



UNIVERSITÉ
DE NAMUR

University of Namur

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

researchportal.unamur.be

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Etude des effets d'une déficience en tripeptidyl peptidase-1 sur la population mitochondriale de fibroblastes humains

Demine, Stéphane

Award date:
2010

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

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

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

Take down policy

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



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

Faculté des Sciences

**Etude des effets d'une déficience en tripeptidyl peptidase-1 sur la population
mitochondriale de fibroblastes humains**

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

Stéphane DEMINE

Janvier 2010

Remerciements

Ce mémoire représente la fin de mon parcours de master en biologie. Ce dernier a été très enrichissant et m'a appris énormément de choses aussi bien au niveau scientifique, intellectuel qu'humain. Il est maintenant temps pour moi de remercier toutes les personnes qui m'ont permis, pour une raison ou une autre, de réaliser ce mémoire.

Je voudrais premièrement remercier Martine Raes, pour sa direction exemplaire du laboratoire pendant la première partie de mon mémoire bien sur, mais aussi pour le temps précieux et sa gentillesse qu'elle m'a témoignée lors de mon « accident » de travail. Je n'oublie pas non plus ses précieux conseils donnés lors de mes présentations au sein du laboratoire.

Je voudrais ensuite remercier grandement mon promoteur Thierry Arnould. Pour le temps qu'il m'a consacré, pour ses nombreuses corrections tant orales qu'écrites et ses précieux conseils. Désolé pour toutes ces longues heures que vous avez du subir à cause de moi. Merci aussi de m'avoir inspiré tout au long de mon travail grâce à votre dévouement, votre passion pour la science, votre sérieux et votre grande rigueur. Merci aussi pour les « coups de gueule » qui permettent de se remettre en question et d'avancer. Merci pour tous vos enseignements.

Je voudrais également remercier Michel Jadot, mon co-promoteur et directeur de l'URPHYM. Merci pour les conseils que vous avez prodigué à Guillaume Van Beersel et à moi pour la direction à suivre pour ce mémoire.

Merci ensuite à Guillaume Van Beersel. Je pourrais remplir la page si je devais citer tout ce que tu as fait pour moi donc je ne vais que résumer. Merci de m'avoir appris quasiment tout ce que je sais aujourd'hui, merci pour tes conseils, le temps que tu as parfois passé à rattraper mes conneries ou fais une partie d'expérience pour moi. Merci également pour le temps que tu as consacré à mes corrections, pour les articles en tout genre que tu m'as donnés et enfin, mais pas le moindre, pour avoir réussi à supporter mon sale caractère et mes coups de gueule au quotidien !

Je tiens ensuite aussi à remercier Isabelle Hamer. Merci pour votre gentillesse, votre disponibilité en cas de pépin et pour les nombreux conseils que vous m'avez prodigué tout au long de ce mémoire. Vous avez également toujours réussi à garder une neutralité certaine alors que vous faisiez partie de mon jury. Merci pour tout cela.

Mais que serait un laboratoire sans les techniciens qui y travaillent et nous permettent de réaliser nos expériences dans les meilleures conditions possibles ? Je remercierai tout d'abord Edouard Delaive pour ses conseils inestimables dans la réalisation de mes Western blots, pour sa grande disponibilité (y compris les temps de midi !) ainsi que sa bonne humeur et ses discussions enrichissantes. Je remercie également Noëlle Ninanne et Catherine Demazy pour leur disponibilité et leurs conseils pour la microscopie confocale. Merci aussi à Martine Van Steenbrugge et Antoine pour leurs conseils et leur gentillesse.

Je remercierai ensuite tous les mémorants de cette année. Il aurait été difficile de « survivre » sans vous à mes côtés. Tout d'abord Ludmilla Caesens-Koenig pour les moments de délire et la bonne humeur que tu dégages, le glandage des temps de midi mais aussi les nombreux conseils que tu m'as donnés. Je n'oublierai pas tes fonds d'écran de si tôt ! Merci aussi à

Sabrina Braibant pour sa gentillesse et surtout pour avoir subi mes conneries pendant dix mois sans trop broncher. C'était juste pour t'embêter et jamais méchant ;) ! Merci aussi de m'avoir supporté pendant une semaine complète à l'UCL lors de notre Winter School. Je remercie également Marie Genin et Diane Jacques pour votre gentillesse et les bons moments passés ensemble au bureau. Un merci plus général à vous tous, pour l'aide de dernière minute.

Merci également à mes parents pour m'avoir permis de réaliser ces études, d'avoir toujours cru en moi, pour m'avoir aidé et réconforté dans les moments difficiles et pour avoir supporté mes heures de charabia technique sur mes travaux au laboratoire auxquels vous ne compreniez rien mais que vous avez quand même écouté.

Et enfin, une dernière personne qui a permis la réalisation de ce mémoire : ma Sarah. Merci mon amour pour avoir supporté ma mauvaise humeur et mes coups de gueule pendant 10 mois, pour être restée là, lors des moments difficiles et pour m'avoir écouté. Merci pour tout l'amour que tu m'apportes au quotidien. Et j'en profite encore pour te dire une fois « Je t'aime ! ».

Merci également à tous les membres de mon jury. J'espère que vous prendrez autant de plaisir à lire ce mémoire que je n'en ai pris à le réaliser. Merci d'avance pour les commentaires enrichissants que vous pourrez me formuler.

Merci à vous tous ! Je vous souhaite d'avance, une agréable lecture !

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
[Ca ²⁺] _c	Concentration cytosolique en calcium libre
[Ca ²⁺] _m	Concentration mitochondriale en calcium libre
ADNmt	ADN mitochondrial
ADP	Adénosine DiPhosphate
Ala	Alanine
Ambra1	Activating Molecule in Beclin 1-Regulated Autophagy
AMC	Amido-4-Méthylcoumarine
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
ANT2	Adenine Nucleotide Translocator 2
AP-1	Adaptator Protein-1
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ASB	Albumine Sérique Bovine
Atg	Autophagy related
ATGs	AuTophagy-related proteins
ATP	Adénosine TriPhosphate
Bak	Bcl-2 Antagonist/Killer
Bax	Bcl-2 Associated X Protein
BFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
CaMKII	Calmoduline Kinase II
CaMKIV	Calmoduline Kinase IV
CDG-1A	Congenital Disorder of Glycosylation syndrome 1 A
Cl ⁻	Chlore
CLN	Céroïde Lipofuscine Neuronale
CLN	Céroïde Lipofuscine Neuronale
CMH II	Complexe Majeur d'Histocompatibilité II
c-MYC	c-MYC myelocytomatosis viral oncogene homolog
COOH	Carboxy
CREB	cAMP-Response Element-Binding protein
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein 1
Dlp1	Dynamin-Like Protein 1
Drp1	Dynamin-Related Protein 1
EDTA	Ethylène Diamine Tetra-Acétique acid
ERAD	Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation
ERR	Estrogen-Related Receptor
Fe	Fer

GAG	GlycoAminoGlycan
GalNac	N-Acetyl galactosamine
GBAP	GA Binding Protein
GED	GTP Effector Domain
GGA	Golgi-localised, Gamma-ear containing ARF (ADP ribosylation factor)-binding protein
GlcNac	N-acetyl glucosamine
Grp75	75 kDa Glucose-Regulated Protein
H ⁺	Proton
HR	Hydrophobic Heptad Repeat
Hsc-70	Heat Shock Cognate protein of 70 kDa
HSP	Heavy Strand Promoter
HUVEC	Human Umbelical Vein Endothelial Cell
i-AAA	Intermembrane oriented protease
I-Cell disease	Inclusion-Cell disease
IL-1 β	Interleukine-1 β
IMP	Inner Membrane Protease
IP-3R	Inositol-3-Phosphate
IRAK	Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase
Ire1	Inositol Requirement 1
I κ B	Inhibitor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
JAK	Janus Kinase
KFERQ	Lysine (K), Phenylalanine (F), Acide glutamique (E), Arginine (R), Glutamine (Q)
LAMP-1	Lysosomal-Associated Membrane Protein-1
LAMP-2	Lysosomal-Associated Membrane Protein-2
LC3	Microtubule-Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha
LDL	Low Density Lipoprotein
LIMP	Lysosomal Integral Membrane Protein
LINCL	Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis
LPS	LipoPolySaccharide
LSP	Light Strand Promoter
M6-P	Mannose-6-Phosphate
m-AAA	mitochondrial Matrix oriented protease
Man	Mannose-6-Phosphate
MAP	Mitogen Activated Protein
MARCH5	Membrane-Associated Ring Finger 5
MCS	Mucopolysaccharidose
Mdm33	Mitochondrial Distribution and Morphology 33
Mdv1	Mitochondrial Division protein 1
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MEM	Minimal Essential Medium
MET	Microscopie Electronique à Transmission
Mfn	Mitofusine

MitoPLD	Mitochondrial Phospholipase D
ML-IV	Mucopolidose de type IV
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
MPPs	Mitochondrial Processing Peptidases
MSL	Maladie de Surcharge Lysosomale
mtHSP70	mitochondrial Heat-Shock Protein of 70 kDa
mTOR	mechanistic Target Of Rapamycin
MTP18	Mitochondrial Protein of 18 kDa
mtSSB	mitochondrial Single Strand Binding proteins
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene
NAPDH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate
NCX	Sodium/Calcium Exchanger Antiporter
NFκB	Nuclear Kactor of Kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NOS	NO Synthase
Npc1	Niemann-Pick Type C1 Protein
Npc2	Niemann-Pick Type C2 Protein
NRF-1	Nuclear Respiratory Factor 1
NRF-2	Nuclear Respiratory Factor 2
NTF	Nuclear Transcription Factor
Opa1	Optic Atrophy factor 1
PAM	Presequence-Associated Motor
PARL	Presinilin-Associated Rhomboid-Like protease
Pcp1	Processing of cytochrome c peroxydase protein 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PGC-1	PPARγ Co-activator 1
Phe	Phenylalanine
PI3K	PhosphoInositol-3 Kinase
PKA	Protéine Kinase AMPc-dépendante
PLA	Phospholipase 2
POLγ	Polymérase γ
PRC	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma Coactivator-Related
qRT-PCR	Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RaM	Rapid uptake Mode
RE	Réticulum Endoplasmique
RIP140	Receptor-Interacting Protein 140
RNAi	RNA interference
ROS	Reactive Oxygen Species
RXR	Retinoid X Receptor
SAM	Sorting and Assembly Machinery
SAPs	Sphingolipid Activator Proteins
SCMAS	Subunit C Mitochondrial ATP Synthase

SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SENP5	SUMO1/sentrin/SMT3 specific peptidase 2
SERCA	Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SIRT1	Sirtuin 1
SMT3	Suppressor of Mif Two 3 Homolog 1
SOD	SuperOxyde Dismutase
Sp1	Special Protein 1
STAT	Signal Transducer And Transcription activator
STOML2	STOMatin-Like protein 2
SUMO1	SMT3 suppressor of mif two 3 homolog 1
SVF	Sérum de Veau Fœtal
Syt VIII	Synaptotagmine VIII
Tca	Tricarboxylic Acid
TEMED	Tétraméthyl Ethylène Diamine
Tfam	Mitochondrial Transcription Factor A
Tfb1m	Mitochondrial Transcription Factor B1
Tfb2m	Mitochondrial Transcription Factor B2
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TIM	Translocase of Inner Membrane
TLR4	Toll-Like Receptor 4
TNF-α	Tumor Necrosis Factor-α
TOM	Translocase of Outer Membrane
TPP-1	Tripeptidyl Peptidase 1
TRAF6	TNF Receptor-Associated Factor 6
UCM	Uniporteur Calcique Mitochondrial
Ucp	Uncoupling Protein
UPR	Unfolded Protein Response
UVRAG	Ultraviolet Irradiation Resistance-Associated Gene
VAMPS	Vesicle-Associated Membrane Proteins
VDAC	Voltage-Dependant Anion-selective Chanel
Vps	Vacuolar Protein-Sorting
XBP1	X-Box Binding Protein 1
YY1	Ying-Yang 1

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

Etude des effets d'une déficience en tripeptidyl peptidase-1 sur la population mitochondriale de fibroblastes humains

DEMINE Stéphane

Résumé

Les maladies de surcharge lysosomale sont des pathologies génétiques très fréquentes, caractérisées par une déficience de l'activité enzymatique d'une ou plusieurs hydrolases acides. Ce déficit induit une accumulation lysosomale de macromolécules, ne pouvant plus être dégradées. À l'heure actuelle, bien que les causes moléculaires et génétiques de ces maladies soient souvent identifiées, les réponses cellulaires à la surcharge lysosomale sont très peu connues. Afin de mieux comprendre les éventuelles voies de communication existantes entre le lysosome et la mitochondrie, nous avons étudié l'impact de la surcharge lysosomale sur la population mitochondriale dans des fibroblastes d'un patient atteint de Lipofuscinose Neuronale Céroïde Infantile Tardive. Les fibroblastes contrôles ayant été isolés à partir d'un donneur sain non apparenté, nous avons mis au point un modèle de restauration de l'activité TPP-1 dans des fibroblastes LINCL par endocytose d'une pro-enzyme recombinante de remplacement. Nous avons ensuite caractérisé la population mitochondriale dans les fibroblastes de patients d'un point de vue morphologique et fonctionnel. Bien que l'abondance ne soit pas modifiée dans les fibroblastes de patients, la morphologie des mitochondries est altérée et le réseau mitochondrial plus fragmenté dans ces cellules. Ceci pourrait être expliqué par une augmentation du recrutement mitochondrial de la protéine Drp1, un acteur central de la régulation de la fission mitochondriale. Cette fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules déficientes en TPP-1 est accompagnée d'une diminution des capacités mitochondriales d'importation de calcium, en réponse à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre. Cependant ni le potentiel de membrane mitochondriale, ni le contenu intracellulaire en ATP, ni la production mitochondriale de radicaux libres dérivés de l'oxygène ne semble être modifiés dans les fibroblastes issus de patients.

Cette étude a donc permis de mettre en évidence un certain nombre de changements et de dysfonctionnements mitochondriaux dans des fibroblastes présentant une déficience en TPP-1. Elle a également ouvert des pistes pour l'étude des communications inter-organites dans le cadre des maladies de surcharge lysosomale.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2010

Promoteur: T. Arnould

Co-promoteur: M. Jadot

1. Table des matières

1. TABLE DES MATIERES	1
2. INTRODUCTION.....	4
2.1. AVANT-PROPOS – COMMUNICATION INTER-ORGANITES.....	4
2.2. LES LYSOSOMES	4
2.2.1. <i>Structure des lysosomes</i>	4
2.2.2. <i>Biogenèse des lysosomes</i>	5
2.2.2. <i>Fonctions des lysosomes</i>	5
2.2.2.1. Les lysosomes et la dégradation de macromolécules	5
2.2.2.1.1. La voie endocytaire	5
2.2.2.1.2. L'autophagie et la mitophagie	6
2.2.2.2. Les lysosomes et l'homéostasie du cholestérol intracellulaire.....	7
2.2.2.3. Le lysosome et la mort cellulaire par apoptose.....	7
2.2.2.4. Le lysosome et la réparation de la membrane plasmique.....	8
2.3. LES MALADIES DE SURCHARGE LYSOSOMALE	8
2.3.1. <i>Généralités</i>	8
2.3.2. <i>Les lipofuscinoses céréoïdes neuronales</i>	9
2.3.2.1. Généralités	9
2.3.2.2. Lipofuscine et céréoïde.....	9
2.3.2.3. La CLN infantile tardive.....	10
2.3.3. <i>Les traitements des maladies de surcharge lysosomale</i>	11
2.3.4. <i>Les réponses cellulaires et voies de signalisation activées en réponse à une surcharge lysosomale</i>	11
2.4. LA MITOCHONDRIE	13
2.4.1. <i>Structure et fonctions de la mitochondrie</i>	13
2.4.2. <i>La respiration mitochondriale</i>	13
2.4.3. <i>La mitochondrie et la production de radicaux libres</i>	13
2.4.4. <i>La biogenèse mitochondriale</i>	14
2.4.4.1. La régulation de la biogenèse mitochondriale	14
2.4.4.1.1. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale	14
2.4.4.1.2. Les co-activateurs impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale	16
2.4.4.1.3. Principales conditions augmentant la biogenèse mitochondriale.....	16
2.4.4.2. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale	17
2.4.4.2.1. La machinerie d'importation protéique mitochondriale	17
2.4.4.2.2. La réplication du génome mitochondrial	17
2.4.5. <i>Le contrôle de la morphologie des mitochondries</i>	18
2.4.5.1. Le processus de fusion mitochondriale	18
2.4.5.1.1. Mitofusines.....	18
2.4.5.1.2. Opa1	19
2.4.5.2. Le processus de fission mitochondriale	20
2.4.5.2.1. Drp1.....	21
2.4.5.2.2. Fis1	21
2.4.5.3. Conditions altérant la morphologie mitochondriale.....	21
2.4.5.4. Dysfonctionnement des mécanismes de fusion et fission mitochondriales dans les maladies neurodégénératives et les maladies de surcharge lysosomale	23
2.4.6. <i>L'homéostasie du calcium mitochondrial</i>	24
2.4.6.1. Les fonctions mitochondriales du calcium.....	24
2.4.6.2. L'importation mitochondriale de calcium.....	25
2.4.6.2.1. L'importation à travers la MME.....	25
2.4.6.2.1.1. L'uniprotéine calcique mitochondriale	25
2.4.6.2.1.2. Le Rapid Uptake Mode	26
2.4.6.2.1.3. Le rôle de la matrice mitochondriale	26
2.4.6.3. L'exportation mitochondriale de calcium	26
2.4.6.4. Dysfonctionnements de l'homéostasie du calcium dans les maladies de surcharge lysosomale.....	26
2.5. CONTEXTE DE LA RECHERCHE ET OBJECTIFS DE CE MEMOIRE.....	27
3. MATERIEL ET METHODES.....	29
3.1. CULTURE CELLULAIRE	29
3.1.1. <i>Lignées cellulaires utilisées</i>	29
3.1.2. <i>Cultures et sous-cultures cellulaires</i>	29

3.2. DOSAGE DES PROTEINES SELON LA METHODE DE BRADFORD.....	29
3.2.1. Principe.....	29
3.2.2. Matériel et méthode.....	30
3.3. DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA TRIPEPTIDYL PEPTIDASE 1.....	30
3.3.1. Principe.....	30
3.3.2. Matériel et méthode.....	31
3.3.2.1. Sous-culture et préparation du lysat cellulaire.....	31
3.3.2.2. Dosage enzymatique de l'activité TPP-1.....	31
3.4. RESTAURATION DE L'ACTIVITE TPP-1 DES FIBROBLASTES LINCL.....	31
3.4.1. Principe.....	31
3.4.2. Matériel et méthode.....	32
3.5. ANALYSES EN CYTOMETRIE DE FLUX.....	32
3.5.1. Principe de la cytométrie en flux.....	32
3.5.2. Estimation de l'abondance de la population mitochondriale.....	32
3.5.2.1. Principe.....	32
3.5.2.1. Matériel et méthodes.....	33
3.5.3. Mesure du potentiel de membrane mitochondriale.....	33
3.5.3.1. Principe.....	33
3.5.3.2. Matériel et méthodes.....	33
3.5.4. Mesure de la concentration cytosolique libre en calcium.....	34
3.5.4.1. Principe.....	34
3.5.4.2. Matériel et méthodes.....	34
3.6. OBSERVATION DE LA MORPHOLOGIE DE LA POPULATION MITOCHONDRIALE.....	35
3.7. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE.....	35
3.7.1. Principe.....	35
3.7.2. Sous-culture et fractionnement cellulaire.....	35
3.7.3. Dosage des activités enzymatiques de la β -galactosidase et de la cytochrome c oxydase.....	36
3.7.3.1. Principe.....	36
3.7.3.2. Matériel et méthode du dosage enzymatique de la β -galactosidase.....	36
3.7.3.3. Matériel et méthode du dosage enzymatique de la cytochrome c oxydase.....	37
3.8. ANALYSE DE L'ABONDANCE PROTEIQUE PAR GEL SDS-PAGE, WESTERN BLOT ET DETECTION EN FLUORESCENCE.....	37
3.8.1. Principe.....	37
3.8.2. Matériel et méthode.....	37
3.8.2.1. Préparation des lysats clairs.....	37
3.8.2.2. Préparation des gels SDS-PAGE.....	38
3.8.2.3. Transfert des protéines sur une membrane PVDF.....	38
3.8.2.4. Incubation de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires.....	39
3.8.2.5. Révélation et quantification.....	39
3.9. MESURE DE L'ABONDANCE MITOCHONDRIALE EN $O_2^{\bullet -}$	39
3.9.1. Principe.....	39
3.9.2. Matériel et méthodes.....	40
3.10. MESURE DE LA CONCENTRATION EN CALCIUM MATRICIELLE MITOCHONDRIALE PAR MARQUAGE AU X-RHOD 5F.....	40
3.10.1. Principe.....	40
3.10.2. Matériel et méthode.....	40
3.11. RT-PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL.....	41
3.11.1 Principe.....	41
3.11.2. Matériel et méthodes.....	41
3.11.2.1. Sous-culture.....	41
3.11.2.2. Extraction d'ARN total.....	41
3.11.2.3. Dosage de l'ARN.....	42
3.11.2.4. Transcription inverse.....	42
3.11.2.5. qRT-PCR en temps réel.....	42
3.11.2.6. Analyse des résultats.....	43
3.12. DOSAGE DE L'ATP INTRACELLULAIRE.....	43
3.12.1. Principe.....	43
3.12.2. Matériel et méthode.....	43
4. RESULTATS ET DISCUSSION.....	45
4.1. AVANT-PROPOS - CARACTERISTIQUES DU MODELE CELLULAIRE ETUDIE.....	45
4.2. MISE AU POINT D'UN DOSAGE DE L'ACTIVITE TPP-1 ET RESTAURATION DE L'ACTIVITE DE L'ENZYME DANS DES FIBROBLASTES LINCL.....	46

4.2.1. Mise au point d'un dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1.....	46
4.2.2 Modèle de restauration de l'activité enzymatique TPP-1 des fibroblastes LINCL.....	47
4.3. ETUDE DES EFFETS D'UNE DEFICIENCE DE LA TPP-1 SUR L'ABONDANCE ET LA MORPHOLOGIE DE LA POPULATION MITOCHONDRIALE	49
4.4. ETUDE DE L'EFFET D'UNE DEFICIENCE EN TPP-1 SUR L'ABONDANCE ET LE RECRUTEMENT DE DRP1	51
4.5. ETUDE DE L'EFFET DE LA DEFICIENCE EN TPP-1 SUR LE POTENTIEL DE MEMBRANE ET LA PRODUCTION MITOCHONDRIALE DE RADICAUX LIBRES.....	52
4.6. ETUDE D'UNE DEFICIENCE EN TPP-1 SUR LA CONCENTRATION MITOCHONDRIALE RELATIVE EN CALCIUM CYTOSOLIQUE ET MATRICIEL DES FIBROBLASTES LINCL.....	55
4.7. ETUDE DE L'ABONDANCE PROTEIQUE DE TOM20, TOM40 ET DE LA SOUS-UNITE B DE LA F ₀ /F ₁ ATPSYNTHASE MITOCHONDRIALE	58
4.8. EFFET DE LA DEFICIENCE EN TPP-1 SUR LE TRANSCRIT DU GENE <i>ATP5B</i>	59
4.9. EFFET D'UNE DEFICIENCE EN TPP-1 SUR LE CONTENU INTRACELLULAIRE EN ATP.....	60
5. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	62
6. BIBLIOGRAPHIE.....	67

2. Introduction

2.1. Avant-propos – Communication inter-organites

Il a longtemps été pensé que les organites cellulaires étaient des compartiments isolés et qu'ils n'interagissaient pas ou peu entre eux. Cependant plusieurs voies de communications inter-organites ont récemment pu être mises en évidence. Parmi celles-ci, la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) est activée en réponse à la séquestration et à l'accumulation de protéines mal ou non repliées dans le réticulum endoplasmique (RE).

Elle agit tout d'abord sur l'afflux de protéines vers le RE, en diminuant la synthèse protéique, ainsi que leur translocation à l'intérieur du RE. Le second niveau est une activation de la transcription des gènes impliqués dans le repliement des protéines, comme des protéines chaperonnes, ainsi que l'activation de l'ERAD (ER-Associated Degradation). Le mécanisme d'action d'une protéine impliquée dans cette réponse, Ire1, est présentée à la **figure 2.1** (Ron *et al.*, 2007).

Une communication de type rétrograde entre la mitochondrie et le noyau a également pu être mise en évidence. En effet, une mitochondrie non fonctionnelle peut activer certaines voies de signalisation afin de renseigner la cellule sur son état. Par exemple, une inhibition du potentiel de membrane mitochondriale peut conduire à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium ($[Ca^{2+}]_c$) et à l'activation de la CaMKIV (*Calmoduline Kinase IV*). Cette dernière peut alors phosphoryler le facteur de transcription CREB (*cAMP-Responsive Element-Binding protein*) sur la sérine 133 conduisant à son activation et à la transcription de ses gènes cibles nucléaires (Arnould *et al.*, 2002).

Plusieurs voies de communication existent donc entre les organites. Dans ce travail, nous nous intéresserons aux possibles altérations que peut subir la population mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement lysosomal. Dans l'introduction de ce travail, nous décrirons la structure et les fonctions de deux organites : le lysosome et la mitochondrie, mais également les implications respectives de ces organites dans diverses maladies de surcharge lysosomale (MSL). Nous décrivons enfin les objectifs de ce travail.

2.2. Les lysosomes

2.2.1. Structure des lysosomes.

Le lysosome est un organite cellulaire, ubiquiste, d'un diamètre moyen de 500 nm, de contenu hétérogène et délimité par une bicouche lipidique simple enrichie en diverses glycoprotéines. Parmi celles-ci, nous pouvons citer les LAMP-1 et LAMP-2 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein-1 and -2*) et les LIMPs (*Lysosomal Integral Membrane Protein*). La structure ainsi que les principales protéines membranaires du lysosome sont reprises à la **figure 2.2**. Bien que les fonctions des protéines LAMPs soient encore sujettes à débat, on suspecte que ces protéines puissent jouer un rôle dans la biogenèse lysosomale, le trafic du cholestérol et l'autophagie (Eskelinen, 2006). La glycosylation des protéines LAMP-1 et LAMP-2 permettrait une stabilisation de celles-ci dans la lumière lysosomale (Kundra *et al.*, 1999) ainsi qu'une protection de la membrane lysosomale vis-à-vis du contenu du lysosome (Hunziker *et al.*, 1996). La membrane lysosomale contient également des transporteurs d'ions comme des protons (H^+) ou du chlore (Cl^-) mais également de métabolites comme la cystinosine. Ce dernier est un canal protéique impliqué dans l'exportation de cystine à partir de la lumière lysosomale vers le cytosol (Futerman *et al.*, 2004; Saftig *et al.*, 2008). D'autres protéines lysosomales membranaires comme les VAMPS

(*Vesicle-Associated Membrane Proteins*) sont impliquées dans la fusion du lysosome avec d'autres lysosomes ou d'autres organites tels que des endosomes ou des phagosomes (Luzio *et al.*, 2007). La lumière lysosomale contient, quant à elle, plus de 50 hydrolases acides connues à ce jour (Futerman *et al.*, 2004). Celles-ci comprennent des lipases, des phospholipases, des protéases, des glycosidases, des nucléases, des phosphatases et des sulfatases (Bruce Alberts, 2004). Ces enzymes catalysent essentiellement la dégradation de macromolécules afin de permettre la réutilisation des molécules qui en sont issues. Enfin, la présence d'une pompe à protons (Type-V H⁺-ATPase) permet le maintien d'un pH compris entre 5,2 et 5,5. Ce dernier est notamment nécessaire à une activité optimale des hydrolases acides (Nelson *et al.*, 1999).

2.2.2. Biogenèse des lysosomes

Le transport des hydrolases acides néosynthétisées dans le RE vers le lysosome peut se faire par plusieurs voies différentes. La première, ou voie directe, requiert l'acquisition d'un signal mannose-6-phosphate (*M6-P*) par les hydrolases acides néosynthétisées au cours de leur trafic dans le réseau *trans*-Golgi, ce qui permet un adressage lysosomal de celles-ci (**Figure 2.3**) (Saftig *et al.*, 2009). La deuxième, ou voie indirecte, moins connue, comporte un adressage des hydrolases acides lysosomales vers la membrane plasmique par la voie sécrétoire et une récupération de ces dernières par des récepteurs membranaires à mannose, permettant l'endocytose fluide de ces enzymes et leur adressage final vers le lysosome (Elvevold *et al.*, 2008). D'autres protéines lysosomales utilisent, quant à elles, des mécanismes plus spécifiques. Par exemple, la sortiline, une glycoprotéine transmembranaire de l'appareil de Golgi, permet un adressage lysosomal de la spingomyelinase acide et des SAPs (*Sphingolipid Activator Proteins*) (Ni *et al.*, 2006). Une fois ces enzymes liées à la sortiline, la partie COOH-terminale de celle-ci médie la liaison des protéines adaptatrices AP-1 (*Adaptator Protein-1*) et GGA (*Golgi-localised, gamma-ear containing, ARF (ADP ribosylation factor)-binding proteins*), afin de permettre la formation d'une vésicule recouverte de clathrine à partir de l'appareil de Golgi et l'adressage lysosomal de la spingomyelinase acide et des SAPs (Braulke *et al.*, 2009). Le transport de la β -glucocérébrosidase est quant à lui dépendant de la glycoprotéine LIMP2. Cette dernière agit en tant que récepteur à cette enzyme et l'acidification de la lumière lysosomale permet la libération de l'enzyme dans le lysosome (Reczek *et al.*, 2007). Enfin, la présence d'un motif dileucine ou tyrosine à l'extrémité COOH-terminale des protéines lysosomales, conduit également à leur liaison aux protéines AP-1 et GGAs (Saftig *et al.*, 2009) et à leur adressage lysosomal.

2.2.2. Fonctions des lysosomes

2.2.2.1. Les lysosomes et la dégradation de macromolécules

La présence de nombreuses hydrolases acides dans la lumière des lysosomes leur permet de jouer un rôle important dans la dégradation des macromolécules issues de l'endocytose (fluide ou médiée par récepteurs) ou de l'autophagie. Outre ce rôle dans la dégradation de macromolécules, certaines protéines lysosomales comme les cathepsines B, D, E et S sont également impliquées dans la dégradation des antigènes ainsi que dans l'excision du domaine invariable du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II), dans des lymphocytes (Zhang *et al.*, 2000).

2.2.2.1.1. La voie endocytaire.

Ce premier mécanisme d'apport de macromolécules au lysosome consiste en la formation d'une invagination à partir de la membrane plasmique afin de former une vésicule contenant une portion du liquide extracellulaire. Le substrat (comme des hormones ou des

facteurs de croissance) peut également être récupéré suite à la liaison à des récepteurs spécifiques, ceux-ci permettant également la liaison de protéines adaptatrices responsable du recouvrement de la vésicule par de la clathrine. La vésicule résultant de l'endocytose sera ensuite acheminée vers le lysosome par le système endosome-lysosome où le contenu y sera dégradé (Bruce Alberts, 2004).

2.2.2.1.2. L'autophagie et la mitophagie

L'autophagie est un processus de dégradation impliqué essentiellement dans le renouvellement des constituants cellulaires. On en distingue 3 types: 1) la microautophagie, caractérisée par la formation de petites vésicules contenant une portion du cytoplasme à partir de la membrane du lysosome (Marino *et al.*, 2004), 2) la macroautophagie, un processus débutant par la formation d'une double membrane originaire, vraisemblablement, d'un domaine du réticulum endoplasmique (Hayashi-Nishino *et al.*, 2009) et qui aboutit à la formation d'une vésicule englobant une région cytoplasmique. Cette vésicule appelée « autophagosome » (pouvant contenir des organites entiers comme la mitochondrie), fusionne ensuite avec le lysosome. Les mécanismes moléculaires simplifiés de l'autophagie sont repris à la **figure 2.4**. Enfin, 3) l'autophagie médiée par les chaperonnes consiste en la reconnaissance de la séquence d'acides aminés KFERQ (lysine, phenylalanine, acide glutamique, arginine, glutamine) portée par les protéines à dégrader, par un complexe de chaperonnes contenant notamment la protéine hsc70 (*Heat Shock Cognate protein of 70 kDa*). Ce complexe catalyse la linéarisation de la protéine ainsi que son importation au sein du lysosome au travers d'un hypothétique canal formé par LAMP-2a (Dice, 2007).

L'autophagie joue un rôle important dans la survie cellulaire en assurant le recyclage des molécules simples par dégradation de macromolécules existantes. Ce rôle est essentiel à la survie, notamment pour la vie fœtale, lors de la privation en nutriments produits par le placenta, induite par la rupture du cordon ombilical (Eskelinen *et al.*, 2009). Cette importance est notamment mise en évidence par la mort de souris déficientes en Atg5 ou en Atg7 dès le premier jour de vie (Schiaffino *et al.*, 2008). L'autophagie est cependant également impliquée dans le processus de mort cellulaire, ou mort cellulaire de type II. Par exemple une sécrétion d'ecdysone, une molécule intervenant dans la mue et le contrôle de la reproduction des arthropodes, est responsable de la mort cellulaire par autophagie de certains tissus, lors de la métamorphose de la larve de *Drosophile*. Celle-ci induit une inhibition de la voie des PI3K (Phospho-inositol-3 kinases) et conduit ainsi à une activation de la mort cellulaire par autophagie (Codogno *et al.*, 2005).

L'autophagie peut également être hautement sélective. En effet, les peroxyosomes sont dégradés, seuls, grâce à la protéine péroxyosomale peroxin 14, permettant la reconnaissance de cet organite par les mécanismes de l'autophagie, et la dégradation sélective de cet organite (Bellu *et al.*, 2001). De nombreuses études montrent également que l'autophagie de la mitochondrie, ou mitophagie, est sélective. Ce processus consiste en l'enveloppement de la mitochondrie dans un autophagosome, qui pourra ensuite fusionner avec un lysosome afin de conduire à la dégradation de son contenu. Il a été proposé que la mitophagie soit essentielle à la dégradation des mitochondries non fonctionnelles. Par exemple, l'endommagement des mitochondries par un laser est directement suivie de leur enveloppement par une vésicule contenant des protéines LC3-II, preuve d'une mitophagie suivant les éventuels dommages subits par les mitochondries (Kim *et al.*, 2007). Enfin, la mitophagie est également facilitée par une absence de fusion mitochondriale, conduisant ainsi à la fragmentation du réseau mitochondrial. Celui-ci aide la mitophagie mais ne l'induit pas pour autant (Twig *et al.*, 2008).

2.2.2.2. Les lysosomes et l'homéostasie du cholestérol intracellulaire

Outre son rôle dans la digestion et la maturation de nombreuses macromolécules, le lysosome est également un acteur important de l'homéostasie du cholestérol. Les lipoprotéines de faible densité (ou *Low Density Proteins*, LDL) sont impliquées dans le transport de lipides néosynthétisés par le foie vers les tissus périphériques (Goldstein *et al.*, 1977). Les LDLs sont internalisés par endocytose, après leur liaison à leur récepteur (LDL receptor) situé sur la membrane plasmique. Les vésicules peuvent ensuite fusionner avec les lysosomes où, une enzyme lysosomale, de type cholesteryl ester hydrolase, catalyse la déstérisation du cholestérol (Goldstein *et al.*, 1977). D'autres protéines lysosomales comme les protéines de Niemann-Pick c1 et c2 (Npc1 et Npc2) lient alors le cholestérol libre grâce au domaine de liaison aux stérols présent dans l'extrémité COOH-terminale de ces protéines, afin de médier son transport vers d'autres compartiments cellulaires (principalement le RE). Ce dernier mécanisme est peu compris mais il a été proposé que les protéines Npc1 et Npc2 puissent agir en tant que transporteurs de cholestérol, vers la lumière du compartiment cellulaire, ou en catalysant directement son intégration dans la bicouche lipidique (Storch *et al.*, 2009).

2.2.2.3. Le lysosome et la mort cellulaire par apoptose

De nombreuses données présentes dans la littérature laissent également penser que le lysosome pourrait jouer un rôle essentiel dans les mécanismes de mort cellulaire induite par l'apoptose. En effet, le déclenchement de l'apoptose induit une perméabilisation sélective de la membrane lysosomale (Madge *et al.*, 2003) conduisant à la libération dans le cytosol d'hydrolases acides telles que les cathepsines B, D et L. Cette sensibilisation sélective pourrait s'expliquer par la production et l'accumulation lysosomale de sphingosine. L'exposition chronique de cellules Jurkat à une faible concentration de sphingosine, induit en effet, une perméabilisation de la membrane lysosomale par un effet « détergent » (Kagedal *et al.*, 2001). Cet effet n'a cependant pas pu être montré sur des modèles de lysosomes isolés (Werneburg *et al.*, 2002). Une deuxième hypothèse propose qu'une production de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ou *Reactive Oxygen Species*, ROS), pourrait également induire une perméabilisation de cette membrane par oxydation de celle-ci ainsi que du contenu lysosomal. Il a ainsi été montré que de courtes expositions à de faibles concentrations en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) conduit à une activation de la PLA2 (Phospholipase 2), qui serait responsable de la perméabilisation du lysosome, par dégradation des phospholipides contenus dans celle-ci (Zhao *et al.*, 2001). Une fois libérées, les cathepsines B, D et L restent stables à pH 7.0 pendant plus d'une heure et peuvent alors induire le clivage de protéines, comme les procaspases-1 et 11 ainsi que la protéine pro-apoptotique Bid (Guicciardi *et al.*, 2004). Enfin, elles participent à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale, conduisant à la libération du cytochrome c, afin d'induire la mort cellulaire par apoptose. (Foghsgaard *et al.*, 2001; Guicciardi *et al.*, 2004).

Si le rôle de cet organelle dans des modèles *in vitro* semble être bien démontré, ce rôle semble incertain *in vivo*. L'injection d'anticorps agonistes de la protéine Fas dans le foie de souris vivantes, induit une mort cellulaire rapide par apoptose, sans toutefois qu'une perméabilisation du lysosome ne soit observée. Cependant, une injection d'une quantité moindre d'aFas conduit à une mort cellulaire par nécrose au cours de laquelle une perméabilisation de la membrane lysosomale et une libération du contenu de cet organelle est observée (Wattiaux *et al.*, 2007). Le rôle du lysosome dans l'activation de l'apoptose reste donc à controverse.

2.2.2.4. Le lysosome et la réparation de la membrane plasmique

Le lysosome est également impliqué dans la réparation de la membrane plasmique. En effet, une augmentation de la concentration cytosolique en calcium libre ($[Ca^{2+}]_c$) est observée en réponse à une blessure induite par une lame de scalpel dans un tapis cellulaire de fibroblastes. Celle-ci induit la fusion des lysosomes avec la membrane plasmique permettant ainsi la réparation de la membrane plasmique. Ce mécanisme dépend d'une isoforme lysosomale de la synaptotagmine, syt VII (Reddy *et al.*, 2001). Cette dernière est une protéine membranaire impliquée notamment dans l'arrimage et la fusion de vésicules avec la membrane présynaptique.

2.3. Les maladies de surcharge lysosomale

2.3.1. Généralités

L'importance physiologique du lysosome peut être mise en évidence par le grand nombre de pathologies résultant de son dysfonctionnement. En effet, près de cinquante maladies de surcharge lysosomale (MSL) différentes sont connues à ce jour (Futerman *et al.*, 2004). Ces maladies sont caractérisées par une accumulation intralysosomale de macromolécules non dégradées, en réponse à une déficience de l'activité enzymatique d'une ou de plusieurs hydrolases acides. Historiquement, les MSLs ont été classées selon le type de molécules s'accumulant au sein des lysosomes (**Tableau 2.1**). Toutefois, plusieurs maladies pouvant être caractérisées par une accumulation de substances comparables (comme la céréoïde dans les lipofuscinoses), l'utilisation d'une classification reposant sur le gène affecté dans ces pathologies est également intéressante (Futerman *et al.*, 2004). La plupart des MSLs sont des maladies monogéniques présentant un mode de transmission de type autosomique récessif. Cependant, plusieurs de ces maladies sont transmises de manière différente (Vellodi, 2005). Citons par exemple, la mucopolysaccharidose de type II (caractérisée par une déficience en iduronate sulfatase), la déficience en stéroïde sulfatase ainsi que la déficience en arylsulfatase E qui présentent une hérédité liée au chromosome X (Wraith *et al.*, 2008; Casarin *et al.*, 2009; Oji *et al.*, 2009). Les différents type de protéines lysosomales affectées et les principaux mécanismes moléculaires capables de provoquer ces maladies sont repris, respectivement, dans le **tableau 2.1** et à la **figure 2.5**.

Les manifestations cliniques des MSLs sont également très variées. Cependant la plupart de ces maladies se traduisent par des manifestations affectant le système nerveux central ou périphérique. Par exemple, la maladie de Gaucher, causée par un déficit en β -glucosidase qui est responsable de l'accumulation de glucocérébrosides dans la lumière lysosomale, se manifeste essentiellement par des symptômes résultant d'altérations du système nerveux central, mais également de conséquences périphériques. On distingue deux types de maladie de Gaucher. Le premier type, ou maladie de Gaucher non neuropathique est caractérisée par une organomégalie, une anémie, une thrombocytopénie ainsi qu'une atteinte osseuse (Sidransky, 2004). Le deuxième type, ou maladie de Gaucher neuropathique, se manifeste par l'apparition de symptômes tels qu'une ataxie, une démence profonde et des crises d'épilepsie (Sidransky, 2004). Mentionnons encore que certaines MSLs se traduisent par des symptômes essentiellement périphériques. En effet, les symptômes de la maladie de Fabry, causée par une déficience en α -galactosidase A, comportent essentiellement une déficience cardiaque et rénale ainsi que le développement de papules épidermiques (ou angiokératomes) (Schiffmann, 2009). Nous pouvons également dire que la nature et la sévérité des symptômes associés à chaque MSL dépendront essentiellement : 1) du tissu affecté, 2) du type de macromolécules qui s'accumulent mais également, 3) de l'activité enzymatique résiduelle de l'enzyme déficiente (Futerman *et al.*, 2004; Vellodi, 2005).

Parmi les nombreuses MSLs, nous nous intéresserons dans la suite de cette introduction aux Céroïdes Lipofuscinoses Neuronales (CLN). En effet, afin de pouvoir étudier les dysfonctionnements mitochondriaux éventuellement induits par une surcharge lysosomale, nous avons utilisé dans le cadre de ce mémoire, un modèle cellulaire fibroblastique permettant l'étude de la forme infantile tardive de CLN (« *Late Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinosis* » ou LINCL).

2.3.2. Les lipofuscinoses céroïdes neuronales

2.3.2.1. Généralités

Les CLNs sont des maladies génétiques récessives, affectant environ une naissance sur 30.000 (Augestad *et al.*, 2006). En raison de leur incidence élevée, ces pathologies sont considérées comme les maladies neurodégénératives les plus courantes chez l'enfant. Les CLNs résultent de mutations dans les gènes *CLN*. Ces gènes sont au nombre de 10 mais le produit génique est connu pour seulement 7 de ces gènes (*CLN1*, *CLN2*, *CLN3*, *CLN5*, *CLN6*, *CLN8*, *CLN10*) (Kyttala *et al.*, 2006). Le **tableau 2.2** reprend les différentes CLNs en fonction des gènes impliqués, de leur produit et de l'âge d'apparition des symptômes.

2.3.2.2. Lipofuscine et céroïde

Du point de vue cytologique, les CLNs sont caractérisées par l'accumulation lysosomale de céroïde, un lipopigment autofluorescent (λ abs: 360 nm; λ em: 539 nm). Ce dernier est composé de lipides (15%), de glucides (20%), de protéines (60%) mais aussi de métaux (2%). Parmi les protéines qui s'accumulent, on retrouve la sous-unité c de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale (40% de la céroïde) mais également des saposines et le précurseur de la protéine amyloïde β (Seehafer *et al.*, 2006). Cependant, même si la sous-unité c de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale semble être un substrat spécifique de TPP-1 (Ezaki *et al.*, 1999), l'accumulation de cette sous-unité se retrouve également dans d'autres CLNs que la CLN infantile tardive (caractérisée par une déficience en TPP-1) (Jolly *et al.*, 2002). Les raisons de cette accumulation sont encore inconnues à l'heure actuelle. Mentionnons également que le lipopigment céroïde présente certaines analogies avec la lipofuscine, un autre pigment autofluorescent, s'accumulant de manière physiologique au cours du vieillissement cellulaire et qui est également composé d'un agrégat de lipides, de glucides et de protéines oxydées (**Tableau 2.3**) (Seehafer *et al.*, 2006). Le mécanisme conduisant à la formation de la lipofuscine est encore hypothétique. Toutefois, il semblerait que les ROS produits par les mitochondries vieillissantes pourraient, *in fine*, conduire à l'oxydation et l'agrégation de protéines. Ces agrégats ne pouvant alors plus être dégradés par la protéasome, s'accumulent dans le lysosome. La présence de métaux dans la lipofuscine induit également une génération de ROS intralysosomale conduisant à la rupture de la membrane de cet organite et au déclenchement de l'apoptose (Jung *et al.*, 2007). En microscopie électronique à transmission (MET), la céroïde se présente sous la forme d'agrégats d'ultrastructure curvilinéaire, granulaire ou en « fingerprint » (**Figure 2.6**). La similitude entre ces deux composants permettent d'expliquer une mise en évidence de ces lipopigments par des colorants histochimiques semblables (Seehafer *et al.*, 2006).

Si l'accumulation de céroïde touche tous les types cellulaires, les neurones semblent être cependant le type cellulaire le plus affecté. En effet, on observe une dégénérescence massive par apoptose touchant essentiellement les motoneurones. Cette neurodégénérescence conduit à l'apparition de divers symptômes comme une cécité et une surdité précoce, une ataxie suivie d'une perte totale des facultés motrices, un retard mental ainsi que d'intenses crises d'épilepsies (Zhong, 2000). Enfin, on distingue les différentes CLNs selon l'âge

d'apparition des symptômes. Nous ne décrivons dans ce travail que la forme infantile tardive de l'enfant en raison du modèle cellulaire qui y est utilisé.

2.3.2.3. La CLN infantile tardive

La CLN infantile tardive est causée par des mutations situées dans le gène *CLN2* situé sur le chromosome 11 à l'emplacement p15 chez l'homme (Liu *et al.*, 1998). Ce gène code pour la tripeptidyl peptidase-1 (TPP-1), une hydrolase acide lysosomale, exprimée de manière ubiquiste dans les tissus humains et murins (Sleat *et al.*, 1997).

Parmi les mutations pouvant toucher le gène *CLN2*, deux semblent particulièrement fréquentes. La première mutation est constituée du remplacement de la guanine 3556 par une cytosine conduisant à une mutation *missense* (g.G3556C). La substitution de la guanosine 3670 en une cytosine conduit, quant à elle, à l'apparition d'un « codon stop » (p.R208X) dans la séquence protéique et à l'expression d'une protéine tronquée non fonctionnelle. Ces deux mutations comptent ensemble pour plus de 65% des mutations observées dans la CLN infantile tardive, dans la population norvégienne (Zhong *et al.*, 1998; Hartikainen *et al.*, 1999). Dans la majorité des cas, les mutations au sein du gène *CLN2* sont responsables d'une absence d'expression ou une production fortement diminuée de la TPP-1.

Une augmentation de l'abondance de la TPP-1 est notamment observée vers l'âge de 2 ans chez l'homme (Kurachi *et al.*, 2001). Toutefois la raison biologique d'une telle augmentation est encore inconnue à l'heure actuelle. La TPP-1 est synthétisée sous la forme d'un précurseur inactif de 66 kDa (563 acides aminés) capable de s'autoactiver par clivage protéolytique à pH acide dans le compartiment lysosomal afin de conduire à la forme mature et active de la protéine de 45 kDa (368 acides aminés) (Lin *et al.*, 2001). La TPP-1 est une enzyme bi-fonctionnelle caractérisée par deux activités enzymatiques distinctes. La première est une forte activité exopeptidase (pH optimal \approx 4.5) (Page *et al.*, 1993) et la seconde est une faible activité endoprotéase (Ezaki *et al.*, 2000), responsable de l'autoactivation de la TPP-1. Cette enzyme possède également cinq sites de glycosylation, tous glycosylés dans la forme active de la protéine. La glycosylation de cette protéine serait impliquée dans l'acquisition de la structure tertiaire de celle-ci (Golabek *et al.*, 2008). Le pro-segment de TPP-1 pourrait également agir en tant qu'inhibiteur de la TPP-1 (Golabek *et al.*, 2008).

Aucune séquence consensus spécifique de la reconnaissance et de clivage par la TPP-1 n'a été décrite à ce jour. Cependant plusieurs études ont permis de montrer grâce à l'utilisation de bibliothèques de peptides et à l'analyse des résidus situés en P3, P2, P1, P1' et P2' dans la séquence reconnue par la TPP-1 (le clivage par cette dernière ayant lieu entre les résidus P1 et P1'), une certaine spécificité de reconnaissance de résidus (**Figure 2.7**) (Tian *et al.*, 2006). Il semble également que la séquence d'acides aminés Ala-Ala-Phe soit une séquence spécifiquement reconnue et clivée par TPP-1 (Sohar *et al.*, 2000). Bien que la TPP-1 soit potentiellement capable de reconnaître de nombreux substrats à dégrader, seuls quelques uns d'entre eux sont connus. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer deux neurotransmetteurs du système nerveux central, la neuromédine-B (Kopan *et al.*, 2004), impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire, de la température corporelle ainsi que de la concentration sanguine en glucose ; la cholécystokinine, plus particulièrement impliquée dans les sensations de faim et de satiété (Bernardini *et al.*, 2002) ; la protéine pro-apoptotique Bid (Autefage *et al.*, 2009) ainsi que la sous-unité c de la F₀/F₁ ATPsynthase mitochondriale (Ezaki *et al.*, 1999).

L'accumulation de céroïde induite par la déficience en TPP-1 est observée dans tous les tissus des individus affectés (Goebel *et al.*, 2004). Toutefois, le système nerveux central est le plus sérieusement touché dans cette pathologie. En effet, on observe une neurodégénérescence massive par apoptose (principalement des cellules de Purkinje) dans le cervelet, ainsi que dans les neurones du striatum et de l'hippocampe (Jalanko *et al.*, 2009). A l'heure actuelle,

aucun lien n'a pu être mis en évidence entre l'accumulation primaire lysosomale de ce matériel, les conséquences cellulaires et tissulaires observés et les symptômes de la CLN infantile tardive (Kyttala *et al.*, 2006). Ces derniers sont variés et apparaissent vers l'âge de deux ans. Ils comportent des crises sévères d'épilepsie, un dysfonctionnement moteur dont la gravité s'étend d'une légère ataxie à une perte totale de la marche au stade terminal de la maladie. Une perte importante des fonctions cognitives et mentales ainsi qu'une déficience visuelle sévère allant jusqu'à la cécité ont aussi été signalées (Kyttala *et al.*, 2006). Ces altérations contribuent à une mort prématurée de l'enfant vers l'âge de 12-14 ans (Zhong, 2000).

2.3.3. Les traitements des maladies de surcharge lysosomale

Différents types de traitements pour certaines MSLs ont été développés et sont disponibles à l'heure actuelle. Toutefois soulignons que ces derniers ne permettent, en aucun cas, une guérison définitive. En effet, la majorité de ces stratégies thérapeutiques reposent sur un traitement des symptômes des MSLs, dans le but de ralentir la progression de la maladie et sont présentées à la **figure 2.8**. Certains traitements pour la CLN infantile tardive sont en cours de développement. Par exemple, Lobel et ses collaborateurs ont montré que l'incubation de neurones de patients atteints de CLN infantile tardive en présence d'une forme précurseur recombinante de la TPP-1 (produite par des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary cell*)) permet de restaurer l'activité TPP-1 lysosomale déficiente (Lin *et al.*, 2001). Cependant, encore très peu de MSLs peuvent être traitées grâce à cette méthode en raison d'une difficulté d'adressage de l'enzyme vers les cellules affectées et une instabilité de l'enzyme recombinante conduisant à une dégradation rapide et donc une diminution de son activité enzymatique (Futerman *et al.*, 2004).

Bien que les causes moléculaires conduisant au développement d'une MSL et les symptômes associés soient souvent identifiés, la compréhension des mécanismes moléculaires activés en réponse à un dysfonctionnement lysosomal est encore relativement fragmentaire. La connaissance de la réponse cellulaire à la surcharge lysosomale est pourtant primordiale car elle permettrait une meilleure compréhension de l'étiologie des symptômes de ces maladies, mais pourrait aussi conduire, à plus long terme, à la découverte de nouvelles thérapies. Nous allons dans la suite de cette introduction, vous donner un aperçu des connaissances actuelles sur les conséquences cellulaires d'une surcharge lysosomale.

2.3.4. Les réponses cellulaires et voies de signalisation activées en réponse à une surcharge lysosomale

Une première conséquence d'une surcharge lysosomale est une accumulation intralysosomale de substrats conduisant à altération physique de la structure du lysosome, comme une augmentation du diamètre de cet organelle. Ceci peut être observé par microscopie électronique à transmission (MET) (Siso *et al.*, 2004). Il peut également être raisonnable de penser que cette augmentation de volume pourrait conduire à une fragilisation accrue de la membrane lysosomale, pouvant alors plus facilement se rompre et déverser son contenu dans le cytosol. Ce phénomène peut être observé dans l'hémochromatose, une maladie de surcharge caractérisée par une accumulation de fer, dans laquelle il a été montré que la fragilité de la membrane lysosomale conduit à une libération du contenu du lysosome et à l'activation de l'apoptose (Peters *et al.*, 1976).

La surcharge lysosomale peut également altérer certaines voies de signalisation cellulaire. Dans les mucopolysaccharidoses, le glycoaminoglycan (GAG) un des produits accumulés, présente une analogie structurelle avec le lipopolysaccharide bactérien (LPS). Le GAG peut donc se lier au Toll-Like Receptor 4 (TLR4) et activer la voie de signalisation du

TLR4 ainsi qu'une réponse de type pro-inflammatoire causée par une augmentation de l'expression de nombreuses cytokines telles que l'IL-1 β , le TNF- α et le TGF- β (Simonaro *et al.*, 2008) (**Figure 2.9**). De plus, le lysolipide psychosine (la structure de cette molécule est schématisée à la **figure 2.10**) s'accumulant dans les cellules présentant une déficience en galactocérébroside (maladie de Krabbe), peut interférer avec la liaison du diacylglycérol de certaines protéines kinases C. Cette inhibition conduit alors à une diminution de la voie de signalisation en aval des récepteurs aux facteurs de croissance provoquant une croissance plus lentes des cellules de Schwann de patients *in vitro* (Yamada *et al.*, 1996).

On observe également une altération de l'homéostasie du cholestérol dans plusieurs MSLs et notamment dans la maladie de Niemann-Pick de type C, causée par un déficit en Npc-1. Son déficit induit une accumulation de cholestérol non estérifié et de sphingolipides dans les lysosomes et la membrane plasmique. Cet enrichissement en cholestérol de la membrane plasmique conduit, *in fine*, à une autophosphorylation inhibitrice du récepteur à l'insuline et à l'apparition d'une résistance à l'insuline, comparable à celle observée dans les diabètes de type II (Vainio *et al.*, 2005).

Une stimulation de l'autophagie causée par une augmentation de l'expression de la protéine Beclin-1 et une accumulation de la protéine LC3-II (Pacheco *et al.*, 2007) sont observés des fibroblastes de patients atteints de la maladie de Niemann-Pick de type C. La protéine Beclin-1 fait partie d'un complexe protéique notamment composé de Bif-1, UVRAG, Vps34, Vps15 et Ambra1. Ce complexe, tout comme la protéine LC3-II, catalysent la formation de l'autophagosome (Eskelinen *et al.*, 2009). L'augmentation de l'abondance de ces deux protéines induit donc une augmentation soutenue de l'autophagie qui conduit, *in fine*, à une mort cellulaire.

La surcharge lysosomale peut également altérer l'homéostasie cellulaire du calcium. On observe, par exemple, dans la maladie de Gaucher, une hypersensibilisation du récepteur à la ryanodine, présent à la surface du RE. Lors de la libération de glutamate par des neurones, l'activation de son récepteur induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$, rapide, transitoire et de faible amplitude. Le récepteur à la ryanodine sensibilisé est alors stimulé et une libération massive de calcium à partir des réserves du RE se produit. Cette libération peut être observée dans des microsomes et des neurones de patients (Korkotian *et al.*, 1999; Lloyd-Evans *et al.*, 2003). Cette sensibilité différentielle pourrait, en partie du moins, expliquer la neurotoxicité sélective des les neurones glutamatergiques observée dans la maladie de Gaucher. Une altération de l'homéostasie calcique est également observée dans les gangliosidoses à GM₁ et à GM₂. Les gangliosides GM₁ et GM₂ accumulés au cours cette maladie, sont en effet responsables d'une diminution du Vmax de la *sarco-endoplasmic Ca²⁺-ATPase* (SERCA) (Pelled *et al.*, 2003). Cette dernière est une pompe ATPasique assurant l'importation de calcium cytosolique dans le RE. L'inhibition de la pompe SERCA provoque donc le maintien prolongé d'une concentration élevée en calcium, causant une activation soutenue de la réponse UPR (Unfolded-Protein Response) et une activation subséquente de l'apoptose (Tessitore *et al.*, 2004).

Une accumulation lysosomale de substrats non dégradés peut également induire une altération de la biosynthèse de glycérophospholipides. Par exemple, l'accumulation lysosomale de gangliosides GM₂ est directement corrélée à une diminution de l'activité enzymatique de la phosphocholine cytidyl-*transférase* et de la phosphatidylsérine synthase. Ces enzymes catalysent, respectivement, la synthèse de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine. Toutefois, le lien reliant l'accumulation de substrat et la diminution de l'activité de ces enzymes est encore incompris à l'heure actuelle (Buccoliero *et al.*, 2004).

Dans le cadre des modifications et des réponses cellulaires à la surcharge lysosomale, il est également possible que certains organites, autres que les lysosomes, soient affectés dans celles-ci. Parmi ceux-ci, la mitochondrie est intéressante. En effet, elle représente la source

principale d'énergie cellulaire (Karp, 2004), le centre d'intégration de la mort cellulaire par apoptose (Kroemer, 2001) mais régule aussi l'homéostasie d'ions comme le calcium (Graier *et al.*, 2007). De plus, quelques études tendent à montrer l'importance de cet organite dans les MSLs mais aussi, plus généralement, dans les maladies neurodégénératives. Les connaissances actuelles dans le domaine, seront présentées plus tard au cours de travail. Nous allons donc poursuivre cette introduction par la description de la structure et des fonctions de cet organite.

2.4. La mitochondrie

2.4.1. Structure et fonctions de la mitochondrie

La mitochondrie est un organite des cellules eucaryotes de morphologie très variable, d'une taille comprise entre 1 et 4 μm et d'un diamètre variant entre 0,2 et 1 μm (Karp, 2004). La structure générale ainsi que les principaux groupes de protéines de la mitochondrie sont présentés à la **figure 2.11 A**. Toutefois signalons d'ores et déjà que la taille, la morphologie ainsi que l'organisation des mitochondries sont hautement dynamiques (**Figure 2.11 B**). En effet, les mitochondries peuvent former un réseau réticulé et subir des évènements de fusion et de fission continue (Liesa *et al.*, 2009).

2.4.2. La respiration mitochondriale

Une des fonctions principales de la mitochondrie est la production d'énergie sous forme d'ATP, par un processus appelé « respiration mitochondriale ». Cette dernière a lieu au sein de la MMI et repose sur la présence d'une chaîne de transport d'électrons composée de 4 complexes protéiques. La **figure 2.12** reprend un schéma fonctionnel de cette chaîne. Le transport d'électrons le long de celle-ci, induit une libération d'énergie et un transport de protons dans l'espace intermembranaire mitochondrial, par les différents complexes protéiques (I, III et IV). Un gradient électrochimique de protons, responsable de l'établissement d'un potentiel de membrane de part et d'autre de la MMI (180-220 mV). Ce gradient pourra ensuite être utilisé par le complexe V (F_0/F_1 ATPsynthase, la structure détaillée est reprise à la **Figure 2.13**) afin de synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique par chimiosmose. L'ATP produit sera ensuite exporté vers le cytosol par l'ANT (*Adenine Nucleotide Translocator*), un transporteur présent dans la MMI. Cet antiport catalyse l'échange électrogénique d'ADP (3 charges négatives) et d'ATP (4 charges négatives) entre le cytosol et la mitochondrie (Karp, 2004).

2.4.3. La mitochondrie et la production de radicaux libres

En conditions basales, la mitochondrie produit des radicaux libres dérivés de l'oxygène (ou ROS, Reactive Oxygen Species). En effet dans 2% des cas, des électrons peuvent quitter la chaîne de transport d'électrons et se fixer à une molécule d' O_2 ce qui conduit à la formation de ROS. Les réactions menant à l'apparition des différents ROS sont reprises à la **figure 2.14**. Ces évènements se produisent dans la majorité des cas au niveau des complexes I et III (Vergani *et al.*, 2004). La production de ROS mitochondriale est généralement faible. Toutefois, l'inhibition des complexes I et III au moyen de molécules pharmacologiques telles que respectivement, la roténone ou l'antimycine A, induit une augmentation de la production de ROS (Chen *et al.*, 2003) (Jezek *et al.*, 2009).

Plusieurs mécanismes de défense contre les ROS existent dans les mitochondries. Le mécanisme principal est le tripeptide glutathion (glycine, acide glutamique, cystéine ou GSH), importé au sein de la mitochondrie par les transporteurs de l'oxoglutarate et du dicarboxylate (Lash *et al.*, 2002). Son mécanisme d'action est décrit à la **figure 2.15**. De plus, les

glutaredoxines et les peroxyredoxines 3 et 5, d'autres protéines antioxydantes présentes dans la matrice mitochondriale, sont impliquées dans la réduction de protéines oxydées (Jezek *et al.*, 2009). Les superoxyde dismutase (SOD) sont d'autres enzymes, mitochondriales (MnSOD ou SOD2) ou cytosoliques (Cu/ZnSO ou SOD1), catalysant la dismutation de superoxyde en peroxyde d'hydrogène, beaucoup plus stable et diffusible dans les membranes. Enfin la catalase est une enzyme peroxysomale, mitochondriale et cytosolique catalysant la dégradation de l' H_2O_2 en H_2O (Mates, 2000).

Signalons cependant que les ROS jouent également un rôle dans des voies de signalisation cellulaire. Par exemple, la NADPH oxydase est une enzyme membranaire catalysant la formation de radicaux superoxydes à partir de NADPH (**Figure 2.14**) à des fins de signalisation. La **figure 2.16** illustre quelques voies affectées ou induites par les ROS.

En conclusion de ce chapitre, nous avons donc vu que la mitochondrie était une source cellulaire de ROS, notamment en raison de l'échappement d'électrons à partir des complexes I et III des chaînes de transport d'électrons. Cette dernière, couplée au complexe V permet la production d'énergie sous forme d'ATP par chimiosmose. Cette production d'énergie par la mitochondrie, a conduit à une assimilation de la mitochondrie à un centre énergétique de la cellule. Dans le chapitre qui va suivre, nous allons nous intéresser à un processus permettant de réguler l'abondance de la population mitochondriale et ainsi la production d'énergie cellulaire. Cette dernière est régulée par deux mécanismes : le premier, la mitophagie, consistant en la dégradation des mitochondries, comme nous l'avons déjà vu au point **2.2.2.1.2**, et un deuxième, la biogenèse mitochondriale, permettant la synthèse de la mitochondrie, que nous allons décrire dans les lignes suivantes.

2.4.4. La biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est un processus complexe, hautement régulé aboutissant, *in fine*, à la formation de nouvelles mitochondries par expansion de la population mitochondriale existante. Ce processus implique la synthèse *de novo* de protéines mitochondriales, codées par des gènes nucléaires et mitochondriaux (et qui nécessite donc une coordination entre leur expression), la synthèse de phospholipides composant la MME et la MMI, la réplication et la ségrégation de l'ADNmt dans les mitochondries filles et la fission des mitochondries (Hock *et al.*, 2009). Les mécanismes permettant la synthèse et l'acheminement des lipides nécessaires à la biogenèse mitochondriale restent peu compris à l'heure actuelle. En effet, la majorité des études dans ce domaine portent sur la caractérisation de l'activité des protéines régulatrices de la biogenèse mitochondriale, l'abondance des principaux marqueurs protéiques de cet organite, ainsi que l'abondance de la population mitochondriale, notamment par usage des sondes fluorescentes spécifiques de la mitochondrie, comme les sondes MitoTracker (Buckman *et al.*, 2001). Un schéma général et simplifié des principales étapes de la biogenèse mitochondriale est repris à la **figure 2.17**. La biogenèse mitochondriale ainsi que son processus opposé, la mitophagie, sont à la base d'un équilibre entre la demande, la production d'énergie par la cellule et l'abondance de la population mitochondriale.

2.4.4.1. La régulation de la biogenèse mitochondriale

2.4.4.1.1. Les principaux facteurs de transcription impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale

La régulation de la biogenèse mitochondriale est assurée à deux niveaux différents. Premièrement au niveau de l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales, par différents facteurs de transcription. Deuxièmement, plusieurs co-activateurs sont également nécessaires à l'activité de ces facteurs de transcription. Nous

commencerons par décrire les facteurs de transcription impliqués dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale. Les principaux acteurs et co-activateurs sont repris à la **figure 2.18**.

Le facteur de transcription NRF-1 (*Nuclear Respiratory Factor-1*) est impliqué dans la régulation des gènes nucléaires codant pour différentes sous-unités de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, la cytochrome c oxydase, le cytochrome c ainsi que la sous-unité Tom20 du complexe TOM (*Translocase of Outer Membrane*), impliqué dans l'importation des préprotéines mitochondriales dans la mitochondrie (Scarpulla, 2008). Le facteur de transcription NRF-2 (*Nuclear Respiratory Factor-2*) régule, quant à lui, la transcription des gènes nucléaires codant pour certaines sous-unités de la cytochrome c oxydase, les sous-unités Tom20 et Tom70 mais aussi des sous-unités de la F₀/F₁ ATPsynthase mitochondriale (Ongwijitwat *et al.*, 2006; Scarpulla, 2008). Les facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 régulent également l'expression des gènes codant les facteurs de transcription Tfam (ou mtTFA, *mitochondrial Transcription Factor A*), Tfb1m (ou mtTFB1, *mitochondrial Transcription Factor B1*) et Tfb2m (ou mtTFB2, *mitochondrial Transcription Factor B2*), codés par le génome nucléaire et impliqués dans le contrôle de la transcription et la réplication de l'ADNmt. Cette fonction permet de coordonner la régulation de l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et ceux présents dans le génome mitochondrial (Goffart *et al.*, 2003; Ongwijitwat *et al.*, 2006; Scarpulla, 2008).

Les ERRs (Estrogen-Related Receptors) appartiennent à une autre famille de facteurs de transcription partageant une forte homologie de séquence avec le récepteur aux oestrogènes. Cependant, ces facteurs ne sont pas activés par les oestrogènes mais par des interactions avec des protéines co-régulatrices telles que la famille PGC-1 (*PPAR γ Co-activator-1*), SRC et RIP140 (*Receptor-Interacting Protein 140*). Trois isoformes existent : ERR α , ERR β et ERR δ . Les ERRs peuvent agir seuls ou former des homodimères et des hétérodimères et sont impliqués dans l'activation de la transcription de gènes codant pour des composants des protéines de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, la machinerie d'importation mitochondriale et des protéines antioxydantes protégeant la cellule contre les ROS et des enzymes catalysant les réactions du cycle de Krebs (Giguere *et al.*, 2004).

Le facteur de transcription YY1 (*Ying-Yang 1*) régule également l'expression de nombreux gènes nucléaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale tels que ceux codant pour les différentes sous-unités de la cytochrome c oxydase (Seelan *et al.*, 1997). Ce facteur peut, selon les cas, augmenter ou diminuer la transcription de ses gènes cibles (Scarpulla, 2008). Le facteur de transcription Sp1 (*Special Protein 1*) régule la transcription de la sous-unité β de l'ATPsynthase, le transporteur mitochondrial ANT2 (*Adenine Nucleotide Translocator 2*), le facteur de transcription Tfam (Li *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996). Le facteur de transcription CREB (cAMP Responsive Element Binding protein 1) régule, quant à lui, l'expression du gène codant pour la cytochrome c oxydase, notamment en réponse à une privation de sérum de fibroblastes en culture (Herzig *et al.*, 2000). Le facteur de transcription c-Myc active l'expression du gène codant pour PGC-1 β et par cette voie l'expression de protéines mitochondriales. Il agirait en tant que coordinateur entre la prolifération cellulaire et la biogenèse mitochondriale qu'elle nécessite (Hock *et al.*, 2009).

Enfin, les facteurs de transcription de la famille PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*) participent également à la régulation de la biogenèse mitochondriale. Ces derniers forment des hétérodimères avec les récepteurs RXRs (*Retinoid X Receptors*). Les PPARs (notamment le PPAR γ) régulent positivement la biogenèse mitochondriale en se liant à la séquence PPRE (*PPAR Response Element*) des co-activateurs PGC-1 α et PGC-1 β (Tanaka *et al.*, 2003; Hondares *et al.*, 2006). Ceci induit une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et plus particulièrement ceux

participant au métabolisme lipidique et à la thermogénèse (notamment les protéines Ucps, *Uncoupling Proteins*).

2.4.4.1.2. Les co-activateurs impliqués dans la régulation de la biogénèse mitochondriale

La famille de co-activateurs PGC (PPAR γ Co-activator), formée de 3 membres (PGC-1 α , PGC-1 β et PRC), est impliquée dans la régulation de la biogénèse mitochondriale. PGC-1 α est un co-activateur participant à la régulation de l'expression de nombreux facteurs de transcription (NRF-1, NRF-2, Tfam, Tfb1m, Tfb2m, ERR- α et PPAR- α), et permettant de coordonner l'expression de nombreux gènes différents lors de biogénèse mitochondriale. Le facteur PGC-1 β co-active quant à lui les facteurs de transcription Nrf2 et ERR- α . Le co-activateur PGC-1 β présente beaucoup de similitudes avec PGC-1 α et régule notamment l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription NRF-1. La stimulation des fibres musculaires IIX oxydatives induit son activation et notamment celle des facteurs de transcription ERR α et PPAR α (Scarpulla, 2008).

2.4.4.1.3. Principales conditions augmentant la biogénèse mitochondriale

Une augmentation de la biogénèse mitochondriale est observée lors d'un déficit énergétique, un besoin important d'énergie dans la cellule (comme au cours de la mitose) ou la différenciation cellulaire comme celle des adipocytes ou des myoblastes) et certaines conditions de stress (telles que l'exercice physique).

La biogénèse mitochondriale induite par une restriction calorique dépend de l'activation de la protéine SIRT1 (*Sirtuin 1*), une activation de l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) ainsi qu'une production de NO. L'activation de ces mécanismes conduit à une augmentation de la biogénèse mitochondriale par activation du co-activateur PGC-1 α . La population mitochondriale semble également augmenter entre la phase G1 et la phase S de la mitose (Lee *et al.*, 2007).

L'exercice physique important induit une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$ responsable de l'activation des protéines de type Ca^{2+} /calmodulin-dépendent kinases telles que la CaMKII (*Calmoduline Kinase II*) et la CaMKIV (*Calmoduline Kinase IV*), elle-même responsable de l'activation de la MAP (*Mitogen Activated Protein*) kinase p38. Celle-ci peut alors augmenter la transcription du co-activateur PGC-1 α mais également son activité. Enfin une augmentation de la transcription des facteurs de transcription NRF-1, GABP (*GA-Binding Protein*), Tfam, ERR α et PPAR δ conduisant à une biogénèse mitochondriale (Ojuka *et al.*, 2003). L'exercice physique conduit également à une stimulation des fibres β -adrénergiques induisant une élévation de la concentration en cAMP activatrice de la PKA (Phospho Kinase A). Cette dernière induit alors une biogénèse mitochondriale via la voie p38 (Rockl *et al.*, 2008).

Une exposition au froid induit également la stimulation des terminaisons nerveuses sympathiques et β -adrénergiques, conduisant à une augmentation de la biogénèse mitochondriale et à une hausse de la thermogénèse dans des cellules musculaires striées squelettiques, le tissu adipeux brun et blanc (Puigserver *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999). Les mécanismes sont en partie similaires à ceux de la biogénèse mitochondriale induite par l'exercice physique. En effet, l'exposition au froid induit également une activation de SIRT1, de l'AMPK et une production de NO. Celui-ci est produit par la NOS (*NO syntase*) existant en 4 isoformes : eNOS (*endothelial NOS*), iNOS (*Inducible NOS*), nNOS (*Neuronal NOS*) et mtNOS (*Mitochondrial NOS*). Cette dernière isoforme est localisée à la MME et produit du NO en réponse à une augmentation de la concentration en calcium. L'induction de la biogénèse mitochondriale par le NO repose sur l'activation de facteurs de transcription tels que NRF-1, NRF-2 et Tfam (Nisoli *et al.*, 2006).

Enfin la différenciation adipocytaire requiert une biogenèse mitochondriale, qui se traduit par une augmentation de la masse de la population mitochondriale mais aussi une modification de ses caractéristiques. Celle-ci est médiée par l'activation du PPAR γ , de PGC-1 α mais aussi de PGC-1 β (Wilson-Fritch *et al.*, 2003).

2.4.4.2. Les mécanismes moléculaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale

2.4.4.2.1. La machinerie d'importation protéique mitochondriale

La plupart des protéines mitochondriales étant codées par des gènes nucléaires, transcrits dans le noyau, et traduites dans le cytoplasme, ces dernières doivent être importées dans la mitochondrie après leur synthèse. L'importation des protéines mitochondriales est catalysée par des mécanismes distincts selon leur destination d'adressage au sein de la mitochondrie (MME, espace intermembranaire, MMI, matrice). Cette différence d'adressage repose essentiellement sur le signal d'importation mitochondriale (entre 15 et 50 acides aminés) porté par la pré-protéine à importer. Il en existe 2 types. Le premier est constitué d'une séquence peptidique, composée d'acides aminés chargés positivement, adoptant une structure en hélice α aux propriétés amphiphiles. Ce type de séquence est clivable, à l'opposé de celle des préprotéines destinées à la MMI ou la MME. En effet, ces dernières présentent un signal, composé d'acides aminés hydrophobes, suivant le premier signal clivable ou situé dans le domaine transmembranaire de la protéine (Chacinska *et al.*, 2009).

Le principal acteur de l'importation des préprotéines mitochondriales est le TOM (*Translocase of the Outer Membrane*), un énorme complexe protéique de 450 kDa (**Figure 2.19**) dont le principal composant est Tom40. Ce dernier présente une structure formée d'un tonneau β constituant un canal permettant l'importation de protéines au sein de la mitochondrie. Les protéines destinées à la matrice mitochondriale sont prises en charge par le complexe TOM puis par le complexe TIM23. Les protéines destinées à la MMI trafiquent également dans le complexe TOM puis le complexe TOM22. Le mécanisme moléculaire est repris à la **figure 2.19**. Les protéines destinées à la MME sont prises en charge par le complexe TOM puis par les complexes SAM et MDM (**Figure 2.20**). Enfin, l'importation des protéines destinées à l'espace intermembranaire mitochondrial, ainsi que celles de certaines protéines de la MMI, repose sur des interactions avec le complexe Tim9-Tim10 et la protéine Mia, permettant la formation de ponts disulfures au sein de la préprotéine. Toutefois, ce mécanisme est encore très peu connu et ne sera pas abordé au cours de cette introduction (Bolender *et al.*, 2008).

2.4.4.2.2. La réplication du génome mitochondrial

La réplication de l'ADNmt (dont la structure est illustrée à la **figure 2.21**) est complexe. Dans une première étape, une ARN polymérase mitochondriale transcrit un primer d'ARN à partir de la séquence LSP (*Light Strand Promoter*) présent sur le brin léger de l'ADNmt. Ce brin d'ARN est ensuite clivé par une endoribonucléase mitochondriale afin de produire une extrémité 3' libre servant d'amorce pour la synthèse de l'ADNmt. Celle-ci est catalysée par la POL γ , une enzyme caractérisée par une activité 3'-5' exonucléase et une activité 5'-deoxyribose phosphate lyase. La réplication de l'ADNmt nécessite TWINKLE, une hélicase impliquée dans le déroulement de l'ADNmt et les protéines mtSSB (mitochondrial Single Strand Binding proteins), chargées du maintien et de la stabilisation de l'ADNmt sous une forme simple brin (Diaz *et al.*, 2008). La réplication de l'ADNmt est régulée par les facteurs de transcription Tfam, Tfb1m et Tfb2m, codés par le génome nucléaire (Hock *et al.*, 2009).

En résumé de cette partie, nous avons vu que l'abondance de la mitochondrie était régulée par un processus permettant la production de nouvelles mitochondries, la biogenèse mitochondriale. Toutefois, afin d'optimiser les fonctions mitochondriales, le déplacement mais aussi l'organisation des mitochondries est nécessaire, comme nous allons le voir, afin de former un réseau mitochondrial. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la régulation de la morphologie des mitochondries.

2.4.5. Le contrôle de la morphologie des mitochondries

Comme nous l'avons vu lors de la description générale de la mitochondrie, celle-ci n'est pas un organite statique mais bien hautement dynamique. Les mitochondries s'organisent afin de former de véritables réseaux, dont la morphologie est hautement variable. En effet, celle-ci varie : en fonction du type cellulaire, de l'état de différenciation, de la cellule de l'étape du cycle cellulaire, de l'énergie disponible mais aussi de la concentration en de nombreux ions tels que le calcium (Duchen, 2004). Les fonctions de ce réseau sont variées. Il a été proposé qu'une architecture en réseau mitochondrial réticulé soit nécessaire à une production maximale d'ATP et au maintien d'un potentiel de membrane (Amchenkova *et al.*, 1988; Benard *et al.*, 2007; Liesa *et al.*, 2009) ainsi qu'à l'échange de mtDNA entre mitochondries. Cette architecture permet également la fusion des matrices des mitochondries du réseau, permettant alors l'échange de solutés (Liesa *et al.*, 2009). Enfin, la morphologie mitochondriale dépend également d'interactions entre les mitochondries et les composants du cytosquelette comme les microtubules, les filaments intermédiaires et les filaments d'actine, mais aussi des phénomènes de fusion et de fission mitochondriale.

L'état du réseau mitochondrial est principalement déterminé par le ratio entre les phénomènes de fusion et de fission mitochondriales (Herzig *et al.*, 2008). Nous allons donc maintenant nous intéresser, dans la suite de cette introduction, à ces deux processus. Nous décrirons premièrement les mécanismes moléculaires et enfin les différentes conditions induisant un remodelage de l'architecture du réseau mitochondrial par l'utilisation de ces phénomènes.

2.4.5.1. Le processus de fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale est un processus complexe qui se déroule en 2 étapes : premièrement la fusion des MME et dans un second temps, la fusion des MMI. Chaque étape de la fusion mitochondriale est catalysée par diverses protéines mitochondriales spécialisées. Les protéines impliquées dans la fusion mitochondriale sont présentées à la **figure 2.22**. Les protéines Mfn1 et 2 (*Mitofusins 1 and 2*) sont essentielles à la fusion des MME tandis qu'OPA1 (*Optic Atrophy factor 1*) participe à la fusion des MMI (Liesa *et al.*, 2009). Ces deux phénomènes semblent totalement indépendants l'un de l'autre, comme démontré récemment (Song *et al.*, 2009). En effet le *knock-out* du gène codant pour OPA1 inhibe les phénomènes de fusion des MMI tandis que la fusion des MME est toujours observée. Une diminution du potentiel de membrane mitochondriale est également capable de bloquer la fusion des MMI sans pour autant altérer la fusion des MME (Malka *et al.*, 2005).

2.4.5.1.1. Mitofusines

La protéine Mfn1 (codée par le gène *MFN1*, localisé à l'emplacement q26.33 du chromosome 3 chez l'homme) (Santel *et al.*, 2001) est une protéine transmembranaire constituée de 741 acides aminés et localisée uniquement dans la MME (Hales *et al.*, 1997). La protéine Mfn2 (codée par le gène *MFN2*, situé à l'emplacement p36.22 du chromosome 1 chez l'homme) est également une protéine transmembranaire composée de 757 résidus

présentant une homologie de séquence de 63 % avec Mfn1 (Liesa *et al.*, 2009). La structure de ces protéines dotées d'une activité GTPasique est illustrée à la **figure 2.23**.

Le rapprochement de deux mitochondries est catalysé par l'homo- ou l'hétérodimérisation des protéines mitofusines situées sur chaque fragment de la mitochondrie. L'hydrolyse de GTP par ces protéines conduit ensuite à la fusion des membranes des mitochondries bien que le mécanisme moléculaire reste encore peu connu (Chan *et al.*, 2006) (**Figure 2.24**).

La protéine Mfn2 est essentiellement localisée à la MME mais elle est également retrouvée dans la membrane du RE (de Brito *et al.*, 2008), contrairement à Mfn1. Cette localisation dans le RE est médiée par le domaine « coiled-coil » de Mfn2 (de Brito *et al.*, 2009) qui permet la liaison de Mfn2 à la protéine Ras (une protéine dotée d'une activité GTPase notamment impliquée dans la signalisation cellulaire) située en membrane du RE. Elle serait impliquée dans le maintien de la morphologie de cet organite et participerait à l'homéostasie mitochondriale calcique. En effet, il a été montré récemment que la proximité immédiate entre le RE et la mitochondrie résulterait de l'interaction physique entre la Mfn2 de la membrane du RE et la Mfn1 abondante dans la MME des mitochondries (de Brito *et al.*, 2009). De plus, il semble que l'activité du domaine GTPasique de Mfn2 est également plus faible que celle du domaine GTPasique de Mfn1 et que l'inactivation de l'expression de Mfn2 par RNAi conduit à une diminution de fusion mitochondriale plus faible et moins sévère que l'inactivation du gène codant pour Mfn1 (Ishihara *et al.*, 2004).

L'abondance et l'expression de Mfn1 et Mfn2 varie en fonction des tissus considérés. En effet, la protéine Mfn2 est beaucoup plus abondante que Mfn1 au sein des cellules de Purkinje. Ceci explique qu'un *knock-out* du gène *Mfn2* de souris conduit à la formation de souriceaux non viables présentant une grave neurodégénérescence (Chen *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2007).

Il est intéressant de souligner que l'expression du gène codant pour Mfn2 dans les cellules musculaires striées squelettiques est régulée par le facteur de transcription $ERR\alpha$ et le co-activateur $PGC-1\alpha$, soit deux régulateurs importants de la biogenèse mitochondriale (Soriano *et al.*, 2006). Plusieurs hormones exercent également un effet direct sur l'expression de Mfn2. Le PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*), le BFGF (*Basic Fibroblast Growth Factor*) et l'endothéline-1 diminuent l'abondance de Mfn2 dans les cellules musculaires lisses ou striées squelettiques et les fibroblastes (Chen *et al.*, 2004).

L'activité des mitofusines est encore régulée par plusieurs protéines comme la protéine MIB (Mitofusin-binding protein). Cette dernière peut inhiber l'activité GTPasique de Mfn1 suite à sa liaison au domaine de liaison du GTP de Mfn1 et conduire à la fragmentation du réseau mitochondrial (Eura *et al.*, 2006). Bien que non démontrée chez les métazoaires, l'ubiquitinylation de Mfn1 ou de Mfn2 pourrait également survenir (Cervený *et al.*, 2007). En effet, cette modification post-traductionnelle affecte la protéine Fzo1p, une protéine homologue des mitofusines de la levure, par un mécanisme dépendant de Mdm30p. Une fois ubiquitinylée, Fzo1p serait rapidement dégradée par la voie dépendante du protéasome (Cohen *et al.*, 2008). Il est donc possible qu'un mécanisme comparable puisse réguler le temps de demi-vie des mitofusines chez l'homme (Cervený *et al.*, 2007). La protéine StomL2 (STOMatin-Like protein 2) est également localisée à la surface de la MME et pourrait également former un complexe avec Mfn2 par liaison à sa partie transmembranaire. Toutefois le rôle de StomL2 dans le contrôle des activités de Mfn2 impliquées dans la fusion mitochondriale est encore inconnu (Hajek *et al.*, 2007).

2.4.5.1.2. Opa1

La protéine Opa1 (codée par le gène *OPA1* situé à l'emplacement q28-q29 du chromosome 3 chez l'homme) est une protéine de 276 acides aminés (Alexander *et al.*, 2000)

existant sous 8 isoformes différentes issues du « splicing alternatif » des exons 4, 4b et 5b de l'ARNm d'OPA1 (Liesa *et al.*, 2009). La structure de cette protéine est illustrée à la **figure 2.23**. De plus, l'abondance d'OPA1 est principalement régulée, de manière post-traductionnelle, par protéolyse partielle conduisant à la formation de formes lourdes et légères. Les formes lourdes (formes 1, 2, 4 et 7) contenant le domaine transmembranaire d'OPA1, seraient impliquées dans la fusion de la MMI tandis que les isoformes légères (formes 3, 5, 6 et 8), libres dans l'espace intermembranaire, seraient nécessaires à l'activité des formes lourdes (Liesa *et al.*, 2009). La séquence protéique d'OPA1 contient deux sites de clivage protéolytique : S1 et S2. Trois protéases sont impliquées dans le processing d'OPA1 : les protéases de type m-AAA (*mitochondrial Matrix oriented protease*), la protéase de type i-AAA Yme11 (*Intermembrane oriented protease*) et la protéase PARL (*Presinilin-Associated Rhomboid-Like protease*) (Cipolat *et al.*, 2006; Duvezin-Caubet *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007). La protéase i-AAA Yme11 et les m-AAA sont responsables du clivage d'OPA1 en conditions basales et en réponse à une dissipation du potentiel de membrane mitochondriale (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007) tandis que la protéase PARL est responsable de la formation d'une forme soluble d'OPA1 en réponse à une diminution du potentiel de membrane mitochondriale. Cette isoforme est impliquée essentiellement dans le maintien des cristaes dans un état fermé de façon indépendante de la fusion de la MMI (Frezza *et al.*, 2006).

De façon paradoxale, une augmentation de l'expression protéique d'OPA1 conduit à une augmentation de la fragmentation du réseau mitochondrial. En effet, la surexpression d'OPA1 conduirait à un déséquilibre entre ses différentes isoformes responsables de la formation de nombreux complexes d'isoformes d'OPA1. Ces derniers pourraient agir en tant que dominant négatif d'OPA1 (Liesa *et al.*, 2009) et ainsi inhiber les phénomènes de fusion mitochondriale.

Le domaine transmembranaire de la protéine OPA1 pourrait également être impliqué dans la liaison et la stabilisation des nucléoïdes mitochondriaux (assurant la structuration de l'ADNmt). Ces structures stabilisant les nucléoïdes, importants dans la ségrégation des ADNmt dans la fission mitochondriale, seraient formées de complexes protéiques composés d'OPA1 et des mitofusines 1 et 2 (Chen *et al.*, 2007; Liesa *et al.*, 2009). Une inhibition de l'expression d'OPA1 par RNAi entraîne également une diminution du potentiel de membrane et de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire (Olichon *et al.*, 2003).

Enfin certains phénomènes de fission induits par une diminution de l'abondance d'OPA1 conduisent à une diminution du potentiel de membrane des « mitochondries filles ». Ces mitochondries, non fonctionnelles, sont alors dégradées dans les vingt minutes par autophagie (= mitophagie). Comme la surexpression d'OPA1 inhibe cette autophagie, un lien entre cette protéine et le déclenchement de la mitophagie pourrait donc exister mais reste encore non démontré (Twig *et al.*, 2008).

2.4.5.2. Le processus de fission mitochondriale

La fission mitochondriale est un processus complexe nécessitant la fission de la MMI et de la MME. Ce processus, tout comme la fusion mitochondriale, est assuré par un petit nombre de protéines spécialisées, illustrées à la **figure 2.25**.

Les protéines Drp1/Dlp1 (*Dynamain-Related Protein 1*, aussi connu sous le nom *Dynamain-Like Protein 1*) et Fis1 (*Fission protein 1 homolog*) sont impliquées dans la régulation de la fission de la MME (Liesa *et al.*, 2009). Chez la levure, la fission de la MMI est catalysée par la protéine MDM33 (*Mitochondrial Distribution and Morphology 33*). Chez l'homme, la protéine MTP18 (*Mitochondrial Protein of 18 kDa*) pourrait remplir un rôle comparable à celui de MDM33. En effet MTP18 est une protéine supposée de la MMI pouvant interagir avec Fis1. MTP18 agirait en tant que lien permettant la fission de la MME et de la MMI (Tondera *et al.*, 2004; Tondera *et al.*, 2005).

2.4.5.2.1. Drp1

Drp1 est une protéine de 3.699 acides aminés essentiellement cytosolique. Elle est codée, chez l'homme, par le gène *DNM1L* situé sur le chromosome 2 à l'emplacement p11.21 chez l'homme. Toutefois, cette protéine cytosolique peut également être recrutée à la MME, en certains points qui sont probablement les futurs origines de fission de la mitochondrie (Smirnova *et al.*, 1998). La structure de cette protéine est illustrée à la **figure 2.23**.

La fission mitochondriale nécessite donc le recrutement de Drp1 à la MME. Ce dernier est catalysé par la protéine Fis1 vraisemblablement par une interaction avec le domaine GED (*GTP Effector Domain*) de Drp1. Chez la levure, deux protéines supplémentaires servent de lien physique entre Drp1 et Fis1 : Mdv1 (*Mitochondrial Division protein 1*) et Caf4 (Griffin *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2006). Aucune protéine orthologue de ces dernières n'a pu (encore) être mise en évidence chez les mammifères. Une fois en surface des mitochondries, les monomères de Drp1 peuvent s'oligomériser et former un anneau protéique autour de la MME. L'hydrolyse du GTP par le domaine GTPasique de Drp1 conduit à une libération de l'énergie induisant un changement de conformation de Drp1, la constriction de l'anneau formé par Drp1 et finalement la fission de la membrane mitochondriale (Ingerman *et al.*, 2005).

En plus du contrôle de la morphologie mitochondriale, la protéine Drp1 pourrait également être impliquée dans le contrôle de la morphologie du RE, dans la formation des vésicules du système sécrétoire et le contrôle de la fission peroxysomale (Suen *et al.*, 2008).

La régulation de l'activité de Drp1 est très complexe et plusieurs modifications post-traductionnelles l'affectent (Santel *et al.*, 2008). Ces modifications, reprises au **tableau 2.4**, peuvent, selon leur nature, augmenter ou diminuer l'activité de Drp1.

2.4.5.2.2. Fis1

Chez l'homme, la protéine Fis1 est une protéine mitochondriale de 152 acides aminés codée par le gène *FIS1* situé sur le chromosome 7 à l'emplacement q22.1 (James *et al.*, 2003). Sa structure est décrite à la figure **2.23**. La protéine Fis1 est une protéine adaptatrice catalysant le recrutement de Drp1 à la surface de la mitochondrie (Yoon *et al.*, 2003). Fis1 pourrait être l'élément limitant la fission mitochondriale. En effet, sa surexpression semble induire une fragmentation considérable du réseau mitochondrial ainsi qu'une libération massive du cytochrome c. De plus l'inhibition de Fis induit une résistance cellulaire à l'apoptose médiée par Drp1 (Lee *et al.*, 2004). En plus de son rôle mitochondrial, la protéine Fis1 est également impliquée dans le recrutement de Drp1 à la surface du peroxysome. La formation de ce complexe catalyserait donc également la fission peroxysomale (Koch *et al.*, 2005).

2.4.5.3. Conditions altérant la morphologie mitochondriale

La morphologie mitochondriale et son organisation en réseau filamenteux est hautement dynamique. Parmi les conditions modifiant cette organisation, le processus de mort cellulaire par apoptose est le processus le mieux décrit.

L'apoptose est caractérisée par une fragmentation du réseau mitochondrial très tôt après son activation, suivie de la libération du cytochrome c (Suen *et al.*, 2008). Cette fission est catalysée essentiellement par le recrutement de Drp1 à la MME (Arnoult *et al.*, 2005). Une fois recruté, Drp1 forme des complexes avec les protéines Bax et Mfn2 (Karbowski *et al.*, 2002) et induit une fission de la population mitochondriale conduisant à sa fragmentation. Le cytochrome c est ensuite libéré et induit la mort cellulaire par apoptose (Suen *et al.*, 2008). On notera également l'implication de la calcineurine, une phosphatase pouvant déphosphoryler Drp1 sur le résidu sérine 637, et qui peut lorsqu'elle est inhibée, modifier le degré de

phosphorylation de cette sérine 637 et conduire à une fragmentation du réseau mitochondrial, notamment dans une étape précoce de l'apoptose (Santel *et al.*, 2008). L'apoptose est également caractérisée par un clivage excessif d'Opa1 par la protéase PARL induisant une dérégulation de la morphologie des cristaes, leur perméabilisation et à la libération du cytochrome c (Arnoult, 2007). Les isoformes contenant l'exon 5b d'Opa1 régulent directement la libération du cytochrome c lors de l'apoptose (Olichon *et al.*, 2007). Enfin la fragmentation du réseau mitochondrial induite par l'apoptose est aussi médiée, en partie, par les mitofusines et la protéine Bak (Brooks *et al.*, 2007). En effet ces auteurs ont montré que Bak peut se lier à la Mfn2 par son domaine BH₃. Après induction de l'apoptose, un changement conformationnel de la protéine Bak inhibe l'interaction avec Mfn2, conduisant alors à une diminution de l'activité GTPase de Mfn2, et à une interaction avec Mfn1. Une fragmentation du réseau mitochondrial consécutive à un déficit de fusion est alors induite (Brooks *et al.*, 2007). Au final, la fragmentation du réseau mitochondrial induite par l'apoptose semble être causée par une diminution des phénomènes de fusion mitochondriale ainsi que par une augmentation des événements de fission mitochondriale.

L'homéostasie calcique régule également la morphologie du réseau mitochondrial. En effet, une élévation de la concentration cytosolique en calcium induit également une translocation de Drp1 en MME conduisant à une fragmentation du réseau mitochondrial (Hom *et al.*, 2007).

Le stade de différenciation cellulaire requiert également des remodelages de l'architecture du réseau mitochondrial. Par exemple, lors de la différenciation de neuroblastes non différenciés en neurones, le réseau mitochondrial passe d'un état fragmenté à un état réticulé. L'incubation en présence d'acide rétinoïque, permettant une différenciation artificielle de ces cellules, induit une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial, une hausse de la concentration cytosolique en calcium ainsi qu'une augmentation des phénomènes de fusion mitochondriale (Voccoli *et al.*, 2009).

Le niveau énergétique des cellules a également un impact sur la morphologie du réseau mitochondrial. En effet, les protéines impliquées dans ces phénomènes sont, comme nous l'avons vu dotées d'activité GTPasique. Comme la concentration en GTP augmente en fonction de la concentration en ATP, la morphologie du réseau mitochondrial varie donc proportionnellement à la quantité d'ATP disponible. En présence d'ATP, un équilibre entre les phénomènes de fusion et de fission mitochondriales permettent la formation d'un réseau mitochondrial branché (Jezek *et al.*, 2009). Une inhibition de cette production d'énergie par l'utilisation d'un agent découplant, conduit à une baisse de ces phénomènes conduisant à une fragmentation du réseau mitochondrial (Legros *et al.*, 2002). A l'inverse, une organisation des mitochondries en réseau branché est également nécessaire à une production optimale d'ATP et une importation maximale de calcium par la mitochondrie (Benard *et al.*, 2007). Il n'est cependant pas encore clair si c'est la morphologie du réseau mitochondrial ou les protéines impliquées dans la fusion et la fission mitochondriales qui régulent la production énergétique de la cellule (Liesa *et al.*, 2009).

La sénescence semble également être dépendante d'une diminution de processus de fission mitochondriale. Ceci peut être expliqué par une diminution de l'expression de Fis1 au cours du vieillissement. En effet le rétablissement d'un niveau d'expression physiologique permet d'inhiber l'apparition du phénotype sénescence (Yoon *et al.*, 2006). La diminution d'expression de Fis1 serait responsable d'une diminution du phénomène de fission mitochondriale accompagnée d'une diminution de mitophagie. La mitophagie étant nécessaire à l'élimination de mitochondries endommagées et non fonctionnelles (Twig *et al.*, 2008), la diminution de l'expression de Fis1 pourrait donc contribuer à l'accumulation de mitochondries non fonctionnelles, elle-même responsables d'un dysfonctionnement généralisé du réseau mitochondrial, une diminution de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale

ainsi qu'une augmentation de production de ROS menant à l'apparition du phénotype sénescence (Liesa *et al.*, 2009).

Enfin le cycle cellulaire affecte également la morphologie du réseau mitochondrial. Il a été montré que la phosphorylation du résidu 585 de Drp1 par la forme active du complexe Cdk/cycline B (*Cycline Dependent Kinase/Cyclin B*) augmente l'activité de Drp1 et induit la fragmentation du réseau mitochondrial. Cette phosphorylation permet d'induire la fragmentation du réseau mitochondrial nécessaire à la mitose grâce au lien fonctionnel avec les kinases dépendantes des cyclines (Taguchi *et al.*, 2007).

2.4.5.4. Dysfonctionnement des mécanismes de fusion et fission mitochondriales dans les maladies neurodégénératives et les maladies de surcharge lysosomale.

La dérégulation des mécanismes de fusion et de fission mitochondriales semble de plus en plus être, en grande partie, responsables des mécanismes impliqués dans certaines maladies neurodégénératives (Frank, 2006).

La maladie de Charcot-Marie 2A est une maladie neurodégénérative caractérisée par une dégénérescence du système nerveux périphérique et une atrophie musculaire. On y observe une mutation du gène *Mfn2* située à proximité de la séquence codant pour le domaine GTPasique de cette protéine, dans plus de 20 % des patients atteints de cette maladie (Frank, 2006).

Des mutations du gène codant la protéine Opa1 sont également associées à la neuropathie optique dominante autosomale. Les symptômes de cette maladie comportent une dégénérescence progressive des ganglions rétinien conduisant à une cécité précoce. Ces cellules sont caractérisées par un réseau mitochondrial fragmenté associé à une activation de l'apoptose (Davies *et al.*, 2007).

L'expression des protéines Drp1, Mfn1, Mfn2 et Opa1 est réduite dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer alors que celle de Fis1 est considérablement augmentée (Wang *et al.*, 2009). Cela se traduit par une augmentation des phénomènes de fusion et de fission mitochondriale ainsi que par une fragmentation du réseau mitochondrial. La restauration de l'expression de Drp1 permet de restaurer le phénotype de ces cellules, ce qui montre l'importance des phénomènes de fission mitochondriale dans cette maladie (Wang *et al.*, 2009).

A l'opposé des maladies neurodégénératives, il existe beaucoup moins de preuves dans la littérature suggérant une implication des phénomènes de fusion et de fission mitochondriales dans les maladies de surcharge lysosomale. Par contre, la morphologie du réseau mitochondrial, directement sous le contrôle de ces phénomènes, semble être altérée dans bon nombre de ces maladies. Par exemple, la maladie de Batten (caractérisée par une mutation du gène *CLN3* codant pour la batténine), est caractérisée par l'existence de mitochondries plus grandes, plus nombreuses, présentant des cristaes anormales et une accumulation de matériel dans leur matrice semblable à celui retrouvé au sein des lysosomes (Walkley *et al.*, 1995; Fossale *et al.*, 2004). Une fragmentation du réseau mitochondrial, pour des raisons inconnues, est observable dans des neurones de patients atteints de mucopolysaccharidose de type IV (Jennings *et al.*, 2006). Une augmentation de la mitophagie, se traduisant par une hausse de l'abondance des protéines LC3-II, beclin-1 et une activation de la voie mTOR, est observée dans des astrocytes de souris KO pour le gène codant la β -galactosidase (modèle de la gangliosidose à GM₁). Il est pensé que l'activation de l'autophagie dans cette maladie puisse expliquer la fragmentation du réseau mitochondrial qui y est observée (Takamura *et al.*, 2008). Au final, toutes ces études tendent donc à démontrer que la morphologie du réseau mitochondrial semble être altérée dans certaines MSLs. Il serait donc raisonnable de penser

que de telles altérations pourraient être dues à des dysfonctionnements des phénomènes de fusion et de fission mitochondriales.

En conclusion de ce chapitre, nous avons vu que l'abondance tout comme la morphologie (degré de réticulation-fragmentation) peuvent affecter certaines fonctions de la population mitochondriale comme sa capacité à produire de l'ATP (Liesa *et al.*, 2009), à maintenir un potentiel de membrane mitochondriale, à libérer des molécules pro-apoptotiques comme le cytochrome c mais également sa capacité à tamponner des modifications de la concentration en calcium cytosolique libre (Liesa *et al.*, 2009). Connaissant le rôle et les nombreux mécanismes activés par une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$, nous allons terminer cette introduction, en décrivant rapidement le rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie du calcium cellulaire.

2.4.6. L'homéostasie du calcium mitochondrial

2.4.6.1. Les fonctions mitochondriales du calcium

Le calcium est un messager secondaire important dont la concentration intracellulaire (qui varie de 50 à 150 nM) est strictement régulée. Cet ion régule notamment directement l'activité de nombreuses enzymes telles que la pyruvate déshydrogénase et la FAD-glycérol phosphate déshydrogénase par un mécanisme de régulation allostérique (Denton, 2009). Cependant, les effets du calcium sur de nombreuses enzymes (kinases et phosphatases) et voies de signalisation cellulaires sont souvent médiés par la liaison du calcium à la calmoduline (Graier *et al.*, 2007). Par exemple, la liaison du calcium à la calmoduline permet l'activation de la calcineurine, une sérine/thréonine phosphatase, impliquée dans le contrôle de nombreux facteurs de transcription tels que CREB et MEF2, par exemple, afin d'induire la transcription de leurs gènes cibles nucléaires (Stull, 2001).

Cet ion régule également l'activité métabolique de la mitochondrie. En effet, la $[Ca^{2+}]_{mt}$ régule l'activité de nombreuses enzymes mitochondriales impliquées notamment dans le cycle de Krebs (la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase, l' α -cétoglutarate déshydrogénase) et dans la chaîne de phosphorylation oxydative (régulation de la F_0/F_1 ATPsynthase et l'ANT) (Gunter *et al.*, 2000). Le calcium régule également le degré de phosphorylation de certaines protéines mitochondriales. En effet, une augmentation de la $[Ca^{2+}]_{mt}$ conduit à la déphosphorylation, par une phosphatase encore inconnue, de la MnSOD (SOD2), conduisant à une augmentation de l'activité de cette enzyme antioxydante (Azarashvili *et al.*, 2003; Graier *et al.*, 2007). Le déclenchement de l'apoptose dépend également, en partie de la $[Ca^{2+}]_{mt}$. En effet une accumulation massive et soutenue de calcium au sein de la mitochondrie aboutit à la libération de différents facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c, suite à l'ouverture du pore de transition (ou *Permeability Transition Pore, PTP*) mitochondriale (Andreyev *et al.*, 1999). Une $[Ca^{2+}]_{mt}$ élevée stimule également la production de ROS (Kowaltowski *et al.*, 1998), ces derniers pouvant conduire à l'oxydation de protéines du PTP, à son ouverture, à la peroxydation de lipides membranaires et à l'inhibition des réactions d'oxydo-réduction. Enfin, une $[Ca^{2+}]_c$ locale supérieure à 2 μ M conduit à un arrêt massif de la motilité mitochondriale. Cet arrêt pourrait s'expliquer par la fonction d'importation de calcium des mitochondries à l'endroit de l'élévation de la concentration calcique (Yi *et al.*, 2004). La mitochondrie pourrait donc, dans ces conditions, assurer pleinement sa fonction de tampon aux changements calciques dans la cellule.

Si le calcium joue un rôle important au sein de la mitochondrie, cette dernière joue également un rôle important dans l'homéostasie cellulaire de cet ion. En effet, à l'état basal, un flux constant d'ions calcium parcourt la mitochondrie. Lors d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$, la mitochondrie importe rapidement le calcium cytosolique libre au sein de sa matrice. Cette phase rapide est suivie d'une phase dite de « plateau » due à une vitesse

d'importation diminuée. Enfin, un efflux de calcium de la mitochondrie vers le cytosol permet la libération du calcium ainsi rapidement accumulé (Gunter *et al.*, 2000). Détaillons maintenant un peu plus en détails les canaux et mécanismes impliqués dans l'influx et l'efflux de calcium au sein des mitochondries.

2.4.6.2. L'importation mitochondriale de calcium

2.4.6.2.1. L'importation à travers la MME

La MME est fortement perméable aux ions et en particulier au calcium, notamment en raison de la présence de nombreuses porines et canaux ioniques tels que le VDAC (*Voltage-Dependent Anion-Selective Channel*). Le VDAC est un canal protéique de 35 kDa dont la structure (en forme de tonneau β) constitue un large pore de 2,5 nm de diamètre. La protéine VDAC peut présenter différentes conformations en fonction du potentiel de membrane mitochondriale, ce dernier influant directement sur la conductance de VDAC. La surexpression de VDAC augmente la perméabilité de la MME au calcium (Graier *et al.*, 2007). La conductance aux ions calcium de la MME augmente également en réponse à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ supérieure à 2 μM sans que les mécanismes impliqués ne soient compris (Graier *et al.*, 2007).

2.4.6.2.1.1. L'uniporteur calcique mitochondrial

Enrichie en cardiolipines (Karp, 2004), la MMI est, quant à elle, quasiment imperméable aux ions et nécessite donc, pour leur transport, la présence de nombreux canaux et transporteurs spécifiques (**Figure 2.26**). Parmi ceux-ci, l'uniporteur calcique mitochondrial ou UCM (*Mitochondrial Calcium Uniporter*, MCU) (Kirichok *et al.*, 2004) est un complexe protéique dont les composants sont encore peu caractérisés, bien que les *Uncoupling Proteins-2* et *-3* (UCP-2 et UCP-3) pourraient en faire partie (Trenker *et al.*, 2007). L'activité de l'UCM est strictement dépendante du potentiel de membrane mitochondriale et peut être spécifiquement inhibée par le ruthénium red (Broekemeier *et al.*, 1994). L'affinité de l'UCM pour le calcium est relativement faible (10^{-6} - 10^{-4} M) (Graier *et al.*, 2007). Cette faible affinité de l'UCM pour le calcium impose une localisation des mitochondries à proximité (entre 10 et 25 nm) des sources potentielles de calcium cytosolique telles que le RE ou la membrane plasmique (Szabadkai *et al.*, 2003). Ainsi plus de 50 % des mitochondries sont ainsi situées à proximité du et/ou en interaction physique avec le RE. Les nombreux points de contact permettent d'outrepasser la faible affinité de l'UCM pour le calcium, puisque dans ces zones, les concentrations en calcium peuvent devenir localement très élevées. Un lien physique pourrait donc également exister afin de permettre le rapprochement ainsi que la liaison des deux organites. Il a été montré que la protéine Grp75 (*75 kDa Glucose-Regulated Protein*) pourrait interagir avec l'isoforme 1 de VDAC et avec le récepteur à l'inositol-3-phosphate (IP3-R) (Szabadkai *et al.*, 2006). Les points de contact sont également enrichis en diverses chaperonnes telles que Sig-1R (*Sigma-1 Receptor*) pouvant se lier à la protéine Grp75 (*75 kDa Glucose-Related Protein*) et induire une stabilisation du récepteur à l'inositol-3-phosphate. Ce mécanisme permettrait d'augmenter la durée d'importation de calcium dans la mitochondrie en réponse à la stimulation du récepteur à l'inositol-3-phosphate (Hayashi *et al.*, 2007). Enfin, comme nous l'avons déjà mentionné, la protéine Mfn2 pourrait également assurer ce lien physique par des interactions homotypiques et hétérotypiques entre les mitofusines localisées sur la mitochondrie et le RE. Une diminution de l'expression de cette protéine conduit à une altération du réseau mitochondrial couplée à une diminution des facultés d'importation mitochondriale de calcium en réponse à une stimulation des récepteurs à l'inositol-3-phosphate du RE (de Brito *et al.*, 2009).

2.4.6.2.1.2. Le Rapid Uptake Mode

Signalons également l'existence d'un deuxième mode d'importation de calcium au sein de la MMI. En effet, une augmentation rapide de la concentration cytosolique calcique induit une entrée rapide de calcium à l'intérieur de la matrice mitochondriale, désignée sous le nom de RaM (*R*Apid *u*ptake *M*ode) (Sparagna *et al.*, 1995). Bien que les acteurs moléculaires de ce mode de transport soient encore relativement peu connus, il a été proposé que ce mode soit également rempli par l'UCM adoptant une conformation spécifique. Un argument en faveur de cette hypothèse est la nécessité d'un potentiel de membrane mitochondrial afin de permettre le RaM, comme le nécessite également l'UCM (Sparagna *et al.*, 1995). De plus le RaM peut être inhibé par le ruthénium rouge bien que des concentrations supérieures à celles requises pour inhiber l'UCM soient requises (Sparagna *et al.*, 1995).

2.4.6.2.1.3. Le rôle de la matrice mitochondriale

On rappellera que l'importation de calcium par la mitochondrie est directement régulée par la matrice de cette dernière. En effet, la concentration en calcium libre de la matrice mitochondriale (comprise entre 0,4 et 500 μM), et donc accumulable, dépend directement de la concentration en phosphate inorganique, en citrate, en oxaloacétate et en cardiolipine (Spat *et al.*, 2008). Le pH matriciel est également important. En effet, une acidification de la matrice réduit la formation de complexe entre les phosphates et le calcium, ce qui diminue la capacité d'absorption de calcium de la mitochondrie. La concentration en phosphates dans la matrice dépend, quant à elle, de l'activité d'un transporteur mitochondrial de type antiport ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{OH}^-$) (Graier *et al.*, 2007).

2.4.6.3. L'exportation mitochondriale de calcium

L'exportation ou l'efflux de calcium hors de la matrice mitochondriale dans l'espace inter membranaire mitochondrial est principalement médié par l'antiporteur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ NCX_{mito} . Toutefois, la composition protéique du NCX_{mito} reste à déterminer (Graier *et al.*, 2007). Un autre système, indépendant du Na^+ , est constitué d'un antiporteur $2\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Figure 2.17). Ce dernier a été décrit dans des mitochondries isolées de cellules hépatiques bien qu'il ne soit pas exclu que ce dernier soit exprimé de manière constitutive (Graier *et al.*, 2007). Ce système d'antiport permet une extrusion de calcium contre son gradient de concentration. Il est donc possible que ce dernier requiert de l'ATP (Gunter *et al.*, 2000).

L'exportation de calcium joue un rôle important dans la restauration des stocks de calcium du RE. En effet si la proximité entre les mitochondries et le RE est nécessaire à une importation efficace du calcium par les mitochondries lorsqu'il est libéré à partir du RE, l'inverse est également vrai. La mitochondrie peut ainsi libérer du calcium vers le RE, repris par les pompes SERCA (Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase) afin de reconstituer les réserves de calcium. Ce mécanisme dépend du potentiel de membrane mitochondriale, ce qui explique que le découplage des mitochondries induit une diminution de la formation des stocks de calcium du RE (Graier *et al.*, 2007).

2.4.6.4. Dysfonctionnements de l'homéostasie du calcium dans les maladies de surcharge lysosomale

L'impact d'une surcharge lysosomale sur l'homéostasie du calcium, cytosolique ou mitochondriale, est encore peu caractérisé à l'heure actuelle. Toutefois, un modèle cellulaire de la maladie de Niemann-Pick de type C1 est caractérisé par une accumulation de sphingosine à l'intérieur du lysosome. Pour des raisons encore peu comprises, cette accumulation induit une augmentation de la concentration en calcium libre du lysosome. De

manière intéressante, cette déplétion en calcium lysosomal conduit à une accumulation lysosomale de cholestérol, de sphingomyeline et de glycosphingolipides (Lloyd-Evans *et al.*, 2008). De plus, une accumulation de gangliosides à GM1 conduit à une diminution de l'importation de calcium par le réticulum endoplasmique grâce à la pompe SERCA (Pelled *et al.*, 2003). La mucopolipidose de type 4, caractérisée par une déficience de la protéine mucopolipine-1, un canal protéique lysosomal vraisemblablement impliqué dans l'importation de Fe dans le lysosome (Dong *et al.*, 2008), montre également certaines altérations de l'homéostasie du calcium. Dans cette maladie, une fragmentation du réseau mitochondrial semble conduire à une diminution des capacités mitochondriales d'importation de calcium libre (Jennings *et al.*, 2006). Les raisons de ce dysfonctionnement ne sont également pas encore connues. En conclusion, comme nous pouvons le constater, l'implication de l'homéostasie du calcium dans le cadre des maladies de surcharge lysosomale est encore peu caractérisée à l'heure actuelle.

2.5. Contexte de la recherche et objectifs de ce mémoire

Bien que les causes moléculaires et les conséquences phénotypiques de la plupart des maladies de surcharge lysosomales soient bien caractérisées, les conséquences et impacts de la surcharge lysosomale sur les fonctions d'autres organites tels que la mitochondrie et/ou le RE sont encore relativement peu étudiés et donc peu connus. Bien que quelques études rapportent des effets sur la population mitochondriale dans certaines MSLs, ce type d'étude n'a jamais été réalisé dans le cadre de la céréoïde-lipofuscinose neuronale infantile tardive, caractérisée par une déficience en TPP-1. Ceci justifie donc pleinement la recherche menée dans ce travail. Reprenons rapidement les éléments essentiels de la littérature qui supportent l'hypothèse selon laquelle une surcharge lysosomale pourrait affecter la biologie d'un autre organite comme les mitochondries.

Premièrement, dans les fibroblastes de patients atteints de mucopolipidoses de type IV (ML-IV) (caractérisées par une mutation du gène codant la mucopolipine 1, un canal catalysant l'exportation d'ion fer dans le système endolysosomal (Dong *et al.*, 2008)), on observe une fragmentation du réseau mitochondrial, une réduction de la taille des mitochondries, un dysfonctionnement de l'importation calcique et une diminution de la mitophagie (Jennings *et al.*, 2006). Cette dernière caractéristique a également pu être observée dans des cellules de patients atteints de gangliosidose à GM₁, une maladie caractérisée par une déficience en β -galactosidase (Takamura *et al.*, 2008) et dans la maladie de Danon caractérisée par une mutation du gène codant pour la protéine LAMP-2 (Tanaka *et al.*, 2000).

La déficience de la protéine Npc-1 observée dans la maladie de Niemann-Pick est également accompagnée d'une diminution de la taille des mitochondries, d'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale ainsi que d'une inhibition de l'activité du complexe V (F₀/F₁ ATP synthase) (Yu *et al.*, 2005)

Enfin, on retrouve également dans des neurones de patients atteints de la maladie de Batten et de souris KO pour le gène *CLN3*, modèle de la maladie (caractérisée par une mutation du gène *CLN3* codant pour la batténine) (Pearce *et al.*, 1999) des mitochondries plus petites, plus nombreuses, présentant des cristaes anormales et une accumulation de matériel dans leur matrice semblable à celui retrouvé au sein des lysosomes (Walkley *et al.*, 1995; Jolly *et al.*, 2002; Fossale *et al.*, 2004) L'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale est également réduite et la concentration basale en ATP diminuée dans les cellules de patients atteints de lipofuscinoses CLN1 et CLN3 (Das *et al.*, 1999; Fossale *et al.*, 2004).

Rappelons enfin qu'une accumulation de la sous-unité c de l'ATP synthase est observée dans toutes les formes de lipofuscinoses, ce qui suggère que les fonctions de mitophagie soient augmentées dans ce type de maladie (Ezaki *et al.*, 1999; Jalanko *et al.*, 2009)

L'hypothèse de travail qui nous a guidée dans ce travail repose sur un constat simple en provenance des études synthétisées ci-dessus qui montrent que certaines MSLs sont caractérisées par des modifications de l'abondance et/ou de la morphologie de la population mitochondriale. Nous avons émis l'hypothèse que la déficience en TPP-1, induisant la CLN infantile tardive, pourrait également conduire à modifier la biologie de la mitochondrie. Nous avons donc tenté de rechercher les effets de la déficience en TPP-1 sur l'abondance, la morphologie et certains aspects fonctionnels de la mitochondrie dans des fibroblastes de patients atteints de céréïde-lipofuscinoïse neuronale infantile tardive.

Les objectifs de ce travail étaient donc :

- 1) Implémenter et mettre au point un test de l'activité enzymatique TPP-1.
- 2) Etudier l'abondance et la morphologie de la population mitochondriale dans une lignée de fibroblastes de patients atteints de CLN infantile tardive.
- 3) Mesurer la production de ROS et le contenu en ATP dans ces cellules.
- 4) Etudier la capacité fonctionnelle de réponse mitochondriale à « tamponner » une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ des fibroblastes de patients atteints de CLN infantile tardive.

3. Matériel et méthodes

3.1. Culture cellulaire

3.1.1. Lignées cellulaires utilisées

Les cellules utilisées dans le cadre de ce travail sont des fibroblastes humains de peau (*Coriell Institute, USA*). Une lignée cellulaire utilisée provenant d'un donneur sain de 30 ans d'origine caucasienne (GM02456), a été utilisée en tant que contrôle dans ce travail. Nous y ferons référence sous le terme « fibroblastes contrôles ». Une lignée cellulaire déficiente en TPP-1, a été isolée à partir d'une jeune patiente d'origine asiatique atteinte de lipofuscinose céréoïde neuronale infantile tardive (LINCL) (GM09404). La mutation responsable de cette maladie est une mutation *missense* dans le gène *CLN2* consistant en une substitution de la thymidine en une adénosine en position 4023. Cette substitution est responsable de l'apparition d'un codon codant pour une asparagine en position 287 en lieu et place d'un codon codant pour une isoleucine. Dans ce travail, nous ferons référence à cette lignée sous le nom de « fibroblastes LINCL ». Aucune de ces lignées cellulaires n'ayant été immortalisée, les cellules vieillissent au fur et à mesure des passages en culture. Afin de tenir compte de ce vieillissement nous devons veiller à compter les générations cellulaires. En fonction des dilutions réalisées lors des passages en culture nous comptons une ou plusieurs générations supplémentaires (par exemple une dilution de 1 en 2 équivaut à l'ajout d'une génération supplémentaire).

3.1.2. Cultures et sous-cultures cellulaires

Les fibroblastes sont cultivés dans des boîtes de culture de 75 cm² (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*) en présence de 20 ml de milieu de culture MEM Glutamax (*Minimal Essentiel Medium Glutamax*, pH : 7,4) contenant des sels (Earle's salt) et de l'HEPES 25 mM, auquel nous avons rajouté 1 mM de pyruvate (*Gibco BRL, UK*), 100 µM d'acides aminés non essentiels (*Gibco BRL, UK*) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (*Gibco BRL, UK*). Nous ferons référence à ce milieu dans le reste de ce mémoire sous le nom de « milieu MEM complet ». Lorsque les cellules atteignent la confluence, le milieu est décanté puis remplacé par 10 ml de HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) afin de rincer les cellules. Les cellules sont ensuite détachées par l'addition de 1 ml de trypsine 0,25% et EDTA 0.2 g/L (*Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid*) (*Lonza, Suisse*). La trypsine est une protéase qui clive des protéines d'adhérence intercellulaires et à la matrice extracellulaire tandis que l'EDTA est un agent chélateur du calcium, empêchant ainsi ce dernier de stabiliser les « jonctions cadhérines » responsables des interactions intercellulaires. Une fois les cellules détachées (3 min), les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 ml de milieu MEM complet et la suspension cellulaire est homogénéisée. Les cellules sont ensuite diluées (de 1/2 à 1/3) dans des boîtes de culture de format adapté pour l'expérience à réaliser. Finalement, les cellules sont incubées à une température de 37 °C, dans une étuve à atmosphère humide contenant 5% de CO₂.

3.2. Dosage des protéines selon la méthode de Bradford

3.2.1. Principe

Le dosage protéique selon la méthode de Bradford est basé sur l'utilisation du Bleu de Coomassie (Bradford, 1976). Ce colorant se présente deux formes : une forme cationique et une forme anionique, chacune dotée de caractéristiques physiques différentes. La première

forme représente la forme non liée aux protéines de ce colorant et présente une absorption maximale à 465 nm. La liaison du colorant aux résidus de type tryptophane, tyrosine, phenylalanine, arginine et proline des protéines présentes dans la solution, conduit à la formation de la deuxième forme du Bleu de Coomassie. La fixation du colorant sur les protéines est quantitative et peu sensible à la composition des protéines. La forme anionique du colorant présente une capacité maximale d'absorption à une longueur d'onde de 595 nm pouvant être mesurée par l'utilisation d'un spectrophotomètre. Le changement des capacités d'absorption étant proportionnel à la quantité de protéines liées, la concentration en protéines de l'échantillon peut être ainsi calculée.

3.2.2. Matériel et méthode

La solution de Bradford contenant le Bleu de Coomassie (*Biorad, Allemagne*) est diluée 5 fois dans de l'eau distillée et désionisée (MilliQ). Cette solution doit être préparée fraîchement ou filtrée avant utilisation. Premièrement, une droite d'étalonnage est réalisée (un exemple est présenté à la **figure 3.1**). Pour cela, un volume de 10 µl d'albumine sérique bovine (ASB) (*PAA, Autriche*) est ajouté à 1 ml de solution de Bradford (concentrations finales : 1, 2, 4, 8 et 10 µg/µl). Un volume d'échantillon (entre 1 et 10 µl selon l'échantillon à tester) est ensuite ajouté à 1 ml de solution de Bradford. Plusieurs blancs sont également réalisés : un blanc étalon qui est réalisé avec 10 µl d'eau distillée et désionisée (MilliQ) et un blanc échantillon réalisé à partir de 10 µl de tampon de lyse. La solution est ensuite incubée pendant 10 min à température ambiante avant de mesurer l'absorbance des échantillons à 595 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Une fois ces mesures effectuées, la concentration protéique des échantillons peut être calculée par rapport aux valeurs d'absorbance obtenus pour l'étalon BSA. Pour cela, nous avons utilisé la formule suivante :

$$Conc_{éch} = \frac{(Abs_{éch} - Abs_{blancECH})}{(Abs_{éta} - Abs_{blancETA}) \times (Vol_{éta} \times Conc_{éta} / Vol_{éch})}$$

Unités : µg/µl

Abs : absorbance ; Vol : volume ; Conc : concentration ; Ech : échantillon ; ETA : étalon.

3.3. Dosage de l'activité enzymatique de la tripeptidyl peptidase 1

3.3.1. Principe

La tripeptidyl peptidase-1 (TPP-1) est une exopeptidase lysosomale possédant deux activités enzymatiques dont la principale activité est une activité exopeptidase. Même si aucun motif de reconnaissance spécifique par la TPP-1 n'a pu être mis en évidence, il est admis que le substrat Ala-Ala-Phe-7-amido-4-méthylcoumarine (*Ala-Ala-Phe-AMC*) est reconnu et clivé suffisamment spécifiquement par la TPP-1 que pour permettre son utilisation pour le dosage de l'activité de cette enzyme (Sohar *et al.*, 2000). Le clivage de ce substrat par la TPP-1 conduit à la libération du groupement AMC (Amido-4-Méthylcoumarine) qui émet un signal de fluorescence à 460 nm en réponse à une excitation à une longueur d'onde de 350 nm. La libération de ce groupement est donc proportionnelle à l'activité de la TPP-1, qui peut être quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre.

3.3.2. Matériel et méthode

3.3.2.1. Sous-culture et préparation du lysat cellulaire

Les fibroblastes contrôles et LINCL sontensemencés en boîte de culture de 25 cm² à une densité de 300 000 cellules par boîte (*Greiner Bio-One, Allemagne*), 24 h avant l'expérience. Une fois arrivées à confluence, les cellules sont rincées 2 fois avec 10 ml de PBS froid (4 °C) (**Tableau 3.1**), puis incubées à température ambiante pendant 5 min dans 200 µl de tampon de lyse (**Tableau 3.2**). Le lysat cellulaire est ensuite récupéré et homogénéisé par 5 passages dans un homogénéiseur de Dounce. L'homogénat obtenu est placé dans des microtubes (*Sarstaedt, Suisse*).

3.3.2.2. Dosage enzymatique de l'activité TPP-1

Dans une cuvette de spectrofluorimètre (*Sarstaedt, Suisse*), on ajoute 180 µl de mixture réactionnelle (**Tableau 3.3**) mise à préchauffer dans un bain à 37 °C. Afin de déterminer les conditions expérimentales optimales, nous avons ajouté ensuite 20 µl de lysat cellulaire contenant 20 000 (8 µg), 4 000 (1,6 µg) ou 2 000 (1,8 µg) cellules préparé par dilution du lysat primaire dans du tampon de lyse (volume final : 20 µl). La concentration protéique de celui-ci est déterminée par un dosage protéique selon la méthode de Bradford précédemment décrite (**voir point 3.2**). Un blanc échantillon a également été réalisé en ajoutant 20 µl de tampon de lyse. Les échantillons sont ensuite incubés pendant des temps croissants (10, 20, 30, 40, 60 ou 120 min). Au terme de cette incubation, la réaction enzymatique est stoppée par ajout de 1,2 ml de tampon glycine/EDTA (**Tableau 3.4**). Les cuvettes sont alors placées dans un spectrofluorimètre (SPF-500C, SimAmingo, *SLM Instruments, UK*) et l'intensité de fluorescence est mesurée (λ Ex : 350 nm ; λ Em : 460 nm). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence.

Pour le dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1 après restauration de l'activité enzymatique de la TPP-1, le protocole d'obtention du lysat cellulaire est identique à celui précédemment mentionné. Après détermination de la concentration protéique du lysat primaire, nous avons ensuite ajouté un volume d'échantillon de 20 µl (dilué dans du tampon de lyse, équivalant à 8 µg de protéines) à 180 µl de mixture réactionnelle, préalablement préchauffée à 37 °C dans un bain. Nous avons ensuite incubé les échantillons à 37 °C pendant 120 min avant d'arrêter la réaction par ajout de 1,2 ml de tampon glycine/EDTA. Les cuvettes sont alors placées dans un spectrofluorimètre (SPF-500C, SimAmingo, *SLM Instruments, UK*) et l'intensité de fluorescence est mesurée (λ Ex : 350 nm, λ Em : 460 nm). Les résultats sont exprimés en unités de fluorescence relative par µg de protéines.

3.4. Restauration de l'activité TPP-1 des fibroblastes LINCL.

3.4.1. Principe

La production d'une forme précurseur recombinante de la TPP-1 par des cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary cell*) a été mise au point par Lin et ses collaborateurs (Lin *et al.*, 2001). Cette forme recombinante présente l'avantage d'être produite dans des cellules eucaryotes ce qui lui permet d'acquérir les modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité ainsi qu'à son adressage lysosomal. Cette forme recombinante est endocytée et incorporées dans les lysosomes des cellules d'une façon dépendante des récepteurs à mannose-6-phosphate situés à leur membrane plasmique mais aussi par pinocytose (Lin *et al.*, 2001). Après incubation avec cette enzyme (diluée dans du milieu MEM complet + 10 % SVF), nous utilisons le dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1 mis au point au **point 3.3**.

3.4.2. Matériel et méthode

Ce protocole a été adapté des travaux de Lin et de ses collaborateurs (Lin *et al.*, 2001). Les fibroblastes contrôles et LINCL sont repiqués à une densité cellulaire de 150 000 cellules par boîte de culture de 25 cm² (Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne), 24 h avant le début de l'expérience. Une fois à confluence, le milieu des cellules est décanté puis remplacé par du milieu MEM complet + 10 % SVF contenant de la pro-enzyme TPP-1 recombinante (10 nM ou 3 nM) pendant 1, 2 ou 4 jours, afin de déterminer les conditions optimales d'incubation avec la pro-enzyme recombinante. A l'issue de cette incubation, un dosage de l'activité TPP-1 est réalisé comme décrit au **point 3.3**. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence relatives par µg de protéines.

Pour les restaurations de l'activité TPP-1 des cellules LINCL utilisées couramment au cours de ce mémoire, les cellules contrôles et LINCL sont repiquées à une densité de 150 000 cellules par boîte de culture de 25 cm², 24 h avant le début de la restauration de l'activité TPP-1. Nous avons ensuite incubé nos cellules en présence de pro-enzyme TPP-1 (10 nM) pendant 2 j. Au terme de cette incubation, les cellules sont rincées avec 5 ml de HBSS puis incubées en présence de milieu MEM complet + 10 % SVF sans pro-enzyme recombinante pendant 5 j, avant la réalisation des expériences et/ou un dosage de l'activité TPP-1 comme décrit au **point 3.3**. Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence relatives par µg de protéines.

3.5. Analyses en cytométrie de flux

3.5.1. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie de flux est une technique permettant des analyses rapides et multiparamétriques de particules en suspension comme des cellules. Un flux de cellules est créé à partir de cette suspension cellulaire. Les cellules sont ensuite excitées, une par une, grâce à un faisceau lumineux d'une longueur d'onde déterminée. Ce faisceau lumineux sera diffracté, réfracté et réfléchi au sein de la cellule. Le laser utilisé peut également exciter le fluorochrome d'un anticorps ou une sonde fluorescente, éventuellement utilisés pour marquer les cellules. Les signaux lumineux réémis, dépendant donc de la complexité interne, de la taille de la cellule et des éventuels fluorochromes utilisés, sont ensuite séparés par divers filtres optiques, collectés et multipliés grâce à des photomultiplicateurs puis analysés grâce à un logiciel informatique (BD Biosciences, Cellquest, USA). Dans le cadre de ce mémoire, nous avons utilisé la cytométrie de flux pour quantifier la fluorescence associée à la population mitochondriale par la sonde MitoTracker Green. Nous avons également utilisé la cytométrie de flux comme outil de mesure du potentiel de membrane mitochondriale après marquage de l'organite au TMRE et enfin, afin de déterminer la $[Ca^{2+}]_c$ en réponse à une stimulation par la bradykinine ou l'ionomycine, dans les cellules contrôles et LINCL grâce aux sondes Fluo-3/FuraRed.

3.5.2. Estimation de l'abondance de la population mitochondriale

3.5.2.1. Principe

Les sondes MitoTracker (*Molecular Probes, USA*) permettent de marquer spécifiquement les mitochondries. Le principe repose sur le fait que ces sondes possèdent un groupement chlorométhyl capable de réagir avec les groupements thiols présents sur les protéines mitochondriales afin de former des liens aldéhydes entre la sonde et les protéines mitochondriales. La sonde MitoTracker Green présente l'avantage de n'émettre de la fluorescence qu'une fois insérée dans l'environnement lipidique de la mitochondrie.

L'accumulation de la sonde est également indépendante du potentiel de membrane mitochondrial (Haugland, 2002). Cette sonde permet donc le marquage des mitochondries mais également d'effectuer des mesures de l'abondance de la population mitochondriale totale, une des applications de cette sonde dans ce travail. Un exemple de micrographie illustrant l'organisation en réseau de la population mitochondriale marqué par la sonde MitoTracker Green est proposé à la **figure 3.2**.

3.5.2.1. Matériel et méthodes

Des fibroblastes contrôles et LINCL sontensemencés dans des boîtes de cultures de 75cm² (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*) à une densité de 600 000 cellules, 5 j avant la mesure. Une fois la confluence atteinte, les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de HBSS (*Lonza, Allemagne*), puis détachées grâce à 500 µl d'une solution de trypsine 0,25 % + EDTA 0,2 g/l (*Gibco, USA*) pendant 3 min. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 2 ml de milieu MEM complet contenant 10% de SVF, puis centrifugées pendant 10 min à 1 000 rpm à température ambiante. Les culots de cellules sont ensuite resuspendus dans 2 ml de tampon KRH (**Tableau 3.5**) puis les cellules sont centrifugées pendant 10 min à 1 000 rpm à température ambiante. Enfin, les cellules sont resuspendues dans 2 ml d'une solution de KRH contenant 0,5 % d'ASB et 100 nM de MitoTracker Green. Des « blancs » permettant la mesure de l'autofluorescence des cellules, sont réalisés à partir de cellules resuspendues dans du KRH + 0,5% d'ASB. Les cellules sont ensuite incubées à 37 °C, à l'obscurité, pendant 30 min, puis sédimentées par centrifugation à 4 °C pendant 5 min à 1000 rpm. Enfin, les cellules ont été resuspendues dans 2 ml d'une solution de KRH contenant 0.5 % d'ASB puis analysées en cytométrie de flux en fonction de l'intensité de fluorescence (canal : FL-1H, λ Exc : 488 nm ; λ Em 530 nm) et de la taille cellulaire (canal : FSH) (*FACSalibur, BD Biosciences, USA*). Chaque mesure est réalisée sur 10 000 cellules. Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence sont ensuite calculées par le programme *BD Biosciences Cellquest*. Les résultats sont exprimés sous forme d'histogramme reprenant l'intensité de fluorescence en fonction du nombre de cellules.

3.5.3. Mesure du potentiel de membrane mitochondriale

3.5.3.1. Principe

La TetraMethylRhodamine Ethyl ester (TMRE) est une sonde spécifique de la mitochondrie dont l'accumulation est strictement dépendante du potentiel de membrane mitochondriale. Dans ce travail, nous avons utilisé cette sonde dans le but d'évaluer le potentiel de membrane mitochondriale par une analyse en cytométrie de flux. Un des avantages de cette technique est sa grande rapidité, nécessaire pour mesurer les rapides modifications de potentiel mitochondrial, souvent réversibles (*Gottlieb et al., 2003*).

3.5.3.2. Matériel et méthodes

Les fibroblastes contrôles et LINCL sontensemencés à une densité de 150 000 cellules dans des boîtes de culture à 6 puits (*Corning Life Sciences, USA*), 24 h avant l'expérience. Une fois arrivées à confluence, les cellules sont rincées une fois avec 5 ml de HBSS stérile puis incubées à 37 °C pendant 30 min en présence de TMRE à une concentration de 25 nM à l'obscurité. Au terme de l'incubation, les cellules sont rincées une fois avec 5 ml de HBSS, puis détachées par incubation à 37 °C pendant 3 min en présence de 2 ml de trypsine 0,25 % + EDTA 0,2 g/l. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 10 ml de milieu MEM complet + 10 % SVF. Les cellules sont alors centrifugées à 4 °C pendant 5 min à 1 000 rpm, le culot cellulaire est resuspendu dans 500 µl de milieu FACS TMRE (**Tableau 3.6**) puis les cellules sont transférées dans un tube spécial pour FACS (*BD Biosciences, USA*) à 4 °C. Avant

l'analyse, les tubes sont laissés à température ambiante pendant 5 min. Une analyse de l'intensité de fluorescence émise par la sonde (canal FL-3H, λ Exc : 436 nm ; λ Em : 637 nm) est alors réalisée en cytométrie de flux en fonction de la taille cellulaire (canal : FSH) (FACSalibur, *BD Biosciences, USA*). Chaque analyse est réalisée sur 10 000 cellules. Un contrôle « blanc », permettant de mesurer l'autofluorescence des cellules, constitué de cellules contrôles et LINCL non incubées en présence de sonde, est également réalisé. Afin d'être sûr que le signal de fluorescence mesuré soit bien spécifique du potentiel de membrane mitochondrial, un contrôle positif est réalisé en ajoutant 20 μ M de FCCP (*Sigma, Allemagne*), 1 min avant la lecture en cytométrie de flux. Les résultats sont ensuite normalisés par l'intensité de l'autofluorescence de chaque condition. Les résultats sont exprimés sous forme d'histogramme reprenant l'intensité de fluorescence en fonction des conditions.

3.5.4. Mesure de la concentration cytosolique libre en calcium

3.5.4.1. Principe

Afin d'analyser la $[Ca^{2+}]_c$ dans nos deux lignées cellulaires, nous avons utilisé deux sondes différentes : Fluo-3 et FuraRed. L'utilisation simultanée de deux sondes non ratiométriques permet d'éliminer des artefacts de dosage dus à une éventuelle accumulation différentielle des sondes au sein d'une des lignées cellulaires étudiées. En effet, la normalisation des résultats rendra les données indépendantes de la concentration en sonde. Ceci ne pourrait pas être réalisé dans un dosage n'utilisant qu'une seule sonde non ratiométrique. La sonde Fluo-3 AM requiert un premier clivage par des thioestérases cytosoliques avant de pouvoir se lier au calcium. La liaison du calcium à la sonde induit un changement des propriétés optiques de la sonde (λ Em : 515 à 535 nm) et une augmentation de son intensité de fluorescence. La sonde FuraRed présente un comportement optique inverse (λ Em : 685 à 665 nm) et son intensité de fluorescence diminue en présence de calcium. Ce comportement avantageux permet ainsi la création d'un système ratiométrique. De plus, l'utilisation simultanée de ces deux sondes génèrent peu de bruit de fond, tout en permettant une mesure sensible de la $[Ca^{2+}]_c$ (Walczyko *et al.*, 2000).

3.5.4.2. Matériel et méthodes

Les cellules contrôles et LINCL sont repiquées dans des boîtes de culture à 6 puits (*Corning Life Sciences, USA*) à une densité de 150 000 cellules par puits, 24 h avant l'expérience. A confluence, les cellules sont rincées une fois avec 5 ml de HBSS stérile puis incubées à 37 °C pendant 30 min et à l'obscurité, en présence de milieu de culture contenant 2 μ M de sonde Fluo-3 (*Molecular Probes, Invitrogen, USA*) et 5 μ M de sonde FuraRed (*Molecular Probes, Invitrogen, USA*). Au terme de l'incubation, les cellules sont rincées une fois avec 5 ml de HBSS puis incubées à 37 °C pendant 3 min, en présence de 2 ml de trypsine 0,25 % + EDTA 0,2 g/l, avant d'être resuspendues dans 8 ml de milieu MEM complet + 10 % SVF. Les cellules sont ensuite centrifugées à 4 °C pendant 5 min à 1000 rpm. Le culot est resuspendu dans 10 ml de HBSS (**Tableau 3.7**) contenant 1 mM de $CaCl_2$ et centrifugé à 4 °C pendant 5 min à 1000 rpm. Enfin le culot obtenu est décanté, resuspendu dans 500 μ l de HBSS et transféré dans un tube spécial pour FACS (*BD Biosciences, USA*) placé sur glace (4 °C). Les cellules sont ensuite réchauffées à température ambiante pendant 5 min puis sont analysés en cytométrie de flux. L'intensité de fluorescence émise par les sondes (canal FL-1H, λ Exc : 488 nm ; λ Em : 530 nm: Fluo-3 ; canal FL-3H, λ Exc : 436 nm ; λ Em : 637 nm: FuraRed) est mesurée en fonction de la taille cellulaire (canal : FSH) (FACSCalibur, *BD Biosciences, USA*). Cette première lecture permet de mesurer la $[Ca^{2+}]_c$ basale en calcium dans les cellules. Dans certaines conditions expérimentales et comme indiqué dans la légende des figures, les cellules sont ensuite stimulées par 1 μ M de

bradykinine (*Sigma, Allemagne*) ou par 10 μM d'ionomycine (*Sigma, Allemagne*) afin de mesurer l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ en réponse à ces deux molécules. L'analyse en cytométrie de flux est réalisée 1 min après l'addition de la molécule. Des blancs, permettant de mesurer l'autofluorescence des cellules, constitués de cellules incubées en présence de milieu complet + 10 % SVF ne contenant pas de sonde, sont également réalisés. Chaque analyse est réalisée sur 10000 cellules. Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence sont ensuite corrigées par la valeur d'autofluorescence respective à chaque condition. Le ratio entre les intensités de fluorescence émise par les sondes Fluo-3 et celle de l'intensité de fluorescence de la sonde FuraRed, est calculé. Les résultats sont exprimés sous forme d'histogramme reprenant l'intensité de fluorescence en fonction des conditions.

3.6. Observation de la morphologie de la population mitochondriale

Les fibroblastes contrôles et LINCL sontensemencés à une densité de 10 000 cellules par puits dans des boîtes de culture Lab-Tek II (*VWR, France*) et ce, 24 h avant le marquage. Le jour de l'observation, les cellules sont rincées une fois avec 1 ml de tampon Kreb's Ringer HEPES Buffer (*KRH*) (**Tableau 3.5**) puis incubées à 37 °C à l'obscurité pendant 40 min, en présence de 1 ml d'une solution de KRH contenant du MitoTracker Green à 100 nM et 2 % de SVF. Afin de réaliser un contrôle positif, des cellules contrôles sont également préincubées en présence de 20 μM de FCCP (*Sigma, Allemagne*). Pour cette condition, du FCCP 20 μM est ajouté à tous les tampons utilisés par la suite. Une fois l'incubation terminée, les cellules sont rincées 2 fois avec 1 ml de KRH puis sont incubées en présence de 1 ml de KRH pendant la durée de l'observation en microscopie confocale (λ Ex : 490 nm ; λ Em : 516 nm) (*Leica, Allemagne*).

3.7. Fractionnement cellulaire

3.7.1. Principe

La technique de fractionnement cellulaire consiste en la séparation des différents organites par centrifugation différentielle. Dans ce mémoire, nous avons utilisé une méthode de centrifugation adaptée d'un protocole mis au point par Hamer et Jadot (Hamer *et al.*, 2005) afin de récupérer les fractions N (contenant les noyaux), M (contenant les mitochondries), L (contenant les lysosomes et les peroxyosomes), P (contenant les microsomes dont le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi) et S (contenant les constituants cellulaire solubles non sédimentables) des cellules contrôles et LINCL. Enfin un dosage de l'activité d'enzymes spécifiques à certains organites est réalisée afin d'estimer le degré de purification de l'organite d'intérêt. Pour cela, nous avons dosé l'activité enzymatique de la β -galactosidase et celle de la cytochrome c oxydase afin de mesurer le degré d'enrichissement, respectivement, des lysosomes et des mitochondries, dans les différentes fractions cellulaires obtenues. Mentionnons également que les fractions obtenues sont enrichies mais non purifiées, ce qui peut rendre l'interprétation des résultats difficile en raison d'éventuelles contaminations par d'autres organites (Hamer *et al.*, 2005).

3.7.2. Sous-culture et fractionnement cellulaire

Les cellules contrôles et LINCL sont repiquées à une densité de 600 000 cellules par boîte de culture de 75 cm^2 (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*), 4 jours avant le fractionnement cellulaire. Toutes les étapes du fractionnement cellulaire s'effectuent à 4 °C et les échantillons ont été réalisés à partir de 8 boîtes de culture de 75 cm^2 . Lorsque la confluence est atteinte, les cellules sont rincées 3 fois avec 8 ml de PBS puis récupérées dans

1 ml de saccharose 0,25 M. Les cellules des différentes boîtes sont rassemblées puis sont homogénéisées par 6 passages à l'homogénéiseur de Dounce. Les fractions contenant les organites sont ensuite récupérées par différentes centrifugations reprises à la **figure 3.3**. Chaque culot obtenu est resuspendu dans 2 ml de saccharose 0.25 M. La concentration protéique de chaque fraction est ensuite déterminée par la méthode de dosage de Bradford (voir **point 3.2**). Chaque fraction est ensuite aliquotée puis stockée à -20 °C en vue d'une utilisation ultérieure.

3.7.3. Dosage des activités enzymatiques de la β -galactosidase et de la cytochrome c oxydase.

3.7.3.1. Principe

Le dosage de l'activité enzymatique de la β -galactosidase repose sur le clivage d'un substrat couplé à un groupement méthylumbelliferyl afin de libérer un groupement méthyllumbelliférone, disposant de propriétés fluorescentes (λ Em : 365 nm ; λ Exc : 450 nm). Cette enzyme étant lysosomale, elle permet d'estimer la distribution des lysosomes dans les fractions cellulaires obtenues par centrifugation différentielle.

Le cytochrome c présente une propriété d'absorbance très étroite à 550 nm. Une fois oxydé, le spectre d'absorbance devient plus large mais aussi plus faible. Le dosage utilisé ici repose sur l'oxydation de cytochrome c induite par la cytochrome c oxydase présente dans notre échantillon. La décroissance des propriétés d'absorbance du cytochrome c à 550 nm étant proportionnelle à la quantité de cytochrome c oxydase présent dans notre échantillon, celle-ci peut être déduite. La cytochrome c oxydase étant mitochondriale, elle permet d'estimer la distribution des mitochondries dans les fractions cellulaires obtenues par centrifugation différentielle

3.7.3.2. Matériel et méthode du dosage enzymatique de la β -galactosidase

Un volume de 180 μ l de mixture réactionnelle (**Tableau 3.8**) est déposé dans des cuvettes spéciales à fluorescence (*Sarstedt, Allemagne*) (une cuvette test et une cuvette blanc pour chaque fraction cellulaire) que l'on incube à 37 °C pendant 5 min. Les fractions cellulaires sont ensuite diluées dans du sucrose 0,25 M (E : 2X ; N, S : 1X ; M, L, P : 10X) et un volume de 20 μ l de fraction diluée est ajouté à chaque cuvette test. Les échantillons sont ensuite incubés à 37 °C pendant 10 min. A l'issue de cette incubation, on ajoute 1,2 ml de tampon glycine/EDTA (**Tableau 3.4**) afin de stopper la réaction. On ajoute enfin 1,2 ml de tampon glycine/EDTA dans chaque cuvette « blanc » à laquelle on ajoute 20 μ l de fraction diluée. Une droite d'étalonnage est ensuite réalisée en lisant la fluorescence de cuvettes contenant 1,2 ml de solution contenant de la méthylumbelliférone à différentes concentrations croissantes (4 μ M, 8 μ M et 40 μ M). L'intensité de fluorescence des échantillons est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (λ Em : 365 nm ; λ Exc : 450 nm). Enfin l'activité spécifique relative (ASR) de chaque fraction est mesurée selon la formule :

$$AS = \frac{F \times Dil \times Vol_{tot}}{Temps \times Vol_{ech} \times Conc_{prot}}$$

$$ASR = \frac{AS_{fraction}}{AS_{homogénat}}$$

Avec AS : Activité Spécifique ; F : intensité de fluorescence ; Dil : dilution finale ; Vol_{tot} : volume total ; Vol_{ech} : volume de l'échantillon ; Conc_{prot} : concentration protéique de la fraction ; ASR : Activité Spécifique Relative.

Les résultats sont ensuite exprimés sous forme de diagramme reprenant en abscisse le pourcentage de protéines dans chaque fraction de sorte que la somme soit égale à 100% et en ordonnées l'ASR.

3.7.3.3. Matériel et méthode du dosage enzymatique de la cytochrome c oxydase

Une cuvette spéciale pour mesure d'absorbance (*Sarstedt, Allemagne*) contenant 1 ml de cytochrome c oxydé avec du ferricyanure et une autre contenant 1 ml de cytochrome c réduit avec du dithionite sont préparées. Une première lecture de l'absorbance de 1 ml de cytochrome c réduit est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre (λ Abs : 550 nm). On ajoute ensuite, peu à peu, du cytochrome c oxydé à une cuvette contenant 1 ml de solution substrat (**Tableau 3.9**) afin de réduire l'absorbance mesurée à 90% de la première lecture. Les fractions cellulaires sont ensuite diluées 2 fois dans une solution de dilution (**Tableau 3.10**) et 50 μ l de chaque fraction à 1 ml de solution de solution substrat réduit à 90%. L'absorbance des échantillons peut ensuite être mesurée grâce à un spectrophotomètre pendant un temps de 30 s. Le programme Lambda10 permet ensuite la détermination de l'absorbance min et max de chaque échantillon. On calcule alors l'activité de chaque fraction par la formule :

$$AS = \frac{(Abs_{\max} - Abs_{\min}) \times Dil \times Vol_{tot}}{Temps \times Vol_{ech} \times Conc_{prot}}$$

$$ASR = \frac{AS_{fraction}}{AS_{homogénat}}$$

Avec AS : Activité Spécifique ; Abs_{\max} : Absorbance maximale ; Abs_{\min} : Absorbance minimal ; Dil : dilution finale ; Vol_{tot} : volume total ; Vol_{ech} : volume de l'échantillon ; $Conc_{prot}$: concentration protéique de la fraction ; ASR : Activité Spécifique Relative.

Les résultats sont ensuite exprimés sous forme de diagramme reprenant en abscisse le pourcentage de protéines dans chaque fraction de sorte que la somme soit égale à 100% et en ordonnées l'ASR.

3.8. Analyse de l'abondance protéique par gel SDS-PAGE, Western blot et détection en fluorescence

3.8.1. Principe

La technique du Western blot en fluorescence permet la séparation, l'identification de protéines ainsi que la quantification de leur abondance. La technique du Western blot en fluorescence présente l'avantage de montrer moins de bruit de fond que les techniques habituellement utilisées en Western blotting telles que la révélation basée sur la chimioluminescence. De plus, contrairement à cette méthode, cette technique est quantitative sur plusieurs ordres de grandeurs (Gingrich *et al.*, 2000; Delaive *et al.*, 2008).

3.8.2. Matériel et méthode

3.8.2.1. Préparation des lysats clairs

Les fibroblastes sont ensemencés à une densité de 300 000 cellules dans des boîtes de cultures de 25 cm² (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*), 24 h avant la réalisation des lysats clairs. Lorsque la confluence est atteinte, les cellules sont rincées une fois avec 5 ml de PBS (*Phosphate Buffer Saline, Tableau 3.1*) glacé (4 °C). Les cellules sont alors lysées avec 500 μ l de tampon de lyse (**Tableau 3.11**) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*PIC*,

Roche, Allemagne) et de phosphatases (*Protease Inhibitors*, PIB, **Tableau 3.12**) ainsi que du Triton X-100 à 0,1 %, un détergent permettant la lyse des cellules. Les cellules sont incubées 5 min en présence de la solution de lyse, collectées dans des microtubes (*Sarstedt*, Allemagne) puis placés sur une roue à 4 °C pendant 30 min. Les lysats sont ensuite centrifugés à 4 °C pendant 10 min à 13000 rpm. Le surnageant (= lysat clair) est alors récupéré, fractionné par aliquotes de 50 µl puis conservés à -20 °C jusqu'à une utilisation ultérieure.

La concentration protéique des lysats clairs ainsi obtenus est déterminée par la méthode de dosage de Bradford précédemment décrite (voir **point 3.2**). Des volumes correspondants à 10 µg de protéines de chaque échantillon sont préparés, 20 % de tampon « Sample Buffer » (**Tableau 3.13**) concentré 5 fois est alors ajouté et chaque échantillon est porté à un volume égal avec de l'eau distillée et désionisée (MilliQ). Le tampon Sample Buffer contient du glycérol permettant d'alourdir l'échantillon et ainsi de faciliter la charge de ce dernier dans les puits du gel d'électrophorèse. Cette solution contient également du β-mercaptoéthanol responsable de la réduction des ponts disulfures des protéines de l'échantillon, permettant leur dénaturation. Enfin le bleu de bromophénol permet de visualiser le front de migration des échantillons.

Une fois les échantillons préparés, ils sont portés à ébullition par incubation à 100 °C pendant 5 min, centrifugés brièvement à 13 000 rpm avant d'être chargés de manière asymétrique sur le gel. Un volume de 10 µl d'un étalon de poids moléculaire See Blue (*Invitrogen*, USA) est également chargé dans un des puits afin de pouvoir estimer le poids moléculaire des bandes correspondantes à la protéine d'intérêt.

3.8.2.2. Préparation des gels SDS-PAGE

Le premier gel est un gel SDS-PAGE séparateur (**Tableau 3.14**). Il est coulé entre deux plaques de verres avant d'être recouvert d'une couche de 1 ml d'isopropanol (*Merck*, Allemagne). Cette couche est nécessaire afin de permettre la polymérisation de l'acrylamide en absence d'oxygène. Le tétraméthyl éthylène diamine (*TEMED*) ajouté au gel permet de catalyser la formation de radicaux libres ($SO_4^{\cdot -}$) à partir de persulfate d'ammonium. Ces radicaux libres peuvent ensuite réagir sur des monomères de polyacrylamide. Le complexe ainsi formé étant également pourvu d'un doublet électronique libre, il pourra également réagir avec d'autres monomères de polyacrylamide et permettre leur polymérisation. Des monomères de bis-acrylamide sont également présents afin de créer des ponts entre les différents polymères de polyacrylamide. Le gel ainsi obtenu se présente sous la forme d'un tamis moléculaire au travers duquel les protéines peuvent circuler. Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) présent dans le gel est responsable du recouvrement des protéines de charges anioniques, rendant ainsi leur migration dépendante uniquement de leur poids moléculaire (**Figure 3.4**). Le gel séparateur polymérise pendant 45 min. Ensuite, un deuxième gel, le gel concentrateur (**Tableau 3.15**), est coulé par-dessus le premier et un peigne y est placé afin de créer les puits nécessaires au chargement des échantillons. La polymérisation dure 1 h. Les puits sont ensuite rincés à l'eau distillée et désionisée (MilliQ) puis au tampon de migration électrophorétique (**Tableau 3.16**). Les échantillons sont alors chargés sur le gel, ces derniers sont placés dans une cuve d'électrophorèse et sont soumis à une intensité électrique de 35 mA (par gel) pendant 30 min puis à une intensité de 45 mA (par gel pendant) 3 h. Le passage à travers le premier gel permet de concentrer les protéines de l'échantillon avant que ces dernières ne soient séparées en fonction de leur poids moléculaire au travers du gel séparateur.

3.8.2.3. Transfert des protéines sur une membrane PVDF

Lorsque la migration des échantillons est terminée, le gel est alors démoulé puis placé dans un système de sandwich. Le gel est placé sur une membrane de PVDF (*PolyVinylidèneDiFluoride*) (*Milipore*, USA) hydrophobe préalablement hydratée dans du

méthanol pendant 1 min, puis équilibrée dans du tampon de transfert (**Tableau 3.17**) pendant 5 min. Deux papiers Whatman imbibés de tampon de transfert (*Marcherey-Nagel, Allemagne*) sont alors placés de part et d'autre du montage gel/membrane. Le sandwich ainsi obtenu est alors placé dans un appareil de transfert permettant le transfert des protéines contenues dans le gel sur la membrane par transfert semi-sec. Le montage est alors soumis à une intensité constante de 30 mA pendant une nuit.

3.8.2.4. Incubation de la membrane avec les anticorps primaires et secondaires

Une fois le transfert terminé, la membrane sur laquelle les protéines ont été transférées est rincée avec du PBS (*Phosphate Buffer Saline*) (**Tableau 3.1**) contenant 0.1% de Tween-20 (Polyéthylène Sorbitan monolaurate) (*Sigma USA*) puis est incubée pendant 2 h à température ambiante dans une solution bloquante Odyssey Infrared Imaging System Blocking Buffer (*Licor Biosciences, USA*) diluée 5 fois dans du PBS contenant 0.1% de Tween-20. Cette première étape permet de bloquer les sites de liaison non spécifiques des anticorps, afin de diminuer le bruit de fond. La membrane, une fois bloquée, est ensuite incubée pendant 1 h à température ambiante en présence d'un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué à une concentration spécifique (dépendant de l'anticorps utilisé) dans la solution bloquante non diluée. La liste des anticorps utilisés au cours de ce mémoire ainsi que les dilutions utilisées sont reprises au **Tableau 3.18**. La membrane est ensuite rincée 3 fois pendant 10 min avec du PBS contenant 0.1 % de Tween-20. La membrane est ensuite incubée pendant une heure à température ambiante en présence d'une solution contenant l'anticorps secondaire dilué dans la solution bloquante non diluée, puis rincée 3 fois pendant 10 min avec du PBS contenant 0.1% de Tween-20 et 1 fois pendant 10 min avec du PBS. La membrane est ensuite placée sur un papier Whatman, entre deux films plastiques et laissée sécher à 37 °C à l'obscurité.

3.8.2.5. Révélation et quantification

Une fois la membrane complètement sèche, celle-ci est placée dans un scanner (Odyssey Licor) capable de détecter la fluorescence émise par les fluorochromes couplés aux anticorps secondaires (IRDYE 680 nm ou IRDYE 800 nm selon l'anticorps primaire utilisé, voir **Tableau 3.18**). Les bandes correspondant aux protéines d'intérêt sont alors scannées et l'intensité de fluorescence de ces bandes est quantifiée à l'aide du logiciel « Odyssey ». Les intensités de fluorescence ainsi obtenues sont alors normalisées par la fluorescence correspondant à l'immunodétection de diverses protéines utilisées comme contrôle de charge (α -tubuline ou β -actine), comme indiqués dans la légende des figures. Les résultats des Western blots seront présentés sous forme de graphique reprenant la quantification de l'intensité de fluorescence résultant de l'immunodétection de la protéine d'intérêt, normalisée par rapport au contrôle de charge adéquat.

3.9. Mesure de l'abondance mitochondriale en $O_2^{\bullet-}$

3.9.1. Principe

L'abondance en $O_2^{\bullet-}$ (superoxyde) au sein de la mitochondrie peut être déterminée par usage de la sonde MitoSox Red. En présence de ce radical libre (et uniquement celui-ci) la sonde subit une oxydation conduisant à une émission de fluorescence. De plus cette sonde s'accumule de façon spécifique au sein de la matrice mitochondriale. L'intensité de cette dernière peut être aisément mesurée grâce à un spectrofluorimètre, ce qui permet de doser la quantité de radicaux superoxydes présents dans la mitochondrie (Kuznetsov *et al.*, 2008).

3.9.2. Matériel et méthodes

Les fibroblastes contrôles et LINCL sontensemés à une densité de 50 000 cellules par puits dans des plaques de culture à 24 puits (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*), 24 h avant l'expérience. Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, elles sont rincées 2 fois avec 1 ml de HBSS (**Tableau 3.7**) avant d'être incubées à 37 °C, à l'obscurité, pendant 10 min en présence de la sonde MitoSox Red (10 µM) diluée dans du HBSS (*Molecular Probes, USA*). Les cellules sont ensuite rincées 2 fois dans 1 ml de HBSS puis incubées à 37 °C pendant 45 min à l'obscurité en présence d'antimycine A (10 µM) (*Sigma, USA*) diluée dans du HBSS. Une fois l'incubation terminée, les cellules sont ensuite rincées 3 fois dans 1 ml de HBSS et l'intensité de fluorescence émise par la sonde est mesurée grâce à un spectrofluorimètre (λ Ex : 512 nm ; λ Em : 612 nm). Enfin, les cellules présentes dans chaque puits sont rincées deux fois dans 1 ml de HBSS avant d'être lysées dans 100 µl de NaOH (1 N) (*Merck, Allemagne*). La concentration protéique des lysats obtenus est déterminée par la méthode de dosage de Bradford précédemment décrite (voir **point 3.2**). Les résultats sont calculés en unités arbitraires de fluorescence, corrigés par la valeur moyenne d'autofluorescence respective à chaque condition, puis sont normalisés par la quantité de protéines contenue par puits.

3.10. Mesure de la concentration en calcium matricielle mitochondriale par marquage au X-Rhod 5F

3.10.1. Principe

La sonde X-Rhod 5F est une sonde de choix pour la mesure de la $[Ca^{2+}]_{mt}$ basée en partie sur la structure de la rhodamine. La forme acétométhylester (AM) de cette sonde lui confère une hydrophobicité suffisante pour lui permettre d'entrer à l'intérieur des mitochondries, et ce de manière dépendante du potentiel de membrane mitochondriale. Cette sonde permet de marquer de manière spécifique la $[Ca^{2+}]_{mt}$ (Safiulina *et al.*, 2004).

3.10.2. Matériel et méthode

Les fibroblastes contrôles et LINCL sontensemés dans des boîtes de culture à 24 puits (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*) à une densité de 50 000 cellules par puits, 24 h avant l'expérience. Une fois la confluence atteinte, les cellules sont rincées deux fois avec 500 µl de HBSS et une fois avec 500 µl de HBSS (**Tableau 3.7**) contenant 1 mM de $CaCl_2$ (HBSS + Ca^{2+}). Les fibroblastes sont ensuite incubés pendant 30 min à l'obscurité en présence de X-Rhod 5F à une concentration de 2 µM (*Molecular Probes, Invitrogen, USA*) diluée dans du HBSS + Ca^{2+} . Les cellules sont ensuite rincées à deux reprises dans 1 ml de HBSS + Ca^{2+} . Les cellules ont ensuite été traitées avec soit : 500 µl d'ionomycine à 10 µM pendant 10 min, soit 500 µl de rhuténium red à 10 µM pendant 30 min, soit pendant 5 min avec 500 µl de bradykinine à une concentration de 1 µM, soit 500 µl de HBSS + Ca^{2+} . Un « Touch & Go » doit également être réalisé afin d'évaluer l'adsorption éventuelle de la sonde X-Rhod 5F sur le tapis cellulaire. Pour cela, 350 µl de sonde X-Rhod 5F 2 µM diluée dans du HBSS + Ca^{2+} est déposé dans chaque puits puis est immédiatement décanté. Les cellules sont ensuite lavées 2 fois avec 1 ml de HBSS + Ca^{2+} puis incubées en présence de 500 µl de HBSS + Ca^{2+} . Les traitements terminés, l'intensité de fluorescence émise par la sonde X-Rhod 5F reflétant la concentration calcique dans la matrice mitochondriale a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (λ Ex : 515 nm ; λ Em : 612 nm). Les résultats sont exprimés en unités arbitraires de fluorescence (AFU) et ont ensuite été normalisés par la quantité d'ADN présente dans chaque puits, mesurée par incubation des tapis cellulaires en présence d'iodure de propidium. Afin de réaliser ce dosage, 500 µl de HBSS contenant 10 ng/ml d'iodure de

propidium est ajouté dans chaque puits contenant les cellules. L'iodure est un agent intercalant permettant le marquage des acides nucléiques doubles brins (Goff, 1992). La plaque est ensuite incubée à 37 °C pendant 1 h à l'obscurité. Au terme de cette incubation, l'intensité de fluorescence émise par l'iodure de propidium est mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (λ Ex : 515 nm ; λ Em : 612 nm).

3.11. RT-PCR quantitative en temps réel

3.11.1 Principe

La qRT-PCR (*Quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*) en temps réel est une technique permettant de quantifier l'abondance relative d'un ARNm d'un gène donné de manière spécifique. La technique repose sur l'isolation de l'ARNm des cellules dont l'expression génique doit être quantifiée. L'ARNm étant peu stable et se trouvant en petites quantités à l'intérieur des cellules, ce dernier doit subir au préalable une transcription inverse en ADNc (*Reverse Transcription*) par une reverse transcriptase. L'ADNc obtenu est ensuite amplifié par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) à l'aide de nucléotides et d'amorces spécifiques du gène étudié. L'utilisation de ces amorces permet, au cours de la PCR, une amplification spécifique. L'ajout d'un agent intercalant comme le « SYBR Green » permet de quantifier l'amplification de l'ADNc en s'intercalant entre les brins complémentaires de l'ADNc et en émettant un signal de fluorescence dont l'intensité augmentera de manière proportionnelle au nombre de copies d'ADN au cours de la PCR. Le point où la fluorescence émise par le SYBR Green est mesurable et devient supérieure au bruit de fond est le cycle seuil ou Ct (*Cycle Threshold*). Ce seuil sera d'autant plus vite atteint que le nombre de copies d'ADNc (et donc d'ARNm dans l'échantillon) est élevé. La valeur du Ct sera donc inversement proportionnelle à la concentration de départ en ADNc (et donc en ARNm). Les résultats obtenus sont ensuite normalisés par la valeur d'un *housekeeping gene* ou gène de maintenance dont l'expression ne varie pas dans les conditions expérimentales étudiées.

Dans ce mémoire, la qRT-PCR en temps réel nous a permis de quantifier l'expression du gène codant la sous-unité β de l'ATPsynthase.

3.11.2. Matériel et méthodes

3.11.2.1. Sous-culture

Les cellules contrôles et LINCL sont repiquées dans des boîtes de culture de 75 cm² (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*) à une densité de 600 000 de cellules par boîte, 4 j avant l'extraction de l'ARN total. Lorsque les cellules arrivent à confluence, l'ARN total est extrait selon le protocole suivant.

3.11.2.2. Extraction d'ARN total

En raison de la fragilité de l'ARNm ainsi que de la présence de RNAses (enzymes impliquées dans la dégradation de l'ARN) dans notre environnement, l'extraction d'ARN doit se réaliser dans des conditions *RNase-free* (en absence de toute RNase). Ces conditions impliquent l'usage de gants RNase-free, de tips autoclavés RNase-free, d'eau bidistillée, désionisée et autoclavée RNase-free ainsi que l'utilisation d'un emplacement de travail recouvert d'un papier aluminium nettoyé par une solution de SDS 1%.

Les cellules sont rincées 2 fois avec 10 ml de PBS (**Tableau 3.1**) et sont ensuite collectées dans 1 ml de TRIzol. Elles sont alors centrifugées pendant 5 min à 1 000 rpm. On resuspend ensuite les cellules dans 1 ml de TRIzol et on laisse incubé pendant 5 min à température ambiante. On ajoute alors 200 μ l de chloroforme RNase free (*Sigma, USA*) et on agite le microtube vigoureusement à la main pendant 15 s. Les échantillons sont ensuite

incubés pendant 3 min à température ambiante, centrifugés à 4 °C pendant 10 min à 12 000 g. Le surnageant (contenant l'ARN total) est ensuite transféré dans un microtube. On ajoute ensuite 500 µl d'isopropanol RNase free (*Merck, Allemagne*) que l'on homogénéise avec l'ARN par inversion du microtube et on incube les tubes pendant 10 min à température ambiante. L'isopropanol permet de précipiter l'ARN. Au terme de cette incubation, les échantillons sont centrifugés à 4 °C pendant 10 min à 12 000 g. Le surnageant est décanté et le culot est rincé 1 fois dans 1 ml d'éthanol (75%) RNase free (*Merck, Allemagne*). Le microtube est alors vortexé puis centrifugé à 4 °C à 7500 g. Le culot obtenu est laissé à sécher à l'air libre pendant 5 à 10 min avant d'être resuspendu dans 100 µl d'eau RNase free (*Promega, USA*). Les échantillons et une aliquote d'eau RNase free sont ensuite conservés à -70 °C en attendant le dosage de l'ARN.

3.11.2.3. Dosage de l'ARN

Une dilution de l'aliquote primaire (100 fois et 200 fois) dans de l'eau RNase free est d'abord réalisée. La concentration en ARN présent dans les échantillons est calculée en mesurant l'absorbance à 260 et 280 nm (*Eppendorf Biophotometer, Allemagne*). Le ratio entre les absorbances mesurées à 260 et 280 doit être de minimum 1,85. Celui-ci indique la pureté idéale de l'ARN extrait. La formule permettant de calculer la concentration à partir des valeurs d'absorbance est la suivante :

$$Conc = \frac{Abs}{\epsilon \times L}$$

Avec Conc = concentration en ARN ; Abs : absorbance ; ϵ : coefficient d'extinction molaire (ARN = 0,025 mg/ml) ; L : longueur de la cuvette en quartz (= 1 cm)

3.11.2.4. Transcription inverse

Un volume donné correspondant à 1 µg d'ARNm est prélevé de l'échantillon primaire est incubé à 65 °C pendant 10 min en présence de 7 µl de mixture RT (**Tableau 3.19**) (First Strand cDNA Synthesis Kit, *Roche, Allemagne*) contenant notamment la reverse-transcriptase et des oligonucléotides permettant la synthèse d'ADNc à partir de l'ARNm. On incube ensuite l'échantillon à 85 °C pendant 30 min puis pendant 5 min. Les échantillons sont ensuite refroidis sur glace (4 °C) et l'ADNc obtenu est congelé à -20 °C en attendant leur utilisation ultérieure.

3.11.2.5. qRT-PCR en temps réel

Un « mix » RT-PCR contenant, pour un volume final de 20 µl : 12,5 µl de mix SYBR Green I (*Invitrogen, Pays-Bas*), 2,5 µl d'eau MilliQ, 2,5 µl d'amorce *reverse* 3 µM et 2,5 µl d'amorce *forward* 3 µM, est préparé. Le mix SYBR Green contient l'agent intercalant du même nom (*Applied Biosystems, Pays-Bas*), une ADN polymérase thermostable à haute température et des nucléotides (dNTP). Un volume de 20 µl de mix RT-PCR est ensuite déposé dans un puits d'une plaque à 96 puits (*Applied Biosystems, Pays-Bas*) puis 5 µl d'ADNc sont ajoutés. La plaque est ensuite scellée puis centrifugée brièvement avant d'être conservée à 4 °C. La liste des amorces utilisées au cours de ce travail est reprise au **tableau 3.20**.

L'amplification est réalisée dans l'appareil de qRT-PCR ABI Prim 7000 (*Applied Biosystems, Pays-Bas*) et le programme de PCR est lancé. Ce programme comporte plusieurs phases. Premièrement, les échantillons sont chauffés pendant 10 min à 95 °C afin de dénaturer les brins d'ADNc. Les échantillons subissent ensuite 40 cycles alternant successivement un refroidissement à 60 °C de 1 min (afin de permettre la liaison des amorces aux brins d'ADNc

et leur élongation) et une hausse de la température jusqu'à 95 °C pendant 15 s (afin de séparer à nouveau les brins de l'ADNc nouvellement synthétisés). Le SYBR Green s'intercale alors également entre les brins de l'ADN néoformés. Une lecture de la fluorescence émise par le SYBR Green est effectuée par l'appareil à l'issue de chaque cycle (après le refroidissement). Le programme « SDS » permet la quantification et l'analyse des données de fluorescence obtenues. Un contrôle négatif constitué en présence de 5 µl d'eau MilliQ (en lieu et place de l'échantillon) doit être réalisé afin de s'assurer qu'aucune contamination par un ADN étranger n'a eu lieu lors de la préparation de la plaque. L'expression d'un gène de maintenance/référence ou « *housekeeping gene* » est également nécessaire. L'expression de ce gène de référence est supposé être stable et ce, quelque soit la condition expérimentale considérée. La mesure de son expression permet la normalisation de l'expression des gènes d'intérêt.

3.11.2.6. Analyse des résultats

Dans une première expérience, plusieurs concentrations d'ADN (dilué 10X, 100X, 1 000X, 10 000X) et des amorces *forward* et *reverse* sont effectuées afin permettent de déterminer une droite de régression pour les fragments d'ADN d'intérêt et la concentration optimale d'utilisation des amorces permettant d'optimiser la synthèse d'ADNc. La pente de cette droite est ensuite déterminée et utilisée afin de calculer l'efficacité de la PCR selon la formule : $\text{Efficacité} = 10^{-1/\text{pente}}$

Seule l'expression des gènes pour lesquels les droites de régression sont parallèles peut être comparée. Une efficacité optimale est proche de 2 et signifie l'obtention de deux brins d'ADNc à partir d'un brin originel. Une fois les concentrations optimales des amorces déterminées, on procède à la qRT-PCR définitive en utilisant les conditions optimales et à l'analyse de ses résultats. On calcule alors le ΔCt des transcrits par soustraction de la valeur de Ct du gène de référence utilisé à celle du Ct du gène d'intérêt. Dans cette étude, nous avons utilisé les gènes GAPDH, 13 kDa et 18S comme gènes de référence. L'expression relative du transcrit par rapport au gène de référence (ou fold d'induction) peut ensuite être déterminée selon la formule :

$$\text{Abondance relative} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

$$\text{Avec } \Delta\Delta\text{Ct} = (\Delta\text{Ct}_{\text{test}}) - (\Delta\text{Ct}_{\text{condition contrôle}})$$

3.12. Dosage de l'ATP intracellulaire

3.12.1. Principe

Ce test est basé sur une réaction enzymatique d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine par la luciférase en présence d'ATP, d'oxygène et de Mg^{2+} selon la formule présentée à la **figure 3.5**. Cette réaction permet une libération de photons qui est proportionnelle à la concentration en ATP dans le milieu. Dans ce travail, nous avons utilisé ce test afin de doser le contenu intracellulaire en ATP dans les fibroblastes contrôles et LINCL (Yang *et al.*, 2002).

3.12.2. Matériel et méthode

Les cellules contrôles et LINCL sontensemencées à une densité cellulaire de 150 000 cellules par puits dans des boîtes de culture à 6 puits, 24 h avant l'extraction d'ATP (*Greiner Bio-One, Cellstar, Allemagne*). Une fois la confluence atteinte, les cellules sont rincées avec 5 ml de HBSS stérile (*Lonza, Allemagne*), avant d'être incubées pendant 10 s en présence de 500 µl de la solution « ATP Releasing Agent » (*Sigma, Allemagne*) diluée 10 fois dans de l'eau stérile. Cette solution contenant l'ATP est ensuite transférée dans des microtubes

(Sarstaedt, Allemagne), aliquotée puis stockée à -70 °C jusqu'au dosage. Ajoutons que toutes ces étapes sont réalisées sur glace (4 °C). Les échantillons d'ATP sont dilués 2 fois dans la solution « ATP Releasing Agent » et un volume de 100 µl de mixture réactionnelle « ATP assay mix » (**Tableau 3.21**) est placé dans des tubes spéciaux à luminescence (Sarstaedt, Allemagne) puis incubé à température ambiante pendant 3 min. Ensuite un volume de 100 µl d'échantillon est ajouté dans la mixture réactionnelle et les photons émis sont mesurés immédiatement grâce à un bioluminomètre (Berthold Detection System FB12). Les données sont exprimées en unités relatives de luminescence (*Relative Light Units, RLU*) et normalisées par la quantité de cellules déterminée par la quantité d'ADN, elle-même mesurée par l'intensité de fluorescence émise après marquage à l'iodure de propidium (voir **point 3.9.2**).

4. Résultats et discussion

4.1. Avant-propos - Caractéristiques du modèle cellulaire étudié

Bien que les organites comme le RE, les mitochondries ou les lysosomes aient longtemps été considérés comme statiques et isolés, de nombreuses études récentes ont permis de mettre en évidence l'existence de voies de communication moléculaire de type « rétrograde » entre l'organite non fonctionnel et le noyau (Liu *et al.*, 2006). Citons, par exemple, la voie UPR (*Unfolded Protein Response*) activée par le RE en réponse à une accumulation de protéines n'ayant pas acquis une structure tertiaire fonctionnelle (mal conformées ou anormalement repliées). La voie UPR conduit notamment à une oligomérisation de la protéine Ire1 (une enzyme bifonctionnelle dotée d'une activité kinase et endonucléase) qui dimérise en réponse à une dissociation de la chaperonne BiP et qui peut induire une réponse nucléaire. En effet, l'activation de Ire 1 au sein de la membrane du RE favorise la traduction et l'activation de XBP-1, un facteur de transcription capable de contrôler l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines de types chaperonnes (Ron *et al.*, 2007). La mitochondrie, l'organite auquel nous nous sommes intéressés au cours de cette étude, est également capable de communication rétrograde vers le noyau. En effet, par exemple, une inhibition du potentiel de membrane mitochondriale peut conduire à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium ($[Ca^{2+}]_c$) et à l'activation de la CaMKIV (*Calmoduline Kinase IV*). Cette dernière induit la phosphorylation du facteur de transcription CREB, augmentant ainsi la transcription de ses gènes cibles nucléaires (Arnould *et al.*, 2002).

En plus de pouvoir modifier l'expression de gènes, affectant ou non, l'organite dont l'activité et les fonctions sont altérées, le dysfonctionnement des organites peut également avoir un impact direct sur la biologie d'une autre structure subcellulaire. En effet, nous avons également vu qu'un dysfonctionnement d'un organite comme le lysosome peut également modifier l'activité et/ou l'abondance d'autres organites comme la mitochondrie (Guicciardi *et al.*, 2004). De plus, il est connu qu'une perméabilisation de la membrane du lysosome, se produisant dans certaines conditions induisant l'apoptose, comme la stimulation de cellules d'hépatome de rat par le TNF α (Werneburg *et al.*, 2002), est capable de modifier la perméabilité de la membrane mitochondriale conduisant à la libération de différents facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome c (Guicciardi *et al.*, 2004). Cependant, si l'activation de nombreuses voies de communication commence à être élucidée dans le cadre du dysfonctionnement du RE et des mitochondries, la réponse cellulaire au dysfonctionnement et/ou à la surcharge des lysosomes est peu étudiée et peu connue. Cette étude avait donc pour objectif de mettre en évidence d'éventuelles modifications de l'activité et/ou de l'abondance de la population mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement lysosomal.

Les maladies de surcharge lysosomale sont des pathologies génétiques très fréquentes qui affectent, en moyenne, 1 naissance sur 7700 dans le monde (Meikle *et al.*, 1999). Elles sont caractérisées par une déficience d'une ou de plusieurs hydrolases acides lysosomales (des enzymes impliquées dans la dégradation des macromolécules dans le lysosome) qui conduit à l'accumulation intralysosomale du substrat de ces enzymes (Futerman *et al.*, 2004). L'accumulation de ces substrats non dégradés dans les lysosomes conduit à l'apparition de symptômes principalement de type neurodégénératif comme des crises d'épilepsies et une perte des capacités cognitives et locomotrices (Vellodi, 2005).

Le choix de s'intéresser aux effets de la surcharge lysosomale sur la biologie de la mitochondrie a été pris en raison de l'importance cellulaire de cet organite. En effet, nous

avons vu dans l'introduction de ce travail que la mitochondrie constitue la principale la source d'énergie cellulaire (Karp, 2004), mais est aussi le point d'intégration de la mort cellulaire par apoptose (Kroemer, 2001). Elle est également impliquée dans l'homéostasie cellulaire du calcium (Gunter *et al.*, 2000).

Pour étudier la réponse mitochondriale au dysfonctionnement du lysosome, nous avons utilisé un modèle cellulaire permettant d'étudier la réponse de fibroblastes affectés par la cause responsable de la CLN infantile tardive, une pathologie de surcharge lysosomale causée par une mutation du gène *CLN2* codant pour la protéine TPP-1 (Liu *et al.*, 1998). Nous avons donc comparé des fibroblastes de peau humaine issus d'une personne « saine » (fibroblastes contrôles) à des fibroblastes provenant d'une patiente asiatique atteinte de la maladie (fibroblastes LINCL). Ce modèle présente les mêmes avantages et les mêmes limitations que bon nombre de modèles cellulaires. En effet, il permet de travailler sur un seul type cellulaire en permettant facilement d'interférer avec les processus biologiques (inhibiteurs, RNAi,...). Ce modèle cellulaire est complémentaire au modèle animal de souris invalidées (*knock out*) pour le gène *CLN2* (Sleat *et al.*, 2004) utilisé par Guillaume Van Beersel au cours de sa thèse.

Nous sommes cependant bien conscients des limitations d'étudier les effets de la surcharge lysosomale sur cette lignée fibroblastique : 1) ce sont des fibroblastes et non des neurones (type cellulaire dans lequel les effets de la surcharge sont plus sévères) et 2) l'absence de lien de parenté entre les deux personnes donneuses conduit à travailler avec des cellules qui ont un « background génétique » totalement différent. A priori et sans contrôle adéquat, il serait donc difficile, voire impossible, d'attribuer d'éventuelles modifications observées au dysfonctionnement lysosomal causé par la déficience en TPP-1. Nous avons débuté notre travail en mettant au point un dosage de la TPP-1 pour caractériser l'activité de cette enzyme dans nos lignées cellulaires et pouvoir suivre la restauration de l'activité TPP-1 dans la lignée LINCL en présence d'une enzyme recombinante ajoutée dans le milieu de culture (Lin *et al.*, 2001).

4.2. Mise au point d'un dosage de l'activité TPP-1 et restauration de l'activité de l'enzyme dans des fibroblastes LINCL

4.2.1. Mise au point d'un dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1

Nous avons tout d'abord cherché à mettre au point un dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1. Le protocole utilisé est celui précédemment mis au point par l'équipe de Sohar et ses collaborateurs (Sohar *et al.*, 2000). Brièvement, le principe de ce dosage repose sur la spécificité du clivage d'un tripeptide couplé à un groupement amidométhylcoumarine (Ala-Ala-Phe7-AMC) catalysé par la TPP-1 en conditions acides (pH 4,0). Le clivage de ce tripeptide conduit à la libération du groupement fluorescent AMC (amido-4-méthylcoumarine) capable d'émettre de la fluorescence lorsqu'il est libéré par le clivage protéolytique. L'activité TPP-1 peut alors être dosée par la mesure de l'intensité de fluorescence à l'aide d'un spectrofluorimètre.

Dans le but de déterminer la quantité de cellules minimale à engager dans le dosage pour obtenir un bon rapport « signal de fluorescence » / « blanc », nous avons réalisé un dosage de l'activité TPP-1 sur des échantillons contenant 20 000, 4 000 ou 2 000 cellules contrôles ou LINCL. Comme attendu, nous observons bien une activité TPP-1 dans les cellules contrôles qui est dépendante de la quantité de cellules, alors que celle-ci est quasiment indétectable dans les cellules LINCL (**Figure 4.1 A**). Ce résultat montre que l'activité TPP-1 des fibroblastes LINCL est très faible comparativement à celle des cellules fibroblastiques contrôles et ce, quelque soit la quantité de cellules engagée dans le dosage. Ce premier résultat de caractérisation de l'activité TPP-1 dans les lignées cellulaires étudiées

valide donc notre modèle cellulaire de LINCL conformément à ce qui est décrit dans la littérature (Ezaki *et al.*, 2000). Sur base de ce résultat, nous montrons que le dosage peut être effectué dans de bonnes conditions à partir de 20 000 cellules pour obtenir un bon signal de fluorescence. Comme nous avons utilisé un temps d'incubation de 30 min dans cette première expérience, nous avons ensuite cherché à optimiser le temps d'incubation de l'échantillon en présence du substrat de l'enzyme. Nous avons donc dosé l'activité de la TPP-1 dans des échantillons préparés à partir de 20 000 cellules pour des temps d'incubation croissants (20, 40, 60, 80, 100 ou 120 min) (**Figure 4.1 B**). Nous observons que, pour les échantillons préparés à partir des fibroblastes contrôles, l'intensité de fluorescence, reflétant l'activité enzymatique de la TPP-1, augmente progressivement en fonction du temps d'incubation. Comme anticipé, l'activité de la TPP-1 reste quasi indétectable dans les cellules LINCL et ce, quel que soit le temps d'incubation considéré. Nous pouvons donc conclure que le dosage de la TPP-1 est fonctionnel et que, au moins pour des temps d'incubation inférieurs à 120 min, le signal de fluorescence émis ne sature pas le détecteur du spectrofluorimètre, ce qui se traduirait par l'apparition d'une phase plateau, non observée dans les conditions dans lesquelles nous avons effectué ce dosage enzymatique.

À partir de ces expériences préliminaires, nous avons pu mettre au point les conditions de ce dosage enzymatique. Il semble que le dosage réalisé sur des échantillons préparés à partir de 20 000 cellules et un temps d'incubation de 120 min donne de bons résultats et soit suffisamment sensible pour mesurer spécifiquement la TPP-1 sans voir de saturation dans le signal de fluorescence émis. Nous utiliserons donc ces conditions dans les expériences ci-dessous visant à doser l'activité TPP-1 dans des cellules LINCL qui ont récupéré une activité TPP-1.

4.2.2 Modèle de restauration de l'activité enzymatique TPP-1 des fibroblastes LINCL

Rappelons que les deux lignées cellulaires utilisées dans ce mémoire sont non apparentées et présentent donc un fond génétique différent. Afin de nous assurer que les différences éventuellement observées dans la suite de ce travail résultent bien du dysfonctionnement lysosomal, nous avons mis en place une stratégie visant à restaurer l'activité TPP-1 dans les fibroblastes LINCL. Dans ce but, nous avons utilisé une première stratégie reposant sur la transfection, par électroporation (*Nucleofection, Amaxa, USA*) de fibroblastes LINCL avec un plasmide d'expression contenant l'ADNc codant pour la protéine TPP-1. Ce plasmide nous a été fourni gracieusement par le Prof. Peter Lobel (*Center for Advanced Biotechnology and Medicine, University of Medicine and Dentistry of New Jersey, USA*). Cependant, nous n'avons jamais pu restaurer une activité TPP-1, même partiellement dans les fibroblastes LINCL par cette approche. L'efficacité de transfection n'est cependant probablement pas à mettre en cause, car l'électroporation des cellules par nucléofection à l'aide d'un plasmide d'expression codant pour la GFP a permis de calculer un taux de transfection d'environ 70 % avec ce plasmide (données non montrées).

Suite à cette stratégie infructueuse et pour répondre au besoin de devoir corriger le déficit de la TPP-1 dans les cellules LINCL pour pouvoir interpréter correctement nos résultats, nous nous sommes intéressés aux travaux de Lin et collaborateurs qui ont mis au point un protocole de production d'une TPP-1 recombinante sous sa forme précurseur par des cellules d'ovaires de cobaye (CHO, *Chinese Hamster Ovarian cell*) (Lin *et al.*, 2001). Ces auteurs ont montré que l'incubation de neurones et de fibroblastes de peau humains en présence de cette enzyme recombinante diluée directement dans le milieu de culture, permet une récupération de l'activité TPP-1 des cellules déficientes. De plus, l'acheminement de

l'enzyme par une endocytose médiée par les récepteurs à mannose-6-phosphate assure son adressage correct vers le compartiment lysosomal.

Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer le temps d'incubation optimal pendant lequel les fibroblastes LINCL devaient être exposés à l'enzyme recombinante diluée dans le milieu de culture, pour permettre de restaurer l'activité TPP-1 dans ces cellules, à un niveau comparable à l'activité mesurée dans des fibroblastes contrôles. Pour y parvenir, nous avons incubé les cellules LINCL pendant des temps d'incubation croissants (24, 48 et 96 h) en présence de deux concentrations de l'enzyme recombinante (3 et 10 nM) (généreusement donnée par le Prof. P. Lobel) diluée dans du milieu MEM + 10 % SVF. Au terme de ces incubations, nous avons dosé l'activité TPP-1 (**Figure 4.2**). Nous observons que l'activité TPP-1 des fibroblastes LINCL peut être restaurée et que l'activité de la TPP-1 augmente, dans ces cellules, progressivement en fonction du temps d'incubation et ce, pour les deux concentrations testées. Notons également que l'activité basale des cellules contrôles ne varie pas (ou peu) au cours du temps et que l'activité de l'enzyme est toujours indétectable dans les cellules LINCL. Ces résultats suggèrent qu'un temps d'incubation de 48 h des cellules en présence de 10 nM de pro-enzyme recombinante permet de récupérer une activité enzymatique TPP-1 comparable à celle observée dans des fibroblastes contrôles (**Figure 4.2**). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'équipe de Lin et de ses collaborateurs (Lin *et al.*, 2001). En effet, ces auteurs montrent qu'une incubation de neurones LINCL en présence de 10 nM de pro-TPP-1 recombinante pendant 2 jours, permet une restauration de l'activité TPP-1 comparable à l'activité mesurée dans des neurones contrôles. Ces conditions seront donc utilisées dans les expériences ultérieures de ce travail visant à corriger le déficit de l'activité TPP-1 dans les cellules LINCL.

Nous avons ensuite cherché à évaluer la stabilité de cette préprotéine recombinante dans la lignée de fibroblastes LINCL. Nous avons donc incubé les cellules LINCL dans du milieu MEM contenant 10 % de SVF en présence de pro-TPP-1 à une concentration de 10 nM. Après 48 h d'incubation, le milieu a été retiré et les cellules ont ensuite été rincées avec du HBSS (afin d'éliminer toute trace de l'enzyme) avant d'être remplacé par du milieu de culture MEM contenant 10 % de SVF. Après 5 jours d'incubation (« wash out ») l'activité TPP-1 a été mesurée (**Figure 4.3**). Dans ces conditions, nous observons que l'activité TPP-1 dans des fibroblastes LINCL ayant incorporé l'enzyme pendant 48 h reste stable, puisqu'on retrouve encore environ 85 % de l'activité mesurée dans des fibroblastes contrôles. Malheureusement, dans cette expérience, nous n'avons pas le contrôle approprié qui correspondrait à l'activité dans des cellules LINCL ayant incorporé l'enzyme pendant 48 h (qui correspondrait au 100 %). Nous savons cependant, sur base des résultats présentés à la **figure 4.2**, que l'activité TPP-1 mesurée dans des cellules LINCL incubées en présence de l'enzyme recombinante (10 nM) pendant 48 h est comparable à celle dosée dans les cellules fibroblastiques contrôles. Nous pouvons donc dire que l'enzyme TPP-1 recombinante est non seulement active dans les lysosomes des cellules LINCL mais également que l'enzyme est relativement stable puisqu'on retrouve encore 85 % de l'activité après une période d'incubation des cellules de 5 jours en absence de l'enzyme. Cette grande stabilité de la TPP-1 recombinante dans les lysosomes a déjà été rapportée dans la littérature pour des neurones (Lin *et al.*, 2001).

Ajoutons encore que cette stratégie visant à administrer l'enzyme par une voie endocytaire présente des avantages par rapport à la transfection : 1) la pré-protéine recombinante développée par cette équipe étant produite par des cellules eucaryotes, celle-ci présente les modifications post-traductionnelles nécessaires à son activité mais aussi à son ciblage vers le lysosome, 2) la pro-TPP-1 recombinante présente un temps de demi-vie de 11 jours, une fois incorporée au sein des lysosomes, ce qui nous permettrait de développer un modèle de restauration de l'activité TPP-1 à long terme (Lin *et al.*, 2001). Ces divers

avantages nous ont donc poussé à conserver cette approche pour restaurer l'activité TPP-1 dans les fibroblastes LINCL.

Au cours de cette première partie nous avons donc montré que le déficit d'activité TPP-1 dans des fibroblastes LINCL peut être parfaitement restauré, de manière relativement stable, par une simple incubation en présence d'une pré-protéine recombinante.

4.3. Etude des effets d'une déficience de la TPP-1 sur l'abondance et la morphologie de la population mitochondriale

Nous avons vu dans l'introduction de ce travail qu'une surcharge lysosomale peut altérer de nombreux processus biologiques cellulaires, des voies de synthèse de métabolites et l'homéostasie d'ions comme le calcium (voir **point 2.3.4**) (Futerman *et al.*, 2004). Cependant, les effets d'un dysfonctionnement lysosomal induit par la déficience en TPP-1 sur les fonctions et la morphologie d'autres organites comme la mitochondrie sont encore complètement inconnus à l'heure actuelle. Dans le but d'approfondir ces connaissances, nous avons recherché, dans un premier temps, les effets éventuels d'une surcharge lysosomale sur l'abondance, la morphologie et l'activité mitochondriale.

Nous avons donc recherché les éventuelles conséquences d'une surcharge lysosomale induite par la déficience en TPP-1 sur l'abondance de la population mitochondriale. Rappelons que l'abondance de cet organite résulte d'un équilibre entre deux processus complexes et hautement régulés que sont la biogenèse mitochondriale, assurant la formation de nouvelles structures mitochondriales (Diaz *et al.*, 2008; Hock *et al.*, 2009) (voir **point 2.4.5**) et la mitophagie, processus de macroautophagie chargé de la dégradation spécifique de l'organite (Kim *et al.*, 2007) (voir **point 2.2.2.1.2**).

Afin d'évaluer les effets éventuels de la déficience en TPP-1 dans les cellules sur l'abondance de la population mitochondriale dans les fibroblastes LINCL, nous avons quantifié l'abondance de la population mitochondriale en cytométrie de flux suite à un marquage de l'organite avec la sonde MitoTracker Green. Rappelons que cette sonde n'émet de la fluorescence après excitation qu'une fois qu'elle a réagi avec les groupes thiols (-SH) des protéines dans l'environnement lipidique de la mitochondrie. De plus, l'accumulation de la sonde spécifiquement dans la mitochondrie, est indépendante du potentiel de membrane. Le marquage des mitochondries avec cette sonde ne permet donc pas de discriminer des mitochondries découplées (non fonctionnelles) de mitochondries couplées et donc pleinement actives (Haugland, 2002).

Des fibroblastes contrôles et LINCL ont étéensemencés à une densité de 600 000 cellules dans des boîtes de culture de 75 cm², 5 j avant l'expérience, puis incubés en présence de la sonde MitoTracker à 100 nM pendant 30 min. L'intensité de fluorescence a ensuite été mesurée en cytométrie de flux (**Figure 4.4**). Sur cette figure, nous observons premièrement que l'autofluorescence est comparable dans les deux lignées cellulaires. Nous pouvons également voir que l'intensité de fluorescence augmente fortement (shift de fluorescence) dans les cellules marquées par la sonde Mitotracker Green, ce qui atteste que la sonde a bien été incorporée dans les cellules. Cependant, nous observons que, dans les trois expériences indépendantes réalisées, l'intensité de fluorescence mesurée est comparable pour les deux lignées cellulaires (**Figure 4.4**). Ces résultats suggèrent donc que la déficience en TPP-1 ne modifie pas l'abondance totale de la population mitochondriale dans les fibroblastes LINCL. Comme l'abondance mitochondriale n'est pas modifiée dans les cellules déficientes en TPP-1, nous n'avons pas recherché les composantes de biogenèse de l'organite et n'avons pas analysé la mitophagie (deux processus essentiels qui contrôlent l'abondance de l'organite) dans les cellules LINCL.

Bien que la cytométrie en flux permette de mettre en évidence d'éventuelles modifications de l'abondance globale de la population mitochondriale, celle-ci n'apporte aucune information quant à la morphologie ou la distribution du réseau mitochondrial. Rappelons que les mitochondries ne sont pas des organites statiques mais qu'elles forment un réseau dont l'état de branchement et/ou de vésiculation/fragmentation peut varier, selon les conditions environnementales (Liesa *et al.*, 2009). Rappelons également que ce réseau est nécessaire à la production optimale d'ATP par la mitochondrie (Benard *et al.*, 2007). En effet, une fragmentation du réseau mitochondrial conduit à une diminution de la production d'ATP (Ju *et al.*, 2007; Lutz *et al.*, 2009) et à une perturbation de l'homéostasie du calcium (Frieden *et al.*, 2004). Enfin, rappelons qu'une fragmentation du réseau mitochondrial est souvent observée lors des premières étapes de la mort cellulaire par apoptose (Karbowski *et al.*, 2002; Taguchi *et al.*, 2007). L'étude de la morphologie de la population mitochondriale dans des cellules présentant une déficience de l'activité TPP-1 pourrait donc être riche d'enseignements.

Les cellules fibroblastiques de peau, type cellulaire utilisé au cours de cette étude, sont connus pour présenter un réseau mitochondrial d'aspect filamenteux, réticulé et largement interconnecté (Amchenkova *et al.*, 1988). Nous avons donc continué notre travail en recherchant l'impact éventuel d'une déficience en TPP-1 sur la morphologie du réseau mitochondrial.

Les cellules des deux lignées cellulaires ont donc étéensemencées à une densité de 10 000 cellules dans des boîtes de culture de Lab-Tek II. Après 24 h, les cellules ont été incubées pendant 30 min en présence de la sonde fluorescente MitoTracker Green (100 nM). Après rinçages, l'observation du pattern de fluorescence associée à la population mitochondriale en microscopie confocale a été réalisée sur des cellules vivantes (**Figure 4.5**). Nous pouvons voir que les mitochondries des fibroblastes contrôles forment un réseau mitochondrial filamenteux, réticulé et interconnecté conforme à celui rapporté dans la littérature (Amchenkova *et al.*, 1988). Comme contrôle positif, avant le marquage au Mitotracker Green, nous avons également incubé des fibroblastes contrôles pendant des temps croissants (2, 4 ou 6 h) en présence de 20 μ M de FCCP. Le FCCP est un agent découplant qui diminue le potentiel de membrane mitochondrial bien connu pour induire une fragmentation du réseau mitochondrial (Legros *et al.*, 2002).

Dans ces conditions, nous observons bien une fragmentation du réseau mitochondrial caractérisée par l'apparition de mitochondries isolées, vésiculisées attestant de la fragmentation du réseau mitochondrial en réponse au FCCP et ce, déjà après 2 heures d'incubation en présence de la molécule (**Figure 4.5**). Ce résultat confirme donc que le maintien d'un potentiel de membrane mitochondrial est nécessaire à l'établissement d'un réseau mitochondrial filamenteux, interconnecté et réticulé (Legros *et al.*, 2002).

Enfin, sur cette figure, nous voyons également que la morphologie du réseau mitochondrial des fibroblastes LINCL présente également un aspect fragmenté. En effet, le pattern de fluorescence ponctué est compatible avec des mitochondries fragmentées et vésiculisées comparable à la morphologie mitochondriale de fibroblastes contrôles incubés en présence de FCCP (**Figure 4.5**). Les mitochondries des cellules LINCL semblent donc plus petites et plus arrondies que les mitochondries des fibroblastes contrôles. Ces résultats sont en accord avec des données obtenues pour d'autres maladies de surcharge lysosomale qui montrent une augmentation de la fragmentation du réseau mitochondrial dans des fibroblastes de patients atteints de mucopolipidose de type IV (Jennings *et al.*, 2006) ou de gangliosidoses à GM₁ (Sano *et al.*, 2009).

En conclusion, dans cette partie du travail, nous avons donc montré que bien que la déficience en TPP-1 ne semble pas modifier l'abondance de la population mitochondriale, elle

pourrait conduire (directement ou indirectement) à une fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules LINCL. Signalons encore que, bien que ces micrographies soient représentatives des observations, nous ne disposons pas au laboratoire des logiciels nécessaires à la quantification de la fragmentation du réseau mitochondrial, il est donc difficile de pouvoir estimer avec précision le degré de fragmentation du réseau mitochondrial.

4.4. Etude de l'effet d'une déficience en TPP-1 sur l'abondance et le recrutement de Drp1

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, la morphologie du réseau mitochondrial résulte d'un équilibre entre les phénomènes de fusion et de fission mitochondriales. La fusion de la MME est catalysée par les mitofusines, des protéines mitochondriales dotées d'une activité GTPase catalysant le rapprochement et la fusion des MME (Santel *et al.*, 2001; Ishihara *et al.*, 2004). La fusion de la MMI est, quant à elle, médiée par la protéine mitochondriale Opa1 (Alexander *et al.*, 2000; Song *et al.*, 2007). Enfin, la fission nécessite le recrutement de la protéine Drp1 en surface de la mitochondrie (Smirnova *et al.*, 1998), un processus médié par la protéine Fis1 (Yoon *et al.*, 2003).

Puisque la fission mitochondriale peut-être médiée par une diminution de la fusion et/ou une augmentation de la fission, nous avons tenté d'analyser l'abondance de la protéine Drp1, recrutée spécifiquement à la MME de la mitochondrie (Yoon *et al.*, 2003), en émettant l'hypothèse que la translocation de la protéine pouvait constituer un marqueur moléculaire utilisable pour caractériser l'état de fission/fragmentation du réseau mitochondrial observé dans les cellules LINCL.

Nous avons donc analysé l'abondance de Drp1 potentiellement présente à la MME des mitochondries de cellules LINCL et contrôles. Pour cela nous avons réalisé un fractionnement cellulaire qui permet de préparer des fractions mitochondriales enrichies en mitochondries. Nous sommes conscients que la préparation de telles fractions n'est pas optimale pour obtenir un état de pureté important, mais l'enrichissement en mitochondries devrait être suffisant pour pouvoir identifier une éventuelle translocation de Drp1 à la surface des mitochondries. La préparation de fractions contenant les noyaux (N), les mitochondries (M), les lysosomes et les peroxysomes (L), les microsomes (réticulum endoplasmique et appareil de Golgi) (P) ainsi que la fraction soluble (S) a été réalisée par la méthode de centrifugation différentielle (Hamer *et al.*, 2005) (voir **point 3.7**). Afin de suivre la distribution des lysosomes et des mitochondries dans chaque fraction, nous avons dosé l'activité de deux enzymes. La β -galactosidase et la cytochrome c oxydase, qui sont, respectivement, des enzymes marqueurs du lysosome et de la mitochondrie (**Figures 4.6 et 4.7**). A la **figure 4.6**, nous voyons bien que l'activité spécifique relative de la β -galactosidase est plus élevée dans la fraction L, ce qui est attendu vu l'enrichissement de cette fraction en lysosomes. Ajoutons encore que les profils de distribution et ASR (activité spécifique relative) de la β -galactosidase sont comparables dans les fractionnements des deux lignées cellulaires. Nous retrouvons également une activité de l'enzyme dans la fraction M, ce qui indique une contamination de la fraction M par des lysosomes. Enfin, une plus grande contamination de la fraction M par des lysosomes semble retrouvée pour les fractions préparées à partir de fibroblastes LINCL. Nous observons également que l'activité cytochrome c oxydase est essentiellement répartie entre les fractions M et L (**Figure 4.7**). Ce qui suggère que la fraction lysosomale est fortement contaminée par des mitochondries. Si nous devons poursuivre des expériences nécessitant la purification d'organites dans ces cellules, des optimisations du protocole de fractionnement devront être réalisées.

Nous avons ensuite analysé l'abondance de la protéine Drp1, par Western blot en fluorescence, dans des échantillons de fractions M et L préparés à partir de fibroblastes

contrôles et LINCL afin d'estimer le degré de recrutement de la protéine Drp1 à la surface de la mitochondrie (**Figure 4.8**). Nous observons que l'abondance de Drp1 est plus élevée dans les fractions mitochondriale et lysosomale de fibroblastes LINCL par rapport à la fraction mitochondriale des cellules contrôles, ce qui indiquerait un plus grand recrutement de cette protéine à la surface de la mitochondrie dans ces cellules. Les valeurs de fluorescence des bandes (normalisées par le contrôle de charge HADHA) correspondant à Drp1 dans les fractions M des cellules LINCL sont 3 fois supérieures à celles des cellules contrôles. Les valeurs de fluorescence des bandes (normalisées par le contrôle de charge HADHA) correspondant à Drp1 dans les fractions L des cellules LINCL sont, quant à elles, 6 fois supérieures à celles des cellules contrôles. L'augmentation de l'abondance de Drp1 dans la fraction L des cellules LINCL pourrait être expliquée par le fait que la fraction L est contaminée par des mitochondries de petites tailles, et bien que la contamination semble comparable dans les fractions L préparées à partir des deux lignées cellulaires (voir **figure 4.7**), ces petites mitochondries seraient plus riches en protéine Drp1 que les mitochondries présentes dans la fraction L des cellules contrôles. Ajoutons encore que l'abondance de Drp1, analysée sur des lysats totaux, n'est pas plus importante dans les cellules LINCL que dans les lysats de cellules contrôles (données non montrées). Nous pouvons donc en conclure que l'augmentation de l'abondance observée dans la fraction M des cellules LINCL résulte probablement d'un recrutement plus important de cette protéine à la surface de l'organite dans ces cellules. Nous avons également tenté de mesurer l'abondance des protéines Mfn2 et Opa1, mais sans succès. L'absence de signaux de fluorescence pour ces protéines pourrait peut-être s'expliquer par une abondance très faible de ces dernières et donc une limitation due au seuil de sensibilité du Western blot en fluorescence (10 pg de protéines) (Schutz-Geschwender *et al.*, 2004).

En conclusion, bien que ces résultats doivent encore être confirmés, nous pouvons dire que la protéine Drp1 semble être recrutée à la surface des mitochondries de manière plus importante dans les fibroblastes LINCL. L'augmentation de l'abondance de Drp1 associée aux mitochondries dans ces cellules pourrait donc expliquer la fragmentation du réseau mitochondrial observée dans les cellules LINCL. En effet rappelons que la protéine Drp1 catalyse les phénomènes de fission mitochondriale (Smirnova *et al.*, 1998). Une augmentation du recrutement de cette protéine en surface de la mitochondrie conduirait donc à une augmentation des phénomènes de fission mitochondriale, induisant ainsi la fragmentation du réseau mitochondrial. Des observations de la localisation de Drp1 en microscopie confocale et des expériences de double marquage avec une protéine de la MME comme Fis1, son partenaire d'interaction (Yoon *et al.*, 2003) devrait permettre de confirmer la localisation et la différence de recrutement de Drp1 à la surface des mitochondries des cellules LINCL. De plus, une approche visant à invalider l'expression de Drp1 en présence de siRNA dirigés contre le transcrite de ce gène (Benard *et al.*, 2007) ou à surexprimer un dominant négatif de Drp1 empêchant son recrutement à la MME des mitochondries (Li *et al.*, 2008) devrait permettre de pouvoir vérifier si le recrutement différentiel de Drp1 à la MME dans les cellules LINCL est responsable de la morphologie fragmentée de la population mitochondriale dans ces cellules.

4.5. Etude de l'effet de la déficience en TPP-1 sur le potentiel de membrane et la production mitochondriale de radicaux libres

Nous avons déjà mentionné que le potentiel de membrane mitochondriale est impliqué dans le maintien d'un réseau mitochondrial filamentueux réticulé, interconnecté assurant, de manière optimale, la production d'énergie sous la forme d'ATP par la F₀/F₁-ATP synthase mitochondriale (Benard *et al.*, 2007; Liesa *et al.*, 2009). Il constitue également une force

motrice importante dans le contrôle de l'importation des protéines dans la matrice des protéines et donc, est un élément clé de la biogenèse des organites (Karp, 2004; Herzig *et al.*, 2008). Une diminution du potentiel de membrane mitochondriale conduit d'ailleurs à la fragmentation du réseau mitochondrial en conditions pathologiques (Legros *et al.*, 2002). En effet, dans les neurones de souris présentant une déficience en PINK1 (PTEN-induced novel kinase 1), un modèle permettant de mimer la maladie de Parkinson, on observe une diminution du potentiel de membrane mitochondriale conduisant à une fragmentation du réseau des mitochondries (Sandebring *et al.*, 2009). Nous avons également observé que les cellules qui sont incubées en présence de FCCP, une molécule découplante, présente également une fragmentation du réseau mitochondrial (**point 4.4**) (Legros *et al.*, 2002). Si une diminution du potentiel de membrane mitochondriale est effectivement observée dans certaines MSLs telles que les mucopolipidoses de type II, III et IV (Otomo *et al.*, 2009; Tessitore *et al.*, 2009), une altération du potentiel de membrane mitochondriale n'est pas retrouvée dans toutes les MSLs puisqu'il est conservé dans l' α -mannosidose (Brantova *et al.*, 2009). Nous avons donc cherché à comparer le potentiel de membrane mitochondriale dans des mitochondries de fibroblastes contrôles et LINCL.

Afin de mesurer le potentiel membranaire de l'organite, nous avons incubé des fibroblastes contrôles et LINCL en présence de la sonde TMRE (TetraMethylRhodamine Ethyl ester), une sonde permettant de marquer spécifiquement les mitochondries de manière dépendante du potentiel de membrane mitochondriale (Gottlieb *et al.*, 2003). Au terme de cette incubation, l'intensité de fluorescence émise par la sonde TMRE a été mesurée par cytométrie de flux (**Figure 4.9**). Nous observons que les intensités de fluorescence associées aux mitochondries des fibroblastes contrôles et LINCL sont comparables. Bien que l'on observe une diminution d'environ 10 % de l'intensité de fluorescence pour le signal TMRE dans les cellules LINCL, cette différence n'est pas significative dans nos conditions expérimentales. Nous avons également vérifié que l'intensité de la fluorescence mesurée est bien le reflet de la mesure du potentiel de membrane mitochondriale. Pour cela, nous avons incubé des cellules en présence de FCCP (20 μ M) pendant 2 min avant de mesurer le potentiel de membrane mitochondriale (**Figure 4.9**). Dans ces conditions, on remarque que la présence de FCCP permet de diminuer significativement l'intensité de fluorescence mesurée ($p < 0.01$). Soulignons également que la diminution du potentiel de membrane mitochondriale observée en présence de FCCP est comparable entre les deux lignées cellulaires et représente une chute de potentiel de plus de 80 %.

En conclusion, nous montrons que le FCCP, un agent découplant, dissipe bien le potentiel de membrane mitochondriale. La diminution de l'intensité de fluorescence observée en présence de FCCP montre également que l'intensité de fluorescence observée est bien le reflet de la mesure du potentiel de membrane mitochondriale (qui est souvent compris entre -180 et -220 mV), ce qui valide le test utilisé dans cette étude.

Nous pouvons également dire qu'aucune différence significative du potentiel de membrane mitochondriale n'est observée entre les mitochondries de fibroblastes LINCL et les mitochondries de cellules contrôles, contrairement à la diminution observée dans les mucopolipidoses de type II, III et la mucopolysaccharidose de type IV (Otomo *et al.*, 2009; Tessitore *et al.*, 2009).

Il est donc possible que la fragmentation du réseau mitochondrial, dans les cellules présentant une surcharge lysosomale, soit fonction de l'origine/la nature de l'altération conduisant au dysfonctionnement mitochondrial. La fragmentation du réseau mitochondrial induite par la déficience de l'activité enzymatique TPP-1 ne semble donc pas dépendre d'une diminution du potentiel de membrane mitochondriale. De plus, il semble que la fragmentation du réseau mitochondrial observée dans les cellules LINCL ne semble pas conduire à une diminution significative du potentiel de membrane mitochondriale. Cette donnée est en

contradiction avec les données de la littérature (Legros *et al.*, 2002; Liesa *et al.*, 2009). Ajoutons encore que le fait de savoir si la fragmentation du réseau mitochondrial conduit ou non, à une diminution du potentiel de membrane mitochondriale est encore sujet à controverse. En effet, il a été montré que la fragmentation du réseau mitochondrial induite par une surexpression de la protéine Fis1/Drp1, n'est pas corrélée à une diminution du potentiel de membrane mitochondriale (Frieden *et al.*, 2004). Ajoutons que dans les cellules LINCL, la fragmentation semble également dépendre d'un recrutement différentiel de la protéine Drp1. Enfin, n'ayant que 3 échantillons indépendants dans cette expérience, il est possible qu'en augmentant le nombre d'échantillons, cette petite différence d'environ 10 % entre le potentiel des cellules LINCL et les fibroblastes contrôles, pourrait, si elle se confirme, devenir significative. La diminution du potentiel de membrane mitochondriale dans les cellules LINCL serait cependant beaucoup plus faible que celle obtenue en découplant artificiellement la mitochondrie en présence de fortes concentrations en FCCP.

Nous avons toutefois cherché à déterminer si cette faible différence entre le potentiel de membrane mitochondriale entre les cellules contrôles et les cellules LINCL, pouvait être causé par une éventuelle augmentation de la production mitochondriale de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ou *Reactive Oxygen Species*, ROS). En effet, la mitochondrie est une source cellulaire de ROS en raison de son activité de respiration, comme nous l'avons vu au **point 2.4.3**. Une telle production de radicaux libres peut conduire à une diminution du potentiel de membrane mitochondriale, comme observé après traitement de cellules épithéliales au cis-diaminedichloroplatine. Ce dernier induit une production de ROS accrue et une dissipation du potentiel de membrane mitochondriale (Jing *et al.*, 2007). A l'inverse, une diminution du potentiel de membrane mitochondriale augmente la production de ROS dans des cardiomyocytes (Brennan *et al.*, 2006). Enfin, il a été montré qu'une production de ROS mitochondriale était observable dans les fibroblastes de patients atteints de la maladie de Gaucher (Deganuto *et al.*, 2007). En raison de tous ces indices, nous avons donc également mesuré la production de ROS dans nos lignées cellulaires.

Pour cela, nous avons incubé des cellules contrôles et LINCL en présence de la sonde MitoSox Red, permettant une mise en évidence des radicaux superoxydes ($O_2^{\bullet-}$), et ce, de manière spécifique dans la mitochondrie (Kuznetsov *et al.*, 2008). Au terme de cette incubation, la fluorescence émise par la sonde a été quantifiée à l'aide d'un spectrofluorimètre. Nous avons observé que la quantité mitochondriale d' $O_2^{\bullet-}$ est comparable entre les fibroblastes contrôles et LINCL à l'état basal (**Figure 4.10**). Afin de vérifier la fonctionnalité de notre test, nous avons ensuite pré-incubé des cellules contrôles et LINCL pendant 45 min en présence d'antimycine A à 10 μ M. L'antimycine A est une molécule pouvant inhiber le complexe III de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons (He *et al.*, 2008). Une telle inhibition, conduit à l'échappement d'électrons de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons, se fixant alors sur une molécule d'oxygène, ce qui conduit *in fine* à une augmentation de la production d' $O_2^{\bullet-}$, par la mitochondrie. Après stimulation avec de l'antimycine A, nous avons bel et bien observé une augmentation de la quantité d' $O_2^{\bullet-}$ dans la mitochondrie conformément à ce qui était attendu et ce, dans les deux lignées cellulaires. Toutefois, bien qu'une augmentation de ROS en réponse à l'antimycine A soit également observable dans les fibroblastes LINCL, celle-ci paraît plus faible que dans les cellules contrôles. Ceci peut, peut-être, s'expliquer par une éventuelle différence de sensibilité à l'antimycine A entre les deux lignées cellulaires. Afin de vérifier cette hypothèse, cette expérience devra être répétée sur le modèle de fibroblastes LINCL dont l'activité est restaurée.

En conclusion de ces deux expériences, nous avons montré qu'aucune différence n'était observable ni du point de vue du potentiel de membrane mitochondriale, ni du point de vue de

la production de radicaux libres par la mitochondrie, dans les fibroblastes contrôlés et LINCL. La fragmentation observée dans les fibroblastes LINCL ne semble donc pas être corrélée à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial ou une augmentation de la production de ROS.

Nous nous sommes alors intéressés aux éventuels impacts qui pourraient survenir en réponse à une fragmentation du réseau mitochondrial. En effet, nous avons vu, au **point 2.4.5**, que le maintien d'une telle organisation était nécessaire à différentes fonctions de la mitochondrie, comme une production d'énergie optimale par la mitochondrie mais aussi à une importation de calcium en réponse à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ (Benard *et al.*, 2007; Liesa *et al.*, 2009). Dans la suite de notre travail, nous avons donc tenté de mettre en évidence les éventuels effets de la fragmentation du réseau mitochondrial que nous avons observée dans les fibroblastes LINCL, sur ces deux fonctions mitochondriales.

4.6. Etude d'une déficience en TPP-1 sur la concentration mitochondriale relative en calcium cytosolique et matriciel des fibroblastes LINCL

Rappelons que la mitochondrie joue un rôle essentiel dans l'homéostasie du calcium. En effet, dans des conditions basales, un flux de calcium parcourt la mitochondrie en permanence et l'influx est principalement assuré par l'uniprotéine membranaire UCM (Uniprotéine Calcique Mitochondrial). Mais la mitochondrie peut également importer des ions calcium en réponse à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ et assurer ainsi un « effet tampon » protégeant des effets cytosoliques délétères (comme l'activation de nombreuses enzymes dépendantes du calcium/calmoduline) d'une forte élévation de la concentration en calcium (Graier *et al.*, 2007).

Rappelons qu'une perturbation de l'homéostasie du calcium est observée dans certaines MSLs (Lloyd-Evans, 2008) (Lloyd-Evans *et al.*, 2008). Il a notamment été montré que la fonction d'importation de calcium libre par la mitochondrie, en réponse à une stimulation par de la bradykinine, est diminuée dans des fibroblastes issus de patients atteints de mucopolysaccharidose de type IV (Jennings *et al.*, 2006). Rappelons également que la capacité d'importation, par la mitochondrie, du calcium acheminé à partir de canaux de la membrane plasmique ou libéré par le RE, semble également dépendre de l'intégrité du réseau mitochondrial (Frieden *et al.*, 2004). En effet, un réseau mitochondrial filamentueux et interconnecté semble faciliter l'efficacité de l'importation du calcium par la mitochondrie. Comme nous avons montré précédemment une fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules LINCL, nous avons émis l'hypothèse que la déficience en TPP-1 pourrait conduire à une perturbation de l'homéostasie du calcium.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'homéostasie calcique régulée par la mitochondrie dans les deux lignées cellulaires en étudiant notamment la concentration basale en calcium matriciel ainsi que la capacité des mitochondries à importer le calcium en réponse à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre. Pour cela nous avons utilisé deux molécules permettant d'augmenter la $[Ca^{2+}]_c$: la bradykinine et l'ionomycine. Ces deux molécules sont capables d'augmenter la $[Ca^{2+}]_c$ par des mécanismes complètement différents. En effet, la bradykinine peut se lier à son récepteur membranaire, un membre de la famille des récepteurs couplé aux protéines G, ce qui conduit, *in fine*, à la libération de calcium à partir du RE suite à l'activation du récepteur à l'inositol-3-phosphate (Blaukat, 2003). Par contre, l'ionomycine est un ionophore issu de *Streptomyces Conglobatus*, capable de former des pores au sein des bicouches lipidiques conduisant à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ (Himmel *et al.*, 1990).

Avant de nous intéresser aux capacités d'importation du calcium par les mitochondries dans les deux lignées cellulaires en réponse à une stimulation par ces molécules, il était nécessaire de vérifier que les changements de la concentration en calcium cytosolique libre provoqués par la bradykinine ou l'ionomycine (et susceptibles d'induire un influx mitochondrial de calcium) étaient comparables dans les deux lignées.

Pour cela nous avons mesuré la $[Ca^{2+}]_c$ basale ainsi que l'augmentation induite par la bradykinine et l'ionomycine dans des fibroblastes contrôles et LINCL. Afin de mesurer la $[Ca^{2+}]_c$, nous avons utilisé deux sondes spécifiques du calcium cytosolique : Fluo-3 et FuraRed. Les cellules ont été incubées en présence de ces deux sondes simultanément. Aucune de ces sondes n'étant « ratiométrique », le ratio du changement d'intensité de fluorescence émise par les deux sondes permet de créer un système ratiométrique qui rend les signaux de fluorescence obtenus indépendants d'une différence artéfactuelle éventuelle liée à une efficacité de charge différente des sondes entre les deux lignées cellulaires (Walczysko *et al.*, 2000).

Les cellules ont donc été incubées pendant 30 min en présence de milieu MEM + 10 % de SVF contenant du Fluo-3 (2 μ M) et de FuraRed (5 μ M). Après rinçages, nous avons analysé la $[Ca^{2+}]_c$ basale en cytométrie de flux (**Figure 4.11**). Nous observons que les valeurs des rapports de fluorescence Fluo3/FuraRed, et donc les $[Ca^{2+}]_c$, ne sont pas significativement différentes entre les deux lignées cellulaires. Il semblerait donc que la concentration en calcium cytosolique libre ne soit pas modifiée en réponse à un dysfonctionnement lysosomal causé par une déficience en TPP-1. Nous avons ensuite incubé des fibroblastes contrôles et LINCL pendant 1 min en présence de bradykinine (1 μ M) ou d'ionomycine (10 μ M) avant de mesurer l'intensité de fluorescence. Comme on peut le voir à la **figure 4.11**, dans ces conditions, une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ est observée dans les deux types cellulaires en réponse aux deux molécules. Cependant, bien que l'ionomycine provoque des changements calciques dont l'amplitude est plus importante que ceux obtenus pour une stimulation des cellules par la bradykinine, nous n'observons pas de différence dans l'amplitude des changements calciques induits par ces molécules entre les fibroblastes contrôles et LINCL. Ces résultats montrent donc que ces deux lignées cellulaires répondent à la bradykinine et à l'ionomycine et ce, de manière comparable. Ils montrent également que le dosage utilisé est ratiométrique, et qu'il permet de mesurer et de comparer des changements de la concentration cytosolique libre dans les cellules.

Dans ces conditions, nous nous sommes ensuite intéressés aux changements de la $[Ca^{2+}]_{mt}$. Pour cela, nous avons incubé les cellules en présence de la sonde X-Rhod 5F-AM (2 μ M) pendant 30 min. Cette sonde fluorescente permet de mesurer, de manière spécifique, la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale. Nous observons que les fibroblastes LINCL présentent une $[Ca^{2+}]_{mt}$ légèrement (15 %) mais significativement plus élevée par rapport à la $[Ca^{2+}]_{mt}$ des fibroblastes contrôles ($p < 0,05$) (**Figure 4.12**). Une pré-incubation des cellules de 30 min en présence de ruthénium red (10 μ M), un inhibiteur de l'UCM, permet de diminuer (de près de 60 %) l'intensité de fluorescence mesurée. Notons que cette diminution est comparable dans les deux lignées cellulaires. Ces résultats permettent donc de conclure que le signal de fluorescence mesuré pour la sonde X-Rhod 5F AM est bien spécifique du calcium matriciel mitochondrial. En effet, une inhibition de l'importation de cet ion dans l'organite en présence de ruthénium red (Broekemeier *et al.*, 1994) permet de diminuer les valeurs de fluorescence mesurées.

Bien qu'il n'y ait pas de différence importante dans la $[Ca^{2+}]_{mt}$ des cellules LINCL, il est possible que la capacité à importer du calcium dans la matrice mitochondriale soit affectée seulement en réponse à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique dans ces

cellules. Nous avons donc ensuite recherché l'impact éventuel de la déficience en TPP-1 sur la capacité mitochondriale d'importer du calcium cytosolique libre dans les cellules incubées en présence de bradykinine (1 μM) pendant 5 min (**Figure 4.12**). Dans ces conditions, nous observons une augmentation significative de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ en réponse à la bradykinine dans les mitochondries de fibroblastes contrôles (+ 80% de la valeur basale, $p < 0,01$). De manière intéressante, la concentration en calcium matricielle augmente de manière beaucoup plus faible dans les mitochondries de cellules LINCL (+ 25 % de la valeur basale). Cette augmentation n'est pas significative. Des résultats comparables ont été obtenus pour une incubation des cellules en présence d'ionomycine (10 μM) pendant 10 min. En effet, comme il est possible de le voir à la **figure 4.12**, la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ augmente de manière significative dans les mitochondries des cellules contrôles (+ 70 % de la valeur basale) en réponse à l'ionomycine. Une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ est également observée dans les mitochondries des cellules LINCL bien que cette augmentation soit également plus faible bien que significative (+ 40 % de la valeur basale, $p < 0,05$) que celle observée dans les cellules contrôles (+ 70 %).

Ces résultats suggèrent donc qu'une déficience en TPP-1 pourrait induire une diminution de la capacité mitochondriale à importer le calcium cytosolique libre dans les cellules exposées à une stimulation, médiée (bradykinine) ou non (ionomycine) par voie de récepteur. Comme nous l'avons vu à la **figure 4.11**, cette réponse différentielle ne peut pas s'expliquer par une différence de sensibilité des cellules à la bradykinine ou à l'ionomycine entre les fibroblastes contrôles et les cellules LINCL. Cependant, il est possible que ces différences puissent résulter de la différence de patrimoine génétique existant entre les deux lignées cellulaires.

Afin de tester cette hypothèse, nous avons restauré l'activité TPP-1 selon le protocole décrit au **point 3.4**. Pour cela, les cellules ont été incubées en présence de pro-TPP-1 recombinante (10 nM) diluée dans du milieu de culture pendant 2 j, à l'issue desquels, les cellules sont rincées avec du HBSS puis sont incubées avec du milieu de culture ne contenant pas de pro-enzyme pendant 5 j. Au terme de ces incubations, ayant permis de restaurer l'activité TPP-1, nous avons incubé les cellules en présence de la sonde X-Rhod 5F-AM (2 μM) pendant 30 min, afin de mettre en évidence le $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$. Une mesure de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ a ensuite été réalisée par incubation en présence de la sonde X-Rhod 5F-AM.

Dans cette expérience, nous observons que la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ basale semble plus élevée et ce, de manière significative, dans les mitochondries de fibroblastes LINCL par rapport aux mitochondries de fibroblastes contrôles (+ 50 %). Ceci confirme les résultats précédents où nous avons observé une différence significative de 15 % (**Figure 4.13**). La relativement grande différence d'amplitude du changement entre ces deux expériences pourrait peut-être s'expliquer par le fait que, dans cette dernière expérience, les cellules n'étaient pas confluentes. Afin de pouvoir tirer une conclusion définitive, cette expérience devra être répétée, ce qui confirmera ou infirmera la différence de $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ entre les mitochondries des deux lignées cellulaires en conditions basales. Remarquons que la récupération d'une activité TPP-1 dans les fibroblastes LINCL n'affecte pas la valeur de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ basale. Cependant, dans les cellules incubées pendant 10 min en présence d'ionomycine à 10 μM , on observe une augmentation significative de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ dans les fibroblastes contrôles (+ 200 % de la concentration basale), signe d'une accumulation de calcium dans les mitochondries. Dans ces conditions, une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{mt}}$ est également observée dans les fibroblastes LINCL mais l'augmentation est plus faible, bien que toujours significative, (+ 150 % de la concentration basale). Ces résultats confirment que les mitochondries de ces cellules présentent des capacités d'importation du calcium libre plus faibles que les mitochondries des cellules contrôles (respectivement 2 versus 3 fois d'augmentation) (**Figure 4.13**). De plus, l'importation plus faible du calcium dans les mitochondries des cellules LINCL incubées en

présence d'ionomycine n'est plus observée dans les cellules ayant récupéré une activité TPP-1 avant d'être exposées à l'ionomycine. En effet, dans ces conditions, on retrouve une augmentation correspondant à 3 fois la valeur mesurée pour la concentration basale (+ 300 % de la valeur basale).

En conclusion de ces expériences, nous pouvons dire que la déficience en TPP-1 semble induire une diminution de la capacité des mitochondries à importer le calcium cytosolique dans les cellules exposées à une stimulation par la bradykinine ou incubées en présence d'ionomycine. Cette réponse différentielle entre les mitochondries des cellules LINCL et les mitochondries des cellules fibroblastes contrôles pourrait s'expliquer par une fragmentation du réseau mitochondrial observé des les cellules LINCL. En effet une architecture réticulée et interconnectée de ce réseau est nécessaire à une vitesse optimale de la production d'ATP mais également à la capacité d'importation de calcium cytosolique par la mitochondrie (Amchenkova *et al.*, 1988; Frieden *et al.*, 2004; Benard *et al.*, 2007; Liesa *et al.*, 2009). De plus, ces résultats sont en accord avec les travaux de Jennings et collaborateurs sur la mucopolidose de type IV. Les mitochondries de fibroblastes de patients atteints de cette MSL présentent également une capacité d'importation de calcium plus faible que les mitochondries de cellules contrôles en réponse à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ induite par une incubation des cellules en présence de bradykinine (Jennings *et al.*, 2006). Enfin, nous montrons que la plus faible importation de calcium par les mitochondries de cellules LINCL incubées en présence d'ionomycine ne se produit plus si les cellules LINCL ont été préalablement incubées en présence de TPP-1 recombinante permettant de récupérer une activité enzymatique comparable à celle dosée dans les cellules contrôles. Ceci permet raisonnablement de penser que les différences observées ne sont pas le résultat des génomes différents entre ces deux lignées cellulaires.

4.7. Etude de l'abondance protéique de Tom20, Tom40 et de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale

Jusqu'à présent, nous pouvons dire que ni l'abondance mitochondriale, ni le potentiel de membrane mitochondriale ne sont affectés dans les cellules LINCL présentant une déficience en activité TPP-1, bien que la capacité de réponse de l'organite à « tamponner » une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre induite par plusieurs molécules, soit observée dans ces cellules.

L'introduction, la mitochondrie est constituée d'environ 1500 protéines différentes (Taylor *et al.*, 2003). Nous avons donc poursuivi le travail de caractérisation de l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules LINCL en tentant de mettre en évidence d'éventuelles modifications dans l'abondance de certaines protéines mitochondriales dans les cellules présentant une déficience en TPP-1. En effet, bien que l'abondance de la population mitochondriale ne semble pas affectée en réponse à un dysfonctionnement lysosomal, comme nous l'avons vu précédemment, certaines modifications qualitatives de la mitochondrie pourraient survenir au niveau protéique.

Pour tenter de vérifier cette hypothèse, nous avons sélectionné, de manière arbitraire, trois protéines mitochondriales : les sous-unités Tom 20 et Tom 40 faisant partie du complexe TOM, impliqué dans l'importation de protéines mitochondriales (Bolender *et al.*, 2008) ainsi que la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale faisant partie du domaine F_1 (catalytique) du rotor (von Ballmoos *et al.*, 2009). Nous sommes conscients que l'établissement de mitoprotéomes à partir de fractions mitochondriales hautement purifiées serait probablement une approche intéressante pour caractériser la composition en protéines

des mitochondries des cellules LINCL, mais bien qu'arbitrairement choisies, les trois marqueurs protéiques retenus sont intéressants. En effet, deux d'entre eux (Tom 20 et Tom 40) participent au contrôle de l'importation des protéines dans la matrice mitochondriale et jouent donc un rôle essentiel dans la biogenèse de l'organite (Bolender *et al.*, 2008) alors que la sous-unité β de la Fo/F₁ ATPsynthase, par son importance dans la production d'ATP, joue un rôle important dans la bioénergétique de l'organite (von Ballmoos *et al.*, 2009).

Nous avons donc quantifié, par Western blot en fluorescence, l'abondance de ces protéines dans des lysats clairs préparés à partir de fibroblastes contrôles ou LINCL (**Figure 4.14**). Nous observons que l'abondance des sous-unités Tom20 et Tom40 n'est pas modifiée dans les cellules LINCL. Par contre, l'abondance de la sous-unité β de la Fo/F₁ ATPsynthase mitochondriale est significativement plus faible (± 40 à 50 %) dans les fibroblastes LINCL par rapport aux fibroblastes contrôles.

Afin de vérifier que l'abondance plus faible de cette protéine observée dans les cellules LINCL résulte bien d'une déficience en TPP-1 (et pas de la différence de background génétique entre les deux lignées), nous avons restauré l'activité TPP-1 dans des cellules LINCL en les incubant pendant 2 jours en présence de la pro-enzyme TPP-1 recombinante (10 nM). Après une incubation supplémentaire de 5 jours dans du milieu MEM + 10 % de SVF ne contenant plus l'enzyme recombinante, l'abondance de la sous-unité β de la Fo/F₁ ATPsynthase a été analysée par Western blot en fluorescence (**Figure 4.15**). Nous observons une diminution (environ 30 %) de l'abondance de cette sous-unité dans les fibroblastes LINCL par rapport aux fibroblastes contrôles. Nous devons signaler que cette différence est non significative, probablement en raison de la grande variabilité mesurée entre les réplicats, responsable du grand écart-type obtenu pour cette condition. De manière intéressante, nous observons que l'abondance de la sous-unité β de la Fo/F₁ ATPsynthase augmente légèrement (environ 15 %), mais de manière non significative, dans les fibroblastes LINCL préincubés en présence de l'enzyme par rapport aux cellules LINCL déficientes en TPP-1. Dans ces conditions la différence observée n'est plus que d'environ 15 % par rapport à l'abondance de la protéine dans les fibroblastes contrôles. Bien que les écart-types soient élevés et nous empêchent de pouvoir tirer une conclusion définitive, il semblerait que la déficience en TPP-1 pourrait conduire à une diminution de l'abondance de la sous-unité β de la Fo/F₁ ATPsynthase mitochondriale, un effet qui pourrait être réversé, au moins partiellement, lorsque les cellules déficientes en enzyme récupèrent une activité TPP-1. Vu l'importance de cette donnée, et bien que son arrivée tardive dans le cadre de ce travail nous ait empêché de répéter l'expérience, la confirmation de ce résultat sera réalisée dans le cadre de la thèse de Guillaume Van Beersel (3ème année FNRS - thèse en cours).

4.8. Effet de la déficience en TPP-1 sur le transcrit du gène *ATP5B*

Afin de vérifier si la diminution de l'abondance protéique de la sous-unité β de la Fo/F₁ ATPsynthase est corrélée à une diminution de l'abondance du transcrit du gène codant pour cette protéine (*ATP5B*), nous avons ensuite mesuré l'abondance relative du transcrit de ce gène par qRT-PCR en temps réel (**Figure 4.16**). De manière surprenante, l'abondance du transcrit codant la sous-unité β de la Fo/F₁ ATPsynthase mitochondriale est plus élevée (mais pas de manière significative) dans les fibroblastes LINCL (+ 40 % du contrôle) (**Figure 4.16**). Bien qu'il soit couramment admis qu'une augmentation de l'abondance d'une protéine est corrélée à une augmentation du transcrit, de nombreuses exceptions existent (Guo *et al.*, 2008). En effet, un contrôle sur la régulation de la traduction et/ou une stabilité différente de la protéine causée par un changement de la dégradation de la protéine affectant son ton temps de demi-vie et donc son « turn-over », sont autant d'hypothèses avancées pour tenter

d'expliquer les différences observées entre l'abondance d'une protéine et l'abondance du transcrite du gène qui la code. Concrètement, pour la sous-unité β de la F_0/F_1 -ATPsynthase, il a été montré que l'ARNm codant pour cette protéine possède une stabilité diminuée dans des adipocytes bruns comparée à celle du transcrite des cellules cardiaques (Tvrdik *et al.*, 1992). Ceci suggère donc l'existence de mécanismes moléculaires permettant de réguler la stabilité ou la dégradation (et donc le temps de demi-vie) de l'ARNm de cette sous-unité. Bien que cette sous-unité puisse subir une phosphorylation sur plusieurs résidus (Hojlund *et al.*, 2003), aucune modification post-traductionnelle n'a cependant pas pu être reliée à la régulation de la dégradation de cette protéine ni à sa stabilité. Il serait intéressant d'analyser l'abondance du transcrite de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale dans des cellules LINCL ayant récupéré une activité TPP-1. Malgré son importance, cette expérience n'a pas pu être réalisée dans le cadre de ce mémoire. La diminution de l'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale observée dans les fibroblastes LINCL ne peut donc pas s'expliquer par une diminution du transcrite du gène. La diminution de l'abondance protéique de cette sous-unité reste donc non expliquée à ce stade.

4.9. Effet d'une déficience en TPP-1 sur le contenu intracellulaire en ATP

Pour terminer ce travail, nous avons recherché si la diminution d'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 -ATPsynthase mitochondriale observée dans les fibroblastes LINCL pouvait avoir un impact sur l'état énergétique de ces cellules. Rappelons que cette sous-unité est un constituant essentiel de la partie F_1 (catalytique) de la F_0/F_1 -ATPsynthase mitochondriale impliquée dans la production d'ATP (von Ballmoos *et al.*, 2009). Nous avons dès lors émis l'hypothèse que la diminution de l'abondance de cette protéine pourrait compromettre la production d'ATP par la mitochondrie dans les cellules LINCL et provoquer une baisse de la concentration cytosolique en ATP. Nous avons donc mesuré le contenu intracellulaire en ATP dans les fibroblastes contrôles et les cellules LINCL.

Dans ce but, nous avons utilisé un test enzymatique basé sur une réaction de bioluminescence entre la luciférase et la luciférine en présence d'ATP, de Mg^{2+} et d'oxygène. La quantité de photons émise par cette réaction d'oxydation de la luciférine en oxy-luciférine est directement proportionnelle à la quantité d'ATP présent dans l'échantillon. En utilisant ce test, nous avons observé que le contenu cytosolique en ATP est légèrement plus élevé (+ 25 %, différence non significative) dans les fibroblastes LINCL par rapport au contenu des fibroblastes contrôles (**Figure 4.17**).

La diminution de l'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale ne semble donc pas affecter le contenu en ATP dans les cellules LINCL. Plusieurs hypothèses peuvent être proposées pour tenter d'expliquer ce résultat surprenant.

Premièrement, il est possible que la diminution de l'abondance de cette sous-unité observée dans les fibroblastes LINCL ne soit pas suffisante pour altérer la production d'ATP par la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale. Deuxièmement, la mitochondrie des cellules LINCL pourrait produire moins d'ATP mais sans conséquence visible sur le contenu en ATP, si la glycolyse est activée pour compenser la diminution de l'activité mitochondriale. Troisièmement, il est également envisageable que la consommation de l'ATP dans les cellules LINCL soit plus faible. Cette molécule est essentiellement utilisée lors de la synthèse des protéines et des acides nucléiques. Ceci peut être montré par une diminution de production d'ATP par cellule (par la mitochondrie ou la glycolyse) qui conduit à une diminution rapide de ces processus selon une certaine hiérarchie (diminution de la synthèse des acides nucléiques puis de la synthèse protéique, de l'homéostasie du sodium et du calcium) (Buttgereit *et al.*, 1995; Wieser *et al.*, 2001). Dans le cas d'une diminution de l'utilisation de

ces processus dans les cellules LINCL, une moindre consommation d'énergie pourrait masquer une diminution de la production d'ATP par les mitochondries de ces cellules. Enfin, bien qu'elle soit essentiellement retrouvée dans la MMI, la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale, ainsi que le complexe protéique dont elle fait partie, sont également localisés dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique de cellules endothéliales (Martinez *et al.*, 2003). Le rôle de ce complexe dans la membrane plasmique serait d'assurer l'endocytose de l'ApoA-1, et donc le trafic du cholestérol dans des cellules endothéliales. Il a également été montré, dans des adipocytes, que ce complexe assurerait une synthèse d'ATP dans le milieu extracellulaire (Kim *et al.*, 2004) et, dans les hépatocytes, jouerait un rôle de récepteur à l'entérostatine, une hormone sécrétée par l'intestin grêle et impliquée dans le contrôle de la satiété et l'inhibition de la sécrétion d'insuline (Park *et al.*, 2009).

Enfin, un article récent rapporte qu'une augmentation de l'abondance la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase est retrouvée dans la lipofuscinose céréoïde neuronale infantile (INCL), caractérisée par une déficience enzymatique de la palmitoyl protéine thioestérase 1 (PTT-1). Cette augmentation affecterait uniquement le « pool » membranaire de cette protéine (Lyly *et al.*, 2008). Il est donc possible d'envisager que la diminution de l'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale n'affecte que le « pool » membranaire de cette protéine dans les cellules LINCL. En effet, la cavéoline-1, une protéine capable de se lier au cholestérol, est impliquée dans la structure des cavéoles ainsi que dans le transport du cholestérol. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique (50-100 nm) notamment impliquées dans l'endocytose, la transcytose, le transport de cholestérol ainsi que la transduction du signal (Parton *et al.*, 2007). De plus, il a été montré qu'un enrichissement artificiel du contenu intracellulaire en cholestérol induit également un réadressage de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase et de la protéine cavéoline-1, dans les cavéoles de la membrane plasmique (Wang *et al.*, 2006). Or, rappelons que dans les cellules LINCL, on observe une accumulation de céréoïde, un lipopigment contenant, notamment, du cholestérol (Seehafer *et al.*, 2006). Il est donc raisonnable de penser que cette accumulation de matériel contenant du cholestérol au sein du lysosome puisse également altérer sa distribution dans la membrane plasmique, induisant ainsi un réadressage de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase en membrane.

Nous vérifierons cette hypothèse, par des marquages immunohistochimiques de la protéine dans des cellules perméabilisées ou non pour localiser les différents « pools » du complexe ATPsynthase dans les fibroblastes LINCL et les cellules contrôles.

5. Conclusions et perspectives

Les maladies de surcharge lysosomale sont des pathologies génétiques très fréquentes (affectant 1 naissance sur 7.700 dans le monde (Meikle *et al.*, 1999)) caractérisées par une déficience d'une ou de plusieurs hydrolases acides lysosomales (des enzymes impliquées dans la dégradation des macromolécules dans le lysosome) qui conduit à l'accumulation intralysosomale du substrat de ces enzymes, qui ne peut plus être dégradé (Futerman *et al.*, 2004) et, *in fine*, à l'apparition de symptômes principalement de type neurodégénératif comme des crises d'épilepsies ainsi qu'une perte des capacités cognitives et locomotrices (Vellodi, 2005).

On a longtemps pensé que les organites, comme les mitochondries ou les lysosomes, étaient des structures subcellulaires statiques et isolées, ne communiquant pas entre eux. Cependant comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence l'existence de voies de communication moléculaires de type « rétrograde » entre un organite non fonctionnel et le noyau. Citons, par exemple, la voie UPR activée par le RE en réponse à une accumulation de protéines n'ayant pas acquis une bonne conformation (Ron *et al.*, 2007) ou encore le dysfonctionnement mitochondrial, causé par le découplage ou des altérations dans le génome mitochondrial qui est capable d'activer de nombreuses voies de signalisation (Arnould *et al.*, 2002). Si le dysfonctionnement des organites est relativement bien étudié dans le cadre de la mitochondrie et du RE, les réponses cellulaires à la surcharge lysosomale sont beaucoup moins bien connues.

Notre étude avait pour objectif principal de tenter de mettre en évidence d'éventuelles modifications de l'activité et/ou de l'abondance de la population mitochondriale en réponse à un dysfonctionnement lysosomal causé par une déficience en TPP-1. Ce travail fait partie intégrante de la thèse de Guillaume Van Beersel (FNRS-3ème année, thèse en cours) qui s'intéresse à l'activation de voies de signalisation et de facteurs de transcription dans le cerveau de souris invalidées pour le gène *CLN2*, gène qui code pour la TPP-1 (Sleat *et al.*, 2004). Dans le cerveau de ces souris à un stage avancé de la maladie, il semblerait que la déficience en TPP-1 conduise à une activation du facteur de transcription c-Jun et vraisemblablement à celle d'autres facteurs de transcription (identifiés à l'aide de la technologie Protein/DNA array, Panomics). Les candidats identifiés pourraient être impliqués dans l'établissement d'une réponse inflammatoire.

Le choix de s'intéresser aux modifications éventuelles de la mitochondrie dans les cellules présentant une déficience en TPP-1 a été pris en raison de l'importance cellulaire de cet organite puisque la mitochondrie constitue la source d'énergie principale dans les cellules eucaryotes de mammifères. Cet organite est aussi le point d'intégration de la mort cellulaire par apoptose (Kroemer, 2001) et contribue grandement à l'homéostasie cellulaire du calcium (Gunter *et al.*, 2000). De plus, rappelons que, très récemment, la mucopolidose de type IV et de nombreuses autres maladies de surcharge lysosomale ont été caractérisées par des changements importants au niveau de la population mitochondriale comme une fragmentation du réseau et une moindre capacité à importer du calcium en réponse à une stimulation qui augmente la $[Ca^{2+}]_c$ (Jennings *et al.*, 2006). Ces auteurs proposent même que l'accumulation de mitochondries altérées et fragmentées serait le résultat d'un déficit de la formation d'autophagolysosomes et donc une diminution de l'efficacité de la mitophagie. Le déficit d'autophagie maintenant en place une fraction de la population mitochondriale incapable de jouer son rôle de tampon contre une élévation de la $[Ca^{2+}]_c$, est même présenté comme le

facteur générique susceptible de conduire à la dégénérescence cellulaire et/à l'apoptose induite dans le cadre des MSLs.

Une diminution de la mitophagie est également observée dans la gangliosidose à GM1 (Takamura *et al.*, 2008) et la maladie de Danon (Tanaka *et al.*, 2000). Une diminution de la taille des mitochondries, du potentiel de membrane mitochondrial ainsi qu'une diminution de l'activité du complexe V (Fo/F1 ATP synthase) a également été observée dans la maladie de Niemann-Pick de type C (Yu *et al.*, 2005).

C'est en raison de ces preuves que la biologie de la mitochondrie pouvait être affectée par la surcharge lysosomale que nous nous sommes intéressés aux éventuels effets d'une déficience de l'activité enzymatique de la TPP-1, responsable de la MSL connue sous le nom de lipofuscinose neuronale céréoïde infantile tardive (Ezaki *et al.*, 2000) sur la morphologie et certaines fonctions mitochondriales. Dans ce travail, nous avons cherché à mieux comprendre les effets de la surcharge lysosomale induite par une déficience en TPP-1, une exopeptidase connue pour dégrader certains substrats tels que deux neurotransmetteurs (la neuroméline B et la cholecystokinine (Bernardini *et al.*, 2002; Kopan *et al.*, 2004)), la sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale (Ezaki *et al.*, 1999) et la protéine pro-apoptotique Bid (Autefage *et al.*, 2009).

Dans cette étude, nous avons utilisé un modèle cellulaire de fibroblastes affectés par une déficience en TPP-1, cause de la pathologie LINCL. Nous avons à notre disposition deux lignées de fibroblastes humains de peau.

Dans un premier temps, nous avons vérifié le déficit enzymatique en TPP-1 des fibroblastes LINCL et pour cela, nous avons implémenté un dosage de l'activité enzymatique de la TPP-1, précédemment décrit par Sohar et collaborateurs (Sohar *et al.*, 2000). Nous confirmons bien la diminution de l'activité de cette enzyme dans les fibroblastes LINCL (Ezaki *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001). Pour pouvoir analyser nos résultats, étant donné que les lignées de fibroblastes utilisées dans le cadre de ce mémoire proviennent de deux donneurs non apparentés, nous avons développé une stratégie permettant une récupération de l'activité TPP-1 dans les fibroblastes LINCL en vue de rechercher une restauration de phénotype. Cette stratégie repose sur incubation des cellules LINCL en présence de la forme précurseur recombinante de la TPP-1 (Lin *et al.*, 2001). Dans nos conditions expérimentales, nous montrons qu'après 48 h d'incubation, l'activité TPP-1 retrouvée dans les fibroblastes LINCL est comparable à l'activité dosée dans les cellules contrôles. De plus, l'enzyme ainsi endocytée, semble très stable comme l'atteste l'activité mesurée après 5 jours post-traitement. La capacité de pourvoir restaurer l'activité à long terme est absolument nécessaire pour pouvoir prétendre à réverser des changements observés dans la lignée LINCL, comme des modifications de la transcription de gènes cibles affectant l'abondance de différentes protéines. Dans ce cadre, une perspective intéressante à ce travail serait de pouvoir établir des protéomes complets et/ou ciblés sur les mitochondries (mitoprotéomes) de cellules LINCL afin de pouvoir identifier, au niveau protéique, des modifications induites par la déficience en TPP-1. Pour réaliser ces expériences, le modèle de réversion phénotypique éventuel causé par une récupération de l'activité de l'enzyme TPP-1 pendant plusieurs jours est absolument nécessaire. Dans ce travail, nous avons déterminé les conditions permettant d'utiliser ce contrôle essentiel.

Nous nous sommes ensuite intéressés aux effets potentiels de la surcharge lysosomale causée par la déficience en TPP-1 sur la population mitochondriale. Dans un premier temps,

nous avons montré que l'abondance de la population mitochondriale totale ne semble pas altérée dans les fibroblastes LINCL et que le potentiel de membrane mitochondriale semble peu ou pas affecté. Toutefois, nous avons également montré que la morphologie mitochondriale pourrait être altérée puisque le réseau mitochondrial semble plus fragmenté dans les fibroblastes déficients en TPP-1. Ces résultats sont en accord avec d'autres études montrant une fragmentation du réseau mitochondrial dans d'autres MSLs telles que la mucopolipidose de type IV (Jolly *et al.*, 2002; Jennings *et al.*, 2006). Comme nous l'avons également montré, il semble que cette fragmentation du réseau mitochondrial puisse être induite par une augmentation du recrutement de la protéine Drp1, impliquée dans la fission du réseau mitochondrial (Smirnova *et al.*, 1998). En effet, nous montrons une abondance plus grande de Drp1 dans des fractions mitochondriales de cellules LINCL par rapport à l'abondance de la protéine de fission dans les mitochondries des cellules contrôles. Dans un futur proche, nous devons évidemment rechercher l'effet de la récupération de l'activité TPP-1 dans les cellules LINCL sur la morphologie de la population mitochondriale et voir si le fait de récupérer une activité TPP-1 permet de modifier le recrutement de Drp1 à la MME des mitochondries dans ces cellules. La relevance et la pertinence biologique de ces résultats montrant la fragmentation du réseau mitochondrial devront également être recherchés dans des MEFs (*Mouse Embryonic Fibroblasts*) de souris invalidées pour le gène *CLN2*, des cultures de neurones et/ou d'astrocytes en provenance de ces souris ou mieux encore sur des coupes de cerveaux de ces souris. Enfin, pour comprendre le rôle éventuel de Drp1 dans la fragmentation du réseau mitochondriale dans les cellules LINCL, les effets d'une inhibition de son expression par une approche de type RNAi ou la prévention de son recrutement par des dominants négatifs sur la morphologie mitochondriale pourrait être recherchés.

D'un point de vue mécanistique, comme la morphologie du réseau mitochondrial repose sur un équilibre entre les phénomènes de fusion (médiée par les mitofusines 1 et 2 et Opa1) et de fission mitochondriales (médies par Drp1 et Fis1), des expériences supplémentaires seront nécessaires pour analyser l'abondance de ces différents acteurs dans les mitochondries des cellules affectées par une déficience en TPP-1. En effet, il pourrait être intéressant de s'intéresser à la protéine Fis1, une protéine adaptatrice, liant la protéine Drp1 à la MME (Yoon *et al.*, 2003).

Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence les conséquences fonctionnelles de la fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules LINCL en nous intéressant, notamment, au contenu en ATP dans les cellules. Nous n'avons cependant pas observé de diminution du contenu en ATP intracellulaire dans les fibroblastes LINCL, ce qui suggère que la production d'ATP par la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale n'est probablement pas diminuée en réponse à la fragmentation du réseau mitochondrial. Ce résultat semble en désaccord avec des données de la littérature qui montrent qu'une inhibition de l'expression de Drp1 par RNAi dans des cellules HeLa conduisant à une altération du réseau mitochondrial, est corrélée avec une diminution de l'activité des complexes IV de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons (Benard *et al.*, 2007). Une diminution de la production d'énergie est alors observée. Une diminution de l'expression de Fis1 conduit au même phénotype (Twig *et al.*, 2008).

L'absence de la diminution du contenu en ATP dans les cellules LINCL est surprenante, surtout si nous tenons compte de la diminution de l'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mise en évidence dans ces cellules. En effet, en recherchant l'effet de la déficience en TPP-1 sur l'abondance de quelques marqueurs protéiques mitochondriaux, nous avons montré que bien que l'abondance des protéines mitochondriales Tom20 et Tom40, impliquées dans le complexe TOM, ne soit pas modifiée, l'abondance de la sous-unité β de la

F₀/F₁ ATPsynthase mitochondriale est diminuée dans les fibroblastes LINCL. Nous avons également montré que cette diminution semblait pouvoir être corrigée, du moins partiellement et de manière non significative dans nos conditions expérimentales, par la restauration de l'activité TPP-1 dans ces fibroblastes. Il serait donc intéressant dans le futur de répéter ces expériences afin de pouvoir montrer si la diminution de l'abondance de cette sous-unité protéique est bel et bien induite par la déficience en TPP-1. Il sera également important de rechercher les causes de la diminution d'abondance de cette protéique qui ne semble pas provenir d'un changement de l'abondance du transcrit, comme déterminé en qRT-PCR en temps réel.

Nous émettons également l'hypothèse que la diminution globale observée sur des lysats totaux pourrait provenir de la dégradation ciblée d'un « pool » membranaire de la sous-unité β de la F₀/F₁ ATPsynthase, n'affectant pas le « pool » mitochondrial et donc la capacité de production d'ATP dans les cellules LINCL. En effet, il a été montré qu'un réadressage de la sous-unité β de la F₀/F₁ ATPsynthase en membrane plasmique peut se produire dans des fibroblastes INCL en réponse à une déficience en palmitoyl-protein thioestérase 1 (Lyly *et al.*, 2008). Nous proposons donc de déterminer la localisation de la sous-unité β de la F₀/F₁ ATPsynthase par immunodétection et observation en microscopie confocale de cette protéine dans des cellules perméabilisées ou non. Il conviendrait également de rechercher l'abondance, par des analyses en Western blot en fluorescence, de cette sous-unité dans des fractions mitochondriales enrichies et des fractions S100 enrichies en membranes plasmiques.

Enfin, s'il s'avère que la diminution de la sous-unité β de la F₀/F₁ ATPsynthase se produit bien dans le « pool » de la membrane plasmique, nous nous intéresserons à ses conséquences fonctionnelles pour la cellule LINCL. En effet, il a été montré que la présence de la sous-unité β de la F₀/F₁ ATPsynthase mitochondriale joue un rôle de récepteur membranaire à l'ApoA1 et catalyse son endocytose (Martinez *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant de pouvoir déterminer les cinétiques de capture du cholestérol dans les cellules LINCL et rechercher l'impact de la diminution cette protéine en membrane plasmique sur l'homéostasie du cholestérol ou la production d'ATP extracellulaire, comme démontré pour les adipocytes (Kim *et al.*, 2004) ou les astrocytes, où cette molécule régule notamment la transmission synaptique mais agit également en tant que messenger entre les astrocytes et les neurones (Joseph *et al.*, 2003; Womac *et al.*, 2009).

Ajoutons encore que nous n'avons analysé l'abondance que de quelques marqueurs mitochondriaux dans ce travail, une étude plus systématique serait nécessaire pour identifier, dans les cellules LINCL, les changements éventuels dans la composition protéique des mitochondries induits par la déficience en TPP-1. Nous proposons l'analyse de mitotranscriptomes et de mitoprotéomes de cellules LINCL pour mettre en évidence un ensemble de changements d'expression ou d'abondance de protéines mitochondriales. Cette approche devrait éventuellement permettre de mettre en évidence des changements de nature qualitative dans la composition mitochondriale de cellules présentant une déficience ou une invalidation de la TPP-1 comme dans les MEFs CLN₂^{-/-}.

La partie la plus aboutie de ce travail porte certainement sur l'impact de la déficience en TPP-1 sur l'homéostasie calcique. En effet, nous avons pu mettre en évidence une diminution des capacités d'importation de calcium cytosolique libre par les mitochondries des cellules LINCL en réponse à une augmentation de la [Ca²⁺]_c induite par la bradykinine ou l'ionomycine. Il semblerait donc que la fragmentation du réseau mitochondrial s'accompagne d'une diminution des capacités d'importation de calcium libre par la mitochondrie dans ces cellules. Nos résultats sont en accords avec d'autres données de la littérature. En effet des

données comparables ont été obtenues dans la mucopolipidose de type IV (Jennings *et al.*, 2006). Ces auteurs montrent également que le déficit d'importation pourrait également être responsable d'une élévation anormale de la $[Ca^{2+}]_c$ au sein des neurones. Or il a pu être montré qu'une élévation continue de la $[Ca^{2+}]_c$ et/ou de la $[Ca^{2+}]_m$ contribuait à l'activation de la mort cellulaire par apoptose (Nasr *et al.*, 2003). Ce déficit d'importation de calcium libre par la mitochondrie en réponse à une simulation pourrait donc éventuellement être responsable de l'apoptose massive observée dans les neurones de patients LINCL par un mécanisme comparable à celui mis en évidence pour la mucopolipidose de type IV (Jennings *et al.*, 2006).

Nous devons également tenter de découvrir si la fragmentation du réseau mitochondrial est bel et bien la cause de la diminution des capacités d'importation mitochondriales du calcium dans les fibroblastes LINCL. En effet, rappelons également, comme nous l'avons vu dans l'introduction, que la mitochondrie co-localise avec le réticulum endoplasmique. Cette interaction physique est médiée notamment par les interactions entre les protéines du réticulum endoplasmique Grp75 (Szabadkai *et al.*, 2006) et les protéines mitochondriales VDAC-1 et/ou Mfn2 (de Brito *et al.*, 2008). Il a été montré que cette interaction est nécessaire à une capacité mitochondriale d'importation de calcium libre maximale (Hayashi *et al.*, 2007). Il est donc également possible que la fragmentation induite par la déficience en TPP-1 observée dans notre travail, soit responsable d'une perte de co-localisation entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique, conduisant à une altération de l'homéostasie du calcium entre les deux organites. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en recherchant d'éventuelles co-localisations entre les protéines Grp75 ou VDAC-1 en microscopie confocale. Il serait également possible d'induire une répression de l'expression de ces protéines par RNAi dans les fibroblastes contrôles. En effet, si l'interaction physique entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries existe dans les fibroblastes WT-CTL et que celle-ci est nécessaire à la capacité d'importation mitochondriale de calcium cytosolique libre, nous devrions observer une diminution de l'importation mitochondriale du calcium dans les fibroblastes contrôles en réponse au silençage des protéines Grp75 ou VDAC-1.

Enfin, tous les résultats obtenus sur des cellules humaines au cours de ce mémoire devront également être confirmés dans le futur, dans d'autres modèles, tels que la souris *knock-out* pour le gène *CLN2* ou une lignée de MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) dérivée de ces souris.

En résumé nous avons donc montré qu'une surcharge lysosomale en céréoïde, induite par une déficience en TPP-1, pouvait induire divers possibles dysfonctionnements mitochondriaux tels qu'une fragmentation du réseau mitochondrial, une diminution de l'abondance de la sous-unité β de la F_0/F_1 ATPsynthase mitochondriale ainsi qu'une diminution des capacités d'importation de calcium par la mitochondrie. Rappelons cependant que ces résultats restent fragmentaires et que ces derniers devront être confirmés dans le futur. Toutefois, il ne semble faire aucun doute quant à la possibilité d'un éventuel lien entre un dysfonctionnement lysosomal et une altération des fonctions de la mitochondrie. Une recherche approfondie de ces éventuels liens doit donc être réalisée. Cette amélioration de nos connaissances nous permettra sans doute de mieux comprendre les processus impliqués dans l'apparition des symptômes des maladies de surcharge lysosomale. Ils permettront peut-être également, à long terme, la mise en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques de ces maladies, encore aujourd'hui, incurables.

6. Bibliographie

- Alexander, C., M. Votruba, et al. (2000). "OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28." Nat Genet **26**(2): 211-5.
- Amchenkova, A. A., L. E. Bakeeva, et al. (1988). "Coupling membranes as energy-transmitting cables. I. Filamentous mitochondria in fibroblasts and mitochondrial clusters in cardiomyocytes." J Cell Biol **107**(2): 481-95.
- Andreyev, A. and G. Fiskum (1999). "Calcium induced release of mitochondrial cytochrome c by different mechanisms selective for brain versus liver." Cell Death Differ **6**(9): 825-32.
- Arnould, T., S. Vankoningsloo, et al. (2002). "CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation." Embo J **21**(1-2): 53-63.
- Arnould, D. (2007). "Mitochondrial fragmentation in apoptosis." Trends Cell Biol **17**(1): 6-12.
- Arnould, D., N. Rismanchi, et al. (2005). "Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death." Curr Biol **15**(23): 2112-8.
- Augestad, L. B. and W. D. Flanders (2006). "Occurrence of and mortality from childhood neuronal ceroid lipofuscinoses in Norway." J Child Neurol **21**(11): 917-22.
- Autefage, H., V. Albinet, et al. (2009). "Lysosomal serine protease CLN2 regulates tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis in a Bid-dependent manner." J Biol Chem **284**(17): 11507-16.
- Azarashvili, T., O. Krestinina, et al. (2003). "Physiological Ca²⁺ level and Ca²⁺-induced Permeability Transition Pore control protein phosphorylation in rat brain mitochondria." Cell Calcium **34**(3): 253-9.
- Ballabio, A. and V. Gieselmann (2009). "Lysosomal disorders: from storage to cellular damage." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 684-96.
- Bellu, A. R., M. Komori, et al. (2001). "Peroxisome biogenesis and selective degradation converge at Pex14p." J Biol Chem **276**(48): 44570-4.
- Benard, G. and N. Bellance (2007). "Mitochondrial bioenergetics and structural network organization." Journal of Cell Science **120**: 838-848.
- Bernardini, F. and M. J. Warburton (2002). "Lysosomal degradation of cholecystokinin-(29-33)-amide in mouse brain is dependent on tripeptidyl peptidase-I: implications for the degradation and storage of peptides in classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." Biochem J **366**(Pt 2): 521-9.
- Blaukat, A. (2003). "Structure and signalling pathways of kinin receptors." Andrologia **35**(1): 17-23.
- Bolender, N., A. Sickmann, et al. (2008). "Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins." EMBO Rep **9**(1): 42-9.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-54.
- Brantova, O. and B. Asfaw (2009). "Ultrastructural and functional abnormalities of mitochondria in cultivated fibroblasts from α -mannosidosis patients." Biologia **2**: 394-401.
- Braulke, T. and J. S. Bonifacino (2009). "Sorting of lysosomal proteins." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 605-14.

- Brennan, J. P., R. Southworth, et al. (2006). "Mitochondrial uncoupling, with low concentration FCCP, induces ROS-dependent cardioprotection independent of KATP channel activation." Cardiovasc Res **72**(2): 313-21.
- Broekemeier, K. M., R. J. Krebsbach, et al. (1994). "Inhibition of the mitochondrial Ca²⁺-uniporter by pure and impure ruthenium red." Mol Cell Biochem **139**(1): 33-40.
- Bruce Alberts, A. J. (2004). Transport du réseau trans-golgien aux lysosomes. Biologie moléculaire de la cellule. M.-S. Flammarion: 739-745.
- Buccoliero, R., J. Bodennec, et al. (2004). "Phospholipid synthesis is decreased in neuronal tissue in a mouse model of Sandhoff disease." J Neurochem **90**(1): 80-8.
- Buckman, J. F., H. Hernandez, et al. (2001). "MitoTracker labeling in primary neuronal and astrocytic cultures: influence of mitochondrial membrane potential and oxidants." J Neurosci Methods **104**(2): 165-76.
- Buttgereit, F. and M. D. Brand (1995). "A hierarchy of ATP-consuming processes in mammalian cells." Biochem J **312** (Pt 1): 163-7.
- Casarin, A., F. Rusalen, et al. (2009). "X-linked brachytelephalangic chondrodysplasia punctata: a simple trait that is not so simple." Am J Med Genet A **149A**(11): 2464-8.
- Cervený, K. L., Y. Tamura, et al. (2007). "Regulation of mitochondrial fusion and division." Trends Cell Biol **17**(11): 563-9.
- Chacinska, A., C. M. Koehler, et al. (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." Cell **138**(4): 628-44.
- Chan, D. C. (2006). "Mitochondrial fusion and fission in mammals." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 79-99.
- Chen, H., S. A. Detmer, et al. (2003). "Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development." J Cell Biol **160**(2): 189-200.
- Chen, H., J. M. McCaffery, et al. (2007). "Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum." Cell **130**(3): 548-62.
- Chen, K. H., X. Guo, et al. (2004). "Dysregulation of HSG triggers vascular proliferative disorders." Nat Cell Biol **6**(9): 872-83.
- Chen, Q., E. J. Vazquez, et al. (2003). "Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III." J Biol Chem **278**(38): 36027-31.
- Cipolat, S., T. Rudka, et al. (2006). "Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling." Cell **126**(1): 163-75.
- Codogno, P. and A. J. Meijer (2005). "Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death." Cell Death Differ **12 Suppl 2**: 1509-18.
- Cohen, M. M., G. P. Leboucher, et al. (2008). "Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion." Mol Biol Cell **19**(6): 2457-64.
- Das, A. M., R. D. Jolly, et al. (1999). "Anomalies of mitochondrial ATP synthase regulation in four different types of neuronal ceroid lipofuscinosis." Mol Genet Metab **66**(4): 349-55.
- de Brito, O. M. and L. Scorrano (2008). "Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria." Nature **456**(7222): 605-10.
- de Brito, O. M. and L. Scorrano (2009). "Mitofusin-2 regulates mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology and tethering: The role of Ras." Mitochondrion **9**(3): 222-6.
- Deganuto, M., M. G. Pittis, et al. (2007). "Altered intracellular redox status in Gaucher disease fibroblasts and impairment of adaptive response against oxidative stress." J Cell Physiol **212**(1): 223-35.

- Delaive, E., T. Arnould, et al. (2008). "A sensitive three-step protocol for fluorescence-based Western blot detection." *J Immunol Methods* **334**(1-2): 51-8.
- Demaurex, N. and D. Poberko (2009). "Cell biology. A revolving door for calcium." *Science* **326**(5949): 57-8.
- Denton, R. M. (2009). "Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions." *Biochim Biophys Acta* **1787**(11): 1309-16.
- Diaz, F. and C. T. Moraes (2008). "Mitochondrial biogenesis and turnover." *Cell Calcium* **44**(1): 24-35.
- Dice, J. F. (2007). "Chaperone-mediated autophagy." *Autophagy* **3**(4): 295-9.
- Dong, X. P., X. Cheng, et al. (2008). "The type IV mucopolipidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel." *Nature* **455**(7215): 992-6.
- Duchen, M. R. (2004). "Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology." *Mol Aspects Med* **25**(4): 365-451.
- Duvezin-Caubet, S., M. Koppen, et al. (2007). "OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria." *Mol Biol Cell* **18**(9): 3582-90.
- Elvevold, K., J. Simon-Santamaria, et al. (2008). "Liver sinusoidal endothelial cells depend on mannose receptor-mediated recruitment of lysosomal enzymes for normal degradation capacity." *Hepatology* **48**(6): 2007-15.
- Eskelinen, E. L. (2006). "Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy." *Mol Aspects Med* **27**(5-6): 495-502.
- Eskelinen, E. L. and P. Saftig (2009). "Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease." *Biochim Biophys Acta* **1793**(4): 664-73.
- Eskelinen, E. L., Y. Tanaka, et al. (2003). "At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins." *Trends Cell Biol* **13**(3): 137-45.
- Eura, Y., N. Ishihara, et al. (2006). "Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function." *J Cell Sci* **119**(Pt 23): 4913-25.
- Ezaki, J., M. Takeda-Ezaki, et al. (2000). "Characterization of endopeptidase activity of tripeptidyl peptidase-I/CLN2 protein which is deficient in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." *Biochem Biophys Res Commun* **268**(3): 904-8.
- Ezaki, J., I. Tanida, et al. (1999). "A lysosomal proteinase, the late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene (CLN2) product, is essential for degradation of a hydrophobic protein, the subunit c of ATP synthase." *J Neurochem* **72**(6): 2573-82.
- Foghsgaard, L., D. Wissing, et al. (2001). "Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor." *J Cell Biol* **153**(5): 999-1010.
- Fossale, E., P. Wolf, et al. (2004). "Membrane trafficking and mitochondrial abnormalities precede subunit c deposition in a cerebellar cell model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis." *BMC Neurosci* **5**: 57.
- Frank, S. (2006). "Dysregulation of mitochondrial fusion and fission: an emerging concept in neurodegeneration." *Acta Neuropathol* **111**(2): 93-100.
- Frezza, C., S. Cipolat, et al. (2006). "OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion." *Cell* **126**(1): 177-89.
- Frieden, M., D. James, et al. (2004). "Ca(2+) homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1." *J Biol Chem* **279**(21): 22704-14.
- Futerman, A. H. and G. van Meer (2004). "The cell biology of lysosomal storage disorders." *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(7): 554-65.
- Gingrich, J. C., D. R. Davis, et al. (2000). "Multiplex detection and quantitation of proteins on western blots using fluorescent probes." *Biotechniques* **29**(3): 636-42.

- Goebel, H. H. and K. E. Wisniewski (2004). "Current state of clinical and morphological features in human NCL." Brain Pathol **14**(1): 61-9.
- Goff, L. L. (1992). "Effect of biophysical changes on propidium iodide access to DNA during oxidative stress of cultured human skin cells " Toxicology in Vitro **6**(5): 423-432.
- Goffart, S. and R. J. Wiesner (2003). "Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis." Exp Physiol **88**(1): 33-40.
- Golabek, A. A., N. Dolzhanskaya, et al. (2008). "Prosegment of tripeptidyl peptidase I is a potent, slow-binding inhibitor of its cognate enzyme." J Biol Chem **283**(24): 16497-504.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1977). "The low-density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis." Annu Rev Biochem **46**: 897-930.
- Gottlieb, E., S. M. Armour, et al. (2003). "Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis." Cell Death Differ **10**(6): 709-17.
- Graier, W. F., M. Frieden, et al. (2007). "Mitochondria and Ca(2+) signaling: old guests, new functions." Pflugers Arch **455**(3): 375-96.
- Griffin, E. E., J. Graumann, et al. (2005). "The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria." J Cell Biol **170**(2): 237-48.
- Guicciardi, M. E., M. Leist, et al. (2004). "Lysosomes in cell death." Oncogene **23**(16): 2881-90.
- Gunter, T. E., L. Buntinas, et al. (2000). "Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions." Cell Calcium **28**(5-6): 285-96.
- Guo, Y., P. Xiao, et al. (2008). "How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes." Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) **40**(5): 426-36.
- Hajek, P., A. Chomyn, et al. (2007). "Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2." J Biol Chem **282**(8): 5670-81.
- Hamer, I. and M. Jadot (2005). "Endolysosomal transport of newly-synthesized cathepsin D in a sucrose model of lysosomal storage." Exp Cell Res **309**(2): 284-95.
- Hancock, J. T., R. Desikan, et al. (2001). "Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways." Biochem Soc Trans **29**(Pt 2): 345-50.
- Hartikainen, J. M., W. Ju, et al. (1999). "Late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis is due to splicing mutations in the CLN2 gene." Mol Genet Metab **67**(2): 162-8.
- Haugland, R. P. (2002). Handbook of Fluorescent Probes and Research Products.
- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, et al. (2009). "A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation." Nat Cell Biol **11**(12): 1433-7.
- Hayashi, T. and T. P. Su (2007). "Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca(2+) signaling and cell survival." Cell **131**(3): 596-610.
- He, Y., K. W. Leung, et al. (2008). "Mitochondrial complex I defect induces ROS release and degeneration in trabecular meshwork cells of POAG patients: protection by antioxidants." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(4): 1447-58.
- Herzig, R. P., S. Scacco, et al. (2000). "Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c." J Biol Chem **275**(17): 13134-41.
- Herzig, S. and J. C. Martinou (2008). "Mitochondrial dynamics: to be in good shape to survive." Curr Mol Med **8**(2): 131-7.
- Himmel, H. M., R. Riehle, et al. (1990). "Effects of the divalent cation ionophore ionomycin on the performance of isolated guinea-pig atria." Basic Res Cardiol **85**(3): 247-56.

- Hock, M. B. and A. Kralli (2009). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function." Annu Rev Physiol **71**: 177-203.
- Hojlund, K., K. Wrzesinski, et al. (2003). "Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes." J Biol Chem **278**(12): 10436-42.
- Hom, J. R., J. S. Gewandter, et al. (2007). "Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis." J Cell Physiol **212**(2): 498-508.
- Hondares, E., O. Mora, et al. (2006). "Thiazolidinediones and rexinoids induce peroxisome proliferator-activated receptor-coactivator (PGC)-1alpha gene transcription: an autoregulatory loop controls PGC-1alpha expression in adipocytes via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivation." Endocrinology **147**(6): 2829-38.
- Hunziker, W. and H. J. Geuze (1996). "Intracellular trafficking of lysosomal membrane proteins." Bioessays **18**(5): 379-89.
- Ingerman, E., E. M. Perkins, et al. (2005). "Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria." J Cell Biol **170**(7): 1021-7.
- Ishihara, N., Y. Eura, et al. (2004). "Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity." J Cell Sci **117**(Pt 26): 6535-46.
- Jalanko, A. and T. Braulke (2009). "Neuronal ceroid lipofuscinoses." Biochim Biophys Acta **1793**(4): 697-709.
- James, D. I., P. A. Parone, et al. (2003). "hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery." J Biol Chem **278**(38): 36373-9.
- Jennings, J. J., Jr., J. H. Zhu, et al. (2006). "Mitochondrial aberrations in mucopolipidosis Type IV." J Biol Chem **281**(51): 39041-50.
- Jezeq, P. and L. Plecita-Hlavata (2009). "Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 1790-804.
- Jing, X. B., X. B. Cai, et al. (2007). "Reactive oxygen species and mitochondrial membrane potential are modulated during CDDP-induced apoptosis in EC-109 cells." Biochem Cell Biol **85**(2): 265-71.
- Jolly, R. D., S. Brown, et al. (2002). "Mitochondrial dysfunction in the neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease)." Neurochem Int **40**(6): 565-71.
- Joseph, S. M., M. R. Buchakjian, et al. (2003). "Colocalization of ATP release sites and ecto-ATPase activity at the extracellular surface of human astrocytes." J Biol Chem **278**(26): 23331-42.
- Ju, W. K., Q. Liu, et al. (2007). "Elevated hydrostatic pressure triggers mitochondrial fission and decreases cellular ATP in differentiated RGC-5 cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(5): 2145-51.
- Jung, T., N. Bader, et al. (2007). "Lipofuscin: formation, distribution, and metabolic consequences." Ann N Y Acad Sci **1119**: 97-111.
- Kagedal, K., M. Zhao, et al. (2001). "Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases." Biochem J **359**(Pt 2): 335-43.
- Karbowski, M., Y. J. Lee, et al. (2002). "Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis." J Cell Biol **159**(6): 931-8.
- Karp, G. (2004). Structure et fonction de la mitochondrie. Biologie cellulaire & cellulaire. d. Boeck: 183-187.
- Kim, B. W., H. J. Choo, et al. (2004). "Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts." Exp Mol Med **36**(5): 476-85.

- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, et al. (2007). "Selective degradation of mitochondria by mitophagy." *Arch Biochem Biophys* **462**(2): 245-53.
- Kirichok, Y., G. Krapivinsky, et al. (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." *Nature* **427**(6972): 360-4.
- Koch, A., Y. Yoon, et al. (2005). "A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells." *Mol Biol Cell* **16**(11): 5077-86.
- Kopan, S., U. Sivasubramaniam, et al. (2004). "The lysosomal degradation of neuromedin B is dependent on tripeptidyl peptidase-I: evidence for the impairment of neuropeptide degradation in late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." *Biochem Biophys Res Commun* **319**(1): 58-65.
- Korkotian, E., A. Schwarz, et al. (1999). "Elevation of intracellular glucosylceramide levels results in an increase in endoplasmic reticulum density and in functional calcium stores in cultured neurons." *J Biol Chem* **274**(31): 21673-8.
- Kowaltowski, A. J., E. S. Naia-da-Silva, et al. (1998). "Ca²⁺-stimulated mitochondrial reactive oxygen species generation and permeability transition are inhibited by dibucaine or Mg²⁺." *Arch Biochem Biophys* **359**(1): 77-81.
- Kroemer, G. (2001). "[Mitochondrial control of apoptosis]." *Bull Acad Natl Med* **185**(6): 1135-42; discussion 1143.
- Kundra, R. and S. Kornfeld (1999). "Asparagine-linked oligosaccharides protect Lamp-1 and Lamp-2 from intracellular proteolysis." *J Biol Chem* **274**(43): 31039-46.
- Kurachi, Y., A. Oka, et al. (2001). "Distribution and development of CLN2 protein, the late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis gene product." *Acta Neuropathol* **102**(1): 20-6.
- Kuznetsov, A. V., J. Smigelskaite, et al. (2008). "Survival signaling by C-RAF: mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ are critical targets." *Mol Cell Biol* **28**(7): 2304-13.
- Kyttala, A., U. Lahtinen, et al. (2006). "Functional biology of the neuronal ceroid lipofuscinoses (NCL) proteins." *Biochim Biophys Acta* **1762**(10): 920-33.
- Lash, L. H., D. A. Putt, et al. (2002). "Protection of NRK-52E cells, a rat renal proximal tubular cell line, from chemical-induced apoptosis by overexpression of a mitochondrial glutathione transporter." *J Pharmacol Exp Ther* **303**(2): 476-86.
- Lee, S., S. Kim, et al. (2007). "Cell cycle-dependent mitochondrial biogenesis and dynamics in mammalian cells." *Biochem Biophys Res Commun* **357**(1): 111-7.
- Lee, Y. J., S. Y. Jeong, et al. (2004). "Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis." *Mol Biol Cell* **15**(11): 5001-11.
- Legros, F., A. Lombes, et al. (2002). "Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins." *Mol Biol Cell* **13**(12): 4343-54.
- Levine, B. and V. Deretic (2007). "Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* **7**(10): 767-77.
- Li, H., Y. Chen, et al. (2008). "Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons." *PNAS* **105**(6): 2169-2174.
- Li, R., Z. Hodny, et al. (1996). "Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (ANT2) gene." *J Biol Chem* **271**(31): 18925-30.
- Li, R., K. Luciakova, et al. (1996). "Expression of the human cytochrome c1 gene is controlled through multiple Sp1-binding sites and an initiator region." *Eur J Biochem* **241**(2): 649-56.
- Liesa, M., M. Palacin, et al. (2009). "Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease." *Physiol Rev* **89**(3): 799-845.

- Lin, L. and P. Lobel (2001). "Production and characterization of recombinant human CLN2 protein for enzyme-replacement therapy in late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." *Biochem J* **357**(Pt 1): 49-55.
- Liu, C. G., D. E. Sleat, et al. (1998). "Structural organization and sequence of CLN2, the defective gene in classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." *Genomics* **50**(2): 206-12.
- Liu, Z. and R. A. Butow (2006). "Mitochondrial retrograde signaling." *Annu Rev Genet* **40**: 159-85.
- Lloyd-Evans, E. (2008). "Abnormal lysosomal calcium homeostasis in mucopolidosis type IV" *Molecular Genetics and Metabolism* **93**(2): 29-30.
- Lloyd-Evans, E., A. J. Morgan, et al. (2008). "Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium." *Nat Med* **14**(11): 1247-55.
- Lloyd-Evans, E., D. Pelled, et al. (2003). "Glucosylceramide and glucosylsphingosine modulate calcium mobilization from brain microsomes via different mechanisms." *J Biol Chem* **278**(26): 23594-9.
- Lutz, A. K., N. Exner, et al. (2009). "Loss of parkin or PINK1 function increases Drp1-dependent mitochondrial fragmentation." *J Biol Chem* **284**(34): 22938-51.
- Luzio, J. P., P. R. Pryor, et al. (2007). "Lysosomes: fusion and function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(8): 622-32.
- Lyly, A., S. K. Marjawaara, et al. (2008). "Deficiency of the INCL protein Ppt1 results in changes in ectopic F1-ATP synthase and altered cholesterol metabolism." *Hum Mol Genet* **17**(10): 1406-17.
- Madge, L. A., J. H. Li, et al. (2003). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine-initiated cathepsin-dependent apoptosis." *J Biol Chem* **278**(23): 21295-306.
- Marino, G. and C. Lopez-Otin (2004). "Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology." *Cell Mol Life Sci* **61**(12): 1439-54.
- Martinez, L. O., S. Jacquet, et al. (2003). "Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis." *Nature* **421**(6918): 75-9.
- Mates, J. M. (2000). "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology." *Toxicology* **153**(1-3): 83-104.
- May-Panloup, P., M. F. Chretien, et al. (2004). "[Mitochondria and reproduction]." *Med Sci (Paris)* **20**(8-9): 779-83.
- Meikle, P. J., J. J. Hopwood, et al. (1999). "Prevalence of lysosomal storage disorders." *Jama* **281**(3): 249-54.
- Nasr, P., H. I. Gursahani, et al. (2003). "Influence of cytosolic and mitochondrial Ca²⁺, ATP, mitochondrial membrane potential, and calpain activity on the mechanism of neuron death induced by 3-nitropropionic acid." *Neurochem Int* **43**(2): 89-99.
- Naylor, K., E. Ingerman, et al. (2006). "Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division." *J Biol Chem* **281**(4): 2177-83.
- Nelson, D. L. and M. M. Cox (2000). *Lehninger - Principles of biochemistry* W. Publishers.
- Nelson, N. and W. R. Harvey (1999). "Vacuolar and plasma membrane proton-adenosinetriphosphatases." *Physiol Rev* **79**(2): 361-85.
- Ni, X. and C. R. Morales (2006). "The lysosomal trafficking of acid sphingomyelinase is mediated by sortilin and mannose 6-phosphate receptor." *Traffic* **7**(7): 889-902.
- Nisoli, E. and M. O. Carruba (2006). "Nitric oxide and mitochondrial biogenesis." *J Cell Sci* **119**(Pt 14): 2855-62.
- Oji, V. and H. Traupe (2009). "Ichthyosis: clinical manifestations and practical treatment options." *Am J Clin Dermatol* **10**(6): 351-64.

- Ojuka, E. O., T. E. Jones, et al. (2003). "Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle." *Faseb J* **17**(6): 675-81.
- Olichon, A., L. Baricault, et al. (2003). "Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis." *J Biol Chem* **278**(10): 7743-6.
- Olichon, A., G. Elachouri, et al. (2007). "OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis." *Cell Death Differ* **14**(4): 682-92.
- Ongwijitwat, S., H. L. Liang, et al. (2006). "Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs." *Gene* **374**: 39-49.
- Otomo, T., K. Higaki, et al. (2009). "Inhibition of autophagosome formation restores mitochondrial function in mucopolipidosis II and III skin fibroblasts." *Mol Genet Metab* **98**(4): 393-9.
- Pacheco, C. D., R. Kunkel, et al. (2007). "Autophagy in Niemann-Pick C disease is dependent upon Beclin-1 and responsive to lipid trafficking defects." *Hum Mol Genet* **16**(12): 1495-503.
- Page, A. E., K. Fuller, et al. (1993). "Purification and characterization of a tripeptidyl peptidase I from human osteoclastomas: evidence for its role in bone resorption." *Arch Biochem Biophys* **306**(2): 354-9.
- Park, M., J. Farrell, et al. (2009). "Enterostatin alters protein trafficking to inhibit insulin secretion in Beta-TC6 cells." *Peptides* **30**(10): 1866-73.
- Parton, R. G. and K. Simons (2007). "The multiple faces of caveolae." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(3): 185-94.
- Pearce, D. A., T. Ferea, et al. (1999). "Action of BTN1, the yeast orthologue of the gene mutated in Batten disease." *Nat Genet* **22**(1): 55-8.
- Pelled, D., E. Lloyd-Evans, et al. (2003). "Inhibition of calcium uptake via the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in a mouse model of Sandhoff disease and prevention by treatment with N-butyldeoxynojirimycin." *J Biol Chem* **278**(32): 29496-501.
- Peters, T. J., C. Selden, et al. (1976). "Lysosomal disruption in the pathogenesis of hepatic damage in primary and secondary haemochromatosis." *Ciba Found Symp*(51): 317-29.
- Puga, A. C., L. B. Jardim, et al. (2000). "Neuronal ceroid lipofuscinoses: a clinical and morphological study of 17 patients from southern Brazil." *Arq Neuropsiquiatr* **58**(3A): 597-606.
- Puigserver, P., Z. Wu, et al. (1998). "A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis." *Cell* **92**(6): 829-39.
- Reczek, D., M. Schwake, et al. (2007). "LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase." *Cell* **131**(4): 770-83.
- Reddy, A., E. V. Caler, et al. (2001). "Plasma membrane repair is mediated by Ca(2+)-regulated exocytosis of lysosomes." *Cell* **106**(2): 157-69.
- Rockl, K. S., C. A. Witczak, et al. (2008). "Signaling mechanisms in skeletal muscle: acute responses and chronic adaptations to exercise." *IUBMB Life* **60**(3): 145-53.
- Ron, D. and P. Walter (2007). "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response." *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**(7): 519-29.
- Safiulina, D., A. Kaasik, et al. (2004). "Method for in situ detection of the mitochondrial function in neurons." *J Neurosci Methods* **137**(1): 87-95.
- Saftig, P., W. Beertsen, et al. (2008). "LAMP-2: a control step for phagosome and autophagosome maturation." *Autophagy* **4**(4): 510-2.

- Saftig, P. and J. Klumperman (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(9): 623-35.
- Sandebring, A., K. J. Thomas, et al. (2009). "Mitochondrial alterations in PINK1 deficient cells are influenced by calcineurin-dependent dephosphorylation of dynamin-related protein 1." *PLoS One* **4**(5): e5701.
- Sano, R., I. Annunziata, et al. (2009). "GM1-ganglioside accumulation at the mitochondria-associated ER membranes links ER stress to Ca(2+)-dependent mitochondrial apoptosis." *Mol Cell* **36**(3): 500-11.
- Santel, A. and S. Frank (2008). "Shaping mitochondria: The complex posttranslational regulation of the mitochondrial fission protein DRP1." *IUBMB Life* **60**(7): 448-55.
- Santel, A. and M. T. Fuller (2001). "Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin." *J Cell Sci* **114**(Pt 5): 867-74.
- Scarpulla, R. C. (2008). "Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function." *Physiol Rev* **88**(2): 611-38.
- Schiaffino, S., C. Mammucari, et al. (2008). "The role of autophagy in neonatal tissues: just a response to amino acid starvation?" *Autophagy* **4**(5): 727-30.
- Schiffmann, R. (2009). "Fabry disease." *Pharmacol Ther* **122**(1): 65-77.
- Schutz-Geschwender, A. and Y. Zhang (2004). Quantitative, Two-Color Western Blot Detection With Infrared Fluorescence. *Licor Biosciences*.
- Seehafer, S. S. and D. A. Pearce (2006). "You say lipofuscin, we say ceroid: defining autofluorescent storage material." *Neurobiol Aging* **27**(4): 576-88.
- Seelan, R. S. and L. I. Grossman (1997). "Structural organization and promoter analysis of the bovine cytochrome c oxidase subunit VIIc gene. A functional role for YY1." *J Biol Chem* **272**(15): 10175-81.
- Sidransky, E. (2004). "Gaucher disease: complexity in a "simple" disorder." *Mol Genet Metab* **83**(1-2): 6-15.
- Simonaro, C. M., M. D'Angelo, et al. (2008). "Mechanism of glycosaminoglycan-mediated bone and joint disease: implications for the mucopolysaccharidoses and other connective tissue diseases." *Am J Pathol* **172**(1): 112-22.
- Siso, S., C. Navarro, et al. (2004). "Adult onset thalamocerebellar degeneration in dogs associated to neuronal storage of ceroid lipopigment." *Acta Neuropathol* **108**(5): 386-92.
- Sleat, D. E., R. J. Donnelly, et al. (1997). "Association of mutations in a lysosomal protein with classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." *Science* **277**(5333): 1802-5.
- Sleat, D. E., J. A. Wiseman, et al. (2004). "A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis based on targeted disruption of the CLN2 gene results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration." *J Neurosci* **24**(41): 9117-26.
- Smirnova, E., D. L. Shurland, et al. (1998). "A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria." *J Cell Biol* **143**(2): 351-8.
- Sohar, I., L. Lin, et al. (2000). "Enzyme-based diagnosis of classical late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis: comparison of tripeptidyl peptidase I and pepstatin-insensitive protease assays." *Clin Chem* **46**(7): 1005-8.
- Song, Z., H. Chen, et al. (2007). "OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L." *J Cell Biol* **178**(5): 749-55.

- Soriano, F. X., M. Liesa, et al. (2006). "Evidence for a mitochondrial regulatory pathway defined by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1 alpha, estrogen-related receptor-alpha, and mitofusin 2." *Diabetes* **55**(6): 1783-91.
- Sparagna, G. C., K. K. Gunter, et al. (1995). "Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode." *J Biol Chem* **270**(46): 27510-5.
- Storch, J. and Z. Xu (2009). "Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking." *Biochim Biophys Acta* **1791**(7): 671-8.
- Stull, J. T. (2001). "Ca²⁺-dependent cell signaling through calmodulin-activated protein phosphatase and protein kinases minireview series." *J Biol Chem* **276**(4): 2311-2.
- Suen, D. F., K. L. Norris, et al. (2008). "Mitochondrial dynamics and apoptosis." *Genes Dev* **22**(12): 1577-90.
- Szabadkai, G., K. Bianchi, et al. (2006). "Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels." *J Cell Biol* **175**(6): 901-11.
- Szabadkai, G., A. M. Simoni, et al. (2003). "Mitochondrial Ca²⁺ uptake requires sustained Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum." *J Biol Chem* **278**(17): 15153-61.
- Taguchi, N., N. Ishihara, et al. (2007). "Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission." *J Biol Chem* **282**(15): 11521-9.
- Takamura, A., K. Higaki, et al. (2008). "Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis." *Biochem Biophys Res Commun* **367**(3): 616-22.
- Tanaka, T., J. Yamamoto, et al. (2003). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(26): 15924-9.
- Tanaka, Y., G. Guhde, et al. (2000). "Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice." *Nature* **406**(6798): 902-6.
- Taylor, S. W., E. Fahy, et al. (2003). "Characterization of the human heart mitochondrial proteome." *Nat Biotechnol* **21**(3): 281-6.
- Tessitore, A., P. M. M. del, et al. (2004). "GM1-ganglioside-mediated activation of the unfolded protein response causes neuronal death in a neurodegenerative gangliosidosis." *Mol Cell* **15**(5): 753-66.
- Tessitore, A., M. Pirozzi, et al. (2009). "Abnormal autophagy, ubiquitination, inflammation and apoptosis are dependent upon lysosomal storage and are useful biomarkers of mucopolysaccharidosis VI." *Pathogenetics* **2**(1): 4.
- Tian, Y., I. Sohar, et al. (2006). "Determination of the substrate specificity of tripeptidyl-peptidase I using combinatorial peptide libraries and development of improved fluorogenic substrates." *J Biol Chem* **281**(10): 6559-72.
- Tondera, D., F. Czauderna, et al. (2005). "The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells." *J Cell Sci* **118**(Pt 14): 3049-59.
- Tondera, D., A. Santel, et al. (2004). "Knockdown of MTP18, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein, affects mitochondrial morphology and induces apoptosis." *J Biol Chem* **279**(30): 31544-55.
- Trenker, M., R. Malli, et al. (2007). "Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport." *Nat Cell Biol* **9**(4): 445-52.
- Tvrđik, P., S. Kuzela, et al. (1992). "Low translational efficiency of the F1-ATPase beta-subunit mRNA largely accounts for the decreased ATPase content in brown adipose tissue mitochondria." *FEBS Lett* **313**(1): 23-6.
- Twig, G., A. Elorza, et al. (2008). "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." *Embo J* **27**(2): 433-46.
- Vainio, S., I. Bykov, et al. (2005). "Defective insulin receptor activation and altered lipid rafts in Niemann-Pick type C disease hepatocytes." *Biochem J* **391**(Pt 3): 465-72.

- Varki (2009). Bacterial and Viral Infections. Essentials of glycobiology.
- Vellodi, A. (2005). "Lysosomal storage disorders." Br J Haematol **128**(4): 413-31.
- Ventura-Clapier, R., A. Garnier, et al. (2008). "Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1 α ." Cardiovasc Res **79**(2): 208-17.
- Vergani, L., M. Floreani, et al. (2004). "Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines." Eur J Biochem **271**(18): 3646-56.
- Voccoli, V. and L. Colombaioni (2009). "Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts." Brain Res **1252**: 15-29.
- von Ballmoos, C., A. Wiedenmann, et al. (2009). "Essentials for ATP synthesis by F1F0 ATP synthases." Annu Rev Biochem **78**: 649-72.
- Walczysko, P., E. Wagner, et al. (2000). "Use of co-loaded Fluo-3 and Fura Red fluorescent indicators for studying the cytosolic Ca(2+) concentrations distribution in living plant tissue." Cell Calcium **28**(1): 23-32.
- Walkley, S. U., P. A. March, et al. (1995). "Pathogenesis of brain dysfunction in Batten disease." Am J Med Genet **57**(2): 196-203.
- Wang, T., Z. Chen, et al. (2006). "Cholesterol loading increases the translocation of ATP synthase beta chain into membrane caveolae in vascular endothelial cells." Biochim Biophys Acta **1761**(10): 1182-90.
- Wattiaux, R., S. Wattiaux-de Coninck, et al. (2007). "Lysosomes and Fas-mediated liver cell death." Biochem J **403**(1): 89-95.
- Werneburg, N. W., M. E. Guicciardi, et al. (2002). "Tumor necrosis factor- α -associated lysosomal permeabilization is cathepsin B dependent." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **283**(4): G947-56.
- Wieser, W. and G. Krumschnabel (2001). "Hierarchies of ATP-consuming processes: direct compared with indirect measurements, and comparative aspects." Biochem J **355**(Pt 2): 389-95.
- Wilson-Fritch, L., A. Burkart, et al. (2003). "Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone." Mol Cell Biol **23**(3): 1085-94.
- Wisniewski, K. E. (2006). "Neuronal Ceroid-Lipofuscinoses." Gene reviews, from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=ncl>.
- Womac, A. D., J. F. Burkeen, et al. (2009). "Circadian rhythms of extracellular ATP accumulation in suprachiasmatic nucleus cells and cultured astrocytes." Eur J Neurosci **30**(5): 869-76.
- Wraith, J. E., M. Scarpa, et al. (2008). "Mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome): a clinical review and recommendations for treatment in the era of enzyme replacement therapy." Eur J Pediatr **167**(3): 267-77.
- Wu, Z., P. Puigserver, et al. (1999). "Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1." Cell **98**(1): 115-24.
- Yamada, H., P. Martin, et al. (1996). "Impairment of protein kinase C activity in twitcher Schwann cells in vitro." Brain Res **718**(1-2): 138-44.
- Yang, N. C., W. M. Ho, et al. (2002). "A convenient one-step extraction of cellular ATP using boiling water for the luciferin-luciferase assay of ATP." Anal Biochem **306**(2): 323-7.
- Yi, M., D. Weaver, et al. (2004). "Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit." J Cell Biol **167**(4): 661-72.
- Yoon, Y., E. W. Krueger, et al. (2003). "The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1." Mol Cell Biol **23**(15): 5409-20.

- Yoon, Y. S., D. S. Yoon, et al. (2006). "Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1." J Cell Physiol **209**(2): 468-80.
- Yu, W., J. S. Gong, et al. (2005). "Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function." J Biol Chem **280**(12): 11731-9.
- Zhang, T., Y. Maekawa, et al. (2000). "Lysosomal cathepsin B plays an important role in antigen processing, while cathepsin D is involved in degradation of the invariant chain in ovalbumin-immunized mice." Immunology **100**(1): 13-20.
- Zhao, M., U. T. Brunk, et al. (2001). "Delayed oxidant-induced cell death involves activation of phospholipase A2." FEBS Lett **509**(3): 399-404.
- Zhong, N. (2000). "Neuronal ceroid lipofuscinoses and possible pathogenic mechanism." Mol Genet Metab **71**(1-2): 195-206.
- Zhong, N., K. E. Wisniewski, et al. (1998). "Two common mutations in the CLN2 gene underlie late infantile neuronal ceroid lipofuscinosis." Clin Genet **54**(3): 234-8.