



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

Institutional Repository - Research Portal Dépôt Institutionnel - Portail de la Recherche

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Contribution à l'étude de la mitobiogenèse dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial

Gilquin, Cindy

Award date:
2003

[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.

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine Diphosphate
AIF	Apoptosis Initiating Factor
ANT	Adénine Nucléotide Translocase
AP endonucléase	Apurinic/apyrimidinic endonuclease
APAF	Apoptotic Protease-Activating Factor
ARN r	Acide ribonucléique Ribosomal
ARN t	Acide ribonucléique de transfert
ATP	Adénosine Triphosphate
BER	Base Excision Repair
BSA	Bovine Serum Albumine
CaM	Calmodulin
CaMK	Calmodulin dependent Kinase
CAT	Chloramphenicol Acetyltransferase
CBP	CREB Binding Protein
COX	Cytochrome Oxydase
CPT	Carnitine Palmitoyl Transférase
CREB	c-AMP Responsive Element-Binding
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DHG	Dulbecco's modified Eagle's medium High Glucose
DTT	Dithiotréitol
m	Potentiel de membrane mitochondriale
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetate
FADH2	Flavine Adénine Dinucléotide réduit
FBS	Fœtal Bovine Serum
FCCP	Carbonyl cyanide p-trifluoro-methoxyphenylhydrazone
FMN	Flavine Mononucléotide
GABP	GA-Binding Protein
GIP	General Insertion Pore
GTP	Guanosine Triphosphate
HB	Hypotonic Buffer
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HDAC	Histone Deacetylases
HMG	High Mobility Group
HRP	Horse Radish Peroxydase
HS	Heavy Strand
HSL	Hormone Sensitive Lipase
HSP	Heavy Strand Promoter
Hsp	Heat shock protein

HtrA2	High temperature-requiring proteins
IAPs	Inhibitors of Apoptotic Proteins
IP3	Inositol 1,4,5 -triphosphate
KID	Kinase-inducing domain
LHON	Leber's Hereditary Optic Neuropathy
LS	Light Strand
LSP	Light Strand Promoter
MEF2C	Myocyte Enhancer Factor 2C
MERRF	Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
MOPS	3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
MPP	Mitochondrial Processing peptidase
MRP	Mitochondrial RNA-Processing
MSF	Mitochondrial Import Stimulation Factor
mtCLIC	Mitochondrial Chloride Intracellular Channel
mtTERF	Mitochondrial Transcription Terminal Factor
mtTFA	Mitochondrial Transcription Factor A
mtHSP	matricielle Heavy Strand Promotor
MTP	Mitochondrial TransitionPore
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Réduit
NAO	Nonyl Acridine Orange
NARP	Neurogenic muscle weakness, Ataxia and Retinis Pigmentosa
NFkB	Nuclear Factor kB
NLS	Nuclear Localisation Site
NRF	Nuclear Respirating Factor
NSF	N-Ethylmaleimide Sensitive Factor
ONPG	O-NitroPhénylGalactopyranoside
OXA	Oxidase assembly
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldéhyde
PGC-1	PPARg coactivator-1
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PK	Protéinase K
PKA	Proteine Kinase A
PNPP	p-Nitrophenyl Phosphate
PPARg	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor g
PPRE	PPARg Responsive Element
PRC	PGC-1-related co-activator
PTP	Permeability Transition Pore
PVDF	Polyvinylidène fluoride

RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
RLU	Relative Light Units
ROS	Reactive Oxygen Species
RRM	RNA Recognition Motif
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SEM	Sucrose-EDTA-MOPS
SI	Sucrose-Imidazol
Smac/DIABLO	Second mitochondrial activator of caspases/Direct Inhibitor of Apoptosis proteins Binding protein with Low pI
SNARE	Soluble NSF Attachment Protein Receptor
Sp1	Specificity protein 1
SRC-1	Steroid Receptor Coactivator 1
SVF	Sérum de veau foetal
TBS	Tris Buffer Saline
TFB1M	Transcription Factor B1 mitochondrial
TFB2M	Transcription Factor B2 mitochondrial
TIM	Translocase Inner Membrane
TMB	Tetra-Methyl Benzine
TMRE	TetraMethylRhodamine Ethylester
TMRH	TetraMethylRhodamine Methylester
TOM	Translocase Outer Membrane
TR	Thyroid hormone Receptor
UCP	Uncoupling Protein
VDAC	Voltage-Dependent Anion Channel
YY1	YingYang1

Table des matières

1. INTRODUCTION GENERALE.....	1
1.1 LA MITOCHONDRIE	4
1.1.1 L'origine de la mitochondrie.....	4
1.1.2 Le génome mitochondrial.....	4
1.1.3 Réplication, transcription et traduction du génome mitochondrial	5
1.1.4 Structures et fonctions des mitochondries.....	6
1.1.4.1 Dynamique mitochondriale	7
1.1.4.2 La membrane mitochondriale externe	8
1.1.4.3 L'espace intermembranaire	8
1.1.4.4 La membrane mitochondriale interne.....	9
1.1.4.5 La matrice.....	10
1.1.4.6 Les zones de contacts entre la MMI et la MME	10
1.1.5 Fonctions mitochondriales.....	11
1.1.5.1 Production d'énergie	11
1.1.5.2 Autres fonctions de la mitochondrie.....	12
1.1.5.2.1 Homéostasie du calcium	12
1.1.5.2.2 Thermogénèse.....	13
1.2 LES PATHOLOGIES MITOCHONDRIALES	14
1.2.1 Homoplasmie et hétéroplasmie	14
1.2.2 Les mutations dans le génome mitochondrial	14
1.2.2.1 Les mutations ponctuelles dans les gènes codant les protéines de la phosphorylation oxydative.....	14
1.2.2.2 Les mutations ponctuelles altérant les ARN de transfert codés par le génome mitochondrial.....	15
1.2.3 Réarrangements du génome mitochondrial.....	15
1.3 LES CELLULES DEPLÉTEES EN ADN MITOCHONDRIAL (ADNMT) OU CELLULES RHO ⁰	15
1.3.1 Obtention des cellules déplétées en ADN mitochondrial	16
1.3.2 Caractéristiques des cellules rho ⁰	16
1.3.2.1 La croissance des cellules rho ⁰	16
1.3.2.2 Potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules rho ⁰	17
1.4 LA MITOBIOGENESE	17
1.4.1 Les acteurs nucléaires.....	18
1.4.1.1 Les facteurs respiratoires nucléaires.....	18
1.4.1.1.1 NRF-1.....	18
1.4.1.1.2 NRF-2 (GABP).....	18
1.4.1.2 Les facteurs de transcription ubiquistes.....	19
1.4.1.2.1 Sp1.....	19
1.4.1.2.2 YY1	20
1.4.1.3 Les facteurs de transcription spécifiques.....	20
1.4.1.3.1 CREB.....	20
1.4.1.3.2 PPAR γ	21
1.4.1.4 Les co-activators.....	21
1.4.1.4.1 PGC-1	21
1.4.1.4.2 PRC	21
1.4.2 Les hormones	22
1.4.2.1 Les glucocorticoïdes.....	22
1.4.2.2 L'hormone thyroïdienne.....	22
1.5 IMPORTATION ET EXPORTATION DES PROTEINES MITOCHONDRIALES.....	22
1.5.1 Les acteurs moléculaires de l'importation des protéines mitochondriales	23
1.5.1.1 Le complexe TOM	23
1.5.1.2 Les complexes TIM.....	24
1.5.2.2.1 Le complexe TIM 23	24
1.5.2.2.2 Le complexe TIM 22.....	24
1.5.2 Les mécanismes d'importation des protéines mitochondriales	25
1.5.2.1 Translocation des protéines vers la matrice	25
1.5.2.1.1 Reconnaissance de la protéine	25
1.5.2.1.2 Passage de la membrane externe.....	25
1.5.2.1.3 Passage de la membrane interne	26
1.5.2.1.4 Maturation de la protéine.....	26
1.5.2.2 Translocation des protéines dans la membrane mitochondriale interne.....	27
1.5.2.2.1 Passage de la membrane externe.....	27
1.5.2.2.2 Insertion en membrane interne.....	27
1.5.3 Le complexe OXA 1.....	27

CONTEXTE DE LA RECHERCHE ET OBJECTIFS DE CE MEMOIRE.....	29
<i>Résumé des recherches ayant servi de base à ce mémoire.....</i>	29
<i>Objectifs de ce mémoire.....</i>	30
CONSTRUCTIONS UTILISEES DANS CE TRAVAIL.....	31
2 MATERIEL ET METHODES.....	33
2.1 CULTURE CELLULAIRE ET SOUS-CULTURES.....	33
2.1.1 <i>Matériel.....</i>	33
2.1.2 <i>Solution.....</i>	33
2.1.3 <i>Sous-cultures.....</i>	34
2.2 DOSAGE DE PROTEINES PAR LA METHODE DE BRADFORD.....	34
2.2.1 <i>Matériel.....</i>	34
2.2.2 <i>Méthode.....</i>	34
2.3 WESTERN BLOT.....	35
2.3.1 <i>Principe.....</i>	35
2.3.2 <i>Solutions et matériels.....</i>	35
2.3.3 <i>Méthode.....</i>	36
2.3.3.1 <i>Préparation de lysats clairs.....</i>	36
2.3.3.2 <i>Préparation des échantillons.....</i>	36
2.3.3.3 <i>Les gels.....</i>	36
2.3.3.4 <i>Transfert des protéines sur une membrane de PVDF.....</i>	36
2.3.3.5 <i>Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation.....</i>	37
2.4 DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LIAISON A L'ADN DES FACTEURS DE TRANSCRIPTION SP1 ET PPAR γ EN PLAQUE MULTIPUITS.....	37
2.4.1 <i>Principe du test.....</i>	37
2.4.2 <i>Préparation des extraits nucléaires.....</i>	38
2.4.2.1 <i>Solutions.....</i>	38
2.4.2.2 <i>Méthode.....</i>	38
2.4.3 <i>Dosage de l'activité de liaison des facteurs de transcription à leur séquence consensus.....</i>	39
2.4.3.1 <i>Solutions/ Matériels.....</i>	39
2.4.3.2 <i>Méthode.....</i>	39
2.4.3.2.1 <i>Fixation du trappeur dans les puits d'une plaque 96 puits tapissés par la streptavidine.....</i>	39
2.4.3.2.2 <i>Liaison du facteur de transcription.....</i>	39
2.4.3.2.3 <i>Reconnaissance du facteur de transcription par l'anticorps primaire.....</i>	40
2.4.3.2.4 <i>Reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire.....</i>	40
2.4.3.2.5 <i>Révélation.....</i>	40
2.5 TRANSFECTION TRANSITOIRE ET GENES RAPPORTEURS.....	40
2.5.1 <i>Principe.....</i>	40
2.5.2 <i>Méthode.....</i>	41
2.5.2.1 <i>Recherche de l'activité des facteurs de transcription YY1, NRF-1, PPARγ et CREB.....</i>	41
2.5.2.2 <i>Dosage de l'activité luciférase.....</i>	41
2.5.2.2.1 <i>Principe.....</i>	41
2.5.2.2.2 <i>Lyse cellulaire.....</i>	42
2.5.2.2.3 <i>Dosage de l'activité luciférase.....</i>	42
2.5.2.2.4 <i>Dosage de l'activité β-galactosidase.....</i>	42
2.5.3 <i>Activité du promoteur authentique du cytochrome c dans les cellules 143B et 143B rho⁰: le gène rapporteur CAT.....</i>	42
2.5.3.1 <i>Principe.....</i>	42
2.5.3.2 <i>Méthode.....</i>	43
2.5.3.2.1 <i>Transfection transitoire des cellules avec le système rapporteur CAT.....</i>	43
2.5.3.2.2 <i>Lysats cellulaires.....</i>	43
2.5.3.2.3 <i>Le dosage de l'activité CAT.....</i>	43
2.6 MARQUAGES EN IMMUNOFLUORESCENCE ET MICROSCOPIE CONFOCALE.....	44
2.6.1 <i>Principe.....</i>	44
2.6.2 <i>Matériel.....</i>	44
2.6.3 <i>Marquage immunocytochimique.....</i>	44
2.6.3.1 <i>Incubation avec l'anticorps primaire.....</i>	45
2.7 QUANTIFICATION DE L'ABONDANCE DES POPULATIONS MITOCHONDRIALES PAR L'UTILISATION DE SONDES MITOCHONDRIALES.....	45
2.7.1 <i>Le Mitotracker Red.....</i>	46
2.7.1.1 <i>Principe.....</i>	46

2.7.1.2	Méthode.....	46
2.7.2	<i>Le NAO</i>	46
2.7.2.1	Principe	46
2.7.2.2	Solutions et Matériel	46
2.7.2.3	Méthode.....	47
2.7.3	<i>La Rhodamine 123</i>	47
2.7.3.1	Principe	47
2.7.3.2	Solution et Matériel	47
2.7.3.3	Méthode.....	47
2.8	PREPARATION DE FRACTIONS ENRICHIES EN MITOCHONDRIES	48
2.8.1	<i>Principe</i>	48
2.8.2	<i>Solutions et matériel</i>	48
2.8.3	<i>Méthode</i>	48
2.9	SYNTHESE IN VITRO DE PROTEINES RECOMBINANTES MARQUEES RADIOACTIVEMENT A LA [³⁵ S]- METHIONINE.....	49
2.9.1	<i>Principe</i>	49
2.9.2	<i>Méthode</i>	49
2.9.2.1	Transcription et traduction de la protéine d'intérêt.....	49
2.9.2.2	Révélation de la transcription-traduction.....	50
2.9.2.2.1	Préparation des échantillons	50
2.9.2.2.2	Séchage du gel.....	50
2.10	MESURE IN VITRO DE L'IMPORTATION DE PROTEINES MITOCHONDRIALES	50
2.10.1	<i>Solutions</i>	51
2.10.2	<i>Méthode</i>	51
2.11	DOSAGE DE L'ATP	52
2.11.1	<i>Principe</i>	52
2.11.2	<i>Méthode</i>	52
2.12	ANALYSES STATISTIQUES	53
3	RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	54
3.1	CARACTERISATION DE L'ABONDANCE DE LA POPULATION MITOCHONDRIALE AU SEIN DES DIFFERENTES LIGNEES CELLULAIRES.....	55
3.2	ETUDE DE DIFFERENTS FACTEURS DE TRANSCRIPTION IMPLIQUES DANS LA MITOBIOGENESE	57
3.2.1	<i>Etude de l'activité de liaison des facteurs de transcription Sp1 et PPARγ à leur séquence consensus</i>	58
3.2.2	<i>Etude de l'activité transcriptionnelle des facteurs YY1, NRF-1, PPARγ et CREB dans les cellules déplétées en ADNmt</i>	59
3.3	MISE AU POINT D'UN TEST D'IMPORTATION DE PROTEINES RECOMBINANTES MARQUEES A LA [³⁵ S]- METHIONINE DANS LES MITOCHONDRIES DE CELLULES DE MAMMIFERES	62
3.3.1	<i>Mise au point du test d'importation des protéines recombinantes dans les mitochondries de cellules L929</i>	63
3.3.2	<i>Comparaison de l'importation de protéines mitochondriales dans des mitochondries purifiées à partir de cellules 143B et 143B rho⁰</i>	65
3.4	MESURE DU POTENTIEL DE MEMBRANE MITOCHONDRIAL DANS LES CELLULES PARENTALES ET DEPLETEES EN ADN MITOCHONDRIAL	65
3.5	DOSAGE DES CONTENUS EN ATP DES CELLULES PARENTALES ET DEPLETEES EN ADN MITOCHONDRIAL 66	
4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	68
5	BIBLIOGRAPHIE	72

1. INTRODUCTION GENERALE

1.1 La mitochondrie

1.1.1 L'origine de la mitochondrie

La mitochondrie ou plus exactement le réseau mitochondrial ou « mitochondriome », tel que nous le connaissons, proviendrait d'une bactérie aérobie et parasite internalisée il y a 1,5 milliards d'années par un ancêtre de la cellule eucaryote. Même si l'espèce bactérienne est encore controversée de nos jours, il semble que la mitochondrie provienne du sous-groupe des α -protéobactères (Gray et al., 1999)(figure 1.1).

Au cours de l'évolution, une partie du génome de l'endosymbiote a progressivement été transférée dans le génome de la cellule hôte, d'autres gènes mitochondriaux redondants ont été délétés. Le génome, plus compact, résultant de ces phénomènes est appelé génome proto-mitochondrial (Gray et al., 1999).

1.1.2 Le génome mitochondrial

Il faut savoir que l'hérédité du génome de la mitochondrie est exclusivement maternelle (Kaneda et al., 1995). Ce n'est que dans certaines situations pathologiques que l'ADN mitochondrial paternel peut échapper aux mécanismes actifs d'élimination. Des études ont montré que l'ubiquitination est un mécanisme participant à l'élimination des mitochondries d'origine paternelle lors de la fertilisation. La destruction des mitochondries paternelles apparaît comme un avantage évolutif. Une première hypothèse pour expliquer l'élimination est que les mitochondries des spermatozoïdes ainsi que l'ADNmt sont compromis par l'action oxydative des espèces réactives de l'oxygène durant la fertilisation. Sutovsky et al. ont montré, durant la spermatogenèse, que des protéines mitochondriales des spermatozoïdes étaient marquées par l'ubiquitine, un marqueur universel de la protéolyse par le protéasome et du recyclage des protéines. Ce « tag » ubiquitine est masqué par des ponts disulfures lors du passage dans l'épididyme. Les motifs ubiquitinés sont démasqués lors de la fertilisation suite à la réduction des ponts disulfures et, lors de la fertilisation, l'ubiquitination augmente la dégradation des protéines mitochondriales paternelles. Au stade quatre cellules du développement préimplantatoire leur dégradation sera complète (Sutovsky et al., 2000).

Chez les mammifères, l'ADN mitochondrial se présente sous la forme d'une petite molécule circulaire bicaténaire de 16,6 kb, dont le nombre varie entre cinq et dix copies par mitochondrie (Gray et al., 1999). Le génome mitochondrial (ADNmt) ne possède pas d'intron et n'est pas organisé par des protéines histones comme le génome nucléaire. La régulation du nombre de copies ainsi que la maintenance de l'ADNmt ne sont pas encore bien comprises. Il semblerait que ce soit la présence de facteurs *trans* impliqués dans la réplication de l'ADNmt qui contrôlent l'abondance de l'ADNmt (Moraes et al., 1999).

Les deux brins de l'ADNmt se distinguent par leur composition en base : le brin lourd (HS pour *heavy strand*) contient plus de guanines et le brin léger (LS pour *light strand*) possède quant à lui, plus de cytosines (figure 1.2). Ce génome mitochondrial chez l'homme et la souris contient 37 gènes codant pour 2 ARNr, 22 ARNt et 13 peptides de la chaîne de transport d'électrons localisés dans la membrane mitochondriale interne (MMI). Naturellement, ces 13 produits géniques ne représentent qu'une infime partie des protéines mitochondriales estimées à 1500 protéines. Les autres gènes codant les protéines mitochondriales sont présents dans le génome nucléaire. Les protéines sont synthétisées dans le cytosol par des ribosomes libres puis importées dans la mitochondrie. Ces mécanismes seront expliqués en détails au point 1.5.

Ajoutons encore que l'ADN mitochondrial est associé à la membrane mitochondriale interne. Des études chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont montré que l'ADNmt était associé à des protéines (Rim1p, Abf2p,...) pour former des nucléoïdes ou avec Mmm1p localisée dans la membrane mitochondriale externe (MME). Cette protéine interagirait avec les filaments d'actine du cytosquelette pour maintenir une conformation allongée de la mitochondrie (Hobbs et al., 2001). La perte de fonction de cette protéine provoque également la perte de la structure du nucléoïde suggérant une interaction. D'autres protéines comme Mdm10p et Mdm12p résidant en membrane mitochondriale externe, ont également été décrites comme participant à la ségrégation des mitochondries et au maintien de la stabilité de l'ADNmt (Hobbs et al., 2001).

Contrairement à ce que l'on a longtemps passé la mitochondrie possède également un système de réparation de l'ADN appelé BER (Base Excision Repair). Il est initié par une DNA glycosylase qui clive le lien glycosydique entre la base endommagée et le sucre. L'activité de cette enzyme est suivie par l'action d'une lyase, qui coupe le lien phosphodiester situé en 3'. Une AP endonucléase clive ensuite le lien phosphodiester en 5' et provoque la formation d'un « trou ». L'ADN polymérase γ vient par la suite rajouter une nouvelle base (figure 1.3) (Mandavilli et al., 2002). Enfin, le code génétique mitochondrial est différent du code "universel". Par exemple le codon stop « UGA » du code universel code pour un résidu tryptophane dans les mitochondries humaines et de levures. D'autres exemples de ces différences sont présentés à la figure 1.4.

1.1.3 Réplication, transcription et traduction du génome mitochondrial

La transcription des deux brins de l'ADN mitochondrial se réalise de manière asymétrique à partir d'un promoteur unique porté par chacun des brins : LSP (*Light Strand Promoter*) et HSP (*Heavy Strand Promoter*) situés tous deux dans la boucle D (*Displacement loop*).

La transcription du génome mitochondrial est essentiellement régulée par le facteur mTFA (mitochondrial Transcription Factor A) (Choi et al., 2001). Ce facteur de transcription mitochondrial est une protéine de 27 kDa qui appartient à la famille des protéines HMG (High Mobility Group proteins) et augmente l'activité de la mtRNA polymérase. C'est la concentration de ce facteur qui régule la transcription de manière biphasique: à faible concentration, le mtTFA active le LSP tandis qu'à forte concentration, c'est le HSP qui est activé. Le modèle proposé est que le mtTFA interagirait avec l'ADN au niveau du site

d'activation de la transcription. Ceci entraînerait une modification conformationnelle de la région du promoteur permettant la fixation de la mtRNA polymérase (Shadel and Clayton, 1997). Ces deux promoteurs permettent une transcription bidirectionnelle, inverse et indépendante des deux brins du génome mitochondrial (figure 1.2).

Le mtTFA a longtemps été considéré comme le seul facteur de transcription mitochondrial. Cependant, deux autres facteurs d'initiation de la transcription ont récemment été découverts : TFB1M (McCulloch et al., 2002) et TFB2M (Falkenberg et al., 2002). Ces protéines furent appelées de cette manière en raison de leur forte homologie avec les RNA méthyltransférases. Ces deux facteurs semblent interagir directement avec la mtRNA polymérase.

Le mtTERF (mitochondrial transcription termination factor) est un troisième facteur qui intervient, quant à lui, dans la terminaison de la transcription, (Daga et al., 1993; Fernandez-Silva et al., 1997). C'est une protéine de 34 kDa qui possède trois motifs « leucine zipper » mais se lie de manière monomérique à l'ADN mitochondrial (Shang and Clayton, 1994).

Comme le génome mitochondrial ne possède pas d'intron, le produit de la transcription est un ARNm polycistronique qui est clivé et mûri ultérieurement par des RNAses spécifiques.

La machinerie traductionnelle de la mitochondrie est constituée de mitoribosomes, de petits ARNt et d'ARNm non coiffés. Cet ensemble permet la synthèse de 13 sous-unités des complexes I, III, IV et V intervenant dans la chaîne de transporteurs d'électrons et la phosphorylation oxydative. La synthèse protéique mitochondriale est spécifiquement inhibable par le chloramphénicol.

Chaque brin de l'ADN mitochondrial possède, en plus de son promoteur propre, une origine de réplication. La réplication des deux brins se fait en sens inverse avec un léger décalage dans le temps. La réplication commence par la transcription du brin léger, qui sera clivé par la RNase MRP (mitochondrial RNA-processing endonucléase) pour générer un transcrit qui servira de « primer » ou amorce à l'ADN polymérase gamma mitochondriale.

Cette ADN polymérase est composée de deux sous-unités : la grande sous-unité α catalytique (125-140kDa) (Graves et al., 1998; Gray and Wong, 1992) et la petite β (30-54 kDa) impliquée dans la reconnaissance de l'amorce (Carrodeguas et al., 1999; Fan et al., 1999; Lim et al., 1999). Elle possède également une activité exonucléase 3'-5', catalysée par la sous-unité α (Longley et al., 2001).

1.1.4 Structures et fonctions des mitochondries

La taille et le nombre de mitochondries varient en fonction du type cellulaire mais également en fonction de son état d'activité. Ces modifications sont particulièrement observées au cours de la prolifération et de la différenciation cellulaire. L'exercice et la contraction musculaire s'accompagnent également de changements dans la structure mitochondriale. La variété des structures des mitochondries ainsi que ses mouvements sont déterminés par des interactions entre des protéines de la membrane mitochondriale externe et le cytosquelette (Rapaport et al., 1998). La visualisation de la mitochondrie sous la forme de

« réseau mitochondrial » a été rendue possible par l'utilisation de techniques telles que la microscopie confocale et le marquage à l'aide d'anticorps conjugués à des fluorochromes (figure 1.5) (Yaffe, 1999).

En effet, la mitochondrie subit des modifications structurales au cours de la vie cellulaire, c'est ce que l'on appelle la « dynamique structurale mitochondriale » qui permet de réguler le nombre de mitochondries dans une cellule à un moment donné. L'un de ces aspects est la fusion mitochondriale. Cette fusion, contrairement aux autres organites, comme le Golgi, le RER, ne fait pas intervenir les facteurs tels que le NSF (N-éthylmaléimide sensitive factor), les SNARE (Soluble NSF Attachment Protein Receptors) ou les rab-GTPases (Hermann and Shaw, 1998). Ces événements, qui sont les mieux étudiés chez la levure, sont régulés par des GTPases situées au niveau de la membrane mitochondriale externe (Shaw and Nunnari, 2002).

1.1.4.1 Dynamique mitochondriale

Plusieurs protéines interviennent dans les mécanismes de fusion-fission. Citons respectivement : Dnm1p, Fzo1p et Mgm1p chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ou les protéines orthologues : Drp1, la mitofusine et Opa1 dans les cellules de mammifères (Shaw and Nunnari, 2002).

Les structures des différentes protéines de la levure sont présentées à la figure 1.6. La protéine Fzo1 localisée dans la membrane mitochondriale externe possède un domaine GTPasique à son extrémité NH₂-terminale et deux domaines transmembranaires à l'extrémité COOH-terminale. Les protéines Dnm1p et Mgm1p ont une structure semblable à celle de la GTPase dynamine. Elles possèdent un domaine NH₂-terminal GTPasique, un domaine dit « middle » d'environ 150 acides aminés, une séquence divergente appelée « insert B » et un domaine COOH-terminal formant une hélice α (AH) ou domaine effecteur GTPase (GED).

Des études faites chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* montrent que dans des mutants *fzo1p*, le processus de fusion des mitochondries est bloqué mais que la fission reste possible. Par contre, dans des mutants *dnm1p*, la fission est abolie mais la fusion des mitochondries est maintenue. Dans des mutants *mgm1p*, les mitochondries se fragmentent et perdent leur ADNmt. Ce processus résulte soit d'un blocage de la fusion soit d'une fission dépendante de Dnm1p (Shaw and Nunnari, 2002).

Un modèle moléculaire de la division mitochondriale ou fusion chez la levure est présenté à la figure 1.7. La division est initiée par le recrutement de la protéine Dnm1p-GTP au niveau de la mitochondrie, où la protéine Fis1p régule l'assemblage de la structure du complexe à la surface de la membrane mitochondriale externe. La protéine Mdv1p s'associe à la protéine Dnm1p-GTP pendant ou après l'assemblage de la structure. Ensuite, le changement de conformation dans ce complexe permet une interaction entre les protéines Fis1p et Mdv1p, ce qui initie la constriction de la membrane externe. Après la constriction de la membrane, la protéine Dnm1p hydrolyse le GTP entraînant le désassemblage du complexe Dnm1p-Mdv1p-Fis1p et la fission de la membrane.

Il s'avère que le cytosquelette n'est pas la seule structure avec laquelle la mitochondrie interagit. Plusieurs études ont montré l'existence de relations morphologiques privilégiées entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Rizzuto et al., 1998).

De nos jours, il apparaît donc de plus en plus clairement que la mitochondrie ne peut plus être considérée comme un organite isolé.

1.1.4.2 La membrane mitochondriale externe

C'est une membrane composée de 40 % de lipides (cholestérol, phosphatidylcholine, phosphatidyléthanolamine et phosphatidylinositol) et de 60 % de protéines. Elle possède une grande perméabilité aux ions et aux petites molécules, due à la présence de porines ou VDAC (voltage-dependent anion channel). L'ouverture des porines est fonction du potentiel de membrane et répond à divers stimuli. Ces porines présentent une perméabilité préférentielle pour les anions et assurent le trafic de nombreux solutés hydrophiles de masse moléculaire pouvant atteindre 10 kDa (Mannella, 1998). Cette membrane possède d'autres types de protéines plus spécifiques telles que l'acétyl-CoA synthétase et la carnitine palmitoyl-transférase 1 (CPT-1) nécessaires pour la synthèse et le transport des formes importables des acides gras. Elle possède également les composants du complexe TOM nécessaire à la translocation des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire (voir point 1.5) (Pfanner and Wiedemann, 2002).

1.1.4.3 L'espace intermembranaire

L'espace intermembranaire joue un rôle important dans la production d'énergie. Les complexes I, III et IV de la chaîne de transporteurs d'électrons expulsent des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce transfert entraîne à la fois la production d'un potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$) et un gradient de pH (ΔpH) de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. La résultante de ces deux forces est nommée « force électro motrice » et s'exprime en mV. Elle varie de 150 à 180 mV dans des mitochondries couplées (Ganitzkevich, 2003). Le retour des protons dans la matrice suivant le gradient de concentration, permet de générer de l'ATP via la Fo-F1 ATP synthase.

C'est sur l'existence d'un potentiel de membrane que se base l'utilisation de sondes spécifiques telle que la rhodamine 123 (R123) et le TMRE (Tetramethylrhodamine methylester) et TMRH (Tetramethylrhodamine ethylester) qui s'accumulent dans les mitochondries proportionnellement au $\Delta\psi_m$. La R123 est un cation lipophile utilisé dans de nombreuses applications (Scaduto and Grotyohann, 1999). Cependant, la rhodamine et ses dérivés (TMRE, TMRH) ne sont pas adaptés aux traitements de fixation des cellules et ne permettent donc pas la visualisation de leur accumulation en microscopie confocale. Pour cela, d'autres types de sondes seront utilisées. Les sondes de type MitoTracker tel que le MitoTracker Red, qui réagit avec les groupements thiols (-SH) des protéines est également décrite pour être retenue plus spécifiquement dans la mitochondrie en fonction du potentiel de membrane (Buckman et al., 2001). Elle a l'avantage de permettre la fixation des cellules et l'observation au microscope à fluorescence.

On trouve également dans l'espace intermembranaire, des protéines impliquées dans l'apoptose. Parmi les protéines pro-apoptotiques délocalisables à partir de l'espace intermembranaire, citons le cytochrome c (Liu et al., 1996), la caspase-9 (Susin et al., 1999), Smac/DIABLO (second mitochondrial activator of caspases/direct inhibitor of apoptosis proteins binding protein with low pI) (Verhagen et al., 2000), AIF (Apoptosis-inducing factor) (Zamzami and Kroemer, 2001), HtrA2 (high temperature-requiring proteins) (Suzuki et al., 2001) et l'endonucléase G (Li et al., 2001).

Lors d'une stimulation pro-apoptotique dépendante de la mitochondrie par le $TNF\alpha$, l'augmentation de la perméabilité de la membrane externe provoque la libération du cytochrome c dans le cytosol (Liu et al., 1996). Le cytochrome c cytosolique initie alors la formation d'un complexe multiprotéique composé d'APAF-1 (apoptotic protease-activating factor), d'ATP et de la caspase-9 (Liu et al., 1996; Zou et al., 1997). Ce complexe porte le nom d'apoptosome. La maturation autocatalytique de la caspase-9 permet le clivage de la caspase-3, ce qui entraîne la phase d'exécution de l'apoptose.

L'activité des caspases en conditions normales est inhibée par des IAPs (inhibitors of apoptosis) (Crook et al., 1993). Quand la cellule perçoit des stimuli apoptotiques, Smac/DIABLO est libéré de l'espace intermembranaire et se lie aux IAPs. Cette liaison permet la libération des caspases actives et favorise l'apoptose.

HtrA₂/Omi est une sérine protéase résidant dans l'espace intermembranaire comme le cytochrome c et Smac/DIABLO. Lors de l'apoptose, elle est libérée et interagit et dégrade les IAPs, favorisant l'activation des caspases (Suzuki et al., 2001).

La mitochondrie libère également les AIFs et des endonucléases G qui agissent directement au niveau du noyau en induisant le clivage de l'ADN. La libération des AIFs dans le cytosol est initiée par le clivage de la partie N-terminale de ces protéines qui, en réalité, est une séquence d'adressage mitochondriale. Leur translocation vers le noyau est médiée par le segment COOH-terminal qui possède deux éléments de localisation nucléaire, NLS (Nuclear Localisation Site) (Susin et al., 1999).

Les mécanismes permettant la libération des facteurs pro-apoptotiques, sont encore mal connus. Cependant, de nombreuses études ont montré l'implication du PTP (permeability transition pore). L'activation de ce canal conduirait à une augmentation de la perméabilité de la membrane externe pour les protéines et finalement à celle de la membrane interne pour des ions de poids moléculaire élevé (Zamzami and Kroemer, 2001). Plusieurs études suggèrent que, lors de l'induction de l'apoptose, des protéines pro-apoptotiques de la famille des Bcl-2 (telle que BAX) interagiraient avec les composants du PTP (en particulier VDAC et ANT : Adenine Nucleotide Translocase) pour former un large pore et ainsi permettre la sortie du cytochrome c et des autres protéines pro-apoptotiques (Narita et al., 1998) (Shimizu et al., 1999) (Marzo et al., 1998; Shimizu et al., 2000). L'apoptose n'étant pas le sujet de ce travail, nous ne parlerons pas davantage de ce processus très important impliquant souvent les mitochondries.

1.1.4.4 La membrane mitochondriale interne

La MMI est, quant à elle, imperméable à la plupart des ions et aux métabolites. Elle contient 80 % de protéines, 20 % de lipides et se distingue par sa composition riche en cardiolipine et pauvre en cholestérol. Cette composition particulière contribue à la rendre plus rigide. Le rôle physiologique est probablement d'assurer la stabilité des assemblages macromoléculaires tels que les complexes de la chaîne respiratoire. Cette particularité est également utilisée pour marquer expérimentalement la mitochondrie à l'aide de sondes fluorescentes. En effet, le NAO (Nonyl Acridine Orange), par exemple, se lie à la cardiolipine et permet ainsi une quantification de l'abondance de la population mitochondriale (Mileykovskaya et al., 2001).

La membrane interne possède également un système très sélectif pour assurer le transport transmembranaire de molécules oxydables (pyruvate et acides gras), des équivalents réducteurs comme le NADH et des ions (comme le calcium). Cette perméabilité sélective aux ions est nécessaire pour le maintien d'un potentiel de membrane.

On retrouve également une série de protéines impliquées dans la chaîne de transporteurs d'électrons et dans la phosphorylation oxydative de l'ADP en ATP par la F₀-F₁ ATP synthase.

L'échange d'ATP mitochondrial contre l'ADP de l'espace intermembranaire est assuré au niveau de cette membrane par les isoformes 1 et 3 de l'antiport ANT (Fiore et al., 1998).

La membrane mitochondriale interne possède également les complexes d'importation TIM 23 et TIM 22 et le complexe d'exportation OXA 1 dont nous reparlerons au point 1.5.3 (Hoogenraad et al., 2002).

1.1.4.5 La matrice

La matrice mitochondriale est homogène et possède une densité analogue à celle du cytoplasme. Les granules contenus dans la matrice représentent des formes de stockages des ions calcium et magnésium. Elle renferme des mitoribosomes plus petits que leurs homologues cytoplasmiques. Ces mitoribosomes sont associés à la membrane interne et sont regroupés en mitopolysomes. Elle renferme également plusieurs copies de l'ADN mitochondrial. De plus, la matrice est le siège de nombreuses réactions métaboliques comme le cycle de Kreb et la β -oxydation des acides gras (Schechter and Rossignol, 1997).

1.1.4.6 Les zones de contacts entre la MMI et la MME

Les deux membranes mitochondriales présentent des zones de contact pour former des pores de translocation constitués par des protéines appartenant aux deux membranes.

Au niveau de ces zones de contact intermembranaire, on observe la formation de mégacanaux ou PTP (Permeability Transition Pores ou MTP). Leur structure n'est pas entièrement élucidée. Ils rassembleraient VDAC et le récepteur périphérique des benzodiazépines pour la membrane externe, la cyclophiline D et l'ANT de la membrane interne (Brdiczka et al., 1998). L'ouverture de ce PTP est régulable et déclenchée, entre autres, par une diminution du contenu en ATP, par une production accrue de radicaux libres (Raha and Robinson, 2001) ou encore par une dérégulation de l'homéostasie calcique (Ermak and Davies, 2002). La perméabilité de la MMI est donc également modifiée. Cette transition s'accompagne du relargage de nombreuses molécules séquestrées dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie tels que le cytochrome c et l'AIF impliqués dans l'apoptose.

1.1.5 Fonctions mitochondriales

1.1.5.1 Production d'énergie

Pour produire de l'énergie par voie aérobie, la cellule peut oxyder différents substrats tels que le glucose, les acides gras ou encore certains acides aminés. Leur oxydation permettra de régénérer des équivalents réducteurs (comme le NADH et le FADH₂) qui fourniront des électrons à la chaîne de transporteurs d'électrons respectivement au niveau des complexes I et II.

Du NADH est formé lors de la glycolyse et est ensuite importé dans la matrice mitochondriale (Saraste, 1999). Le NADH et le FADH₂ peuvent également être générés à partir de l'oxydation de l'acétyl-CoA en CO₂ produit au cours du cycle de Krebs. Ces réactions entraînent la production de trois molécules de NADH et d'une molécule de FADH₂. Le transfert des électrons à partir du NADH jusqu'à l'oxygène se déroule en plusieurs étapes. En effet, la chaîne de transporteurs est constituée de couples rédox dont le potentiel rédox est croissant (figure 1.8). Chaque transporteur est réduit par les électrons cédés par celui qui le précède. Il est par la suite oxydé en cédant les électrons au transporteur suivant. Le dernier accepteur de cette chaîne est l'oxygène qui sera ensuite réduit en eau. L'énergie libérée au cours de ce transfert est stockée sous la forme d'un gradient électrochimique de protons. Ceux-ci sont expulsés au niveau des complexes I, III et IV de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le retour des protons vers la matrice est assuré par la F₀-F₁ ATP synthase permettant la formation d'ATP. L'ATP est ensuite échangé par l'ANT contre de l'ADP cytosolique et cette énergie pourra être utilisée par la cellule.

Le complexe I (NADH/Ubiquinone réductase) réunit plus de 41 sous-unités dont 7 codées par le génome mitochondrial. Il catalyse le transfert des électrons du NADH matriciel à l'ubiquinone. A l'intérieur du complexe I, les électrons passent d'un couple rédox à l'autre (7 couples rédox au total) et ce phénomène s'accompagne d'un transfert de deux protons dans l'espace intermembranaire. Le complexe I est la cible d'inhibiteurs tels que la roténone et l'amital.

Le complexe II (succinate-ubiquinone réductase) capture deux électrons au succinate et les cède à l'ubiquinone. Il contient huit chaînes associées au FAD, un hème de type b et quatre centres Fe/S. Le transfert à travers ce complexe ne s'accompagne pas de transfert de proton. Ce complexe peut être inhibé par le malonate.

L'ubiquinone est une « navette » qui se déplace dans la membrane interne jusqu'au complexe III (Ubiquinone/cytochrome c réductase). A ce niveau elle est oxydée et les deux électrons fournis par cette oxydation permettent de réduire deux molécules de cytochrome c (Fe³⁺) en cytochrome c (Fe²⁺). Cette étape d'oxydoréduction permet le passage de quatre protons de la matrice dans l'espace intermembranaire. Ce complexe peut être inhibé par l'antimycine A.

Le cytochrome c réduit diffuse vers le complexe IV (cytochrome c oxydase) qui catalyse le transfert des électrons du cytochrome c vers l'oxygène moléculaire. Le trajet des électrons dans le complexe IV est inhibé par le cyanure. Trois ou quatre protons sont transférés dans l'espace intermembranaire.

L'énergie libérée par le flux des électrons va permettre de générer un gradient de concentration en protons. Ce phénomène génère donc un potentiel électrochimique et une différence de potentiel ($\Delta\psi_m$).

La F_0 - F_1 ATP synthase va transformer l'énergie stockée sous forme du potentiel électrochimique en énergie chimique. Cet assemblage multi-moléculaire est constitué de deux sous-unités : un domaine membranaire F_0 (o pour sensibilité à l'oligomycine) soluble dans les détergents, qui joue le rôle de canal à protons et un domaine matriciel hydrophile F_1 qui constitue la partie catalytique. Les protons empruntant la partie F_0 entraînent la rotation de la partie F_1 . Le passage des protons provoque une modification de la conformation de la partie F_1 , altère l'affinité de la protéine pour l'ADP et le phosphate inorganique (P_i) et entraîne la formation puis la libération de l'ATP. La figure 1.9 représente la structure de la F_0 - F_1 ATP synthase.

1.1.5.2 Autres fonctions de la mitochondrie

Les mitochondries participent à de nombreuses autres fonctions telles que la β -oxydation des acides gras, la thermogénèse adaptative, l'homéostasie du calcium... Chacune pourrait faire l'objet d'une introduction complète. Nous avons donc décidé de ne parler que de l'homéostasie du calcium et de la thermogénèse. Ce choix est motivé par le fait que la concentration en Ca^{2+} est plus importante dans les cellules déplétées en ADNmt (Arnould et al., 2002) (Biswas et al., 1999) et que la thermogénèse, quant à elle, nécessite l'activation de facteurs de transcription impliqués dans la mitobiogénèse.

1.1.5.2.1 Homéostasie du calcium

L'ion calcium est un messager secondaire important dans la cellule. Il régule des mécanismes comme la sécrétion, la contraction musculaire et la prolifération cellulaire. Le calcium peut se lier à la calmoduline (CaM) et de cette manière moduler l'activité de certaines kinases telles que les kinases dépendantes de la calmoduline (CaMK), de phosphatases et de déshydrogénases. La CaMK peuvent phosphoryler des facteurs de transcription tel que CREB et également induire l'expression de PGC-1, un co-activateur important pour la mitobiogénèse dont l'expression est modulée par l'activité du facteur CREB (voir point 1.4.1.4.1) (Wu et al., 2002).

La concentration en Ca^{2+} cytosolique libre pour une cellule au repos ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) est de l'ordre de 100 nM. Suite à un stimulus qui entraîne l'ouverture de canaux ioniques intracellulaire, sa concentration augmente et peut atteindre plusieurs μ M. Dans les cellules non excitables, l'ouverture des canaux calciques est, par exemple, régulée par un messager intracellulaire : l'inositol 1,4,5,-tri-phosphate (IP_3) provenant de l'hydrolyse de dérivés du phosphatidylinositol de la membrane plasmique par les phospholipases C. L' IP_3 , en se fixant sur son récepteur situé au niveau du réticulum endoplasmique, ouvre un canal et permet la libération de calcium dans le cytosol. La libération de l'ion se réalise sous forme de vagues ou d'oscillations très ordonnées.

Le calcium peut entrer dans la mitochondrie par un uniport de faible affinité, saturable (10-20 μ M) et situé au niveau de la MMI (Figure 1.10). L'uniport est activé par une concentration physiologique de spermine et de taurine (Bernardi, 1999) et peut être inhibé par du ruthénium rouge (Carafoli, 2003). L'entrée de calcium est dépendante du potentiel de membrane mitochondriale et l'ouverture de l'uniport est également régulée par la

concentration locale en calcium cytosolique (Ganitkevich, 2003). Seule une faible proportion du calcium reste libre dans la matrice. Les ions Ca^{2+} sont essentiellement liés aux phospholipides de la membrane interne ou forment des précipités avec les phosphates (Horikawa et al., 1998; Pivovarova et al., 1999; Thayer et al., 2002). La mitochondrie peut ensuite libérer lentement du calcium dans le cytosol et ainsi jouer un rôle tampon pour la concentration en calcium. La libération du calcium par la mitochondrie se fait par deux mécanismes impliquant des antiports : l'un dépendant du sodium et l'autre de protons (Peiffer et al., 2001). L'efflux mitochondrial du calcium est électrogéniquement neutre et se fait via un antiport qui échange deux ions Na^+ contre un ion Ca^{2+} (Peiffer et al., 2001). Notons que dans les cellules déplétées en ADNmt, la concentration cytosolique en calcium est constitutivement augmentée comme le montrent les études réalisées sur des myoblastes C2C12 (Biswas et al., 1999) et des cellules de fibrosarcomes murins (Arnould et al., 2002).

1.1.5.2 Thermogenèse

La thermogenèse adaptative se définit par la capacité à produire de la chaleur en réponse à des variations de température et des changements de régime alimentaire. Elle sert à protéger l'organisme contre une exposition au froid et à réguler la balance énergétique lors d'un régime (Lowell and Spiegelman, 2000).

La première molécule décrite connue pour être impliquée dans la régulation de la thermogenèse induite par le froid dans les tissus adipocytaires bruns est l'UCP-1 (Uncoupling Protein-1). C'est une protéine intégrale de la membrane mitochondriale interne qui assure un passage de H^+ vers la matrice et découple donc l'entrée de protons dans la matrice et la synthèse d'ATP par la $\text{F}_0\text{-F}_1$ ATPsynthase. Il a été montré que des souris « knock out » pour le gène codant UCP-1 exposées au froid présentent une diminution de leur température corporelle.

Deux homologues de la protéine UCP-1 ont ensuite été identifiés, UCP-2 et UCP-3. La protéine UCP-2 est exprimée dans la plupart des tissus mais avec des taux d'expression variables. La protéine UCP-3 est surtout exprimée dans les muscles squelettiques et les tissus adipocytaires bruns. Plusieurs études ont montré que les UCPs 2 et 3 sont également capables de transporter des protons (Enerback et al., 1997) (Fleury et al., 1997).

L'aspect de la régulation de l'expression des UCPs est intéressant car il met en jeu des facteurs de transcription qui jouent également un rôle dans la mitobiogenèse. En effet, le promoteur du gène UCP-1 possède un élément « enhancer » de 220 pb situé 2,4 kb en amont du gène codant UCP-1 (Kozak et al., 1994). Cet « enhancer » possède des sites reconnus par $\text{PPAR}\gamma$ (Peroxisome Proliferator Activating Receptor- γ), par des récepteurs à l'hormone thyroïdienne et le récepteur de l'acide rétinoïque. Il a été montré que la liaison de $\text{PPAR}\gamma$ était essentielle pour la transcription du gène codant UCP-1. Il a également été montré que PGC-1 ($\text{PPAR}\gamma$ co-activator-1) est fortement exprimé dans le cœur, le foie, le cerveau, le tissu adipocytaire brun et le muscle squelettique et agit comme un co-activateur de $\text{PPAR}\gamma$.

Les agonistes des récepteurs β -adrénergique (β -AR) stimulent la production d'AMPc, lequel active des kinases comme la protéine kinase A (PKA). La PKA phosphoryle CREB et l'active et l'activation de CREB induit l'expression de PGC-1. Le co-activateur PGC-1 et le facteur de transcription s'assemblent et induisent alors l'expression de l'UCP-1. PGC-1 peut également agir comme un co-activateur du facteur de transcription NRF-1 et induire sa surexpression. Ce dernier augmente l'expression de nombreux gènes impliqués dans la mitobiogenèse (Lowell and Spiegelman, 2000).

1.2 Les pathologies mitochondriales

L'ADN mitochondrial est plus sensible aux mutations que l'ADN nucléaire. Cela peut s'expliquer, chez la souris et l'homme, par le fait que l'ADN mitochondrial ne possède pas d'intron, pas de séquence non codante intergénique et n'est pas structuré par les histones. De plus, l'ADNmt est localisé à proximité de sites de production de ROS (Reactive Oxygen Species) et les systèmes de réparation, bien qu'existant, sont moins efficaces.

1.2.1 Homoplasmie et hétéroplasmie

Nous savons que la mitochondrie possède plusieurs copies d'ADN circulaire (point 1.1.2). Lorsqu'une mutation dans une des copies apparaît, on observe un mélange d'ADN sauvage et muté. Cet état est appelé hétéroplasmie. Au fil des générations, ces copies sauvages et mutées peuvent se répartir inégalement par un phénomène de ségrégation. Un phénotype muté peut apparaître si le nombre de molécules d'ADN mutées atteint un certain pourcentage par rapport aux molécules d'ADN sauvages. C'est la notion de seuil qui est variable en fonction de la mutation et du tissu considéré. De plus, une même mutation peut donner des phénotypes différents. Citons par exemple l'atrophie optique de Leber (LHON, Leber's hereditary optic neuropathy) et la dystonie, qui sont des pathologies causées toutes deux par la mutation d'une G en A dans le gène mitochondrial ND6 qui code pour la sous-unité VI de la NADH déshydrogénase. Cette mutation se traduit par une diminution de l'activité du complexe I (Shoffner et al., 1995). Ce phénomène est appelé recouvrement. A l'inverse, des mutations différentes peuvent conduire à un même phénotype : ceci est appelé convergence.

1.2.2 Les mutations dans le génome mitochondrial

1.2.2.1 Les mutations ponctuelles dans les gènes codant les protéines de la phosphorylation oxydative

De nombreuses pathologies ou syndromes sont associés à ou causés par des mutations ponctuelles de type « missens » dans des gènes codant des protéines entrant dans la composition de la chaîne de transporteurs d'électrons. Reprenons l'exemple de l'atrophie optique de Leber qui est due à la substitution de l'arginine en position 11778 par une histidine (A11778H). Cette substitution touche ainsi la sous-unité 6 de la NADH déshydrogénase (Wallace et al., 1988). Un autre syndrome entraînant une cécité est le NARP (neurogenic muscle weakness, ataxia and retinis pigmentosa) ou syndrome de Leigh (Holt et al., 1990). Dans ce cas, c'est le gène de la sous-unité VI de la F₀-F₁ ATPsynthase qui est touché. La leucine du codon 156 est changée en arginine. Lorsque les ADNmt mutés sont présents en faible proportion (< 75 %) on n'observe pas le NARP. Cependant, si l'hétéroplasmie augmente (> 95 %), on observe le syndrome de Leigh, caractérisé par un désordre neurodégénératif progressif (Nijtmans et al., 2001).

La gravité et la diversité des symptômes dépendent donc du degré d'hétéroplasmie atteint et la mort arrive toujours avant l'homoplasmie.

1.2.2.2 Les mutations ponctuelles altérant les ARN de transfert codés par le génome mitochondrial

Ce type de mutation observé au niveau du génome mitochondrial est le plus fréquent (Schon et al., 1997) et provoque une abération de la traduction des protéines mitochondriales. Dans la plupart des cas, les mutations sont hétéroplasmiques et causent fréquemment des anomalies du système nerveux central. La mutation la plus étudiée est celle conduisant à l'épilepsie myoclonique associée à une altération de fibres rouges dans les muscles (MERRF, Myoclonic Epilepsy Ragged Red Fibers) (Chomyn, 1998) (Wallace et al., 1988). Les symptômes apparaissent lorsque l'hétéroplasmie est de 85 %. On peut observer chez ces patients souffrant d'encéphalomyopathie caractérisée par de l'ataxie et une dégénérescence musculaire, une accumulation subsarcolemmique de mitochondries dans les cellules musculaires. La mutation responsable de ce syndrome se situe en position 8344, dans un gène codant pour un ARN de transfert spécifique de la lysine (Shoffner et al., 1995). Le nombre d'ARN^{lys} va diminuer dans la mitochondrie suite à une augmentation de son instabilité. Cette mutation provoque donc une terminaison prématurée de la traduction protéique mitochondriale. Le taux de synthèse protéique mitochondrial est donc affecté et induit une déficience des complexes I et III (Wallace et al., 1988).

1.2.3 Réarrangements du génome mitochondrial

Outre les mutations ponctuelles, le génome mitochondrial peut subir la délétion d'un fragment important de la séquence codante. Elles surviennent souvent dans la zone exposée lorsque le brin lourd est sous une forme simple brin pendant la réplication du génome mitochondrial.

De nombreuses pathologies sont donc clairement associées à un dysfonctionnement mitochondrial. Cependant, les mécanismes précis par lesquels les dysfonctionnements mitochondriaux mènent à un phénotype pathologique ne sont pas encore complètement élucidés.

Le développement de différents modèles cellulaires a grandement contribué à l'avancement des recherches sur les maladies mitochondriales. Parmi ceux-ci, les cellules déplétées en ADN mitochondrial offrent de nombreuses perspectives. Nous allons maintenant présenter le modèle cellulaire utilisé au laboratoire.

1.3 Les cellules déplétées en ADN mitochondrial (ADNmt) ou cellules rho0

Les types cellulaires que nous utilisons sont issues d'un ostéosarcome humain (143B) et d'un fibrosarcome murin (L929). Pour chacun de ces types cellulaires, nous possédons une lignée déplétée en ADNmt qui est clonale (143B rho0) ou non clonale (L929dADNmt).

1.3.1 Obtention des cellules déplétées en ADN mitochondrial

Ce modèle cellulaire a été développé pour étudier la contribution du génome mitochondrial au phénotype et à l'activité cellulaires de cellules eucaryotes (Morais, 1996). Ces modèles sont également utilisés pour rechercher les messagers et effecteurs moléculaires capables d'activer certaines voies de signalisation générés par un dysfonctionnement mitochondrial.

Les cellules déplétées en ADN mitochondrial sont obtenues par un traitement chronique au bromure d'éthidium, une molécule aromatique qui s'intercale dans l'ADN et l'ARN double brin. Cette molécule est également un inhibiteur potentiel de l'hélicase (Nass, 1970). C'est d'ailleurs par son action sur l'hélicase mitochondriale qu'il entraîne une inhibition de la réplication et de la transcription de l'ADN mitochondrial. L'éthidium bromide n'affecte, à faible concentration, ni l'expression de gènes, ni la synthèse de l'ADN nucléaire (Radsak et al., 1971).

Le génome mitochondrial est donc dilué au cours des passages cellulaires en culture. Après 30 à 50 passages, un traitement à l'aide d'inhibiteurs de la respiration mitochondriale tels que l'antimycine A ou l'oligomycine permet donc de sélectionner les cellules dont la survie, et donc la production d'ATP n'est plus dépendante de l'activité mitochondriale. On peut à partir de cette étape, générer des populations clonales (homogènes) ou non (hétérogènes).

Remarquons qu'en absence de bromure d'éthidium, ce phénomène est réversible dans une population non clonale. Il faut donc poursuivre le traitement au bromure d'éthidium pour conserver la culture cellulaire déplétée en ADNmt (Smith, 1977).

Ces cellules dont les mitochondries sont déplétées en ADNmt ne sont donc plus capables de synthétiser les 13 peptides de la chaîne de transporteurs d'électrons codés par ce génome. Les cellules rho⁰ sont devenues incapables de produire de l'ATP à partir de la phosphorylation oxydative et seule la glycolyse assure la production d'ATP. Une conséquence directe de ce changements est l'accumulation d'acide lactique qui provoque une acidification plus rapide du milieu de culture.

Pour caractériser la déplétion en ADNmt, on utilise plusieurs marqueurs tels que le niveau d'expression de COX I (sous-unité I de la cytochrome oxydase) qui est codée par le génome mitochondrial (Arnould et al., 2002), le contenu en ATP, leur abondance maintenue en ADNmt.

1.3.2 Caractéristiques des cellules rho⁰

1.3.2.1 La croissance des cellules rho⁰

Ces cellules sont auxotrophes pour l'uridine en raison de la déficience en dihydroorotate déshydrogénase. Cette enzyme catalyse la conversion de l'acide dihydroorotique en acide orotique, lequel intervient dans la voie de biosynthèse des bases pyrimidiques (Gregoire et al., 1984). Elle est localisée au niveau du feuillet externe de la

membrane mitochondriale interne et nécessite pour son activité une chaîne de transporteurs d'électrons fonctionnelle (Morais, 1996).

Le taux de croissance de la population de cellules rho⁰ dépend de la concentration en uridine dans le milieu mais également de celle du pyruvate.

1.3.2.2 Potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules rho⁰

Les cellules rho⁰ ne possèdent plus de chaîne de transporteurs d'électrons fonctionnelle et le transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire est donc absent dans ces cellules. Le maintien du potentiel de membrane doit donc être assuré par d'autres mécanismes. L'hypothèse la plus généralement admise est que le complexe F₁ de l'ATP synthase participe avec l'ANT au maintien du $\Delta\psi_m$ (Buchet and Godinot, 1998). La partie F₁ dissociée de la F₀ hydrolyserait l'ATP⁴⁻ en ADP³⁻ et Pi. La sortie de l'ADP³⁻ de la matrice vers l'espace intermembranaire se réalise via l'ANT en échange de l'entrée d'un ATP⁴⁻ cytosolique produit lors de la glycolyse. Cet échange d'ADP³⁻ matriciel par de l'ATP⁴⁻ cytosolique permettrait le maintien d'un potentiel de membrane dans les cellules déplétées en ADNmt. Cette hypothèse repose sur le fait que des inhibiteurs de l'ANT comme l'acide bongkrékique ou de la F₁-ATPase tels que l'azide peuvent diminuer le potentiel de membrane dans les cellules rho⁰ (Appleby et al., 1999).

Une deuxième hypothèse proposée récemment au laboratoire est que le maintien d'un potentiel de membrane dans les cellules rho⁰ pourrait être assuré par le canal mtCLIC (mitochondrial Chloride Intracellular Channel). Le gène codant cette protéine a été identifié comme un gène différentiellement exprimé chez la souris « knock out » pour p53 (Fernandez-Salas et al., 1999). Des résultats obtenus au laboratoire, montrent que CLIC4, l'orthologue humain de mtCLIC, est surexprimé dans les cellules 143B rho⁰. Il a également été montré que ce gène cible surexprimé dans les cellules L929dADNmt est régulé par le calcium et l'activité de p53 modulé par CREB. Ce canal de la membrane mitochondriale interne permettrait le passage d'un Cl⁻ de l'espace intermembranaire dans la matrice. L'entrée de chlore a été révélée en utilisant un test d'importation en présence de ³⁶chlorine (Arnould et al., FASEBj, sous presse) (figure 1.11).

1.4 La mitobiogenèse

La mitobiogenèse est un phénomène encore mal compris et peu étudié. On retrouve deux composantes essentielles : la synthèse et l'assemblage de phospholipides, ainsi que la synthèse, l'importation et l'assemblage de nombreuses protéines. Nous ne nous intéresserons qu'à la deuxième composante. Nous allons donc maintenant passer en revue les facteurs de transcription, connus à ce jour, impliqués dans la régulation de l'expression de gènes codant pour des protéines mitochondriales, et plus particulièrement de sous-unités de la chaîne respiratoire. La mitobiogenèse est actuellement décrite pour dépendre de la coordination étroite entre les génomes mitochondriaux et nucléaires. En effet, sur la centaine de sous-unités que compte la chaîne respiratoire, seules 13 sont codées par le génome mitochondrial.

1.4.1 Les acteurs nucléaires.

Comme dit précédemment, le génome mitochondrial ne code que pour un pourcent des protéines mitochondriales. Les autres gènes codant les protéines mitochondriales sont présents dans le génome nucléaire. Chez les eucaryotes en général et les cellules de mammifères en particulier, la régulation de la transcription de ces gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales suit les mêmes principes de régulation que pour les autres gènes eucaryotes. Ils sont contrôlés à l'étape d'initiation par l'interaction du complexe ARN polymérase II avec le promoteur du gène. L'efficacité de l'assemblage et des processus d'initiation qui déterminent le taux de transcription sont variables et régulés par la liaison de protéines spécifiques à des séquences d'ADN localisées dans le promoteur du gène d'intérêt. On les appelle les facteurs de régulation de la transcription. Ils peuvent soit activer, soit réprimer la transcription des gènes qu'ils régulent.

Nous allons passer rapidement en revue les différents facteurs de transcription connus à ce jour pour jouer un rôle dans la mitobiogenèse.

1.4.1.1 Les facteurs respiratoires nucléaires

1.4.1.1.1 NRF-1

NRF-1 fut le premier facteur identifié par Evans & Scarpulla (1989) comme étant un activateur du promoteur du cytochrome c de rat. Il est impliqué, entre autre, dans la transactivation de plusieurs sous-unités des cinq complexes de la chaîne respiratoire (Scarpulla, 1997). Il joue le rôle d'activateur de transcription pour le gène nucléaire codant le facteur de transcription mitochondrial mtTFA (Virbasius and Scarpulla, 1994) (Choi et al., 2001) et le gène codant l'endonucléase MRP (Mitochondria RNA Processing) impliquée dans la réplication de l'ADNmt (Evans and Scarpulla, 1990). Il jouerait aussi un rôle important dans la coordination de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux. Un tableau présenté à la figure 1.12. reprend les différents gènes contrôlés par les facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2.

NRF-1 se lie à des séquences palindromiques riches en guanines (figure 1.13). Sous sa forme active, il est phosphorylé sur des résidus sérines situés au niveau du domaine NH₂-terminal qui lie l'ADN. NRF-1 se lie à sa séquence consensus comme un homodimère. Si la phosphorylation du domaine NH₂-terminal renforce son activité, la glycosylation de ce facteur lui permet d'agir comme un répresseur.

Le rôle important de NRF-1 dans l'intégrité et la fonction mitochondriales a été confirmé par le « knock out » du gène NRF-1 chez la souris : un embryon NRF-1^{-/-} montre une diminution du taux d'ADNmt et la mortalité survient aux jours 3,5-6,5 (Huo and Scarpulla, 2001). Un animal hétérozygote est quant à lui viable, plus petit et montre une déficience dans l'oxydation du succinate dans le foie (Huo and Scarpulla, 2001).

1.4.1.1.2 NRF-2 (GABP)

L'analyse des promoteurs de la COXIV de rat et de souris, bien que dépourvus de sites pour NRF-1, a permis de découvrir des sites spécifiques permettant la fixation d'un second activateur : NRF-2 (Virbasius and Scarpulla, 1991). NRF-2 est l'homologue humain de la

protéine murine GABP, un activateur de l'expression du gène viral de l'Herpes (Thompson et al., 1991). Les sites de répétition directe reconnus par ce facteur contiennent des motifs GGAA caractéristiques des sites de liaisons pour les facteurs de transcription nucléaires de la famille des facteurs de transcription ETS. Il est composé de cinq sous-unités : une sous-unité α pour la liaison à l'ADN et quatre autres (β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2) qui ne se lient pas à l'ADN mais sont complexés à α (figure 1.13). Des sites de liaisons pour ce facteur sont retrouvés dans les promoteurs plusieurs de sous-unités de COX, de mtTFA (Larsson et al., 1996) et plus récemment dans le promoteur de mtTFB (McCulloch et al., 2002) (voir figure 1.12).

1.4.1.2 Les facteurs de transcription ubiquistes

1.4.1.2.1 Sp1

C'est une protéine à doigts de zinc qui se lie au niveau des promoteurs à des séquences riches en GC (figure 1.14). Sp1 est présent dans de nombreux promoteurs de « housekeeping gene » et de gènes codant des protéines mitochondriales telle que la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD). Des études ont montré que Sp1 est la cible de modifications post-traductionnelles par glycosylation et phosphorylation indiquant que son activité est régulée par de nombreux mécanismes (Jackson et al., 1990). Sp1 peut être phosphorylé par des kinases telles que PKA, CKII, cycline dependent kinase 2 (cdk2),... Une phosphorylation de Sp1 sur une thréonine appartenant au deuxième domaine en doigt de zinc provoque une inhibition de sa liaison à l'ADN et est corrélée à une réduction de l'expression des gènes dépendants de Sp1. Sp1 peut également être glycosylé, ce qui peut altérer son interaction avec les facteurs de la machinerie basale de transcription (Roos et al., 1997) et moduler sa dégradation. Il a été proposé que la régulation de Sp1 par glycosylation ou phosphorylation est finement contrôlée et qu'une diminution de sa glycosylation ou une augmentation de sa phosphorylation conduirait à une activation de sa dégradation (Mortensen et al., 1997).

L'effet de Sp1 sur l'expression de gènes codant des protéines de la chaîne respiratoire fut découvert lors de l'analyse de la région promotrice de cytochrome c (Evans and Scarpulla, 1988). Des sites disposés en tandem dans le premier intron ont un effet marqué sur l'activité du promoteur et Sp1 s'y lie de manière coopérative pour maximiser l'expression du cytochrome c. Des sites fonctionnels de Sp1 ont également été découverts dans le promoteur de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase (Virbasius and Scarpulla, 1991).

La prédiction de l'effet de Sp1 sur le niveau d'expression du gène cible est cependant difficile car ce facteur peut à la fois activer ou réprimer l'expression du gène nucléaire codant une protéine mitochondriale en fonction des sites utilisés dans le promoteur. Par exemple pour l'ANT₂, deux sites Sp1 situés en amont activent l'expression de l'ANT₂ tandis que le troisième, adjacent au codon start, réprime son expression. Un effet de répression de Sp1 est également observé au niveau du promoteur de la sous-unité β de l'ATP synthase (Zaid et al., 1999). Son rôle dans la mitobiogenèse est apparu dans une étude faite par Connor et al. (2001) qui ont montré que dans des myoblastes murins C2C12, l'activité contractile augmentait le taux de Sp1 et provoquait une meilleure activité de liaison de Sp1 à sa séquence consensus. De plus, l'activité contractile dans les cellules de muscles squelettiques induit la transcription du cytochrome c via un mécanisme impliquant Sp1 (Connor et al., 2001).

1.4.1.2.2 YY1

Comme Sp1, il fait partie de la famille des protéines à doigts de zinc. Il est également ubiquiste et peut, comme Sp1, activer ou réprimer l'expression des gènes qu'il régule. Ces effets varient d'une espèce à l'autre et d'un gène à l'autre. En effet, le promoteur de la sous-unité Vb de la cytochrome oxydase murine possède un site de liaison pour le facteur YY1 qui réprime l'expression de ce gène (Wan and Moreadith, 1995). Ceci contraste avec l'effet activateur de YY1 au niveau du promoteur de la sous-unité IIc de la COX bovine (Seelan and Grossman, 1997). YY1 possède quatre motifs à doigts de zinc, et lie à la séquence CGCCATnTT. En fonction de sa concentration, des facteurs avec lesquels il interagit et les séquences bordant sa séquence consensus dans le promoteur, il sera activateur ou répresseur. L'activité transcriptionnelle de ce facteur est de plus régulée par de nombreuses interactions protéine-protéine avec des facteurs de transcription (CREB, Sp1), des histones acétylases (CBP, p300) et des histones déacétylases (HDAC) (Figure 1.15) (Yao et al., 2001). Ces auteurs ont permis de comprendre la régulation de YY-1. L'association de YY-1 avec une histone déacétylase provoque une répression de l'expression du gène par YY-1 et son association avec une histone acétylase entraîne une activation de la transcription des gènes qu'il régule. Leurs résultats ont également montré que YY-1 est acétylé par p300 dans la région centrale et par PCAF également dans la région centrale et dans le domaine COOH-terminal. La région centrale de YY-1 est la cible des histones déacétylases contrairement au domaine COOH-terminal (Yao et al., 2001).

1.4.1.3 Les facteurs de transcription spécifiques

1.4.1.3.1 CREB

CREB (cyclic AMP-responsive element binding protein) est le facteur de transcription le mieux caractérisé de la famille CREB/ATF. Il appartient à la famille des b-zip (basic leucine-zipper) et a une masse moléculaire de 43 kDa. Il est la cible de nombreuses kinases dont la PKA et des membres de la famille des CaMK (calmodulin-dependent kinases) telles que la CaMKII et la CaMKIV (Sheng et al., 1991). L'isoforme IV de la CaMK serait activée par une augmentation du calcium et phosphorylerait CREB sur la sérine 133 pour l'activer. Très récemment, ce facteur de transcription a été impliqué dans la régulation de la biogenèse mitochondriale (Wu et al., 2002). En effet, des sites CRE (TGACGTCA) sont retrouvés dans les promoteurs du cytochrome c (Evans and Scarpulla, 1989), de la MnSOD (Kim et al., 1999) et de PGC-1 (Herzig et al., 2001). CREB régule l'expression de ces gènes cibles via les domaines d'activation Q2 et KID (Kinase-inducible domain). Le domaine KID possède la sérine 133 qui est phosphorylée par les kinases activatrices. Une fois phosphorylé, CREB recrute des co-activateurs comme p300 ou CBP (CREB-binding protein) (Figure 1.16) (Chrivia et al., 1993). Ce domaine ne suffit pas pour activer la transcription des gènes cibles. Un domaine supplémentaire Q2 est nécessaire. C'est un domaine riche en glutamine qui interagit avec TFIID (Ferreri et al., 1994).

Une étude menée au laboratoire sur des cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial a montré une augmentation du taux de phosphorylation de CREB dans ces cellules. Cette augmentation est due à une activation de la CaMK IV (Arnould et al., 2002).

Le rôle potentiel de CREB dans la mitobiogenèse est suspecté depuis longtemps. En effet, des sites de liaison pour ce facteur ont été découverts au niveau du promoteur du cytochrome c. CREB contribuerait donc à l'activation de ce promoteur en aval des voies de

signalisation qui augmente le taux d'AMPC dans la cellule (Gopalakrishnan and Scarpulla, 1994).

1.4.1.3.2 PPAR γ

PPAR γ est un facteur de transcription appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires. Il est exprimé abondamment au niveau de l'intestin, dans les tissus adipocytaires et des glandes mammaire (Dello Russo et al., 2003).

Il forme un hétérodimère avec RXR et se lie à la séquence PPRE (AGGTCAnAGGTCA) située au niveau des promoteurs des gènes cibles. La séquence PPRE consiste en une répétition directe espacée par une ou deux bases. Comme exemple de gènes régulés par PPAR γ citons UCP-1 impliqué dans la thermogénèse adaptative.

La formation de l'hétérodimère PPAR γ /RXR n'explique pas à elle seule l'activation subséquente de la transcription du gène cible. En effet, l'activité transcriptionnelle de PPAR γ est également dépendante de ligands (figure 1.18) (Yeldandi et al., 2000). La liaison d'un ligand provoque un changement de conformation qui permet l'activation de la transcription. Après sa liaison à la séquence PPRE, l'hétérodimère recrute divers co-activateurs comme CBP, SRC-1 (Stéroïde Recepteur -1) et PGC-1 (PPAR γ co-activateur -1).

1.4.1.4 Les co-activators

1.4.1.4.1 PGC-1

PGC-1 est le premier co-activateur impliqué dans la régulation de gènes codant des protéines mitochondriales qui a été découvert dans les tissus adipocytaires bruns. Cette protéine est un régulateur transcriptionnel de l'activité PPAR γ . PGC-1 agirait comme un recruteur. La liaison à l'ADN de PPAR γ provoquerait un changement de conformation de PGC-1, ce qui faciliterait le recrutement des histones acétyltransférases (Puigserver et al., 1999). Il est fortement exprimé dans les tissus possédant un nombre élevé de mitochondries tels que le cœur, le cerveau, le foie et les graisses brunes. En effet, il a été montré que la surexpression de PGC-1 dans les muscles squelettiques provoque la prolifération mitochondriale (Lin et al., 2002). L'expression de PGC-1 est dépendante de NRF-1, de NRF-2 et de CREB (Herzig et al., 2001). Sa structure est présentée à la figure 1.19.

1.4.1.4.2 PRC

PRC (PGC-1-related co-activator) est un troisième co-activateur. Il possède une homologie avec PGC-1 mais on ne le retrouve que dans les muscles squelettiques. Des expériences sur la prolifération des fibroblastes BALB/3T3 ont montré que l'expression de PRC était surrégulée, suggérant son rôle dans la régulation biogénèse mitochondriale au cours du cycle cellulaire (Andersson and Scarpulla, 2001).

Mentionnons également que les glucocorticoïdes et l'hormone thyroïdienne stimulent la mitobiogénèse.

1.4.2 Les hormones

1.4.2.1 Les glucocorticoïdes

Les glucocorticoïdes tels que le cortisol ou la cortisone, régulent la réponse de la demande énergétique. Plusieurs études ont montré deux effets différents des glucocorticoïdes sur la respiration mitochondriale. Un premier, spécifique du tissu musculaire squelettique, est l'activation de gènes codés par le génome nucléaire conduisant à la mitobiogenèse et donc à une stimulation de la respiration (Weber et al., 2002). Le second effet est une réponse rapide des glucocorticoïdes provoquant une augmentation de la respiration mitochondriale sans la biogenèse de l'organite et sans synthèse de protéines *de novo* (Allan et al., 1983).

1.4.2.2 L'hormone thyroïdienne

L'hormone thyroïdienne ou triiodothyronine (T3) joue sur la concentration du calcium intracellulaire et peut donc moduler l'activité de plusieurs kinases et la respiration mitochondriale. Son effet passe également par la régulation de l'expression de gènes suite à sa liaison sur des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs, Thyroid hormone receptors) (Enriquez et al., 1999; Weitzel et al., 2001)

1.5 Importation et exportation des protéines mitochondriales

Le trafic de protéines est un processus vital pour la cellule eucaryote de mammifères qui reprend le transport et l'acheminement de la protéine du site de synthèse à la localisation subcellulaire où elle est fonctionnelle. Comme, déjà mentionné au point 1.1.2, l'ADN mitochondrial des cellules de mammifères ne code que pour 13 peptides de la chaîne respiratoire, le reste des protéines mitochondriales (estimées à environ 1500) étant codées par des gènes nucléaires. Rappelons également que la mitochondrie est divisée en quatre compartiments : deux chambres aqueuses (la matrice et l'espace intermembranaire) et deux membranes (MMI et MME). De multiples voies existent dans la mitochondrie pour assurer l'importation et l'exportation de protéines. Ce sont ces mécanismes que nous allons décrire pour terminer cette introduction.

Les gènes nucléaires codant les protéines mitochondriales sont transcrits dans le noyau puis traduits dans le cytosol par des ribosomes libres. A ce niveau, des chaperonnes cytosoliques telles que les Hsp 70 et 90 (Heat shock protein 70 et 90) mais également des « presequence binding factor » (Murakami and Mori, 1990) et des MSF (mitochondrial import stimulating factor) (Hachiya et al., 1995) interviennent pour accompagner la protéine à la membrane mitochondriale externe. Cette membrane possède un complexe, le complexe TOM (Translocase Outer Membrane), qui forme un canal et permet à la préprotéine d'entrer dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Par la suite, la protéine sera dirigée soit vers la matrice via le complexe TIM 23 (Translocase Inner Membrane 23) soit vers la membrane interne via le complexe TIM 22 (figure 1.19).

Toutes les protéines porteuses d'une préséquence NH₂-terminale sont importées dans la matrice mitochondriale par le complexe de translocation TIM 23. Le transport de la préséquence chargée positivement à travers la MME se fait via un pore aqueux et le potentiel de membrane de part et d'autre de la MMI est utilisé comme force motrice de ce processus. Dans une deuxième étape, l'action dépendante de l'ATP d'une « heat-shock protéine » matricielle (mtHsp70) en association avec des protéines « helper » (Tim44 et Mge1) assurent le mouvement unidirectionnel des protéines précurseurs dans la matrice mitochondriale.

Le transport et l'insertion des protéines dans la MMI sont assurés par le complexe TIM 22 et cet adressage est uniquement fonction du potentiel de membrane. Nous allons maintenant décomposer le phénomène d'importation en décrivant successivement les nombreuses protéines et complexes impliqués, et en expliquant la mécanistique actuelle permettant d'expliquer l'importation des protéines mitochondriales.

1.5.1 Les acteurs moléculaires de l'importation des protéines mitochondriales

1.5.1.1 Le complexe TOM

A ce jour, un seul complexe est connu pour assurer l'entrée et le passage à travers la membrane mitochondriale externe de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire. Ce complexe est composé de trois récepteurs (Tom70, Tom20, Tom22) qui assurent la reconnaissance des séquences signales et d'un cœur constitué de Tom40, Tom7, Tom6 et Tom5 également appelé GIP (General Insertion Pore). Dans la nomenclature des complexes, les chiffres indiquent le poids moléculaire des différentes protéines. Le complexe TOM possède une masse moléculaire allant de 490-600 KDa (Ahting et al., 1999), tandis que le complexe cœur a un poids moléculaire de 400-410 KDa. Les petits Tom (7,6,5) quant à eux, modulent la dynamique et l'assemblage du complexe de translocation. Tom 6 et 7 sont des facteurs d'assemblage du complexe précurseur TOM, Tom5 est un « récepteur-like » capable de lier les protéines précurseurs avec ou sans préséquence. Tom7 est décrit pour avoir une influence déstabilisante sur la machinerie TOM (Honlinger et al., 1996). La stabilisation ou la déstabilisation du complexe TOM est donc un aspect important de la régulation de la machinerie d'importation des protéines mitochondriales (figure 1.20).

Au niveau structural, Tom40 traverse la membrane mitochondriale externe en une série de feuilletts β antiparallèles, ce qui forme un tonneau β ayant plus ou moins 200 nm de diamètre (Hill et al., 1998). Les autres composants, quant à eux, seraient enchassés dans la membrane externe par une simple hélice α formant le domaine transmembranaire.

Notons que tous les composants de la machinerie de translocation mitochondriale sont codés par le noyau. Les protéines composant ces différents complexes doivent donc être importées et assemblées en complexes multiprotéiques au sein des membranes mitochondriales.

1.5.1.2 Les complexes TIM

Ces complexes se situent au niveau de la membrane interne et comprennent : le complexe TIM 23 et le complexe TIM 22.

Le complexe TIM 23 transloque les protéines possédant une préséquence dans la matrice tandis que le complexe TIM 22 assure la ségrégation de préprotéines dirigées vers la membrane interne. Ajoutons encore que la préséquence est non seulement importante pour la reconnaissance par les récepteurs et la translocation au travers de la MME, mais également pour l'initiation de l'import au travers de la MMI.

1.5.2.2.1 Le complexe TIM 23

Il est constitué de Tim 23, de Tim 17, Tim 50 et de Tim 44. Les deux premières protéines intégrales possèdent quatre domaines transmembranaires. Elles formeraient un complexe cœur dont la masse moléculaire est estimée à 100 kDa (Dekker et al., 1993). La molécule Tim 23 est un canal hydrophile traversant la membrane interne dont le pore a un diamètre de 200 nm. Le potentiel de membrane mitochondrial favorise sa dimérisation et son assemblage fonctionnel (Truscott et al., 2003). Il a été montré que le domaine NH₂-terminal de Tim23 lierait la préséquence de la future protéine mitochondriale ce qui permettrait la translocation (Bauer et al., 1996).

Le rôle de la molécule Tim 17 n'est pas clair mais elle pourrait participer à l'assemblage du canal Tim23.

Tim50 est une nouvelle protéine Tim récemment découverte (Geissler et al., 2002) (figure 1.21). C'est une protéine intégrale possédant un large domaine COOH-terminal flottant dans l'espace intermembranaire. Plusieurs approches ont été réalisées pour purifier cette protéine. La première consiste en un « tag » placé sur le domaine NH₂-terminal de Tim 23 qui est surexprimé. Après purification par chromatographie d'affinité, les protéines copurifiées ont été identifiées par spectrométrie de masse. Dans la seconde méthode, une préprotéine est arrêtée en cours d'importation. Un « photocrosslinking » est réalisé et les produits récupérés sont purifiés par affinité via le « tag » de la préprotéine (Truscott et al., 2003). La protéine Tim 50 assure un lien physique entre le complexe TOM et le canal formé par Tim 23. Tim 50 est liée à une partie du domaine NH₂-terminal de Tim 23 et guide ainsi la protéine précurseur directement dans le pore. Elle jouerait également un rôle de chaperonne.

Tim 44, quant à elle, est une protéine hydrophile, associée au feuillet interne de la MMI et peut facilement être extraite en utilisant une solution de force ionique élevée ou à pH alcalin (Schneider et al., 1994).

1.5.2.2.2. Le complexe TIM 22

Il est constitué de Tim 22, de Tim 54 et de Tim 18. Les fonctions de Tim 54 et Tim 18 ne sont pas encore connues. Tim 54 expose un grand domaine dans l'espace intermembranaire qui pourrait jouer le rôle de récepteur. Tim 22, quant à lui, est un homologue de Tim 23 et de Tim 17 (Moro et al., 1999).

1.5.2 Les mécanismes d'importation des protéines mitochondriales

Il faut donc distinguer essentiellement deux classes majeures de protéines mitochondriales : celles qui sont dirigées vers la matrice et celles acheminées dans la membrane mitochondriale interne.

1.5.2.1 Translocation des protéines vers la matrice

1.5.2.1.1 Reconnaissance de la protéine

Une fois la protéine mitochondriale précurseur codée par le génome nucléaire synthétisée, des chaperonnes cytosoliques telles que Hsp70 et Hsp90 s'y lient pour empêcher son agrégation et assurer une conformation qui permet sa reconnaissance par les récepteurs Tom20 et Tom22. La préprotéine possède une extension de séquence NH₂-terminale appelée préséquence qui sera clivée dans la matrice lors de la translocation de la protéine. Cette préséquence est utilisée comme un signal cible qui dirige la protéine dans la mitochondrie à travers les deux membranes.

La séquence signale ne possède pas de motif caractéristique conservé en acides aminés mais est en fait composée d'une succession d'acides aminés basiques, hydrophobes et hydroxylés qui ont la capacité de former une hélice α amphiphile. Il a été proposé que l'hélice α se compose d'une surface chargée positivement et d'autre part d'une surface hydrophobe. Celles-ci seraient reconnues par les différents composants du système d'importation (Brix et al., 1997) (Meisinger et al., 2001) (figure 1.22).

La surface hydrophobe de la préséquence est d'abord reconnue par le récepteur Tom20. Par la suite, le récepteur Tom22 reconnaît les charges positives de l'hélice α . Il y a donc un transfert de la protéine précurseur du récepteur Tom20 à Tom22. Tom22 peut également reconnaître les précurseurs protéiques sans séquence NH₂-terminale. Un troisième niveau d'interaction peut se former ensuite avec Tom5 qui, de part sa localisation, permet une orientation du précurseur protéique, en vue de son entrée dans le canal de translocation Tom40.

1.5.2.1.2 Passage de la membrane externe

Lorsque la surface de la préséquence, chargée positivement, est reconnue par le récepteur Tom22 ou Tom5, ceux-ci transfèrent la préséquence au pore de translocation GIP ou Tom40.

A ce niveau, la translocation de la protéine n'est médiée ni par le potentiel de membrane ni par un processus dépendant de l'ATP. Une hypothèse proposée dans la littérature est celle de la « chaîne d'acides ». En effet, contrairement au pore unique retrouvé dans le réticulum endoplasmique (« ER translocon »), le complexe GIP contient deux à trois pores formés de la protéine intégrale Tom40 maintenus par l'interaction de Tom40 avec Tom22. Le rôle de Tom22 dans l'assemblage moléculaire est illustré par le fait que chez la levure, dépourvue de Tom22, la taille du complexe n'atteint jamais 400 kDa (Truscott et al., 2003). Le transport de la préprotéine à travers Tom40 est assuré par la fixation successive de

l'extrémité NH₂-terminale basique à une série de domaines acides d'avidité croissantes portées par le canal Tom40 (Schleiff et al., 1997).

La protéine, après son passage par le pore Tom40, se retrouve dans l'espace intermembranaire et doit encore traverser la membrane interne.

1.5.2.1.3 Passage de la membrane interne

La préséquence du précurseur se lie à Tim50 qui assiste la protéine dans son transfert vers la matrice et la guide vers le canal Tim23. Il existe deux forces qui permettent l'avancement du polypeptide : le potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$) et l'hydrolyse de l'ATP dans la matrice par la chaperonne mtHsp70.

L'action du $\Delta\psi_m$ sur l'importation s'explique de deux manières : il exerce un effet électrophorétique sur la préséquence chargée positivement et active le canal Tim23 en favorisant sa dimérisation (Bauer et al., 1996) (Truscott et al., 2001).

Lorsque la protéine émerge dans la matrice, elle est prise en charge par la mtHsp70 qui termine l'acheminement de la protéine dans la matrice. Cette chaperonne interagit avec Mge1/Ssc1, un facteur d'échange nucléotidique assurant l'échange ADP/ATP. Tim44 interagit avec Tim23 au niveau du feuillet interne de la membrane interne. Cette protéine possède un domaine de liaison pour la préséquence du polypeptide et un domaine d'interaction avec mtHsp70.

Deux hypothèses s'affrontent dans la littérature au sujet des mécanismes de progression de la protéine mitochondriale dans la matrice : le modèle de « trapping » et celui du « pulling ». Le premier modèle propose une action passive de la mtHsp70 dans la translocation de la protéine. La chaperonne reconnaîtrait et se lierait au domaine non replié de la protéine précurseur lors de sa sortie du canal Tim23 empêchant ainsi le retour du polypeptide vers l'espace intermembranaire. De plus en plus de mtHsp70 se lient et la préprotéine est bloquée dans la matrice (Gaume et al., 1998). Dans le second modèle, mtHsp70 jouerait un rôle actif dans l'importation en coopération avec Tim44 et Mge1/Ssc1. L'association entre Tim44 et mtHsp70 est ATP dépendante. Un changement de conformation induit par l'hydrolyse de l'ATP par la mtHsp70 entraînerait la traction de la protéine dans la matrice et la perte d'affinité pour Tim44. Le facteur Mge1/Ssc1 se lierait alors à la chaperonne et échangerait l'ADP de la mtHsp70 par de l'ATP, ce qui libérerait le segment du polypeptide. Ce cycle est répété jusqu'à ce que la protéine soit totalement entrée dans la matrice (Glick, 1995) (Voisine et al., 1999) (figure 1.23). De récentes études montrent que ces deux modèles ne sont pas exclusifs et pourraient co-exister (Geissler et al., 2001).

1.5.2.1.4 Maturation de la protéine

Lorsque la protéine arrive dans la matrice, elle possède toujours sa préséquence et n'a pas de conformation fonctionnelle. L'enzyme qui catalyse le clivage protéolytique du signal NH₂-terminal est la MPP (Mitochondrial Processing Peptidase). Cette enzyme est un hétérodimère composé de sous-unités α (55 kDa) et β (52 kDa), appartenant à la famille des métalloendopeptidases. La sous-unité β possède deux résidus chargés négativement qui interagissent avec la position -2 de la préséquence et une phénylalanine qui se lie aux résidus hydrophobes de la préséquence, assurant un clivage spécifique de la préséquence (Gavel and von Heijne, 1990). Après le clivage, la protéine matricielle est transférée sur la chaperonne mitochondriale mtHsp60 dont l'activité chaperonne nécessite l'hydrolyse d'ATP et une

régulation par la mtHsp10 (Hohfeld and Hartl, 1994). MtHsp60 est un tétramère de 60 kDa organisé en deux cylindres creux reliés entre eux. La protéine non repliée serait encapsulée dans la cavité du complexe formée par mtHsp60/mtHsp10 (Figure 1.24).

1.5.2.2 Translocation des protéines dans la membrane mitochondriale interne

Un schéma illustrant l'importation en membrane mitochondriale interne est présenté à la figure 1.25.

1.5.2.2.1 Passage de la membrane externe

Contrairement aux protéines matricielles, les futures protéines de la membrane interne contiennent plusieurs signaux d'adressage au sein de leur séquence primaire et ces séquences mitochondriales correspondent aux futurs domaines transmembranaires de la protéine. Ces séquences hydrophobes protégées par les chaperonnes cytosoliques sont amenées au récepteur Tom70. La présence du précurseur protéique entraîne une oligomérisation de Tom70 et chaque molécule de Tom70 se lie à un domaine hydrophobe de la protéine à importer (Brix et al., 1997). Le récepteur Tom70 possède également des propriétés de chaperonnes (Wiedemann et al., 2001) et des sites de « docking » pour les chaperonnes cytosolique Hsp70 et Hsp90.

La protéine hydrophobe est transférée dans le canal GIP avec l'aide de Tom5, la partie NH₂-terminale est transloquée en premier comme une chaîne polypeptidique linéaire ou en forme de boucle (Wiedemann et al., 2001).

1.5.2.2.2 Insertion en membrane interne

Arrivée dans l'espace intermembranaire, les segments sont liés à une machinerie spéciale : le complexe Tim9-Tim10. Ce complexe hétéro-oligomérique est constitué de trois molécules Tim9 et trois molécules Tim10 qui possèdent les propriétés de chaperonnes (Curran et al., 2002). Ils lient préférentiellement les domaines hydrophobes de la protéine précurseurs et la guident à travers l'espace intermembranaire. L'insertion de la protéine dans la membrane interne se fait via le complexe composé de Tim 22, Tim54 et Tim18, tous ancrés en membrane. La protéine Tim22 étant le canal membranaire formant un pore de diamètre variable allant de 110 nm à 180 nm (Kovermann et al., 2002).

Le potentiel de membrane mitochondrial est la seule source d'énergie permettant l'insertion de la protéine en membrane. L'ouverture du canal est médiée par la présence de la protéine et un potentiel de membrane élevé.

Bien que moins étudiés, la mitochondrie possède également des systèmes d'exportation dont le plus connu est OXA1.

1.5.3 Le complexe OXA 1

Les mitochondries assurent donc la synthèse de 13 peptides dont certaines doivent rejoindre la MMI. Ces protéines passent par un complexe spécifique appelé OXA1, une

translocase de la membrane interne au même titre que Tim23 ou Tim22. C'est une protéine de 36 kDa qui traverse cinq fois la membrane interne (Herrmann et al., 1997). L'exemple d'exportation le plus connu est l'insertion de la sous-unité II de la cytochrome oxydase (COX 2) dans la MMI (Herrmann et al., 1995) (Hell et al., 1997) (figure 1.26).

COX2 est une protéine membranaire intégrale possédant deux segments transmembranaires, dont les extrémités NH₂ et COOH-terminales sont orientées vers l'espace intermembranaire. COX2 est synthétisée dans la matrice comme un précurseur pCox2 qui possède une préséquence NH₂-terminale clivable. L'exportation de la région COOH-terminale, qui porte des charges négatives, nécessite la présence du potentiel de membrane comme énergie de translocation (Hell et al., 1997). pCox2 est également associée la chaperonne membranaire COX20 pendant son exportation (Hell et al., 2000). COX20 est également nécessaire à la protéolyse de la préséquence NH₂-terminale de la préprotéine par les protéases Imp1/Imp2 situées au niveau du feuillet externe de la membrane interne (Schneider et al., 1991).

L'insertion de COX2 ainsi que l'exportation de ses régions NH₂- et COOH-terminales dans l'espace intermembranaire sont facilitées par la présence du complexe protéique OXA1 situé dans la membrane interne.

Contexte de la recherche et objectifs de ce mémoire

Résumé des recherches ayant servi de base à ce mémoire

Un sujet de recherche portant sur la “communication moléculaire rétrograde” entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau a récemment été lancé au sein de l’URBC. Il vise à étudier les effets d’une inhibition de l’activité mitochondriale sur l’expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales ou non dans les cellules de mammifères. Nous nous intéressons également aux voies de signalisation et aux effecteurs moléculaires (messagers secondaires, kinases et facteurs de transcription) capables de renseigner le noyau sur l’état d’activité de la mitochondrie.

Le résumé des activités de recherche sur les cellules déplétées en ADN mitochondrial réalisées au laboratoire est présenté ci-dessous :

1) Nous avons montré que les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial et les cellules 143B rho⁰ ont une concentration en calcium cytosolique libre plus élevée que les cellules parentales. Dans ces cellules, le calcium participe à l’activation de la calmoduline-kinase IV qui phosphoryle le facteur de transcription CREB sur la sérine-133. Cette voie de signalisation et d’activation dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial induit un ralentissement du cycle cellulaire en régulant l’abondance de la protéine p21^{Waf-1}, un inhibiteur de kinases dépendantes des cyclines, via a mécanisme dépendant de CREB et de p53 (Arnould et al., 2002).

2) Nous avons également caractérisé la régulation de mtCLIC, un gène surexprimé dans des cellules en conditions de stress énergétique. Ce gène a été identifié comme un gène différentiellement exprimé dans les cellules L929 dADNmt par la technique de « RT-PCR differential display ». L’expression de mtCLIC est régulée par le calcium et l’activation du facteur de transcription p53 modulée par l’activité de CREB. Les études fonctionnelles montrent que les mitochondries de cellules L929 déplétées en ADNmt incorporent plus de ³⁶chlorine et qu’en modifiant l’abondance de mtCLIC ou son activité, on modifie également le potentiel de membrane mitochondrial des cellules déplétées en ADN mitochondrial. Nous proposons donc que mtCLIC contribue directement ou indirectement à maintenir un potentiel de membrane dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial (Arnould et al, FASEBJ., sous presse).

De manière surprenante et comme illustré sur des micrographies de microscopie électronique à transmission (MET) pour des L929 dADNmt, il est intéressant de noter que la structure mitochondriale est toujours observée dans les cellules déplétées en ADNmt. Depuis peu, et dans le cadre de la thèse de M. Ludovic Merci (Chercheur FRIA, première année), nous nous intéressons à comprendre les mécanismes qui permettent à la cellule déplétée en ADN mitochondrial de maintenir une structure mitochondriale et un certain potentiel de membrane en absence de la respiration mitochondriale.

L’ensemble de ces observations suggèrent donc que la mitobiogenèse reste active dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial.

Objectifs de ce mémoire

L'objectif de notre travail est donc de mieux comprendre les mécanismes et les effecteurs moléculaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale des cellules déplétées en ADN mitochondrial.

Dans un premier temps, après avoir caractérisé l'abondance de la protéine COXI (sous unité I de la cytochrome oxydase) codée par le noyau, pour vérifier la qualité de nos lignées cellulaires, nous utiliserons différentes approches pour rendre compte de l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules. Nous utiliserons tout d'abord les sondes Mitotracker Red et NAO pour quantifier et visualiser la structure mitochondriale dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial.

Dans un deuxième temps, nous nous intéresserons à caractériser l'état d'activation de certains facteurs de transcription connus pour jouer un rôle dans l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales qui sont utilisées comme marqueur de la biogenèse. Ces facteurs de transcription seront étudiés par leur activité de « binding » à une séquence consensus d'ADN (PPAR γ et Sp1) dans un système colorimétrique en multi-puits et par leur activité transcriptionnelle à l'aide de systèmes rapporteurs luciférase (PPAR γ , CREB, NRF-1 et YY-1). Les facteurs étudiés ont été choisis sur base de la présence des outils au laboratoire (dosage en multi-puits, constructions rapporteurs). Cette liste est loin d'être exhaustive. Une attention particulière sera portée à l'analyse de l'expression du cytochrome c, une protéine mitochondriale couramment utilisée comme protéine marqueur de la mitobiogenèse.

Enfin, dans une troisième étape, nous avons tenté de mettre au point un test d'importation de protéines mitochondriales. Pour cela nous avons utilisé des protéines synthétisées *in vitro* et recombinantes marquées radioactivement. Ces protéines chimériques possèdent une séquence d'adressage mitochondrial fusionnée à la DHFR (Dihydrofolate reductase). Nous avons optimisé quelques paramètres (temps d'importation, quantité de protéines mitochondriales, quantité de protéines recombinantes). Ce test nous a ensuite permis de mettre en évidence que l'importation est moindre dans les mitochondries isolées à partir de cellules déplétées en ADN mitochondrial.

Si la mécanistique de l'importation ne sera pas abordée dans ce travail, nous terminerons en donnant quelques résultats préliminaires sur la charge en ATP et le potentiel de membrane mitochondrial dans les différentes lignées cellulaires. Ces deux paramètres étant en effet considérés comme les « forces motrices » de l'importation de protéines dans la matrice mitochondriale. Nous montrons que tant le contenu en ATP que le potentiel de membrane mitochondrial sont réduits dans les cellules déplétées en ADNmt.

Constructions utilisées dans ce travail

Certaines des expériences que nous avons réalisées nécessitent la transfection d'un plasmide. Les différentes constructions que nous avons utilisées sont :

- Un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur authentique de l' α -inhibine, contenant 4 sites CRE reconnus par le facteur CREB. Cette construction nous a été donnée par le Dr. Jameson (*Northwestern University, Evanston, USA*) ;
- Un plasmide contenant le gène de la β -galactosidase d'*E. coli*. Cette construction, utilisée pour normaliser les taux de transfection, contient le gène de la β -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur fort (*SV-40*) et nous a été fourni par le Prof. C. Cepko (*Harvard Medical School, Boston, USA*) ;
- Un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur synthétique contenant 4 sites reconnus par NRF-1 fourni par le Dr. Scarpulla (*Northwestern University Medical School, Chicago, USA*)
- Un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur synthétique contenant 3 sites reconnus par YY1 fourni par le Dr. Shum (*National Institute of Arthritis and Musculoskeletal and Skin Diseases, National Institute of Health, Bethesda, USA*)
- Un plasmide rapporteur contenant le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur synthétique contenant 3 sites PPRE reconnus par PPAR γ fourni par le Pr. Evans (*The Salk Institute for Biological Studies, San Diego, California*)
- Un plasmide rapporteur contenant le gène CAT placé sous le contrôle du promoteur authentique du cytochrome c fourni par le Dr. Zaid (*Department of Biochemistry, Stockholm University, Sweden*)
- Deux plasmides codant pour des dominants négatifs du facteur CREB (M1-CREB et K-CREB). Ces deux constructions nous ont été données par le Prof. E. Greenberg (*Children's Hospital, Department of Neurobiology, Harvard Medical School, Boston, USA*)

Deux autres plasmides fournis par le Pr. Voos (*Albert-Ludwig-Universität, Freiburg, Allemagne*), codant pour les deux protéines traceurs adressées à la mitochondries, ont été utilisés :

- Un plasmide codant pour la protéine de fusion entre la partie NH₂-terminale du cytochrome b₂ et la DHFR (pb₂(167) Δ -DHFR) (dihydrofolate réductase)
- Un plasmide codant pour la protéine de fusion entre la séquence d'adressage de la sous-unité 9 de la F₀ ATPase de *Neurospora crassa* et la DHFR.

Ces différentes constructions ont été amplifiées dans la souche bactérienne *E. coli SURE* (*Stratagene, USA*), dont les membranes sont perméabilisées au CaCl₂ (bactéries « CaCl₂-compétentes ») avant la transformation par choc thermique. La purification des

constructions amplifiées permet de récupérer les plasmides qui, après mesure de leur concentration au photomètre (Pharmacia Biotech, Grande-Bretagne), seront utilisées dans les expériences de transfection (méthode décrite par Ausubel et al., 1996). Les techniques de transformation, d'amplification et de purification plasmidiques étant des techniques classiques de biologie moléculaire, elles ne seront pas décrites ici.

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 Culture cellulaire et sous-cultures

2.1.1 Matériel

Nous avons utilisé différentes lignées cellulaires dans ce travail. Pour chacune d'elles, nous disposons de cellules sauvages et de cellules montrant un dysfonctionnement mitochondrial obtenu par une déplétion partielle ou totale de l'ADN mitochondrial (dADNmt).

Les cellules 143B sont des cellules issues d'un ostéosarcome humain. Nous possédons également une lignée clonale de cellules, 143B rho⁰ complètement déplétées en ADN mitochondrial. Ces deux lignées nous ont été généreusement données par le professeur G. Attardi (California Institute of Technology, CIT, USA) et ont été caractérisées précédemment. Une lignée de cellules L929 sera également utilisée dans le cadre de ce travail. Ces cellules proviennent d'un fibrosarcome murin. La population de cellules déplétées en ADNmt dérivée de ce type cellulaire est non clonale. Ceci signifie, que des cellules présentant des degrés divers dans la déplétion en ADNmt co-existent dans la culture. Ces deux lignées nous ont été fournies par le laboratoire du professeur J Grooten de l'université de Gand (Belgique). Etant donné leur hétérogénéité, les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial sont maintenues en présence de bromure d'éthidium (400 ng/ml).

Les cellules sont maintenues en culture dans des boîtes de 75 cm² (Costar, USA) contenant 15 ml de milieu DHG (Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose : 4,5 g/litre) contenant 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Gibco BRL, Grande-Bretagne). Ce milieu contient également 0,11 g/l de pyruvate. Les cellules sont placées dans une étuve à 37 °C (Heraeus, Allemagne) contenant une atmosphère composée de 5 % de CO₂ et 95 % d'air humide. Les différentes lignées cellulaires utilisées sont sous-cultivées 2 fois par semaine suivant le protocole expérimental expliqué ci-dessous.

Les cellules L929 dADNmt ont été caractérisées par leur abondance moindre en ADN mitochondrial, leur contenu réduit en ATP et l'expression plus faible de la sous-unité I de la cytochrome oxydase, sous-unité codée par le génome mitochondrial (Arnould et al., 2002). Plusieurs de ces marqueurs sont régulièrement utilisés pour s'assurer de l'absence de réversion de phénotype.

2.1.2 Solution

- PBS(Phosphate Buffer Saline) : 10 mM KH₂PO₄ / KHPO₄ ; pH 7,4, 0,9 % NaCl
- Trypsine : 0,5 g/l dans une solution de Puck (Gibco, Invitrogen, Grande Bretagne)

2.1.3 Sous-cultures

Le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS préchauffé à 37 °C. On ajoute ensuite 1 ml de trypsine afin de dégrader les composants de la matrice extracellulaire et de détacher les cellules. On laisse agir l'enzyme deux à trois minutes et l'état d'avancement de la trypsinisation est suivi au microscope optique à contraste de phase. Les cellules sont ensuite resuspendues dans un volume adéquat de DHG contenant 10 % de sérum. Un comptage cellulaire peut alors être réalisé sur la suspension cellulaire à l'aide d'une chambre de Neubauer (Marienfeld, Allemagne). Les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial se divisant moins rapidement que les cellules parentales, il faut en tenir compte lors de la dilution au repiquage. En pratique, nous réalisons une dilution 1/8 pour les cellules parentales et 1/4 pour les cellules déplétées en ADNmt. De plus, les cellules 143B rho⁰ et L929 dADNmt étant auxotrophes pour l'uridine (Gregoire et al., 1984), nous devons en ajouter dans leur milieu de culture (50 µg/ml).

2.2 Dosage de protéines par la méthode de Bradford

2.2.1 Matériel

- Etalon BSA (Bovine Serum Albumin) : 2 µg/µl (Pierce, USA)
- PBS : 10 mM KH₂PO₄ / KHPO₄ ; pH 7,4, 0,9 % NaCl
- Le réactif de Bradford : Protein Assay (BioRad, Allemagne)

2.2.2 Méthode

Un volume déterminé d'échantillon biologique à tester (allant 1 à 10 µl) est prélevé et ajouté à 1 ml de réactif Bradford. Ce réactif aura été préalablement dilué 5 fois dans de l'eau distillée et filtré. La solution est ensuite vortexée pendant 10 s et après 5 min d'incubation, la densité optique (D.O.) est mesurée à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Bradford, 1976). On calcule alors la concentration en protéines grâce à un étalon BSA de concentration connue (2 mg/ml) en utilisant la formule suivante :

$$[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \left(\frac{\text{DO échantillon} - \text{DO blanc échantillon}}{\text{DO étalon} - \text{DO blanc étalon}} \right) \times \frac{5 \mu\text{g}}{\text{Nombre } \mu\text{l ajoutés}}$$

Les 5 µg correspondent à 2,5 µl de BSA étalon.

2.3 Western Blot

La technique du Western Blot a été utilisée afin de caractériser, dans les différents types cellulaires, l'abondance totale mitochondriale au moyen de marqueurs mitochondriaux tels que les sous-unité IV et I de la cytochrome oxydase (COX IV et COX I) et le cytochrome c.

2.3.1 Principe

Le Western Blot nécessite d'abord une étape de séparation des protéines. Celles-ci sont déposées dans un gel de polyacrylamide de pourcentage déterminé. Le gel est alors soumis à une différence de potentiel pour entraîner la migration des protéines dans le gel en fonction de leur masse moléculaire. Un étalon constitué de protéines de masses moléculaires connues permet, par comparaison, d'estimer celle de la protéine d'intérêt. Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidène fluoride). Par la suite, la membrane est mise à bloquer dans une solution de lait. Cette étape permet d'éviter ou de réduire la liaison non spécifique des anticorps primaires et secondaires utilisés. La détection de la protéine d'intérêt se réalise en utilisant un anticorps primaire dirigé contre un épitope ou plusieurs épitopes. Dans un second temps, un anticorps secondaire dirigé contre le fragment Fc de l'anticorps primaire est ajouté. L'anticorps secondaire est couplé à un système de révélation telle que la peroxydase provenant du raifort (HRP: Horse Radish Peroxydase). La révélation est réalisée en présence du substrat de la peroxydase et de luminol. La réaction catalysée par la HRP produit des photons capables d'imprimer un film autoradiographique. Dans la zone de linéarité d'exposition et avant la saturation, le signal est directement proportionnel à la quantité d'antigène présent, et donc à la quantité de la protéine d'intérêt.

2.3.2 Solutions et matériels

- Tampon de lyse : 40 mM Tris; pH7,5, 300 mM KCl, 2 mM EDTA, 1 % Triton X-100 et des inhibiteurs de protéases en tablettes (Roche, Allemagne)
- Laemmli sample buffer 5x, composé de : 0,5 M Tris; pH 6,8, 20 % Sodium Dodécyl Sulfate (SDS), 20 % glycérol, 1 % bleu de bromophénol, 20 % bromo-mercaptoéthanol.
- PBS 10mM tampon phosphate ; pH 7,4, 0,9 % NaCl
- TBS (Tris Buffer Saline) : 200 mM Tris-HCl ; pH 7,4, 140 mM NaCl
- TBS-T (Tris Buffer Saline-Tween) : TBS 1X et 0,1 % Tween-20 (Sigma Chemical, USA)
- Etalon de poids moléculaire : SeeBlue Plus2 (Invitrogen, USA)
- Gel Nu-PAGE 4-12 % (Invitrogen, USA)
- Membrane de transfert PVDF (Polyvinylidène fluoride) (Amersham, Grande Bretagne)
- Running buffer 20 x (Invitrogen, USA)
- Tampon de transfert (Invitrogen, USA)
- Méthanol (Acros Organics, Belgique)
- Antioxydants (Invitrogen, USA)
- Film autoradiographique : Hyperfilm (Amersham, Grande Bretagne)

- Révélateur : (ILFORD 2000 RT imaging, Grande Bretagne)
- Fixateur : (ILFORD 2000 RT imaging, Grande Bretagne)
- ECL : Enhanced ChemiLuminescence (Amersham, Grande Bretagne)
- Lait en poudre : Gloria (Nestlé, Belgique)
- Anticorps primaires :
 - Anticorps polyclonal de lapin anti-cytochrome c 200 µg/ml (Santa-Cruz, USA)
 - Anticorps monoclonal de souris anti- COX I ou COX IV 200 µg/ml (Molecular Probes, USA)
 - Anticorps polyclonal de lapin anti-TBP 200 µg/ml (Santa-Cruz, USA)
- Anticorps secondaires :
 - Anticorps polyclonal de singe anti-Ig de lapin (Amersham, Grande Bretagne)
 - Anticorps polyclonal de chèvre anti-Ig de souris (Amersham, Grande Bretagne)

2.3.3 Méthode

2.3.3.1 Préparation de lysats clairs

Les cellules 143B, 143B rho⁰, L929 et L929 dADNmt confluentes sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS à 4 °C. Elles sont ensuite raclées dans 1 ml de tampon de lyse et transférées dans un microtube. Les cellules ainsi récupérées sont laissées sur glace pendant 30 min, puis centrifugées à 15000 rpm (4 °C) pendant 15 min afin de sédimenter le matériel insoluble dans le tampon de lyse. Ensuite, le lysat clair (ou surnageant) est prélevé et aliquoté. Un dosage de protéines par la méthode de Bradford expliquée au point 2.2 est ensuite réalisé.

2.3.3.2 Préparation des échantillons

A partir des différents types d'échantillons (lysats clairs ou fractions mitochondriales), on prélève un volume correspondant à une quantité de protéines déterminée (15, 20 ou 25 µg) et on le porte à 32 µl avec du tampon de lyse. On ajoute ensuite 8 µl de Laemmli sample buffer 5x. Les échantillons sont portés à 100 °C pendant 5 min, centrifugés 30 s à 13000 rpm et déposés dans les puits d'un gel précoulé NuPage. Dans un des puits, 10 µl d'un étalon contenant des protéines de masses moléculaires connues sont ajoutés.

2.3.3.3 Les gels

Les gels utilisés sont des « mini gels » précoulés NuPAGE 4-12 %. Le tampon de migration est également fourni. Avant utilisation, on lui ajoute 0,25 % d'antioxydants. La migration des protéines est réalisée en appliquant un courant électrique et qui génère une différence de potentiel de 200 V pendant une durée de 50 min.

2.3.3.4 Transfert des protéines sur une membrane de PVDF

Lorsque la migration est terminée, le gel est démoulé et on réalise un montage en « sandwich » dans une cuve de transfert Novex (Mini Cell, Invitrogen, USA). Le montage en

sandwich est présenté schématiquement à la figure 2.1. Le montage constitué d'éponges, de papiers Whatman, d'une membrane de PVDF et du gel, est placé entre deux électrodes pendant 2 h à une différence de potentiel de 30 V et baigne dans un tampon de transfert contenant 20 % de méthanol et 0,1 % d'antioxydants. La présence de méthanol augmente l'affinité de la membrane pour les protéines.

2.3.3.5 Incubation de la membrane avec les anticorps et révélation

La membrane de PVDF est mise à bloquer pendant 2 h à température ambiante ou pendant 18 h à 4 °C dans une solution de TBS-T contenant 5 % de lait poudre.

Pour la détection du cytochrome c, nous utilisons un anticorps polyclonal de lapin dilué 2000 fois dans du TBS-T 5% de lait. La détection de COX I et COX IV est réalisée à l'aide d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre COX I ou COX IV et dilués 1000 fois dans du TBS-T/5% de lait. Après une incubation de 2 h à température ambiante avec l'anticorps primaire, la membrane est rincée 3 fois 5 min avec du TBS-T/5 % de lait en poudre. L'anticorps secondaire polyclonal anti-Ig de lapin ou anti-Ig de souris couplé à la HRP est dilué 100000 fois dans du TBS-T/5 % de lait et ajouté pendant 1 h. La membrane est rincée 3 fois 20 min avec du TBS-T. La révélation est réalisée par une incubation de 5 min avec de l'ECL. La membrane est placée dans une cassette avec un film autoradiographique. Après l'exposition, le film est révélé, rincé et fixé par des bains successifs dans une solution de révélation, de l'eau et une solution de fixation. Après séchage, le film est scanné.

2.4 Dosage de l'activité de liaison à l'ADN des facteurs de transcription Sp1 et PPAR γ en plaque multipuits

Afin de déterminer l'activité de liaison des facteurs de transcription Sp1 et PPAR γ , nous avons réalisé des tests de liaison de ces facteurs à leur séquence d'ADN consensus. Ces tests sont réalisés en plaque multipuits à partir d'extraits protéiques nucléaires préparés à partir des lignées cellulaires 143B, 143B rho⁰, L929 et L929 dADNmt. Le principe de ce test colorimétrique mis au point et décrit initialement pour le facteur NF κ B (Renard et al., 2001), est présenté à la figure 2.2.

2.4.1 Principe du test

Dans une plaque 96 puits dont les puits sont tapissés par de la streptavidine, on fixe un oligonucléotide double brin de 127 pb biotinylé qui comprend un site de liaison (la séquence consensus) pour le facteur de transcription étudié. Ce fragment d'ADN possède également un fragment "spacer", qui permet d'éloigner le site de fixation du facteur de transcription du fond du puits. Ces oligonucléotides sont synthétisés par PCR (Polymerase Chain Reaction), purifiés et mis à disposition par l'équipe « Facteur de Transcription » de EAT (Eppendorf, Belgique). Des extraits nucléaires préparés à partir de différentes lignées cellulaires sont incubés dans les puits. Après plusieurs rinçages, la liaison éventuelle du facteur de transcription à sa séquence cible est mise en évidence par une incubation avec un anticorps primaire dirigé contre un ou plusieurs épitopes du facteur de transcription d'intérêt. Après une

seconde série de rinçages, un anticorps secondaire conjugué à la peroxydase (HRP) est ajouté. La révélation se fait en présence du substrat de l'enzyme et l'absorbance du produit de la réaction colorimétrique est mesurée à 450 nm dans un spectrophotomètre (figure 2.2).

2.4.2 Préparation des extraits nucléaires

2.4.2.1 Solutions

- PBS : 10 mM de tampon phosphate ; pH 7,4, 0,9 % NaCl contenant 1 mM Na₂MoO₄ (Sigma USA) et 5 mM NaF (Merck, Allemagne)
- HB 2x (Hypotonic Buffer) : 40 mM Hepes (ACROS organics, USA), 10 mM NaF, 2 mM Na₂MoO₄, 0,2 mM EDTA (Ethylène dinitrilo tetraacetic acid, Merck Allemagne)
- Tampon de lyse : HB 1x , 0,5 % NP-40 (Nonidet P-40)
- Tampon d'inhibiteurs de phosphatases (PIB, Phosphatase Inhibitor Buffer) : 25 mM NaVO₃ (Sigma, USA), 250 mM PNPP (p-NitroPhényl Phosphate) (Sigma, USA), 250 mM β-glycérophosphate (Sigma, USA), 125 mM NaF (Merck, Allemagne). Cette solution stock (25x) est fractionnée et conservée à -20 °C.
- Cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC, Protease Inhibitor Cocktail) : une tablette de PIC (Roche, Allemagne) pour 2 ml d'H₂O. Cette solution stock (25x) est fractionnée et conservée à -20 °C.
- Tampon de resuspension (TR): HB 1x, 5 % Glycérol (Merck, Allemagne). Des inhibiteurs de protéases (PIC) et de phosphatases (PIB) sont ajoutés fraîchement lors de l'extraction.
- Tampon salin (TS): HB 1x, 5 % Glycérol, 0,4 M NaCl (Merck, Allemagne) contenant les inhibiteurs de protéases (PIC) et de phosphatases (PIB) aux mêmes concentrations que dans le TR.

2.4.2.2 Méthode

Les cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰ sont repiquées dans des boîtes de 75 cm² et sont utilisées à confluence. Toutes les étapes de cette extraction sont réalisées à 4 °C et les tampons sont maintenus sur glace. Le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS. Elles sont ensuite rincées avec du PBS contenant 1 mM Na₂MoO₄ et 5 mM NaF. Elles sont incubées sur glace pendant 5 min en présence de 10 ml de tampon HB 1x. Les cellules sont alors raclées dans 500 µl de tampon de lyse. Le lysat est récupéré dans un microtube et centrifugé 30 s à 13000 rpm. Le surnageant correspondant aux extraits cytoplasmiques est éliminé et le culot de noyau est resuspendu dans 50 µl de tampon de resuspension. Une fois le culot resuspendu, 50 µl de tampon salin sont ajoutés. Le contenu des microtubes est par la suite, agité sur une roue pendant au moins 30 min à 4 °C. On centrifuge alors 10 min à 13000 rpm et à 4 °C. Le surnageant contenant les protéines nucléaires est récupéré, aliquoté et stocké à -70 °C pour des expériences ultérieures, telles que le test colorimétrique de liaison à l'ADN. Un aliquot est conservé pour réaliser un dosage de protéines par la méthode Bradford (point 2.2.2) permettant de déterminer la concentration protéique dans les échantillons.

2.4.3 Dosage de l'activité de liaison des facteurs de transcription à leur séquence consensus

2.4.3.1 Solutions/Matériels

- Plaques de 96 puits coatés à la streptavidine (Roche, Allemagne)
- Tampon de liaison 1x: 10 mM Tris-HCl ; pH 7,5, 50 mM NaCl, 4 % Glycérol, 0,5 mM EDTA, 1 mM MgCl₂, 10 mg/ml BSA.
- Tampon de liaison complet: 5 ml de tampon de liaison 1x , 10 µl de DTT 1 mM, 8,5 µl de Poly dI-dC 0,1 µg/µl
- PBS₅₀ : 10 mM tampon phosphate; pH 7,5, 50 mM NaCl
- Tween-20 (Sigma, USA)
- PBS₅₀- Tween-20 à 0,1 %
- BSA (Bovine Serum Albumin) (Sigma, USA)
- PBS₅₀-BSA 1 %
- Anticorps primaires :
 - Anti-PPAR γ : Ac polyclonal de chèvre anti-PPAR γ 200 µg/ml (Santa-Cruz, USA)
 - Anti- Sp1 : Ac polyclonal de chèvre anti-Sp1 200 µg/ml (Santa-Cruz, USA)
- Anticorps secondaires :
 - polyclonal de lapin anti-Ig de chèvre couplé à la HRP (Amersham, Grande-Bretagne)
- Solution Stop : H₂SO₄ (Biosource, Belgique)
- TMB : Tetra-Methyl Benzidine (Biosource, Europe, Belgique)
- Spectrophotomètre lecteur de plaque multipuits (Ultramark, Microplate Imaging System, Bio-Rad, Allemagne)

2.4.3.2 Méthode

2.4.3.2.1 Fixation du trappeur dans les puits d'une plaque 96 puits tapissés par la streptavidine

Par puits, on dépose 50 µl d'une solution de trappeur biotinylé dilué dans du PBS à une concentration finale de 200 nM et incubée 1 h à 37 °C. Ensuite, les puits sont rincés deux fois avec 100 µl de PBS₅₀-0,1 % Tween-20 et une fois avec 200 µl d'H₂O. La plaque est mise à sécher pendant 30 min à 37 °C et peut être conservée à 4 °C jusqu'au dosage.

2.4.3.2.2 Liaison du facteur de transcription

Le dosage s'effectue à température ambiante. Par puits, on dépose 40 µl de tampon de liaison complet et 10 µl de l'extrait nucléaire dilué dans du tampon de lyse à une concentration de 5 µg/10 µl. Des blancs ne contenant que 10 µl de tampon de lyse et 40 µl de tampon de liaison sont également réalisés. On laisse incuber 1 h sous agitation à température ambiante. Après cette incubation, les puits sont rincés 3 fois avec 200 µl de PBS₅₀-1 % Tween-20.

2.4.3.2.3 Reconnaissance du facteur de transcription par l'anticorps primaire

L'anticorps primaire polyclonal de chèvre dirigé contre le facteur de transcription Sp1 est dilué 1000 fois dans du PBS₅₀-1 % BSA tandis que l'anticorps primaire polyclonal de chèvre dirigé contre PPAR γ est dilué 500 fois dans du PBS₅₀-1 % BSA. On ajoute 100 μ l de solution d'anticorps par puits. Après une incubation de 1 h à température ambiante, les puits sont rincés 3 fois avec 200 μ l de PBS₅₀-1 % Tween-20.

2.4.3.2.4 Reconnaissance de l'anticorps primaire par l'anticorps secondaire

L'anticorps secondaire anti-Ig couplé à la peroxydase est dilué 1000 fois dans du PBS₅₀-1 % BSA et 100 μ l de cette dilution sont ajoutés par puits. Après 1 h d'incubation à température ambiante, les puits sont rincés 4 fois avec 200 μ l de PBS₅₀-1 % Tween-20 avant la révélation.

2.4.3.2.5 Révélation

Par puits, on ajoute 100 μ l de TMB. L'incubation dure 5 min à l'abri de la lumière. Ensuite, on ajoute 100 μ l d'une solution diluée d' H₂SO₄ pour arrêter la réaction enzymatique. Enfin, la densité optique est mesurée à 450 nm (référence 655 nm) dans un spectrophotomètre lecteur de plaques.

2.5 Transfection transitoire et gènes rapporteurs

2.5.1 Principe

La transfection est une technique qui consiste à faire incorporer de l'ADN exogène par une cellule eucaryote. Cette technique a été utilisée, dans le cadre ce travail afin de mesurer l'activité transcriptionnelle dépendante des facteurs NRF-1, YY1, PPAR γ et CREB, suspectés de jouer un rôle dans la mitobiogenèse (Scarpulla, 2002). L'activité transcriptionnelle de ces facteurs a été déterminée au moyen de systèmes rapporteurs luciférase. Un autre marqueur de la mitobiogenèse que nous avons utilisé est l'étude de la transcription d'un gène nucléaire codant pour le cytochrome c. Pour cela, nous avons utilisé un gène rapporteur Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT) dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur authentique du cytochrome c. La transfection transitoire a également été utilisée afin de surexprimer deux protéines mutées agissant comme des dominants négatifs pour CREB. Les deux constructions codent respectivement pour M1-CREB et K-CREB. Les différentes constructions utilisées au cours de ce mémoire sont décrits à la page 28.

Nous avons utilisé le Superfect (Qiagen, Allemagne) comme agent transfectant. Il s'agit d'un dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique (figure 2.3). Il se lie aux groupements phosphates de l'ADN et le complexe en une structure compacte en forme d'anneau facilitant son entrée dans la cellule. Le complexe Superfect-ADN possède une charge nette positive, qui permet la liaison du complexe à des glycoprotéines chargées négativement situées à la surface des cellules eucaryotes. A l'intérieur de la cellule, l'agent

transfectant tamponne le pH de l'endosome, permettant, au moins partiellement la stabilisation de l'ADN dans les cellules transfectées.

2.5.2 Méthode

Les cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰ sontensemencées dans des boîtes de 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits pour la transfection de cellules avec les gènes rapporteurs luciférase. Le jour suivant, les cellules sont co-transfectées transitoirement avec une quantité de 0,75µg de rapporteur luciférase et 0,25 µg de rapporteur β-galactosidase par puits. Les étapes du protocole de la transfection sont reprises à la figure 2.4. On resuspend l'ADN dans un équivalent de 75 µl de milieu sans sérum par puits et on ajoute le Superfect dans un rapport 1 : 5 (5 µl de Superfect par µg d'ADN). La solution est vortexée 10 s et laissée à température ambiante pendant 15 min. Cette étape permet la formation des complexes ADN/Superfect. Du milieu avec sérum est ensuite ajouté à raison de 400 µl par puits. On dispense ensuite 450 µl de la solution par puits avant de remettre les cellules à l'étuve pendant 6 h. Le milieu de transfection est ensuite renouvelé par du DHG contenant 10 % de SVF.

2.5.2.1 Recherche de l'activité des facteurs de transcription YY1, NRF-1, PPARγ et CREB

Afin de pouvoir mettre en évidence et quantifier l'activité transcriptionnelle dépendante des facteurs YY1, NRF-1, PPARγ et CREB, nous utilisons des plasmides rapporteurs codant pour le gène de la luciférase (figure 2.5). L'expression de ce gène est placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur du gène Msx2 contenant 3 sites reconnus par le facteur de transcription YY-1 (Tan et al., 2002), d'un promoteur synthétique contenant 4 sites reconnus par NRF-1 (Gugneja et al., 1996), d'un promoteur synthétique contenant 3 sites PPRE reconnus par PPARγ, du promoteur authentique de l'α-inhibine contenant 4 sites CRE reconnus par CREB (Ito et al., 2000). Le gène de la luciférase sera donc exprimé en fonction de l'état d'activation des différents facteurs de transcription étudiés.

Afin de normaliser les résultats de la transfection, les cellules sont co-transfectées avec un plasmide codant pour le gène de la β-galactosidase. Son expression est dépendante d'un promoteur viral fort (CMV, cytomégalovirus) et le gène codant la β-galactosidase est donc exprimé constitutivement dans les cellules transfectées. L'expression de la β-galactosidase est donc fonction de l'efficacité de transfection mais est indépendante de la condition expérimentale.

2.5.2.2 Dosage de l'activité luciférase

2.5.2.2.1 Principe

Le dosage de l'activité luciférase est réalisée au moyen du kit *luciferase reporter assay* (Promega, USA). En présence d'ATP et d'oxygène, la luciférase oxyde la luciférine. Un des intermédiaires obtenu est ensuite oxydé en oxyluciférine et cette réaction s'accompagne d'une libération de photons. L'émission de photons, proportionnelle à l'activité de l'enzyme

est quantifiée dans un bioluminomètre (Biocounter M2010, Lumac, Pays-Bas). La réaction catalysée par la luciférase est présentée à la figure 2.12.

2.5.2.2.2 Lyse cellulaire

Les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de PBS et lysées dans 200 µl de tampon de lyse (Passive lysis buffer, Promega, USA). La boîte de cellules est mise sous agitation douce à température ambiante pendant 15 min. Les lysats obtenus sont ensuite récupérés en microtubes et centrifugés pendant 3 min à 13000 rpm. Les dosages des activités luciférase et β-galactosidase sont réalisés sur les surnageants.

2.5.2.2.3 Dosage de l'activité luciférase

On prélève 20 µl du lysat que l'on ajoute à 100 µl de mixture réactionnelle contenant le substrat de l'enzyme. L'émission de photons qui s'exprime en RLU (Relative Light Units) est ensuite mesurée pendant 30 s dans un bioluminomètre.

2.5.2.2.4 Dosage de l'activité β-galactosidase

Dans une plaque 96 puits, 40 µl de lysat sont ajoutés à 40 µl de mixture réactionnelle contenant le substrat de l'enzyme. La composition de cette solution est pour 50 ml : 200 mM de Na₂HPO₄/NaHPO₄ ; pH 7.3, 50 µl de MgCl₂ 2M, 350 µl de 2-mercapto-éthanol et 66,5 mg d'ONPG (O-nitrophénylgalactopyranoside) (Sigma, USA). L'absorbance est lue à 405 nm au spectrophotomètre après différents temps d'incubation (37 °C). La densité optique doit être comprise entre 0,1 et 0,5.

Les valeurs du dosage de l'activité luciférase sont ensuite normalisées par celles obtenues pour la mesure de l'activité β-galactosidase. Les résultats sont donc calculés en RLU /D.O. et exprimés arbitrairement en nombre de fois l'augmentation du contrôle.

2.5.3 Activité du promoteur authentique du cytochrome c dans les cellules 143B et 143B rho⁰ : le gène rapporteur CAT

2.5.3.1 Principe

Le système rapporteur CAT est composé d'un gène bactérien qui code pour la chloramphenicol acetyltransferase dont l'expression est contrôlée par le promoteur authentique du cytochrome c (figure 2.6). Dans les bactéries, cette enzyme inactive le chloramphénicol, un antibiotique qui inhibe la synthèse protéique bactérienne en se fixant sur la sous-unité 50 S ribosomale, en l'acétylant sur ses groupements hydroxyles. Dans nos conditions, l'activité CAT est dosée en mettant l'enzyme en présence de son substrat marqué radioactivement et d'un donneur d'acétyl, le n-butyryl-CoA. Dans un deuxième temps, le chloramphénicol est séparé de sa forme non acétylée par une extraction au xylène, un solvant organique. La radioactivité associée à la phase organique contenant le chloramphénicol acétylé peut ensuite être comptée. La radioactivité est proportionnelle à la quantité de chloramphénicol acétylé et donc à l'activité de la CAT synthétisée et donc indirectement à l'activité du promoteur du cytochrome c.

2.5.3.2 Méthode

2.5.3.2.1 Transfection transitoire des cellules avec le système rapporteur CAT

La méthode utilisée est adaptée d'un protocole préalablement décrit par Zaid et al (1999). Les cellules 143B et 143B rho⁰ sontensemencées dans des boîtes de Pétri (diamètre de 60 mm) à une densité de 500000 cellules par boîte. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées transitoirement avec, par boîte, 2,5 µg d'un plasmide codant le rapporteur CAT et 0,75 µg d'une construction codant la β-galactosidase et de plus, suivant les conditions avec 1,75 µg de plasmide codant pour les dominants négatifs K-CREB ou M1-CREB ou 1,75 µg d'un plasmide vide. On ajoute 150 µl de milieu sans sérum aux ADN, puis le Superfect dans un rapport 1 : 5. La solution est vortexée 10 s et laissée 15 min à température ambiante pour assurer la formation des complexes. Du milieu avec sérum est ajouté et on dispense ensuite 2 ml par boîte avant de remettre les cellules à l'étuve pendant 6 h. Le milieu de transfection est alors remplacé par 5 ml de DHG contenant 10 % de SVF pendant 24 h.

2.5.3.2.2 Lysats cellulaires

Le jour suivant la transfection, les cellules 143B et 143B rho⁰ sont rincées 3 fois avec du PBS (4 °C) puis lysées dans 400 µl de tampon de lyse (Cell culture lysis reagent, Promega, USA) et placées sous agitation pendant 15 min à température ambiante. Les cellules sont raclées, transférées en microtubes et vortexées 10 s. A ce moment, des aliquots de 100 µl de lysats cellulaires sont prélevés pour réaliser un dosage de l'activité β-galactosidase (comme expliqué au point 2.5.2.2.4). Les 300 µl restant sont incubés 10 min à 60 °C pour inhiber les déacétylases endogènes. Les lysats sont alors centrifugés 2 min à 13000 rpm. Le surnageant est transféré et des aliquots de 20 µl sont prélevés pour réaliser un dosage de protéines selon la méthode de Bradford (point 2.2.2).

2.5.3.2.3 Le dosage de l'activité CAT

La mixture réactionnelle est composée de 5 µl de n-butyryl-CoA (le donneur de groupements acétyls), d'un volume de lysat cellulaire correspondant à 80 µg de protéines, d'eau, de 3 µl de ¹⁴C-chloramphénicol (50 à 60 mCi/mmoles) pour un volume total de 125 µl par test. La réaction est réalisée pendant 18 h à 37 °C. Des contrôles négatifs sont réalisés dans lesquels les lysats cellulaires sont remplacés par x µl de tampon de lyse. Au terme de l'incubation, les échantillons sont centrifugés et 300 µl de xylène sont ajoutés. Le mélange réactionnel est vortexé 30 s puis centrifugé 3 min à 13000 rpm. On observe alors 2 phases : la phase organique supérieure correspondant au xylène contenant le chloramphénicol acétylé et la phase aqueuse inférieure. La phase supérieure est transférée dans un microtube et l'on ajoute 100 µl de tampon 0,25 M Tris-HCl ; pH 8. Le mélange est vortexé puis centrifugé 3 min à 13000 rpm. Cette étape est réalisée 2 fois afin d'augmenter le rendement de récupération du chloramphénicol acétylé. Enfin, la radioactivité associée est comptée sur un aliquot de 200 µl de la phase supérieure. Cet aliquot est placé dans une fiole de comptage auquel on ajoute 5 ml de liquide scintillant (Aqualuma, Lumac, Pays-Bas). Le comptage de la radioactivité se fait à l'aide d'un compteur à scintillations (Tri-Card 2100 TR, Liquid Scintillation Analyser, Bioscience Compagny).

2.6 Marquages en immunofluorescence et microscopie confocale

2.6.1 Principe

Cette technique permet de mettre en évidence la présence et la localisation subcellulaire d'antigènes particuliers. Elle se base sur la reconnaissance spécifique qui existe entre d'une part, un antigène cellulaire et un anticorps primaire dirigé contre celui-ci et d'autre part, entre cet anticorps primaire et un anticorps secondaire reconnaissant le fragment Fc de l'anticorps primaire. L'anticorps secondaire est couplé à un fluorochrome (ex : les sondes Alexa) qui émet de la fluorescence après excitation à une longueur d'onde déterminée.

Cette technique a été utilisée pour mettre en évidence l'abondance et caractériser la structure de la population mitochondriale dans les quatre lignées cellulaires (143B, 143B rho⁰, L929 et L929 dADNmt). Les marqueurs mitochondriaux pour lesquels des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale ont été réalisées sont le cytochrome c, COX IV et COX I. La sonde MitoTracker Red (CM-H2XRos) a également été utilisée.

2.6.2 Matériel

- PBS : 10 mM tampon phosphate ; pH 7,4, 0,9 % NaCl
- Paraformaldéhyde 3 % (Merck, Allemagne) préparé dans du PBS
- Triton X-100 (Merck, Allemagne)
- BSA (Sigma, USA)
- Anticorps primaires:
 - Anti-cytochrome c: anticorps polyclonal de lapin 200 µg/ml (Santa-Cruz, USA)
 - Anti-COX I: anticorps monoclonal de souris 200 µg/ml (Molecular Probes, USA)
 - Anti-COX IV: anticorps monoclonal de souris 200 µg/ml (Molecular Probes, USA)
- Anticorps secondaire : anti-Ig de lapin et anti-Ig de souris couplés à une sonde Alexa rouge (Ex : 578 nm ; Em : 603 nm) ou verte (Ex : 495 nm ; Em : 519 nm) (Molecular Probes, USA)
- Mowiol (Calbiochem, USA) : 0,1 g de mowiol par ml d'un tampon Tris ; pH 8,5, 22 % glycérol. L'ensemble est chauffé à 50 °C sous agitation jusqu'à dissolution.
- Microscope confocal Leica (Leica, Allemagne)
- Glutaraldéhyde 0,5 % préparé dans du PBS

2.6.3 Marquage immunocytochimique

Les différents types cellulaires utilisés (143B, 143B rho⁰, L929, L929 dADNmt) sont ensemencés sur des lames couvre-objets stérilisées à l'alcool à une densité de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits.

Le jour du marquage, les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml de PBS préchauffé à 37 °C. Par la suite, les cellules sont fixées pendant 10 min avec 1 ml d'une solution de PBS–3 % PFA préchauffé à 37 °C. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de PBS, puis perméabilisées 5 min à température ambiante avec 1 ml de PBS–1 % Triton X-100. Les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de PBS–1 % BSA avant l'incubation avec l'anticorps primaire.

2.6.3.1 Incubation avec l'anticorps primaire

Les cellules fixées et perméabilisées sont alors incubées dans une chambre humide avec 30 µl d'un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre le cytochrome c dilué 100 fois dans du PBS–1 % BSA ou d'anticorps primaires monoclonaux de souris dirigés contre COX I ou IV (dilués 100 fois dans du PBS–1 % BSA). Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire pendant 18 h à 4 °C. Ensuite les cellules sont rincées 3 fois avec 1 ml PBS–1 % BSA pour enlever l'excès d'anticorps primaire non fixé.

L'incubation des cellules avec les anticorps secondaires se base sur le même principe que les incubations avec les anticorps primaires mais l'incubation ne dure qu'une heure et se déroule dans l'obscurité à température ambiante. Les anticorps secondaires Alexa anti-Ig de lapin et anti-Ig de souris utilisés sont dilués 1000 fois dans du PBS–1 % BSA. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois au PBS–1 % BSA et 1 fois au PBS.

Pour le montage des couvre-objets, une goutte de Mowiol préchauffé à 56 °C, est déposée sur une lame dégraissée à l'alcool (Memzel-Gloser, Allemagne) et le couvre-objet est retourné sur la goutte, en évitant la formation de bulles d'air. Les lames sont conservées à l'obscurité pendant 16 h à 4 °C pour permettre la polymérisation du Mowiol avant d'observer les cellules au microscope confocal.

Pour le marquage avec la sonde fluorescente MitoTracker Red (CM-H2XRos), les cellules sontensemencées sur des couvre-objets à une densité de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits. Deux jours plus tard, les cellules sont incubées avec la sonde (250 nM) dans du DHG pendant 15 min. Elle sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de PBS préchauffé à 37 °C et fixées pendant 15 min avec du PBS–0,5 % glutaraldéhyde. Les lames sont ensuite montées comme expliqué précédemment.

2.7 Quantification de l'abondance des populations mitochondriales par l'utilisation de sondes mitochondriales

Différentes sondes mitochondriales provenant de chez Molecular Probes ont été utilisées pour quantifier l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules ou pour mesurer le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$).

Des marquages au MitoTracker Red (CM-H2XRos) et au NAO (Nonyl Acridine Orange) ont été réalisés pour estimer et quantifier l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰. La sonde rhodamine 123 a été utilisée pour mesurer le potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules.

2.7.1 Le Mitotracker Red

2.7.1.1 Principe

Le Mitotracker Red (CM-H2XROS) est une sonde fluorescente qui possède un groupement chlorométhyl pouvant réagir avec les groupements thiols (-SH) des résidus cystéines des protéines pour former un conjugué aldéhyde (figure 2.7). Le marquage des mitochondries par cette sonde est dépendant, en partie, du potentiel de membrane (Buckman et al., 2001).

2.7.1.2 Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de 24 puits à une densité de 50000 cellules par puits. Le lendemain, certains puits sont préincubés avec 10 μ M de FCCP pendant 1 h à 37 °C. Les milieux sont ensuite décantés et les cellules sont incubées pendant 30 ou 60 min en présence de la sonde le MitoTracker Red (CM-H2XROS) à 250 nM dilué dans du DHG. Dans les conditions FCCP, les cellules sont préincubées 10 min avec du FCCP à une concentration de 10 μ M dilué dans du DHG. Ensuite, du FCCP 10 μ M est ajouté pendant la charge des cellules avec la sonde. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois au PBS puis lysées pendant 15 min à température ambiante et sous agitation douce dans 150 μ l de tampon de lyse (Passive Lysis Buffer, Promega, USA). Les lysats cellulaires sont récupérés en microtubes et centrifugés 15 min à 13000 rpm. On reprend 100 μ l du surnageant que l'on répartit dans une plaque 96 puits. La fluorescence associée est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Fluostar, BMG lab technologies, Allemagne) La longueur d'onde d'excitation est de 585 nm et celle d'émission de 612 nm. Un dosage de protéines comme expliqué au point 2.2.2 est réalisé. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence par μ g de protéines.

2.7.2 Le NAO

2.7.2.1 Principe

Le NAO est une sonde fluorescente, qui se lie aux molécules de cardiolipine présentes dans la membrane mitochondriale interne (Figure 2.7). L'accumulation de cette sonde dans les mitochondries se fait de manière spécifique mais non dépendante du potentiel de membrane (Kunz-Schughart et al., 2001). Cette sonde permet donc de quantifier l'abondance de la population mitochondriale présente dans les cellules.

2.7.2.2 Solutions et Matériel

- HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) dont la composition pour un litre est de : 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 60 mg Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 60 mg KH₂PO₄, 100 mg MgSO₄ · 7 H₂O, 0,147 g CaCl₂, 1 g de glucose et 100 mg MgCl₂
- Tampon de lyse : Passive Lysis Buffer (Promega, USA)
- Spectrofluorimètre : FLUOstar (BMG lab technologies, Allemagne)

2.7.2.3 Méthode

Les cellules sont repiquées dans des boîtes de 24 puits la veille de leur utilisation à une densité de 50000 cellules par puits. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 30 ou 60 min à 37 °C en présence de la sonde NAO à une concentration de 10 µM dans un tampon HBSS. Les cellules sont alors rincées 2 fois avec 1 ml de HBSS puis lysées dans 150 µl de tampon de lyse pendant 15 min à température ambiante. Les lysats cellulaires ainsi obtenus sont récupérés en microtube et centrifugés 3 min à 13000 rpm. On prélève 100 µl du surnageant que l'on place dans une plaque 96 puits. La fluorescence associée est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 495 nm et de 519 nm. Un dosage de protéines comme expliqué au point 2.2.2, a été réalisé par la suite. Les résultats sont exprimés en intensité de fluorescence par µg de protéines.

2.7.3 La Rhodamine 123

2.7.3.1 Principe

La rhodamine 123 (R123) est une molécule cationique (Figure 2.7) qui peut être rapidement séquestrée par les mitochondries actives et son accumulation renseigne donc sur le potentiel de membrane des mitochondries (Scaduto and Grotyohann, 1999).

2.7.3.2 Solution et Matériel

- PBS: 10 mM tampon phosphate ; pH 7,4, 0,9 % NaCl
- Tampon de lyse: Passive Lysis Buffer 5 x, Promega, USA
- Spectrofluorimètre: Fluostar, BMG lab technologies, Allemagne

2.7.3.3 Méthode

Les cellules sontensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 12 puits. Le lendemain, elles sont préincubées ou non en présence de 10 µM de FCCP pendant 2 h. Ensuite les cellules sont incubées pendant 5 min à 37 °C en présence de la sonde R123 à une concentration de 10 µM avec ou sans FCCP. Les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS puis lysées pendant 15 min dans 150 µl de tampon de lyse 1x à température ambiante et sous agitation douce. Les lysats sont récupérés en microtubes et centrifugés 15 min à 13000 rpm. On récupère 100 µl du surnageant que l'on répartit dans une plaque 96 puits. La fluorescence associée est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre(Ex: 520 nm; Em: 485 nm).

2.8 Préparation de fractions enrichies en mitochondries

2.8.1 Principe

La méthode utilisée est adaptée d'un protocole préalablement décrit par Darley-USmar et al. (1987). L'obtention d'une fraction mitochondriale enrichie est réalisée par la technique de la centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire. On utilise pour cela des vitesses de centrifugation de plus en plus élevées pour sédimenter des particules de plus en plus petites. La centrifugation différentielle consiste à fractionner un homogénat en population d'organites en fonction de leur masse. Les fractions mitochondriales ont été utilisées dans des expériences visant à comparer le taux d'importation de protéines mitochondriales ainsi que dans des expériences d'estimation du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) en présence de R123.

2.8.2 Solutions et matériel

- Tampon Imidazole (Merck, Allemagne): solution stock 0,1 M; pH 7,4
- Tampon Sucrose-Imidazole (SI) : 3 mM de tampon imidazole; pH 7,4, 0,23 g/l de sucrose
- Centrifugeuse (1): Heraeus Labofuge 400 R
- Centrifugeuse (2): Van der Heyden Biofuge 17 RS
- Dounce: piston B, Kontes Glass Co

2.8.3 Méthode

Le milieu de culture est retiré et les cellules sont rincées deux fois avec 10 ml de PBS (4 °C). On ajoute ensuite 1 ml de tampon SI et on racle le contenu de la boîte. La suspension contenant les cellules est récoltée à la pipette pasteur et subit 30 à 40 passages au Dounce. Cette étape permet de rompre les membranes plasmiques cellulaires, grâce aux forces de cisaillement qu'entraîne le mouvement du piston. Par la suite, on transfère l'homogénat dans un tube de 10 ml et une centrifugation (1) de 10 min à 1700 rpm (4 °C) est réalisée. A ce stade, on récupère le surnageant qui est transféré dans un microtube. Le microtube contenant le surnageant est centrifugé (2) 2 min à 12500 rpm (4° C). Les mitochondries sont ensuite rincées doucement dans 1 ml de tampon SI et une centrifugation dans les mêmes conditions est réalisée. De cette manière, on récolte un culot enrichi en mitochondries que l'on resuspend dans un tampon adéquat suivant les expériences à réaliser (exemples : tampon de lyse pour Western Blot, tampon SEM (Sucrose-EDTA-MOPS) pour le test d'importation ou du tampon SI pour la mesure du $\Delta\psi_m$).

2.9 Synthèse in vitro de protéines recombinantes marquées radioactivement à la [³⁵S]-méthionine

Un kit de transcription-traduction (TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega, USA) a été utilisé afin de synthétiser *in vitro* les protéines utilisées comme traceurs dans le test d'importation de protéines mitochondriales décrit au point 2.10. Pour ce test, nous utiliserons deux protéines de fusion différentes possédant une séquence d'adressage pour la mitochondrie. La première est une protéine de fusion entre la préséquence de la sous-unité 9 de l'ATPase de *Neurospora crassa* et de la DiHydroFolate Reductase (pSu9-DHFR). La deuxième est une protéine de fusion possédant la préséquence du cytochrome b₂(Δ167) fusionnée à la DHFR (pb₂(167)_Δ-DHFR) (figure 2.8). Dans cette protéine de fusion, la séquence du cytochrome b₂ est délétée entre les acides aminés 46 et 65, ce qui force l'adressage de la protéine dans la matrice mitochondriale suite à la délétion du motif d'adressage interne pour la MMI contenu dans la séquence de « sorting » de la protéine.

Les plasmides codant ces deux protéines nous ont été généreusement fournis par le professeur W. Voos (Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg, Allemagne).

2.9.1 Principe

L'ADN plasmidique codant la séquence des protéines chimériques utilisé comme « template » est mis en présence d'une ARN polymérase qui transcrit l'insert d'intérêt en présence d'un lysat de rétyculocytes qui possède tous les réactifs nécessaires tels que des nucléotides, des ribosomes, auquel on ajoute une ARN polymérase. Une ARN polymérase Sp6 a été utilisée car les séquences à transcrire et traduire ont été sous-clonées en aval d'un promoteur reconnu par cette enzyme. Cette mixture réactionnelle contient également des inhibiteurs de nucléases qui pourraient dégrader les ARNm avant leur traduction et des acides aminés à l'exception de la méthionine. De la méthionine marquée radioactivement au ³⁵S est ajoutée et sera incorporée dans la protéine nouvellement synthétisée. Ce marquage nous permet de vérifier la synthèse sur gel et de quantifier la protéine traceur lors d'un test d'importation. Ce test est expliqué au point 2.10.

2.9.2 Méthode

2.9.2.1 Transcription et traduction de la protéine d'intérêt

La mixture réactionnelle est composée de :

- 25 µl de lysat de réticulocytes de lapin,
- 2 µl de TNT tampon de réaction,
- 1 µl de TNT RNA polymérase Sp6,
- 1 µl de la mixture d'acides aminés sans méthionine (1mM),
- 2 µl de [³⁵S] méthionine (1000 Ci/mmoles, Amersham, Grande Bretagne)
- 1 µl de RNasin, inhibiteur de ribonucléases (40 µg / µl),

- 1 µg de plasmide codant la protéine d'intérêt (ADN template)

De l'eau « RNase free » est ajoutée pour obtenir un volume final de réaction de 50 µl. La mixture réactionnelle est incubée à 37 °C pendant 90 min. Un contrôle négatif est réalisé en ne mettant pas d'ADN plasmidique « template ».

2.9.2.2 Révélation de la transcription-traduction

Afin de s'assurer de la synthèse des protéines recombinantes, d'estimer l'abondance et de vérifier leur taille, nous réalisons une séparation par électrophorèse suivie d'une autoradiographie. Nous réalisons cette vérification pour chaque « batch » de protéines traceur produit. Nous utilisons des mini gels NuPAGE (Invitrogen, USA) comme la technique de Western Blot décrit au point 2.3.

2.9.2.2.1 Préparation des échantillons

Au terme de la réaction, un aliquot de 10 µl de la solution de lysat réticulocytes est prélevé. On y ajoute 10 µl de tampon de lyse et 5 µl de Laemmli sample buffer. La mixture est incubée pendant 5 min à 100 °C pour dénaturer les protéines puis centrifugée 10 min à 13000 rpm (4 °C) dans une microcentrifugeuse. Les 25 µl sont chargés dans le puits d'un gel. Un marqueur de poids moléculaire permettra de vérifier les masses moléculaires des protéines synthétisées et de les comparer aux masses moléculaires attendues. La migration se fait sous une différence de potentiel de 200 V pendant 50 min.

2.9.2.2.2 Séchage du gel

Après la migration, le gel est récupéré et baigné pendant 30 min à température ambiante et sous agitation douce dans une solution de fixation (50 % méthanol, 10 % acide acétique, 40 % H₂O). Le gel est ensuite transféré 5 min dans une solution de 7 % méthanol, 7 % acide acétique et 1 % glycérol. Le glycérol minimise le craquement du gel lors du séchage.

Après ces bains successifs, le gel est placé sur une feuille de papier Whatman, recouvert par un film de célophane avant d'être mis à sécher sous vide pendant 2 h à 80 °C dans un sécheur de gel (Model 583, Gel Dryer, Bio-Rad, Allemagne).

Le gel est ensuite déposé dans une cassette avec un film autoradiographique hyper sensible (Hyperfilm, Amersham, Grande Bretagne). Le film est révélé 48 h plus tard, comme décrit au point 2.3.2.5. Un exemple est présenté à la figure 2.9.

2.10 Mesure in vitro de l'importation de protéines mitochondriales

La méthode utilisée est adaptée d'un test d'importation décrit pour des mitochondries de levures (Geissler et al., 2000). Les différentes mises au point du test ont été réalisées sur des mitochondries isolées à partir de cellules L929 en raison de la plus grande disponibilité en matériel cellulaire. Les tests biologiques destinés à comparer l'importation de protéines dans des mitochondries de cellules rho⁰ et parentales ont par contre été réalisés sur des

mitochondries issues de cellules 143B et 143B rho⁰ en raison de la pureté de la population déplétée en ADNmt et dans le but de maximaliser les effets éventuels.

2.10.1 Solutions

- Tampon d'importation BSA contenant: 10 mM MOPS (3-[N-morpholino] propanesulfonic acid) (Sigma, Allemagne); pH 7,2, 250 mM sucrose; 80 mM KCl (Merck, Allemagne), 5 mM MgCl₂ (Merck, Allemagne), 2 mM KH₂PO₄ (Merck, Allemagne), 5 mM méthionine (Sigma, Allemagne), 3 % de BSA sans acides gras (Bovin serum albumine) (Sigma, Allemagne).
- Tampon SEM : 10 mM MOPS; pH 7,2, 250 mM sucrose, 1 mM EDTA (Merck, Allemagne).
- Mixture d'importation pour 900 µl : 800 µl de tampon d'importation BSA, 40 µl d'une solution stock de malate/succinate 250 mM (Sigma, Allemagne), 10 µl ATP d'une solution stock d'ATP à 0,2 M (Sigma, Allemagne), 50 µl de méthionine (Sigma, Allemagne) 0,1 M dilué dans du 0,2M MOPS ; pH 7,4.

2.10.2 Méthode

Après l'obtention des fractions enrichies en mitochondries (voir point 2.8.3) et le dosage des protéines sur ces fractions (point 2.2.2), des aliquots correspondants à 5, 30 ou 60 µg de protéines sont dilués dans 100 µl de la mixture d'importation. La réaction d'importation commence en ajoutant 1, 5 ou 10 µl du lysat de réticulocytes contenant la protéine traceur d'intérêt. Cette réaction s'effectue à une température de 25 °C pendant un temps déterminé (30 s, 4, 10 ou 30 min). Des blancs sont réalisés en préincubant la fraction mitochondriale pendant 5 min à 25 °C en présence de valinomycine (1 µM final) (Calbiochem, Allemagne) avant de réaliser le test d'importation. La valinomycine est un ionophore pour le potassium qui permet d'abolir le potentiel de membrane et donc d'inhiber l'importation. En découplant les mitochondries, on inhibe ainsi toute importation possible. Les valeurs de radioactivité obtenues dans ces conditions sont soustraites des valeurs des tests d'importation.

L'arrêt de l'importation est réalisé sur glace en ajoutant de la valinomycine pendant 5 min (1 µM final). Chaque test est ensuite aliquoté en deux. Un aliquot sera traité pendant 15 min à 0 °C en présence de Protéinase K (PK) à une concentration de 1 mg/ml. La PK hydrolyse les peptides non importés. Le second aliquot est non traité à la PK. Ces traitements différentiels permettent de discriminer la radioactivité associée à l'importation effective de la protéine traceur de la radioactivité associée à l'adsorption non spécifique de cette protéine à l'extérieur de la mitochondrie et sur les parois du tubes (figures 2.10 et 2.11). Enfin, on ajoute 2 µl d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (PIC) afin d'inhiber la PK et les échantillons sont placés sur glace pendant 10 min.

Les mitochondries sont ensuite sédimentées par centrifugation pendant 2 min à 12500 rpm et rincées une fois avec 50 µl de tampon SEM. Ce rinçage permet d'éliminer la

radioactivité associée aux protéines marquées non importées et dégradées mais également les contaminants du lysat de réticulocytes et la [³⁵S] méthionine.

Après une deuxième centrifugation, le tampon est décanté à sec et 50 µl de NaOH (0,5 N) sont ajoutés pendant 16 h pour lyser les mitochondries. Le lendemain, 50 µl de HCl (0,5 N) sont ajoutés pour neutraliser l'hydrolysate. La radioactivité est alors comptée à l'aide d'un compteur à scintillations sur 100 µl d'hydrolysate auxquels on a ajouté 5 ml d'Aqualuma (Lumac, Pays-Bas). Les résultats sont exprimés en coups par minutes (cpm). Afin de visualiser les effets de ces différents traitements sur gel et notamment l'action de la PK, on reprendra les culots de mitochondries après le test d'importation pour réaliser des Western blot en conditions dénaturantes comme expliqué au point 2.3.

2.11 Dosage de l'ATP

Des dosages d'ATP ont été réalisés sur les cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰ pour permettre la comparaison entre le contenu en ATP dans les cellules contrôles et les cellules déplétées en ADN mitochondrial dont elles sont dérivées.

2.11.1 Principe

Un système luciférine-luciférase est utilisé. Il consiste en l'émission de lumière en présence d'ATP et d'O₂. La réaction catalysée par la luciférase se déroule en deux étapes présentées à la figure 2.12.

L'extraction de l'ATP se fait au moyen d'un tampon (Somatic Cell ATP Releasing Reagent, Sigma, USA) qui perméabilise les membranes plasmiques aux petites molécules. Le dosage de la quantité d'ATP se réalise avec l'aide d'une solution réactionnelle (75 mM HEPES pH 7,7; 75 mM glycine, 75 µM DTT, 125 µM EDTA, 6,25 mM MgCl₂) contenant de la luciférine et de la luciférase de luciole (*Photinus pyralis*).

La quantité de photons libérés par la réaction est directement proportionnelle à la concentration en ATP et une quantification peut donc être réalisée tout en normalisant les résultats par un dosage de protéines.

2.11.2 Méthode

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de 12 puits à une densité de 50000 cellules par puits, deux jours avant l'extraction. Le jour du test, les cellules sont incubées pendant 15 s en présence de 400 µl de tampon (Somatic Cell ATP Releasing Reagent, Sigma, USA) à 4 °C. Le tampon est ensuite prélevé et placé rapidement à -70 °C jusqu'au dosage. Le tapis cellulaire restant est hydrolysé pendant 30 min dans 300 µl de NaOH 0,5 N. Un dosage de protéines par la méthode de Bradford est effectué par la suite comme expliqué au point 2.2.2.

Pour le dosage de l'ATP, les échantillons sont dégelés à température ambiante et placés rapidement sur glace avant leur utilisation. L'échantillon est dilué 30 fois dans de l'eau distillée, sur glace, puis vortexé. Aux 10 µl de cet échantillon, on ajoute 100 µl de la solution luciférine-luciférase. L'émission de photons est mesurée à l'aide d'un bioluminomètre (Biocounter M2010, Lumac, Pays-Bas). Le signal mesuré pendant 30 s, est exprimé en RLU (Relative Light Units). Les résultats sont calculés en RLU par µg de protéines et exprimés en pourcentages du contrôle.

2.12 Analyses statistiques

Les résultats obtenus au cours de ce travail sont exprimés comme la moyenne \pm un écart-type. L'analyse statistique des résultats a été réalisée à chaque fois que les résultats et le nombre de réplicats le permettaient. L'analyse de la variance sur ANOVA 1, suivie de contrastes de Scheffé ont été utilisés pour rechercher les différences significatives entre les moyennes.

3 RESULTATS ET DISCUSSIONS

Ce travail s'inscrit dans une étude plus large menée au laboratoire qui vise à mieux comprendre les mécanismes et les effecteurs moléculaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale dans des cellules déplétées en ADNmt. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles cellulaires différents : des cellules 143B issues d'un ostéosarcome humain et des cellules L929 provenant d'un fibrosarcome murin. Rappelons que pour chacune des lignées, nous disposons d'une lignée de cellules déplétées en ADNmt qui est clonale (143B rho⁰) ou non clonale (L929 dADNmt).

Dans un premier temps, nous avons vérifié que les cellules sont bien déplétées en ADNmt. Elles ont donc été caractérisées par le niveau d'expression des sous-unités I et IV de la cytochrome oxydase, codées respectivement par le génome mitochondrial et le génome nucléaire. L'abondance de ces protéines est couramment utilisée comme marqueur de la déplétion en ADNmt (Appleby et al., 1999).

Les cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰ sontensemencées sur des lames couvre-objets dans des boîtes de 24 puits à une densité de 50000 cellules. Les cellules sont rincées au PBS, fixées et des marquages en immunofluorescence sont réalisés à l'aide d'anticorps primaires monoclonaux de souris dirigés contre un épitope de la sous-unité I ou IV de la cytochrome oxydase. Les photos prises en microscopie confocale après ces marquages sont présentées aux figures 3.1 et 3.2. Sur ces photos, on observe que l'expression de la sous-unité I de la cytochrome oxydase (COX I) est plus faible ou non détectable dans les cellules déplétées en ADNmt ou rho⁰. Par contre l'expression de la sous-unité IV de la cytochrome oxydase (COX IV) est comparable à celle observée dans les cellules parentales. La diminution de l'intensité du marquage pour la protéine COX I, peut donc être utilisée comme un marqueur de la déplétion en ADNmt dans les cellules.

Les niveaux d'expression des protéines COX I et COX IV dans les cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰ ont également été analysés par la technique du Western Blot. Les résultats présentés à la figure 3.3 confirment l'absence (143B rho⁰) ou la forte diminution de l'expression (L929 dADNmt) de la protéine COX I dans les cellules déplétées en ADNmt. L'abondance de la protéine COX IV est, quant à elle, peu ou pas modifiée dans les cellules déplétées en ADNmt. Ces premiers résultats peuvent donc confirmer et valider la qualité des cellules déplétées en ADNmt utilisées dans ce travail. Ce test est réalisé régulièrement pour vérifier la qualité des lignées cellulaires déplétées en ADNmt.

Nous allons maintenant tenter de caractériser l'abondance de la population mitochondriale dans les différentes lignées cellulaires utilisées et ce par différentes approches : un dosage de protéines sur les homogénats et les fractions mitochondriales et l'utilisation de sondes telles que le MitoTracker Red (CM-H2XRos) et le NAO.

3.1 Caractérisation de l'abondance de la population mitochondriale au sein des différentes lignées cellulaires

Dans une première approche, afin d'estimer grossièrement l'abondance de la population mitochondriale dans les lignées cellulaires déplétées ou non en ADNmt, nous avons réalisé des purifications de fractions mitochondriales et nous avons dosé les protéines totales sur les homogénats et les fractions enrichies en mitochondries. Les cellules sont repiquées dans des boîtes de 75 cm² et utilisées à confluence. Etant donné que le temps de doublement est plus long pour les cellules déplétées en ADNmt, nous utilisons un nombre de boîtes supérieur pour les cellules déplétées en ADNmt, afin de compenser cette différence de croissance. Les cellules sont raclées dans un ml de tampon SI, puis homogénéisées à l'aide d'un Dounce (40 passages). Un aliquot de l'homogénat est prélevé pour doser les protéines par la méthode de Bradford. Les homogénats sont ensuite centrifugés 10 min à 1700 rpm (4 °C). Les surnageants sont récupérés puis centrifugés 2 min à 12500 rpm (4 °C). Les culots correspondants aux fractions mitochondriales enrichies obtenues sont resuspendus dans un ml de tampon SI, puis centrifugés 2 min à 12500 rpm (4 °C). Un dosage de protéines est également réalisé sur les fractions mitochondriales enrichies. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.4. On observe que la quantité de protéines de la fraction mitochondriale ne représente, au maximum, que 10-15 % de la quantité de protéines totales des homogénats et ce, quelle que soit la lignée cellulaire considérée. On peut remarquer que l'abondance de la population mitochondriale des cellules 143B rho⁰ est comparable à celle de la population mitochondriale des cellules 143B. Par contre, il semble que la population mitochondriale des cellules L929 dADNmt est inférieure à celle des cellules parentales (9 %). Ces résultats ont été observés dans trois expériences indépendantes.

Il est à noter que ce test n'est qu'indicatif et peu fiable. En effet, nous n'avons à ce stade aucune donnée sur la pureté des fractions mitochondriales préparées dans ces conditions ni sur le degré de contamination par d'autres organites tels que les lysosomes et les peroxysomes. Au laboratoire, Ludovic Mercy (Chercheur en thèse, FRIA première année) a réalisé des études en microscopie électronique à transmission sur ces fractions mitochondriales. On observe bien que les fractions sont riches en mitochondries, on peut également observer d'autres structures subcellulaires et débris cellulaires.

Des données quantitatives sur la pureté des préparations mitochondriales seront prochainement recherchées en dosant l'activité d'enzymes marqueurs de différents organites. Nous pourrions utiliser pour cela la phosphatase acide (Beaufay et al., 1974) et la catalase (Baudhuin et al., 1964) pour déterminer la contamination par respectivement les lysosomes et les peroxysomes.

Toujours dans le but de quantifier l'abondance de la population mitochondriale au sein des différentes lignées cellulaires utilisées, des sondes fluorescentes spécifiques de la mitochondrie ont été utilisées : le MitoTracker Red (CM-H2XR0S) et le NAO.

Nous avons donc mesuré l'incorporation au cours du temps de la sonde MitoTracker Red (CM-H2XR0S) dans des cellules L929 et L929 dADNmt. Les cellules sont ensemencées, 24 h avant le test à une densité de 50000 cellules par puits, dans des boîtes de culture de 24 puits. Le jour de l'expérience, les cellules sont incubées ou non (blanc) pendant des temps croissants en présence de la sonde à une concentration de 250 nM diluée dans du DHG contenant 10 % de sérum. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, lysées,

centrifugées et la fluorescence associée à l'incorporation de la sonde dans les cellules est mesurée au spectrofluorimètre. La figure 3.5 présente les résultats obtenus. On constate que l'incorporation du MitoTracker Red augmente au cours du temps et ce, dans les deux lignées cellulaires. La fluorescence associée à l'incorporation dans les mitochondries de cellules L929 dADNmt est comparable à celle mesurée pour les cellules contrôles. Ces résultats suggèrent que la population mitochondriale dans les cellules L929 déplétées en ADNmt est aussi abondante que dans les cellules parentales.

Nous avons répété ce type d'expérience sur des cellules 143B et 143B rho⁰. De plus, l'influence éventuelle du potentiel de membrane mitochondrial sur l'incorporation de la sonde MitoTracker Red (CM-H2XRos) dans les mitochondries a également été recherchée. Les cellules 143B et 143B rho⁰ sontensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans une boîte de 12 puits. Le lendemain, les cellules sont incubées 30 ou 60 min en présence de la sonde MitoTracker Red (CM-H2XRos) à 250 nM. Dans certaines conditions, les cellules sont préincubées 10 min en présence de FCCP (un agent découplant) à 10 µM avant l'incubation de 30 ou 60 min avec la sonde à 250 nM en présence de FCCP à la même concentration. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, lysées et la fluorescence associée à l'incorporation de la sonde dans les cellules est mesurée au spectrofluorimètre. En tenant compte du fait que la prolifération cellulaire est plus lente dans les cellules déplétées en ADNmt et pour éviter que les variations dans les quantités de cellules engagées dans le test n'interfèrent avec le signal de fluorescence mesuré, nous avons normalisé les valeurs d'intensité de fluorescence par la quantité de protéines dosée dans chacun des échantillons.

Les résultats présentés à la figure 3.6 montrent donc que, tout comme pour les cellules L929 et L929 dADNmt, la fluorescence associée à l'incorporation de la sonde par les cellules 143B déplétées en ADNmt est comparable à celle mesurée pour les cellules parentales. L'incubation des cellules en présence de FCCP a, quant à elle, peu d'effet sur l'incorporation de la sonde. On obtient en effet, des diminutions de 16 % et de 14 % pour respectivement les cellules 143B et 143B rho⁰ pour un temps de charge de 30 min et des diminutions de 15 % et de 9 % après 60 min. Les conditions de temps d'incubation et la concentration en FCCP ont été choisies sur base de résultats d'études préliminaires menées au laboratoire par Ludovic Mercy. Dans ces conditions, à l'aide de la sonde R123 sensible au $\Delta\psi_m$, il montre que le potentiel de membrane est réduit d'environ 35 %. Il semble donc que, pour ce type cellulaire, l'incorporation du MitoTracker Red soit peu sensible au $\Delta\psi_m$. Une étude récente a également mis en évidence la sensibilité différentielle de l'accumulation du MitoTracker Red au $\Delta\psi_m$ en fonction du type cellulaire étudié (Buckman et al., 2001). En effet, ces auteurs montrent que le FCCP ne diminue pas l'importation de la sonde MitoTracker Red dans les mitochondries d'astrocytes alors que l'accumulation dans les neurones est sensible à l'agent découplant. Ces auteurs concluent que ce marqueur fluorescent, qui se lie de manière covalente aux groupements sulfhydriles libres (-SH) des protéines, peut être utilisé pour identifier la localisation des mitochondries dans les cultures cellulaires mais ne renseigne pas nécessairement sur la valeur du $\Delta\psi_m$ (Buckman et al., 2001).

Nous avons ensuite voulu vérifier que l'accumulation de la sonde dans les cellules est bien localisée dans les mitochondries. Pour cela, la localisation de la sonde MitoTracker Red incorporé dans les différentes lignées cellulaires a également été visualisée en microscopie confocale. Les cellules sontensemencées sur des lames couvre-objets à une densité de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 24 puits. Deux jours plus tard, les cellules sont incubées 15 min en présence de la sonde à 250 nM, rincées avec du PBS et fixées. Les lames sont ensuite montées et une observation au microscope confocale est réalisée. Les photos

présentées à la figure 3.7 montrent une accumulation du MitoTracker Red qui suit un pattern mitochondrial comparable dans les cellules déplétées en ADNmt et les cellules parentales. Ces observations confirment les résultats obtenus pour la quantification au spectrofluorimètre et suggèrent que la sonde s'accumule préférentiellement dans les mitochondries. Un double marquage permettant de suivre simultanément l'accumulation du MitoTracker Red et la localisation de COX IV, un marqueur spécifique de la mitochondrie, permettrait, par l'analyse de la co-localisation, de confirmer l'accumulation mitochondriale de la sonde fluorescente.

Le NAO, une sonde fluorescente ayant une affinité pour la cardiolipine a également été utilisée pour caractériser l'abondance des populations mitochondriales de cellules contrôles et de cellules déplétées en ADN mitochondrial. La cardiolipine est très abondante dans la membrane mitochondriale interne et assure la formation des supercomplexes entre les complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Zhang et al., 2002). Cette expérience n'a été réalisée que sur des cellules 143B et 143B rho⁰. Les cellules sontensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans une boîte de 24 puits. Le lendemain, les cellules sont incubées 30 ou 60 min en présence de la sonde NAO à une concentration de 10 µM. Les cellules sont ensuite rincées avec du HBSS, lysées et la fluorescence associée à l'incorporation de la sonde est mesurée au spectrofluorimètre (figure 3.8). On constate que le profil est comparable à celui obtenu avec la sonde MitoTracker Red (CM-H2XRos) (figure 3.6). Une très légère diminution (11 % et 10 %) de l'accumulation de la sonde NAO dans les cellules 143B rho⁰ est observée et ce, après respectivement 30 et 60 min de charge.

On peut donc conclure, à la vue des résultats de marquage obtenus à l'aide de deux sondes fluorescentes spécifiques de la mitochondrie, que l'abondance de la population mitochondriale de cellules déplétées en ADNmt est comparable à celle des cellules parentales. Des résultats semblables ont déjà été décrits par d'autres auteurs (Gilkerson et al., 2000). Il a également été montré que les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt, bien que présentes, ne forment plus de réseau mais adoptent une structure individuelle (Buckman et al., 2001).

Les cellules déplétées en ADNmt conservent donc une population mitochondriale comparable, du point de vue de l'abondance, à celle des cellules parentales. Cette constatation implique donc que ces cellules, bien que privées d'ADNmt, maintiennent un processus de biogenèse mitochondriale. Etant donné que la mitobiogenèse nécessite l'expression de nombreuses protéines mitochondriales comme le mtTFA, la β-ATPase ..., nous avons, dans un premier temps tenté de caractériser l'état d'activation de certains facteurs de transcription connus pour être impliqués dans la mitobiogenèse (Goffart and Wiesner, 2003).

3.2 Etude de différents facteurs de transcription impliqués dans la mitobiogenèse

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'activité de facteurs de transcription tels que Sp1, YY1, NRF-1, CREB et PPARγ (Fernandez-Silva et al., 2003). Le choix de ces facteurs de transcription, a été déterminé par deux éléments. Le premier est l'intérêt potentiel de ces protéines dans la régulation de l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales. En effet, on retrouve des séquences riches en GC dans le promoteur du cytochrome c de rat reconnues par Sp1 (Evans and Scarpulla, 1988). YY1 reconnaît deux sites

dans le promoteur de COX VIIc bovin et NRF-1 possède également des sites de liaisons dans le promoteur du cytochrome c humain et de rat. Enfin, CREB est également capable d'interagir avec des séquences CRE dans le promoteur du cytochrome c (Gopalakrishnan and Scarpulla, 1994).

Le deuxième critère, moins scientifique, est la présence au laboratoire des outils permettant d'étudier l'activité de ces facteurs.

Pour étudier l'activité de ces facteurs de transcription, nous avons utilisé deux approches. Pour les facteurs Sp1 et PPAR γ , nous avons déterminé l'activité de liaison à leur séquence consensus présente sur un oligonucléotide synthétique révélée par des tests colorimétriques basés sur le principe développé et décrit précédemment pour NF κ B (Renard et al., 2001). Nous avons également utilisé la technique du système rapporteur luciférase pour mesurer l'activité transcriptionnelle des facteurs YY1, NRF-1, PPAR γ et CREB.

3.2.1 Etude de l'activité de liaison des facteurs de transcription Sp1 et PPAR γ à leur séquence consensus

PPAR γ est un facteur de transcription qui appartient à la superfamille des récepteurs hormonaux nucléaires. Il intervient dans la régulation de la thermogénèse adaptative, de la β -oxydation des acides gras et régule également le métabolisme du glucose en augmentant l'entrée du glucose dans la cellule (Dello Russo et al., 2003). Il est surtout exprimé dans les tissus riches en adipocytes. Ce facteur est intéressant car il peut interagir avec PGC-1, un co-activateur impliqué dans la mitobiogenèse.

Pour déterminer l'état de liaison de ce facteur, des extraits nucléaires ont été préparés à partir des quatre lignées cellulaires et mis en présence d'un fragment d'ADN double brin, biotinylé possédant la séquence consensus en répétition directe (AGGTCAnAGGTCA) reconnue par ce facteur de transcription. L'ADN est fixé au fond de puits d'une plaque 96 puits tapissés de streptavidine. Après plusieurs rinçages, l'abondance du facteur de transcription PPAR γ lié à sa séquence consensus est estimée en utilisant un anticorps primaire polyclonal de chèvre dirigé contre ce facteur de transcription, puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation se fait en présence du substrat de l'enzyme. L'absorbance du produit de la réaction colorimétrique est mesurée au spectrofluorimètre à 450 nm. De cette manière, nous avons pu quantifier la liaison de PPAR γ à l'ADN pour les cellules 143B, 143B rho⁰, L929 et L929 dADNmt. Les résultats obtenus et présentés à la figure 3.9, révèlent que l'activité de liaison du facteur PPAR γ à sa séquence consensus dans les cellules déplétées en ADNmt est inférieure à celle observée dans les cellules 143B et L929 parentales correspondantes. On peut calculer des diminutions de l'abondance du facteur PPAR γ lié dans les cellules déplétées en ADNmt qui sont de 66 % et 35 % pour respectivement les 143B rho⁰ et les L929 dADNmt.

Le facteur Sp1 est ubiquiste et fait partie de la famille des protéines à doigts de zinc (Goffart and Wiesner, 2003). Son activité transcriptionnelle est régulée par différents mécanismes tels que la phosphorylation, la glycosylation ou le splicing alternatif (Black et al., 2001). On retrouve des séquences consensus pour Sp1 dans les promoteurs de la plupart des gènes impliqués dans les phosphorylations oxydatives tels que le cytochrome c, ANT2 et la sous-unité β de la F1-ATPase (Zaid et al., 1999). Pour le gène de l'ANT-2, ce facteur peut

être soit activateur soit répresseur, suivant la position des séquences reconnues dans le promoteur. La figure 3.10 présente l'activité de liaison du facteur de transcription Sp1 à sa séquence consensus dans les quatre lignées cellulaires étudiées. On constate un profil comparable à celui de PPAR γ , même si la différence d'activité de liaison du facteur Sp1 est moins marquée que dans le cas de PPAR γ . On mesure une diminution de l'activité de liaison de 33 % pour les cellules 143B rho⁰ et une diminution de 24 % pour les cellules L929 dADNmt.

En attendant la mise au point de tests colorimétriques applicables à d'autres facteurs de transcription d'intérêt tels que NRF-1 et YY1, nous pouvons conclure dans ces expériences préliminaires que ni la liaison de Sp1 à sa séquence consensus ni celle de PPAR γ n'est augmentée dans les cellules déplétées en ADNmt.

Etant donné que la liaison d'un facteur de transcription à sa séquence consensus n'est pas toujours corrélée à son état d'activité, nous avons également utilisé des systèmes rapporteurs dans lesquels le gène de la luciférase est placé sous le contrôle de promoteurs authentiques ou synthétiques possédant des séquences reconnues par les facteurs de transcription étudiés.

3.2.2 Etude de l'activité transcriptionnelle des facteurs YY1, NRF-1, PPAR γ et CREB dans les cellules déplétées en ADNmt

L'activité transcriptionnelle des facteurs YY1, NRF-1, PPAR γ et CREB a été étudiée dans les cellules 143B et 143B rho⁰. Pour ces expériences, les cellules sontensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 12 puits. Le lendemain, les cellules sont co-transfectées transitoirement au Superfect pendant 6 h avec 0,75 μ g/puits d'un système rapporteur luciférase spécifique du facteur étudié et 0,25 μ g/puits d'un plasmide codant pour la β -galactosidase. Au terme de cette incubation, les cellules récupèrent 18 h dans du DHG contenant 10 % de FBS. Les dosages des activités luciférase et β -galactosidase sont réalisés sur les lysats clairs 24 h après la transfection.

L'activité transcriptionnelle de YY1 est présentée à la figure 3.11. Dans ce système, le gène de la luciférase est placé sous le contrôle d'un fragment du promoteur du gène Msx2 contenant trois sites (CGCCATNTT) reconnus par le facteur de transcription YY1 (Tan et al., 2002). On constate que l'activité transcriptionnelle de YY1 dans les cellules 143B rho⁰ est comparable à celle observée dans les cellules 143B contrôles. Ce facteur de transcription appartient à la famille des protéines à doigts de zinc. Les gènes ubiquistes codant pour des sous-unités de la COX (7 à 13 chez les eucaryotes) sont régulés par des promoteurs contenant des sites de liaisons pour des facteurs de transcription généraux et spécialisés comme YY1 et NRF-2 (Lenka et al., 1998). L'activité transcriptionnelle de ce facteur est régulée par des mécanismes complexes impliquant des boucles de feed-back négatif et la déacétylation de protéines histones. De plus, YY1 influence la transcription des gènes par des interactions protéines-protéines avec d'autres facteurs de transcription ou co-activateurs tels que Sp1, p300, CBP, CREB. La reconnaissance et l'affinité de ce facteur pour sa séquence consensus d'ADN est également fonction de l'acétylation-déacétylation de la protéine YY1 elle-même (Yao et al., 2001).

La figure 3.12 montre l'activité du facteur de transcription obtenue pour NRF-1 dans les cellules 143B et 143B rho⁰. Pour ce facteur, le promoteur qui contrôle l'expression de la luciférase est synthétique et contient quatre sites reconnus par NRF-1 (Gugneja et al., 1996). L'activité transcriptionnelle de NRF-1 est également comparable dans les deux lignées cellulaires. Comme décrit précédemment dans l'introduction de ce travail au point 1.4.1.1, NRF-1 est un facteur de transcription impliqué dans l'activation de nombreux promoteurs de gènes codant pour des enzymes de la chaîne de transporteurs d'électrons (Goffart and Wiesner, 2003), tels que le cytochrome c (Scarpulla, 1997) mais NRF-1 contrôle aussi l'expression du facteur de transcription comme mtTFA (Virbasius and Scarpulla, 1994).

Nous avons également étudié l'activité du facteur PPAR γ à l'aide d'un système rapporteur luciférase dont le promoteur contient trois sites PPRE reconnus par PPAR γ . Les résultats sont présentés à la figure 3.13. Comme observé pour l'activité de liaison de ce facteur à une séquence d'ADN consensus (figure 3.9), l'activité transcriptionnelle de PPAR γ est plus faible dans les cellules 143B rho⁰ que dans les cellules contrôles. Une diminution de 25 % a été calculée bien que cette différence ne soit pas statistiquement significative.

Enfin, la figure 3.14 présente les résultats obtenus pour l'activité du facteur de transcription CREB. Dans ce cas, le promoteur qui contrôle l'expression de la luciférase est le promoteur authentique de l' α -inhibine qui contient quatre sites CRE reconnus par CREB (Ito et al., 2000). Pour ce facteur, on observe une augmentation de l'activité transcriptionnelle dans les cellules 143B rho⁰. L'activité représente 2,5 fois celle obtenue dans les cellules 143B. CREB est un facteur de transcription dont l'activité est régulée essentiellement par la phosphorylation sur la sérine 133. Il est également un médiateur dans la régulation de la transcription dépendante du calcium (Goffart and Wiesner, 2003).

En conclusion, parmi les facteurs de transcription étudiés dans le contexte de la mitobiogenèse, seul CREB à une activité transcriptionnelle augmentée dans les cellules 143B rho⁰. Ces résultats sont en concordance avec les résultats obtenus récemment au laboratoire qui montrent que l'activation de CREB est augmentée constitutivement dans les cellules L929 déplétées en ADN mitochondrial (L929 dADNmt) en aval d'une voie de signalisation initiée par l'augmentation de la concentration en Ca⁺⁺ cytosolique et impliquant la CaMKIV (Arnould et al., 2002).

Rappelons que de nombreux promoteurs de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales contiennent des éléments CRE (TGACGTCA) reconnus par le facteur de transcription CREB. Citons par exemples, la superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD) (Kim et al., 1999), la carnitine palmitoyltransférase (Brady et al., 1992) et le cytochrome c (Gopalakrishnan and Scarpulla, 1994).

Etant donné que l'augmentation d'activité du facteur de transcription CREB a été confirmée dans les cellules 143B rho⁰ et qu'il pourrait participer à la régulation de l'expression du cytochrome c, nous avons ensuite étudié son effet sur l'expression du cytochrome c en utilisant un gène rapporteur CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) placé sous le contrôle du promoteur authentique du cytochrome c. Avec ce système rapporteur, nous pourrions donc obtenir des renseignements sur le niveau de la transcription du gène codant pour le cytochrome c. De plus, l'abondance du cytochrome c est couramment utilisée comme un marqueur de la mitobiogenèse (Wu et al., 2003) (Nisoli et al., 2003). Etude de l'expression du cytochrome c dans les cellules déplétées en ADNmt

Les cellules 143B et 143B rho⁰ sont ensemencées à une densité de 500000 cellules par boîte de Pétri (60 mm de diamètre). Le jour suivant, elles sont co-transfectées transitoirement pendant 6 h au Superfect avec, par boîte, 2,5 µg du plasmide codant pour le gène CAT et 0,75 µg d'un plasmide codant pour la β-galactosidase. Après cette incubation, les cellules récupèrent 18 h dans du DHG contenant 10 % de SVF. Les cellules sont rincées, lysées puis centrifugées et le surnageant est récupéré. Le dosage de l'activité CAT s'effectue comme décrit au point 2.5.3.

La figure 3.15 présente les résultats obtenus. On constate que l'activité CAT et donc la transcription du gène CAT est environ trois fois plus élevée dans les cellules 143B rho⁰. Nous pouvons donc suggérer que la transcription du gène codant le cytochrome c est plus forte dans les cellules 143B rho⁰. Le cytochrome c est donc un gène surexprimé dans ces cellules.

Afin de vérifier si l'expression de la protéine cytochrome c est bien corrélée à l'augmentation de l'activité transcriptionnelle observée au niveau du promoteur du gène dans les cellules 143B rho⁰, nous avons recherché l'abondance de cette protéine dans les cellules 143B et 143B rho⁰ au moyen d'un marquage immunocytochimique et par la technique du Western blot.

La figure 3.16 présente les micrographies de cellules prises après un marquage en immunofluorescence et une observation en microscopie confocale. Les cellules sont repiquées à une densité de 50000 cellules sur des lames couvre-objets dans des boîtes de 24 puits. Après 48 h, les cellules sont fixées à l'aide de PBS-3 % PFA, puis perméabilisées. Les cellules sont incubées avec un anticorps primaire polyclonal de lapin dirigé contre le cytochrome c, puis avec un anticorps secondaire anti-Ig de lapin couplé à un fluorochrome de type Alexa. A partir de ces micrographies, il est difficile de voir une abondance accrue dans les cellules 143B rho⁰.

Afin de tenter de vérifier les résultats obtenus dans les expériences caractérisant la transcription du cytochrome c dans les cellules 143B rho⁰ et étant donné la localisation mitochondriale du cytochrome c, nous avons alors recherché l'abondance du cytochrome c dans des fractions mitochondriales purifiées à partir de cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰ (Figure 3.17). Le Western blot a été réalisé en chargeant 15 µg de protéines de fractions mitochondriales sur gel. On constate bien que le cytochrome c est plus abondant dans les mitochondries de cellules déplétées en ADN mitochondrial. Un contrôle de charge à visant à contrôler l'abondance du COX IV aurait cependant dû être fait afin de s'assurer que la même quantité de protéines a bien été déposée dans chaque piste.

Nous avons donc pu mettre en évidence que l'activité transcriptionnelle accrue observée au niveau du promoteur du cytochrome c dans les cellules déplétées en ADNmt est bien corrélée à une surexpression de la protéine dans les mitochondries des deux lignées de cellules déplétées en ADNmt.

La structure du promoteur minimum du gène codant pour le cytochrome c n'est pas connue mais les promoteurs des cytochrome c de rat et humain sont décrits pour répondre à NRF-1 (Scarpulla, 2002), Sp1 (Li et al., 1995), CCAAT box factors et ATF/CREB (Herzig et al., 2001). Ceci est d'autant plus intéressant que CREB est le seul facteur qui est activé dans les cellules déplétées en ADNmt. Nous pouvons donc proposer que CREB est impliqué dans l'augmentation de l'expression du cytochrome c dans les cellules déplétées en ADNmt.

Pour tester notre hypothèse, des cellules 143B rho⁰ ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur CAT et des plasmides codant pour des dominants négatifs de CREB, K-CREB et M1-CREB. Les cellules sont repiquées à une densité de 500000 cellules dans des boîtes de Pétri (60 mm de diamètre) et co-transfectées avec 2,5 µg d'un plasmide rapporteur CAT, 0,75 µg d'un plasmide codant pour la β-galactosidase, 1,75 µg d'un vecteur vide ou 1,75 µg d'un plasmide codant pour K-CREB ou M1-CREB. Après une récupération de 48 h, les activités CAT sont dosées sur une même quantité de protéines et normalisées par l'activité β-galactosidase. On constate que la surexpression des dominants négatifs K-CREB et M1-CREB inhibent l'augmentation de l'activité CAT dans les cellules 143B rho⁰ (figure 3.18). Bien que ces résultats doivent être confirmés, on remarque que K-CREB a une faible action inhibitrice sur la transcription du gène CAT plus faible par rapport à l'action de M1-CREB. Cette différence peut s'expliquer par le mécanisme d'action différent des deux dominants négatifs : K-CREB séquestre CREB endogène (Walton et al., 1992) tandis que M1-CREB se lie aux séquences CRE reconnues par CREB empêchant éventuellement d'autres facteurs de la famille CREB/ATF de se lier à leur séquence consensus (Gonzalez and Montminy, 1989). Cette différence pourrait également s'expliquer par le niveau d'expression différent des deux protéines.

A ce stade du travail, nous avons pu montrer qu'une structure mitochondriale est toujours présente dans les cellules déplétées en ADNmt et que l'abondance de la population mitochondriale dans ces cellules déplétées en ADNmt est comparable à celle observée dans les cellules parentales. Nos résultats préliminaires sur la caractérisation de l'état d'activation de facteurs de transcription impliqués dans la mitobiogenèse ont permis de confirmer que parmi les facteurs testés, seul le facteur de transcription CREB semble activé dans les cellules déplétées en ADNmt. De plus, le gène codant le cytochrome c, dont le promoteur contient deux sites CRE, est également surexprimé dans les cellules déplétées en ADNmt. Enfin, nous montrons également que CREB est bien un facteur de transcription qui régule l'expression du cytochrome c dans les cellules 143B rho⁰ puisque la surexpression de deux dominants négatifs de CREB inhibent la surexpression du cytochrome c.

Sachant que près de 99 % des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire et que ces protéines doivent donc être importées dans les mitochondries, il est important dans notre étude de la mitobiogenèse de s'intéresser à la capacité des mitochondries de cellules déplétées en ADNmt à importer ces protéines mitochondriales. Pour cela, dans la suite de notre travail, nous avons tenté de mettre au point un test d'importation de protéines mitochondriales à partir de protéines recombinantes radiomarquées et utilisées comme « traceur ».

3.3 Mise au point d'un test d'importation de protéines recombinantes marquées à la [³⁵S]-méthionine dans les mitochondries de cellules de mammifères

Ce test est nouveau pour deux raisons : il est réalisé sur des mitochondries de mammifères purifiées à partir de cellules. En effet, la plupart des expériences d'importation sont réalisées soit sur des mitochondries purifiées à partir de levures (Geissler et al., 2000) soit sur des mitochondries de mammifères purifiées à partir de tissus (Darley-Usmar, 1987).

Le but de l'utilisation de ce test dans notre recherche est de pouvoir comparer et quantifier l'activité d'importation de protéines mitochondriales dans des cellules déplétées en ADNmt.

Pour cela, nous avons utilisé deux protéines de fusion. Ces deux protéines sont adressées à la matrice mitochondriale (figure 2. 8).

La première étape d'un test d'importation consiste à synthétiser et à marquer radioactivement les deux protéines recombinantes *in vitro*. Pour cela, nous avons utilisé un kit de transcription-traduction *in vitro* (TNT Reticulocyte Lysat, Promega). Les protéines synthétisées sont marquées radioactivement par l'incorporation de [³⁵S]-méthionine lors de l'étape de traduction. La radioactivité associée à ce traceur protéique permettra de vérifier la synthèse des protéines recombinantes par autoradiographie mais également de quantifier l'incorporation des protéines dans les mitochondries par un comptage de la radioactivité associée aux mitochondries récupérées après un test d'importation et un traitement à la PK. Pour chaque production de protéines recombinantes par transcription-traduction *in vitro*, nous vérifions la présence et la taille des protéines synthétisées.

Pour vérifier la synthèse des protéines, un aliquot de 10 µl de la mixture réactionnelle est dénaturé et chargé sur un gel NuPAGE 4-12 %. Ce gel est fixé, séché et la détection des protéines marquées est révélée par autoradiographie après 48 h d'exposition. La figure 3.19 présente les résultats typiquement obtenus lors de ces vérifications. On peut observer que les deux protéines sont présentes aux tailles attendues de 28 et 37 kDa pour respectivement la protéine de fusion entre la sous-unité 9 de l'ATPase et la DHFR (pSu9-DHFR) et la protéine de fusion entre un fragment du cytochrome b₂ et la DHFR (pb₂(167)_Δ-DHFR).

3.3.1 Mise au point du test d'importation des protéines recombinantes dans les mitochondries de cellules L929

Dans un premier temps, nous avons tenté d'optimiser le test d'importation en étudiant différents paramètres tels que le temps d'importation, la quantité de protéines mitochondriales à utiliser et la quantité de protéines « traceurs » à ajouter. Ces paramètres ont été repris de la littérature sur base du test d'importation décrit pour les mitochondries de levures (Geissler et al., 2000). On ne retrouve que peu d'information pour les mitochondries de cellules eucaryotes de mammifères.

Tous les tests de mise au point de l'importation ont été faits sur des mitochondries purifiées à partir de cellules L929 pour des raisons de plus grande disponibilité du matériel cellulaire. Ces tests ont été réalisés chaque fois avec les deux protéines recombinantes pour confirmer les effets observés.

Dans un premier temps, nous avons donc testé l'effet du temps d'incubation sur l'importation de la protéine traceur. La fraction mitochondriale a été purifiée à partir de cellules L929 et par test, une quantité correspondant à 30 µg de protéines mitochondriales purifiées a été mise en présence des protéines traceurs. Au terme du temps d'incubation, l'importation est arrêtée en ajoutant de la valinomycine à 1µM dans chaque test. La suspension de mitochondries est alors aliquotée en deux échantillons : l'un est traité à la PK et l'autre non. Les mitochondries sont sédimentées et rincées une fois avec du tampon SEM pour éliminer la radioactivité associée à la méthionine non incorporée dans les protéines

recombinantes et les protéines non importées et dégradées par la PK. Après une lyse alcaline, la radioactivité associée à chaque fraction est ensuite mesurée à l'aide d'un compteur à scintillations. Les quantités de mitochondries et de lysat de réticulocytes contenant la protéine traceur ont été choisies arbitrairement sur base de la littérature (Geissler et al., 2000). Dans chaque expérience, des blancs sont réalisés. Ils consistent en une préincubation des mitochondries avec 1 μM de valinomycine pour découpler les mitochondries et ainsi empêcher l'importation subséquente. Ces valeurs sont soustraites des valeurs des tests traités à la PK. La différence restante permet d'estimer la radioactivité associée à l'importation.

Les figures 3.20 et 3.21 présentent les résultats obtenus pour respectivement l'importation de la protéine de fusion $\text{pb}_2(167)_\Delta\text{-DHFR}$ et l'importation de la protéine de fusion pSu9-DHFR . Nous constatons que la radioactivité associée à l'importation dans la fraction traitée à la PK est bien inférieure à la radioactivité de la fraction non traitée. L'effet de la PK sur la dégradation de la protéine recombinante a été visualisée sur gel (figure 2.11). On constate également que la radioactivité associée à l'importation des deux protéines chimériques augmente légèrement en fonction du temps d'importation. Les augmentations observées entre 0,5 et 10 min d'importation sont respectivement de 53 % et 35 % pour les constructions pSu9-DHFR et $\text{pb}_2(167)_\Delta\text{-DHFR}$. Des tests préliminaires avec des temps de 4, 10 et 30 min ont été réalisés mais nous n'avons peu ou pas observé de différence entre les temps 10 et 30 min.

Sur base de ces résultats, nous avons donc choisi un temps d'incubation de 10 min dans la suite des expériences de mise au point du test d'importation. Ce temps est comparable aux temps utilisés dans la littérature pour des tests d'importation réalisés sur des mitochondries de levures (Geissler et al., 2000).

Dans un deuxième temps, nous avons recherché l'effet de la quantité de mitochondries purifiées à partir de cellules L929 sur l'importation de la protéine traceur. Pour cela, nous avons utilisé des quantités correspondantes à 5, 30 et 60 μg de protéines mitochondriales.

Les figures 3.22 et 3.23 montrent les résultats obtenus pour les deux protéines traceurs en fonction de quantités croissantes de protéines mitochondriales. Nous constatons que l'importation augmente légèrement avec la quantité de mitochondries. La quantité de mitochondries pour laquelle on observe l'importation la plus importante correspond à 60 μg de protéines mitochondriales. Cependant, pour des raisons de disponibilité de matériel cellulaire, nous avons préféré choisir un compromis et allons conserver une quantité de 30 μg de protéines mitochondriales par test. Il est en effet difficile d'obtenir plus de 300 μg de protéines mitochondriales à partir de six boîtes de 75 cm^2 de cellules confluentes.

On constate que pour une même construction, en fonction des expériences réalisées, il y a une différence d'échelle dans le nombre de cpm comptés. Cette différence peut s'expliquer par le fait qu'il n'a pas été tenu compte du temps de demi-vie de la méthionine pour le marquage. Le temps de demi-vie de la [^{35}S]-méthionine est de 80 jours. La méthionine utilisée lors des premiers tests avait plus de 80 jours contrairement à celle utilisée par la suite.

Maintenant que nous avons déterminé le temps d'incubation et la quantité de mitochondries à utiliser, il faut tester l'effet de la quantité de lysat de réticulocytes, elle-même proportionnelle à la quantité de protéine traceur ajoutée. Nous avons donc répété ce type de test en incubant 30 μg de mitochondries à 25 °C pendant 10 min avec 1, 5 et 10 μl de lysat de réticulocytes.

Les figures 3.24 et 3.25 présentent respectivement la radioactivité associée à l'importation de la protéine de fusion pb₂(167)_Δ-DHFR et l'importation de la protéine de fusion pSu9-DHFR. Comme attendu, nous constatons que la radioactivité des échantillons non traités à la PK, augmente bien avec la quantité de lysat de réticulocytes. On constate par contre dans le cas des échantillons traités à la PK, que la radioactivité attribuée à la quantité de protéine recombinante importée est inchangée quelle que soit la quantité ajoutée.

Nous sommes surpris par ces résultats pour lesquels nous n'avons pas d'explication. Il semble donc que la quantité de protéine traceur présente dans 1 µl de lysat de réticulocytes ne semble pas limitante.

Au terme de ces mises au point, nous conserverons donc un temps de 10 min, une quantité de 30 µg de protéines mitochondriales et 5 µl de lysat de réticulocytes pour les tests visant à comparer l'importation des deux protéines recombinantes dans des mitochondries purifiées à partir de cellules 143B et 143B rho⁰.

3.3.2 Comparaison de l'importation de protéines mitochondriales dans des mitochondries purifiées à partir de cellules 143B et 143B rho⁰.

La figure 3.26 présente les résultats obtenus pour l'importation de la protéine de fusion pb₂(167)_Δ-DHFR dans des mitochondries purifiées à partir de cellules 143B et 143B rho⁰. Nous constatons que l'importation de la protéine traceur est inhibée à plus de 85 % dans les cellules rho⁰. Un profil comparable est observé pour l'importation de la protéine de fusion pSu9-DHFR (figure 3.27). Dans ce cas, l'importation de la protéine traceur ne représente que 34 % de l'importation estimée dans les cellules 143B.

Comme nous l'avons expliqué précédemment, l'importation des protéines mitochondriales nécessite l'existence d'un potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$) généré au niveau de la membrane mitochondriale interne (MMI) et l'activité ATPasique de la chaperonne mtHsp70. Nous avons donc voulu déterminer et comparer le potentiel de membrane mitochondrial et le contenu en ATP dans les cellules déplétées en ADNmt.

3.4 Mesure du potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules parentales et déplétées en ADN mitochondrial.

L'existence d'un potentiel de membrane mitochondrial plus faible dans les mitochondries de cellules déplétées en ADN a déjà été démontré à de nombreuses reprises. De plus, il a été montré récemment au laboratoire qu'un nouveau mécanisme dépendant de mtCLIC participe à générer un $\Delta\psi_m$ dans les mitochondries de cellules L929 déplétées en ADNmt (Arnould et al., FASEB J., sous presse). Afin de confirmer ces résultats sur les cellules 143B rho⁰ et de rechercher la ou les causes responsables de la diminution de l'importation des protéines mitochondriales dans les mitochondries de cellules 143B rho⁰, nous avons réalisé des mesures d'incorporation de la sonde R123 par des cellules L929, L929 dADNmt, 143B et 143B rho⁰ permettant d'estimer et de comparer le $\Delta\psi_m$ dans les cellules.

Des tests ont également été réalisés en présence de FCCP afin de vérifier la dépendance de l'incorporation de la R123 au $\Delta\psi_m$ mitochondrial.

Les cellules sontensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans une boîte de 12 puits. Le lendemain, les cellules sont préincubées ou non pendant 1 h en présence de 10 μM de FCCP puis incubées avec 10 μM de la sonde R123 pendant 5 min à 37 °C avec ou sans FCCP. Les cellules sont rincées, lysées et centrifugées. La fluorescence associée est mesurée sur les surnageants. Les figures 3.28 et 3.29 présentent respectivement les résultats obtenus pour les cellules L929, L929 dADNmt et les cellules 143B, 143B rho⁰.

On constate que la sonde R123 s'accumule moins dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt que dans les mitochondries de cellules parentales. Les diminutions de l'intensité de fluorescence associées à l'incorporation de la sonde dans les cellules déplétées en ADNmt sont de 35 % et de 34 % respectivement pour les cellules L929 dADNmt et les cellules 143B rho⁰. Dans le cas des cellules traitées au FCCP pour induire un découplage mitochondrial, on observe une diminution de 56 % et de 53 % pour respectivement les cellules L929 et L929 dADNmt et une diminution de 40 % et de 24 % pour respectivement les cellules 143B et 143B rho⁰. On constate donc que le FCCP inhibe encore l'incorporation de la sonde R123 dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt. Ceci confirme que les mitochondries déplétées en ADN mitochondrial restent découplables comme montré précédemment (Appleby et al., 1999). Enfin, nous montrons que le potentiel de membrane mitochondrial dans les cellules déplétées en ADNmt est inférieur à celui estimé dans les cellules parentales.

L'importation de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire nécessite également la présence d'ATP, considéré comme la deuxième force motrice de l'importation. L'ATP est hydrolysé par la mtHsp70 au niveau du feuillet interne de la MMI pour permettre l'importation de la protéine mitochondriale dans la matrice mitochondriale (Voos and Rottgers, 2002). Nous avons donc dosé et comparé le contenu en ATP intracellulaire dans chaque type cellulaire, dans le but de tenter d'expliquer la plus faible importation de protéines mitochondriales dans les cellules déplétées en ADNmt.

3.5 Dosage des contenus en ATP des cellules parentales et déplétées en ADN mitochondrial

Pour les expériences de dosage d'ATP, les cellules sontensemencées à une densité de 50000 cellules par puits dans des boîtes de 12 puits. Après 48 h, les cellules sont incubées 15 s en présence d'un tampon qui perméabilise la membrane aux petites protéines pour extraire l'ATP. L'extraction et le dosage de l'ATP cellulaire sont décrits au point 2.11. La figure 3.30 présente les résultats des dosages d'ATP effectués sur des cellules 143B, 143B rho⁰, L929 et L292 dADNmt.

On constate une diminution du contenu en ATP dans les cellules déplétées en ADNmt. Elle est de 73 % dans les cellules 143B rho⁰ par rapport aux cellules 143B et de 67 % dans les cellules L929 dADNmt par rapport aux cellules L929. Cette diminution du contenu en ATP s'explique par le fait que les cellules déplétées en ADNmt n'ont plus que la glycolyse comme source d'énergie puisque les phosphorylations oxydatives sont inhibées en raison de l'absence des protéines codées par le génome mitochondrial.

L'importation plus faible des protéines mitochondriales observée dans des mitochondries de cellules déplétées en ADNmt pourrait donc s'expliquer simplement par le fait que le $\Delta\psi_m$ et la quantité d'ATP disponibles sont réduits dans ces cellules. Ces résultats sont donc en accord avec les mécanismes proposés dans la littérature pour expliquer l'importation de protéines mitochondriales et plus particulièrement de protéines matricielles.

Par contre, ces résultats ne permettent pas d'expliquer les résultats obtenus pour le cytochrome c. En effet, on a constaté que l'abondance du cytochrome c était plus importante dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt que dans les mitochondries des cellules parentales. Comme cette protéine mitochondriale est codée par le génome nucléaire, elle doit donc être importée plus fortement dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt. En fait, pour le cytochrome c, il s'avère qu'il n'est pas importé par le même mécanisme que les autres protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire. Le cytochrome c représente un cas exceptionnel, car son précurseur, l'apocytochrome c, est synthétisé sans préséquence. De plus, l'importation de l'apocytochrome c n'est pas influencée par un traitement aux protéases qui clivent les récepteurs accessibles à la surface de la MME. Des expériences réalisées sur la levure *S. cerevisiae* ont enfin montré que des mutations des récepteurs Tom20 et Tom70 du complexe TOM n'influencent pas l'importation de la protéine cytochrome c (Wiedemann et al., 2003). Cette protéine n'interagit donc pas avec Tom70 et 20. De plus, il a la capacité de s'insérer spontanément dans les bicouches lipidiques et de traverser la MME sans l'aide de protéines telles que Tom 40. Le mécanisme par lequel le précurseur du cytochrome c est importé est encore mal compris de nos jours.

Le cytochrome c n'est pourtant pas la seule protéine nécessaire à la biogenèse mitochondriale, d'autres facteurs tels que la β -ATPase, le mtTFA sont très importants. Au laboratoire Ludovic Mercy a montré que la β -ATPase et le mtTFA sont également surexprimés dans les cellules déplétées en ADNmt. Si le cytochrome c échappe au mécanisme d'importation classique, il se peut donc que d'autres protéines nécessaires à la mitobiogenèse dans les cellules déplétées en ADNmt empruntent également une autre voie d'importation.

4 CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La mitochondrie est un organite qui assure de très nombreuses fonctions comme la production d'ATP, la formation de ROS, la β -oxydation des acides gras. Elle participe également à l'homéostasie du calcium dans la cellule eucaryote. Son fonctionnement et encore plus son dysfonctionnement sont de plus en plus étudiés actuellement. Les raisons sont multiples, mais la découverte de son implication dans les processus apoptotiques et l'identification de nombreuses pathologies ou syndromes associés ou causés par un dysfonctionnement y sont probablement pour beaucoup.

Afin de percevoir un dysfonctionnement mitochondrial, la cellule doit être capable d'intégrer des signaux émis par la mitochondrie non fonctionnelle. Cette communication moléculaire entre la mitochondrie et le noyau implique que des effecteurs moléculaires soient produits par la mitochondrie, et induisent certaines voies de transduction cytosoliques menant à l'activation de facteurs de transcription nucléaires afin de générer une réponse cellulaire impliquant une réponse génique (Liao and Butow, 1993). Actuellement, en dehors de la délocalisation de nombreuses protéines mitochondriales qui assurent probablement une fonction de communication avec le reste des compartiments subcellulaires, le calcium (Biswas et al., 1999) et les ROS (Suzuki et al., 1998) sont des messagers importants de cette communication moléculaire.

Pour permettre l'étude de la communication moléculaire entre les mitochondries non fonctionnelles et ses conséquences pour la cellule, des modèles cellulaires ont été développés, parmi lesquels les cellules déplétées en ADN mitochondrial ou cellules rho⁰. Parmi les caractéristiques de ces cellules, deux sont particulièrement remarquables. En effet, on observe toujours la présence d'une structure mitochondriale attestant d'une biogenèse active de l'organite dans ces cellules. De plus, on peut toujours détecter l'existence d'un potentiel de membrane au niveau de la membrane mitochondriale interne en l'absence de la respiration. Ces deux observations sont à la base d'un projet de recherche mené à l'URBC (thèse de L. Mercy en cours) sur la compréhension des mécanismes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et le maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial dans ces cellules.

Des travaux antérieurs menés au laboratoire ont permis de mettre en évidence que l'activité de certains facteurs de transcription tels que CREB est augmentée dans les cellules déplétées en ADNmt. La phosphorylation de ce facteur implique une voie de signalisation dépendante du calcium et de la calmoduline-kinase (Arnould et al., 2002). De plus, des modifications de l'abondance et/ou de l'activité de mtCLIC, un canal à chlore intracellulaire et mitochondrial codé par un gène surexprimé dans les cellules L929 dADNmt, provoquent des changements dans le potentiel de membrane mitochondrial dans ces cellules. Ces observations sont à la base d'une publication récente présentant une nouvelle hypothèse sur l'existence d'un potentiel de membrane dans les cellules rho⁰ (Arnould et al., FASEB J., sous presse).

Les objectifs de notre travail étaient doubles :

Dans une première approche, nous avons tenté de mieux comprendre les mécanismes participant à la mitobiogenèse en recherchant l'état d'activité de facteurs de transcription connus pour réguler l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et utilisées comme marqueurs de la mitobiogenèse.

-Nous avons étudié les facteurs de transcription (PPAR γ , Sp-1, YY1, NRF-1, CREB) en utilisant soit des tests colorimétriques de liaison à l'ADN (PPAR γ , Sp1) soit des systèmes rapporteurs placés sous le contrôle de promoteurs répondant à ces facteurs (YY1, PPAR γ , NRF-1 ou CREB). Nous montrons que parmi les facteurs testés, seule l'activité transcriptionnelle de CREB est augmentée dans les cellules déplétées en ADNmt. Ces études devraient se poursuivre par l'étude d'autres facteurs comme NRF-2, MyoD et de co-activateurs comme PGC-1. Sachant que CREB régule l'expression de PGC-1 et que la voie CaMKIV-CREB connue pour jouer un rôle dans la mitobiogenèse (Wu et al., 2002), est activée dans les cellules déplétées en ADNmt (Arnould et al., 2002), il serait intéressant de rechercher l'importance de cette voie dans la mitobiogenèse de cellules déplétées en ADNmt.

-Nous avons ensuite recherché l'activité du promoteur authentique contrôlant l'expression du cytochrome c en utilisant un système CAT. Nous observons que l'activité du rapporteur est environ trois fois plus élevée dans les cellules 143B rho⁰ que dans les cellules parentales. De plus, cette augmentation mesurée au niveau transcriptionnel est confirmée par une plus grande abondance de la protéine cytochrome c dans les cellules déplétées en ADNmt comme l'atteste l'abondance du cytochrome c mitochondrial analysé par Western blot sur des fractions mitochondriales enrichies. Les niveaux d'expression d'autres marqueurs de la mitobiogenèse comme VDAC3, ANT-2, COX Vb seront également recherchés par la technique de realtime PCR. Parmi les facteurs impliqués dans la régulation du cytochrome c, NRF-1 et CREB ont récemment été décrits comme régulateurs essentiels lors de la stimulation par le sérum pour rendre compte de l'augmentation de la mitobiogenèse observée lors de la prolifération cellulaire (Herzig et al., 2001). L'importance de CREB dans l'augmentation de la transcription du cytochrome c dans notre modèle de cellules déplétées en ADNmt est démontrée par le fait que l'activité de NRF-1 n'est pas modifiée dans les cellules déplétées en ADNmt mais aussi par l'effet inhibiteur important induit par la surexpression des dominants négatifs (K-CREB/M1-CREB) sur l'activité du rapporteur CAT.

Dans un deuxième temps, et puisque la mitobiogenèse nécessite une activité d'importation dans la mitochondrie de nombreuses protéines mitochondriales codées par le noyau, nous avons tenté de mettre au point un test d'importation *in vitro* de protéines mitochondriales. En effet, les nombreuses études traitant de l'importation de protéines mitochondriales se basent et utilisent essentiellement des mitochondries de levure (Geissler et al., 2000). Pour y parvenir, nous avons utilisé deux protéines recombinantes marquées radioactivement à la [³⁵S]-méthionine et produites dans un système de transcription-traduction *in vitro*.

La première protéine utilisée est une protéine de fusion entre une version tronquée du cytochrome b2, dont le domaine d'adressage membranaire a été en partie délété, et la DHFR. Ces modifications ont pour conséquence de forcer l'adressage dans la matrice mitochondriale. La deuxième protéine est également une protéine de fusion entre la préséquence de la sous-unité 9 de l'ATPsynthase et la DHFR. Après quelques tests de mise au point et d'optimisation reprenant les quantités de mitochondries à utiliser, le volume de lysat de réticulocytes et le temps d'importation, nous avons pu montrer que l'importation de protéines mitochondriales est fortement diminuée dans les cellules 143B rho⁰. Il est à observer que bien que fortement diminuée, l'activité d'importation subsiste dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt. Les résultats de ces expériences devraient être répétés et confirmés sur la lignée de cellules L929 dADNmt.

Nous devons ici mentionner que la mise au point du test n'est pas complètement terminée. Si des renseignements préliminaires montrent qu'un test d'importation à l'aide de

lysate de réticulocytes ne contenant que la [³⁵S]-méthionine (utilisé comme contrôle négatif sans ADN plasmidique) ne permet pas de compter de radioactivité importée après traitement à la PK, nous devrions également pouvoir visualiser, par autoradiographie, la présence de la protéine dans la matrice mitochondriale après un test d'importation. En effet, l'importation complète dans la matrice s'accompagne du clivage de la préséquence d'adressage et donc d'une réduction de la masse moléculaire de la protéine précurseur visualisable sur gel (Wiedemann et al., 2003). Ces expériences pourraient d'ailleurs être réalisées sur des mitoplastes dépourvus de membrane mitochondriale externe pour s'assurer de la qualité terminale de l'adressage. Dans nos conditions, l'importation semble faible, lente et incomplète. Plusieurs aspects peuvent tenter d'expliquer nos observations. Il est possible que la protéine traceur ne soit pas dans une conformation optimale pour l'importation qui nécessite un dépliement de la protéine. Pour cela, certains auteurs traitent les protéines traceurs à l'urée avant le test d'incorporation. Des expériences préliminaires réalisées par Ludovic Mercy ne montrent pas d'effet d'augmentation de l'importation dans ces conditions. De plus, il serait intéressant de réaliser ces tests d'importation en présence ou l'absence de méthotrexate, un ligand de la DHFR qui s'oppose au dépliement de la protéine par la machinerie d'importation et voir si l'on peut inhiber l'importation (Rapaport et al., 1998). Combinés aux résultats en présence d'urée, nous aurons ainsi des données sur l'importance et l'état de repliement des protéines traceur.

De plus, des facteurs cytosoliques essentiels comme la Hsp70 maintenant une conformation propice à la translocation pourraient manquer dans le test *in vitro*. Nous pourrions envisager des tests en ajoutant de la Hsp70 recombinante pendant le test d'importation. Il est également possible que d'autres protéines présentent dans le lysate de réticulocytes complètent ou interfèrent avec le test d'importation. Une dialyse des produits obtenus par transcription-traduction pourrait se révéler être une piste intéressante à tester.

Etant donné que l'importation est réduite dans les cellules déplétées en ADNmt, il serait également intéressant de comprendre le mécanisme responsable de cette diminution d'importation. Dans ce travail, nous avons dosé le contenu en ATP dans les cellules déplétées en ADNmt et les cellules parentales. Nous observons bien une diminution du contenu intracellulaire en ATP dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. De plus comme mesuré par les expériences utilisant la sonde fluorescente R123 qui s'accumule spécifiquement dans les mitochondries possédant un potentiel de membrane mitochondrial, nous observons également que le potentiel de membrane des cellules déplétées en ADNmt est plus faible que le potentiel des cellules parentales. Si ces deux paramètres constituent les sources d'énergie nécessaires pour observer l'importation de précurseurs protéiques dans la matrice mitochondriale, il serait intéressant de rechercher le niveau d'expression des protéines de la machinerie d'importation ou la force des interactions entre le précurseur à importer et les protéines des complexes TOM et TIM.

Nous pourrions donc rechercher les niveaux d'expression des protéines Tom40, Tom22, 20 et 70 ainsi que l'abondance des protéines Tim23, Tim50, et mtHsp70. Il serait également intéressant de caractériser les niveaux d'expression des autres Tom et Tim afin de mettre en évidence un éventuel déficit d'assemblage des principaux acteurs moléculaires. Dans ce contexte, les niveaux d'interactions entre mtHsp70, Tim44 et Mge-1 seront recherchés dans les cellules déplétées en ADNmt après immunoprécipitation d'une de ces protéines. Au terme des incubations, avant de récupérer les mitochondries, on pourrait réaliser un cross-linking avec du DSG (disuccinimidyl glutarate) ou de l'EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride) et réaliser des expériences d'immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigés contre des protéines des complexes TOM et TIM. Ceci permettrait

de détecter les interactants moléculaires à différents moments du test d'importation et de comparer les résultats obtenus dans des lignées de cellules rho⁰ et de cellules parentales.

Rappelons aussi que l'interprétation de ces tests est rendue difficile et ne peut s'appliquer à toutes les protéines mitochondriales. En effet, si l'on reprend l'exemple du cytochrome c, on retrouve plus de cytochrome c dans les mitochondries de cellules déplétées en ADNmt, même si l'importation est diminuée dans ces cellules. En effet, cette protéine n'est pas importée par des mécanismes TOM et TIM (Wiedemann et al., 2003). Il serait également important de rechercher si d'autres protéines mitochondriales peuvent également être importées par des mécanismes différents des mécanismes classiques.

Enfin pour caractériser l'importation de protéines mitochondriales dans les cellules déplétées en ADNmt dans un système cellulaire complet, il serait intéressant de suivre l'importation de protéines marqueurs de la mitochondrie après des expériences de transfection utilisant des constructions codant des protéines adressées à la mitochondrie et possédant un « tag » pour permettre la détection. Un double marquage pour cette protéine et un marqueur des mitochondries comme COX IV permettrait de visualiser en microscopie confocale et de quantifier l'importance de l'importation *in vivo* par des Western blot sur des fractions purifiées.

Tous ces résultats devraient apporter des informations sur les mécanismes qui permettent aux cellules déplétées en ADNmt de maintenir une mitobiogenèse active.

5 BIBLIOGRAPHIE

- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol*, **147**, 959-968.
- Allan, E.H., Green, I.C. and Titheradge, M.A. (1983) The stimulation of glycogenolysis and gluconeogenesis in isolated hepatocytes by opioid peptides. *Biochem J*, **216**, 507-510.
- Andersson, U. and Scarpulla, R.C. (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 3738-3749.
- Appleby, R.D., Porteous, W.K., Hughes, G., James, A.M., Shannon, D., Wei, Y.H. and Murphy, M.P. (1999) Quantitation and origin of the mitochondrial membrane potential in human cells lacking mitochondrial DNA. *Eur J Biochem*, **262**, 108-116.
- Arnould, T., Vankoningsloo, S., Renard, P., Houbion, A., Ninane, N., Demazy, C., Remacle, J. and Raes, M. (2002) CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J*, **21**, 53-63.
- Arnould, T., Mercy, L., Houbion, A., Vankoningsloo, S., Renard, P., Pascal, T., Ninane, N., Demazy, C. and Raes, M. (2003) mtCLIC is upregulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells. *FASEB J.*, *sous presse*.
- Baudhuin, P., Beaufay, H., Rahman-Li, Y., Sellinger, O.Z., Wattiaux, R., Jacques, P. and De Duve, C. (1964) Tissue fractionation studies. 17. Intracellular distribution of monoamine oxidase, aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, D-amino acid oxidase and catalase in rat-liver tissue. *Biochem J*, **92**, 179-184.
- Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. and Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell*, **87**, 33-41.
- Beaufay, H., Amar-Costesec, A., Feytmans, E., Thines-Sempoux, D., Wibo, M., Robbi, M. and Berthet, J. (1974) Analytical study of microsomes and isolated subcellular membranes from rat liver. I. Biochemical methods. *J Cell Biol*, **61**, 188-200.
- Bernardi, P. (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, **79**, 1127-1155.
- Biswas, G., Adebajo, O.A., Freedman, B.D., Anandatheerthavarada, H.K., Vijayasarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M. and Avadhani, N.G. (1999) Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *Embo J*, **18**, 522-533.
- Black, A.R., Black, J.D. and Azizkhan-Clifford, J. (2001) Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer. *J Cell Physiol*, **188**, 143-160.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Brady, P.S., Park, E.A., Liu, J.S., Hanson, R.W. and Brady, L.J. (1992) Isolation and characterization of the promoter for the gene coding for the 68 kDa carnitine palmitoyltransferase from the rat. *Biochem J*, **286 (Pt 3)**, 779-783.
- Brdiczka, D., Beutner, G., Ruck, A., Dolder, M. and Wallimann, T. (1998) The molecular structure of mitochondrial contact sites. Their role in regulation of energy metabolism and permeability transition. *Biofactors*, **8**, 235-242.

- Brix, J., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. *J Biol Chem*, **272**, 20730-20735.
- Buchet, K. and Godinot, C. (1998) Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem*, **273**, 22983-22989.
- Buckman, J.F., Hernandez, H., Kress, G.J., Votyakova, T.V., Pal, S. and Reynolds, I.J. (2001) MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants. *J Neurosci Methods*, **104**, 165-176.
- Carafoli, E. (2003) Historical review: Mitochondria and calcium: ups and downs of an unusual relationship. *Trends Biochem Sci*, **28**, 175-181.
- Carrodeguas, J.A., Kobayashi, R., Lim, S.E., Copeland, W.C. and Bogenhagen, D.F. (1999) The accessory subunit of *Xenopus laevis* mitochondrial DNA polymerase gamma increases processivity of the catalytic subunit of human DNA polymerase gamma and is related to class II aminoacyl-tRNA synthetases. *Mol Cell Biol*, **19**, 4039-4046.
- Choi, Y.S., Kim, S. and Pak, Y.K. (2001) Mitochondrial transcription factor A (mtTFA) and diabetes. *Diabetes Res Clin Pract*, **54 Suppl 2**, S3-9.
- Chomyn, A. (1998) The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet*, **62**, 745-751.
- Chrivia, J.C., Kwok, R.P., Lamb, N., Hagiwara, M., Montminy, M.R. and Goodman, R.H. (1993) Phosphorylated CREB binds specifically to the nuclear protein CBP. *Nature*, **365**, 855-859.
- Connor, M.K., Irrcher, I. and Hood, D.A. (2001) Contractile activity-induced transcriptional activation of cytochrome C involves Sp1 and is proportional to mitochondrial ATP synthesis in C2C12 muscle cells. *J Biol Chem*, **276**, 15898-15904.
- Crook, N.E., Clem, R.J. and Miller, L.K. (1993) An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol*, **67**, 2168-2174.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2002) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *Embo J*, **21**, 942-953.
- Daga, A., Micol, V., Hess, D., Aebersold, R. and Attardi, G. (1993) Molecular characterization of the transcription termination factor from human mitochondria. *J Biol Chem*, **268**, 8123-8130.
- Darley-USmar, V.M. (1987) The molecular aetiology of human mitochondrial myopathies. *Biochem Soc Trans*, **15**, 102-103.
- Dekker, P.J., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N. and Meijer, M. (1993) Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett*, **330**, 66-70.
- Dello Russo, C., Gavrilyuk, V., Weinberg, G., Almeida, A., Bolanos, J.P., Palmer, J., Pelligrino, D., Galea, E. and Feinstein, D.L. (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma thiazolidinedione agonists increase glucose metabolism in astrocytes. *J Biol Chem*, **278**, 5828-5836.
- Enerback, S., Jacobsson, A., Simpson, E.M., Guerra, C., Yamashita, H., Harper, M.E. and Kozak, L.P. (1997) Mice lacking mitochondrial uncoupling protein are cold-sensitive but not obese. *Nature*, **387**, 90-94.
- Enriquez, J.A., Fernandez-Silva, P., Garrido-Perez, N., Lopez-Perez, M.J., Perez-Martos, A. and Montoya, J. (1999) Direct regulation of mitochondrial RNA synthesis by thyroid hormone. *Mol Cell Biol*, **19**, 657-670.

- Ermak, G. and Davies, K.J. (2002) Calcium and oxidative stress: from cell signaling to cell death. *Mol Immunol*, **38**, 713-721.
- Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. (1988) Both upstream and intron sequence elements are required for elevated expression of the rat somatic cytochrome c gene in COS-1 cells. *Mol Cell Biol*, **8**, 35-41.
- Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. (1989) Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences. *J Biol Chem*, **264**, 14361-14368.
- Evans, M.J. and Scarpulla, R.C. (1990) NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev*, **4**, 1023-1034.
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N.G. and Gustafsson, C.M. (2002) Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet*, **31**, 289-294.
- Fan, L., Sanschagrin, P.C., Kaguni, L.S. and Kuhn, L.A. (1999) The accessory subunit of mtDNA polymerase shares structural homology with aminoacyl-tRNA synthetases: implications for a dual role as a primer recognition factor and processivity clamp. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9527-9532.
- Fernandez-Salas, E., Sagar, M., Cheng, C., Yuspa, S.H. and Weinberg, W.C. (1999) p53 and tumor necrosis factor alpha regulate the expression of a mitochondrial chloride channel protein. *J Biol Chem*, **274**, 36488-36497.
- Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A. and Montoya, J. (2003) Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol*, **88**, 41-56.
- Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V. and Attardi, G. (1997) The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *Embo J*, **16**, 1066-1079.
- Ferreri, K., Gill, G. and Montminy, M. (1994) The cAMP-regulated transcription factor CREB interacts with a component of the TFIID complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1210-1213.
- Fiore, C., Trezeguet, V., Le Saux, A., Roux, P., Schwimmer, C., Dianoux, A.C., Noel, F., Lauquin, G.J., Brandolin, G. and Vignais, P.V. (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. *Biochimie*, **80**, 137-150.
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M.F., Surwit, R.S., Ricquier, D. and Warden, C.H. (1997) Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia. *Nat Genet*, **15**, 269-272.
- Ganitkevich, V.Y. (2003) The role of mitochondria in cytoplasmic Ca(2+) cycling. *Exp Physiol*, **88**, 91-97.
- Gaume, B., Klaus, C., Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W. and Brunner, M. (1998) Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *Embo J*, **17**, 6497-6507.
- Gavel, Y. and von Heijne, G. (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Protein Eng*, **4**, 33-37.
- Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N. and Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell*, **111**, 507-518.
- Geissler, A., Krimmer, T., Bomer, U., Guiard, B., Rassow, J. and Pfanner, N. (2000) Membrane potential-driven protein import into mitochondria. The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence. *Mol Biol Cell*, **11**, 3977-3991.

- Geissler, A., Rassow, J., Pfanner, N. and Voos, W. (2001) Mitochondrial import driving forces: enhanced trapping by matrix Hsp70 stimulates translocation and reduces the membrane potential dependence of loosely folded preproteins. *Mol Cell Biol*, **21**, 7097-7104.
- Gilkerson, R.W., Margineantu, D.H., Capaldi, R.A. and Selker, J.M. (2000) Mitochondrial DNA depletion causes morphological changes in the mitochondrial reticulum of cultured human cells. *FEBS Lett*, **474**, 1-4.
- Glick, B.S. (1995) Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell*, **80**, 11-14.
- Goffart, S. and Wiesner, R.J. (2003) Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol*, **88**, 33-40.
- Gonzalez, G.A. and Montminy, M.R. (1989) Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, **59**, 675-680.
- Gopalakrishnan, L. and Scarpulla, R.C. (1994) Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression. *J Biol Chem*, **269**, 105-113.
- Graves, S.W., Johnson, A.A. and Johnson, K.A. (1998) Expression, purification, and initial kinetic characterization of the large subunit of the human mitochondrial DNA polymerase. *Biochemistry*, **37**, 6050-6058.
- Gray, H. and Wong, T.W. (1992) Purification and identification of subunit structure of the human mitochondrial DNA polymerase. *J Biol Chem*, **267**, 5835-5841.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science*, **283**, 1476-1481.
- Gregoire, M., Morais, R., Quilliam, M.A. and Gravel, D. (1984) On auxotrophy for pyrimidines of respiration-deficient chick embryo cells. *Eur J Biochem*, **142**, 49-55.
- Gugneja, S., Virbasius, C.M. and Scarpulla, R.C. (1996) Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Mol Cell Biol*, **16**, 5708-5716.
- Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G. and Lithgow, T. (1995) Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature*, **376**, 705-709.
- Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett*, **418**, 367-370.
- Hell, K., Tzagoloff, A., Neupert, W. and Stuart, R.A. (2000) Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J Biol Chem*, **275**, 4571-4578.
- Herrmann, G.J. and Shaw, J.M. (1998) Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **14**, 265-303.
- Herrmann, J.M., Koll, H., Cook, R.A., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1995) Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II. Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J Biol Chem*, **270**, 27079-27086.
- Herrmann, J.M., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p. *Embo J*, **16**, 2217-2226.
- Herzig, S., Long, F., Jhala, U.S., Hedrick, S., Quinn, R., Bauer, A., Rudolph, D., Schutz, G., Yoon, C., Puigserver, P., Spiegelman, B. and Montminy, M. (2001) CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 179-183.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature*, **395**, 516-521.

- Hobbs, A.E., Srinivasan, M., McCaffery, J.M. and Jensen, R.E. (2001) Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol*, **152**, 401-410.
- Hohfeld, J. and Hartl, F.U. (1994) Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria. *J Cell Biol*, **126**, 305-315.
- Holt, I.J., Harding, A.E., Petty, R.K. and Morgan-Hughes, J.A. (1990) A new mitochondrial disease associated with mitochondrial DNA heteroplasmy. *Am J Hum Genet*, **46**, 428-433.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *Embo J*, **15**, 2125-2137.
- Hoogenraad, N.J., Ward, L.A. and Ryan, M.T. (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 97-105.
- Horikawa, Y., Goel, A., Somlyo, A.P. and Somlyo, A.V. (1998) Mitochondrial calcium in relaxed and tetanized myocardium. *Biophys J*, **74**, 1579-1590.
- Huo, L. and Scarpulla, R.C. (2001) Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol Cell Biol*, **21**, 644-654.
- Ito, M., Park, Y., Weck, J., Mayo, K.E. and Jameson, J.L. (2000) Synergistic activation of the inhibin alpha-promoter by steroidogenic factor-1 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. *Mol Endocrinol*, **14**, 66-81.
- Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S. and Tjian, R. (1990) GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell*, **63**, 155-165.
- Kaneda, H., Hayashi, J., Takahama, S., Taya, C., Lindahl, K.F. and Yonekawa, H. (1995) Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4542-4546.
- Kim, H.P., Roe, J.H., Chock, P.B. and Yim, M.B. (1999) Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. *J Biol Chem*, **274**, 37455-37460.
- Kovermann, P., Truscott, K.N., Guiard, B., Rehling, P., Sepuri, N.B., Muller, H., Jensen, R.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2002) Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel. *Mol Cell*, **9**, 363-373.
- Kozak, U.C., Kopecky, J., Teisinger, J., Enerback, S., Boyer, B. and Kozak, L.P. (1994) An upstream enhancer regulating brown-fat-specific expression of the mitochondrial uncoupling protein gene. *Mol Cell Biol*, **14**, 59-67.
- Kunz-Schughart, L.A., Habbersett, R.C. and Freyer, J.P. (2001) Impact of proliferative activity and tumorigenic conversion on mitochondrial function of fibroblasts in 2D and 3D culture. *Cell Biol Int*, **25**, 919-930.
- Larsson, N.G., Garman, J.D., Oldfors, A., Barsh, G.S. and Clayton, D.A. (1996) A single mouse gene encodes the mitochondrial transcription factor A and a testis-specific nuclear HMG-box protein. *Nat Genet*, **13**, 296-302.
- Lenka, N., Vijayasarathy, C., Mullick, J. and Avadhani, N.G. (1998) Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **61**, 309-344.
- Lestienne, P., Mitochondrial diseases. *Springer*.
- Li, J.M., Nichols, M.A., Chandrasekharan, S., Xiong, Y. and Wang, X.F. (1995) Transforming growth factor beta activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through an Sp1 consensus site. *J Biol Chem*, **270**, 26750-26753.

- Li, L.Y., Luo, X. and Wang, X. (2001) Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, **412**, 95-99.
- Liao, X. and Butow, R.A. (1993) RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus. *Cell*, **72**, 61-71.
- Lim, S.E., Longley, M.J. and Copeland, W.C. (1999) The mitochondrial p53 accessory subunit of human DNA polymerase gamma enhances DNA binding, promotes processive DNA synthesis, and confers N-ethylmaleimide resistance. *J Biol Chem*, **274**, 38197-38203.
- Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P. and Spiegelman, B.M. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J Biol Chem*, **277**, 1645-1648.
- Liu, X., Kim, C.N., Yang, J., Jemmerson, R. and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, **86**, 147-157.
- Longley, M.J., Nguyen, D., Kunkel, T.A. and Copeland, W.C. (2001) The fidelity of human DNA polymerase gamma with and without exonucleolytic proofreading and the p53 accessory subunit. *J Biol Chem*, **276**, 38555-38562.
- Lowell, B.B. and Spiegelman, B.M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, **404**, 652-660.
- Mandavilli, B.S., Santos, J.H. and Van Houten, B. (2002) Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res*, **509**, 127-151.
- Mannella, C.A. (1998) Conformational changes in the mitochondrial channel protein, VDAC, and their functional implications. *J Struct Biol*, **121**, 207-218.
- Marzo, I., Brenner, C., Zamzami, N., Jurgensmeier, J.M., Susin, S.A., Vieira, H.L., Prevost, M.C., Xie, Z., Matsuyama, S., Reed, J.C. and Kroemer, G. (1998) Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*, **281**, 2027-2031.
- McCulloch, V., Seidel-Rogol, B.L. and Shadel, G.S. (2002) A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine. *Mol Cell Biol*, **22**, 1116-1125.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2001) Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol Cell Biol*, **21**, 2337-2348.
- Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Birke, R.L., Zheng, D., Lutterodt, L. and Haines, T.H. (2001) Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Lett*, **507**, 187-190.
- Moraes, C.T., Kenyon, L. and Hao, H. (1999) Mechanisms of human mitochondrial DNA maintenance: the determining role of primary sequence and length over function. *Mol Biol Cell*, **10**, 3345-3356.
- Morais, R. (1996) Isolation of avian mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol*, **264**, 296-304.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. and Brunner, M. (1999) The TIM17.23 preprotein translocase of mitochondria: composition and function in protein transport into the matrix. *Embo J*, **18**, 3667-3675.
- Mortensen, E.R., Marks, P.A., Shiotani, A. and Merchant, J.L. (1997) Epidermal growth factor and okadaic acid stimulate Sp1 proteolysis. *J Biol Chem*, **272**, 16540-16547.

- Murakami, K. and Mori, M. (1990) Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. *Embo J*, **9**, 3201-3208.
- Narita, M., Shimizu, S., Ito, T., Chittenden, T., Lutz, R.J., Matsuda, H. and Tsujimoto, Y. (1998) Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 14681-14686.
- Nass, M.M. (1970) Abnormal DNA patterns in animal mitochondria: ethidium bromide-induced breakdown of closed circular DNA and conditions leading to oligomer accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **67**, 1926-1933.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Attardi, G. and Holt, I.J. (2001) Impaired ATP synthase assembly associated with a mutation in the human ATP synthase subunit 6 gene. *J Biol Chem*, **276**, 6755-6762.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S. and Carruba, M.O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, **299**, 896-899.
- Pfanner, N. and Wiedemann, N. (2002) Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 400-411.
- Pivovarova, N.B., Hongpaisan, J., Andrews, S.B. and Friel, D.D. (1999) Depolarization-induced mitochondrial Ca accumulation in sympathetic neurons: spatial and temporal characteristics. *J Neurosci*, **19**, 6372-6384.
- Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B. and Spiegelman, B.M. (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science*, **286**, 1368-1371.
- Radsak, K., Kato, K., Sato, N. and Koprowski, H. (1971) Effect of ethidium bromide on mitochondrial DNA and cytochrome synthesis in HeLa cells. *Exp Cell Res*, **66**, 410-416.
- Raha, S. and Robinson, B.H. (2001) Mitochondria, oxygen free radicals, and apoptosis. *Am J Med Genet*, **106**, 62-70.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B. (1998) Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 20150-20155.
- Renard, P., Ernest, I., Houbion, A., Art, M., Le Calvez, H., Raes, M. and Remacle, J. (2001) Development of a sensitive multi-well colorimetric assay for active NFkappaB. *Nucleic Acids Res*, **29**, E21.
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A. and Pozzan, T. (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, **280**, 1763-1766.
- Roos, M.D., Su, K., Baker, J.R. and Kudlow, J.E. (1997) O glycosylation of an Sp1-derived peptide blocks known Sp1 protein interactions. *Mol Cell Biol*, **17**, 6472-6480.
- Saraste, M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*, **283**, 1488-1493.
- Scaduto, R.C., Jr. and Grotyohann, L.W. (1999) Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys J*, **76**, 469-477.
- Scarpulla, R.C. (1997) Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 109-119.
- Scarpulla, R.C. (2002) Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1576**, 1-14.
- Schleiff, E., Shore, G.C. and Goping, I.S. (1997) Interactions of the human mitochondrial protein import receptor, hTom20, with precursor proteins in vitro reveal pleiotropic

- specificities and different receptor domain requirements. *J Biol Chem*, **272**, 17784-17789.
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G. and Schatz, G. (1991) Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *Embo J*, **10**, 247-254.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature*, **371**, 768-774.
- Schon, E.A., Bonilla, E. and DiMauro, S. (1997) Mitochondrial DNA mutations and pathogenesis. *J Bioenerg Biomembr*, **29**, 131-149.
- Seelan, R.S. and Grossman, L.I. (1997) Structural organization and promoter analysis of the bovine cytochrome c oxidase subunit VIIc gene. A functional role for YY1. *J Biol Chem*, **272**, 10175-10181.
- Shadel, G.S. and Clayton, D.A. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*, **66**, 409-435.
- Shang, J. and Clayton, D.A. (1994) Human mitochondrial transcription termination exhibits RNA polymerase independence and biased bipolarity in vitro. *J Biol Chem*, **269**, 29112-29120.
- Shaw, J.M. and Nunnari, J. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol*, **12**, 178-184.
- Sheng, M., Thompson, M.A. and Greenberg, M.E. (1991) CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, **252**, 1427-1430.
- Shimizu, S., Ide, T., Yanagida, T. and Tsujimoto, Y. (2000) Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome c. *J Biol Chem*, **275**, 12321-12325.
- Shimizu, S., Narita, M. and Tsujimoto, Y. (1999) Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*, **399**, 483-487.
- Shoffner, J.M., Brown, M.D., Stugard, C., Jun, A.S., Pollock, S., Haas, R.H., Kaufman, A., Koontz, D., Kim, Y., Graham, J.R. and et al. (1995) Leber's hereditary optic neuropathy plus dystonia is caused by a mitochondrial DNA point mutation. *Ann Neurol*, **38**, 163-169.
- Smith, C.A. (1977) Absence of ethidium bromide induced nicking and degradation of mitochondrial DNA in mouse L-cells. *Nucleic Acids Res*, **4**, 1419-1427.
- Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Brenner, C., Larochette, N., Prevost, M.C., Alzari, P.M. and Kroemer, G. (1999) Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*, **189**, 381-394.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G. (2000) Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol Reprod*, **63**, 582-590.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K. and Takahashi, R. (2001) A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell*, **8**, 613-621.
- Suzuki, Y., Ono, Y. and Hirabayashi, Y. (1998) Rapid and specific reactive oxygen species generation via NADPH oxidase activation during Fas-mediated apoptosis. *FEBS Lett*, **425**, 209-212.
- Tan, D.P., Nonaka, K., Nuckolls, G.H., Liu, Y.H., Maxson, R.E., Slavkin, H.C. and Shum, L. (2002) YY1 activates Msx2 gene independent of bone morphogenetic protein signaling. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1213-1223.

- Thayer, S.A., Usachev, Y.M. and Pottorf, W.J. (2002) Modulating Ca²⁺ clearance from neurons. *Front Biosci*, **7**, d1255-1279.
- Thompson, C.C., Brown, T.A. and McKnight, S.L. (1991) Convergence of Ets- and notch-related structural motifs in a heteromeric DNA binding complex. *Science*, **253**, 762-768.
- Truscott, K.N., Brandner, K. and Pfanner, N. (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr Biol*, **13**, R326-337.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. and Wagner, R. (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol*, **8**, 1074-1082.
- Verhagen, A.M., Ekert, P.G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L.M., Reid, G.E., Moritz, R.L., Simpson, R.J. and Vaux, D.L. (2000) Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, **102**, 43-53.
- Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. (1991) Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol Cell Biol*, **11**, 5631-5638.
- Virbasius, J.V. and Scarpulla, R.C. (1994) Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 1309-1313.
- Voisine, C., Craig, E.A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N. and Voos, W. (1999) The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell*, **97**, 565-574.
- Voos, W. and Rottgers, K. (2002) Molecular chaperones as essential mediators of mitochondrial biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, **1592**, 51-62.
- Wallace, D.C., Zheng, X.X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M. and Hopkins, L.C. (1988) Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell*, **55**, 601-610.
- Walton, K.M., Rehfuss, R.P., Chrivia, J.C., Lochner, J.E. and Goodman, R.H. (1992) A dominant repressor of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-regulated enhancer-binding protein activity inhibits the cAMP-mediated induction of the somatostatin promoter in vivo. *Mol Endocrinol*, **6**, 647-655.
- Wan, B. and Moreadith, R.W. (1995) Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase VIa. *J Biol Chem*, **270**, 26433-26440.
- Weber, K., Bruck, P., Mikes, Z., Kupper, J.H., Klingenspor, M. and Wiesner, R.J. (2002) Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology*, **143**, 177-184.
- Weitzel, J.M., Kutz, S., Radtke, C., Grott, S. and Seitz, H.J. (2001) Hormonal regulation of multiple promoters of the rat mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene: identification of a complex hormone-response element in the ubiquitous promoter B. *Eur J Biochem*, **268**, 4095-4103.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Prinz, T., Ryan, M.T., Meisinger, C., Pfanner, N. and Truscott, K.N. (2003) Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome c: a unique relationship to the TOM machinery. *J Mol Biol*, **327**, 465-474.

- Wiedemann, N., Pfanner, N. and Ryan, M.T. (2001) The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *Embo J*, **20**, 951-960.
- Wu, B., Iwakiri, R., Ootani, A., Fujise, T., Tsunada, S. and Fujimoto, K. (2003) Platelet-activating factor promotes mucosal apoptosis via FasL-mediated caspase-9 active pathway in rat small intestine after ischemia-reperfusion. *Faseb J*, **17**, 1156-1158.
- Wu, H., Kanatous, S.B., Thurmond, F.A., Gallardo, T., Isotani, E., Bassel-Duby, R. and Williams, R.S. (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, **296**, 349-352.
- Yaffe, M.P. (1999) Dynamic mitochondria. *Nat Cell Biol*, **1**, E149-150.
- Yao, Y.L., Yang, W.M. and Seto, E. (2001) Regulation of transcription factor YY1 by acetylation and deacetylation. *Mol Cell Biol*, **21**, 5979-5991.
- Yeldandi, A.V., Rao, M.S. and Reddy, J.K. (2000) Hydrogen peroxide generation in peroxisome proliferator-induced oncogenesis. *Mutat Res*, **448**, 159-177.
- Zaid, A., Li, R., Luciakova, K., Barath, P., Nery, S. and Nelson, B.D. (1999) On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes. *J Bioenerg Biomembr*, **31**, 129-135.
- Zamzami, N. and Kroemer, G. (2001) The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 67-71.
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2002) Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem*, **277**, 43553-43556.
- Zou, H., Henzel, W.J., Liu, X., Lutschg, A. and Wang, X. (1997) Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell*, **90**, 405-413.

