



Hétéroplasmie mitochondriale : impact sur les fonctions mitochondriales lors de la différenciation neuronale

Lucie Wilhelm

► To cite this version:

Lucie Wilhelm. Hétéroplasmie mitochondriale : impact sur les fonctions mitochondriales lors de la différenciation neuronale. Sciences pharmaceutiques. 2009. hal-01739169

HAL Id: hal-01739169

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01739169>

Submitted on 20 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ - NANCY 1

2009

FACULTE DE PHARMACIE

HETEROPLASMIE MITOCHONDRIALE :
Impact sur les fonctions mitochondriales lors de la
différenciation neuronale

Présentée et soutenue publiquement

Le 24 septembre 2009

pour obtenir

le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

par **Lucie WILHELM**
née le 12 janvier 1985 à Paris (IV)

Membres du Jury

Président :	M. Bertrand RIHN,	Professeur à la Faculté de Pharmacie de Nancy
Juges :	M. Vincent PROCACCIO,	co-Directeur de Thèse, Professeur (Angers)
	M. Joël COULON,	co-Directeur de Thèse, Maître de Conférences (Nancy)
	M. Philippe LEVY,	Docteur en Pharmacie (Paris)

UNIVERSITE Henri Poincaré - Nancy 1
FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN

Chantal FINANCE

Vice-Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Commission des Relations Internationales

Janine SCHWARTZBROD

Responsable de la Communication

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la Commission Hygiène Sécurité

Laurent DIEZ

Responsable de la filière Officine :

Gérald CATAU

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du CEPH :

(Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier)

Jean-Michel SIMON

Doyen Honoraire : Claude VIGNERON

Professeur Emérite : Gérard SIEST

Professeurs Honoraires

Roger BONALY

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMAN

Michel JACQUE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

François MORTIER

Maurice PIERFITTE

Louis SCHWARTZBROD

Maîtres de Conférences Honoraires

Marie-Claude FUZELLIER

Marie-Andrée IMBS

Marie-Hélène LIVERTOUX

Jean-Louis MONAL

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

Assistante Honoraire

Madame BERTHE

ENSEIGNANTS

PROFESSEURS

Alain ASTIER (en disponibilité)	Pharmacie clinique
Jeffrey ATKINSON	Pharmacologie
Gilles AULAGNER	Pharmacie clinique
Alain BAGREL	Biochimie
Jean-Claude BLOCK	Santé publique
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie cardiovasculaire
Chantal FINANCE	Virologie, Immunologie
Pascale FRIANT-MICHEL	Mathématiques, Physique, Audioprothèse
Marie-Madeleine GALTEAU	Biochimie clinique
Christophe GANTZER	Microbiologie environnementale
Max HENRY	Botanique, Mycologie
Jean-Yves JOUZEAU	Bioanalyse du médicament
Pierre LABRUDE	Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile
Dominique LAURAIN-MATTAR	Pharmacognosie
Isabelle LARTAUD	Pharmacologie
Pierre LEROY	Chimie physique générale
Philippe MAINCENT	Pharmacie galénique
Alain MARSURA	Chimie thérapeutique
Jean-Louis MERLIN	Biologie cellulaire oncologique
Alain NICOLAS	Chimie analytique
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	Biochimie, Biologie moléculaire
Janine SCHWARTZBROD	Bactériologie, Parasitologie
Jean-Michel SIMON	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Claude VIGNERON	Hématologie, Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Monique ALBERT	Bactériologie, Virologie
Sandrine BANAS	Parasitologie
Mariette BEAUD	Biologie cellulaire
Emmanuelle BENOIT	Communication et Santé
Michel BOISBRUN	Chimie thérapeutique
Catherine BOITEUX	Biophysique, Audioprothèse
François BONNEAUX	Chimie thérapeutique
Cédric BOURA	Physiologie
Gérald CATAU	Pharmacologie
Jean-Claude CHEVIN	Chimie générale et minérale
Igor CLAROT	Chimie analytique
Jocelyne COLLOMB	Parasitologie, Organisation animale
Joël COULON	Biochimie
Sébastien DADE	Bio-informatique
Bernard DANGIEN	Botanique, Mycologie
Dominique DECOLIN	Chimie analytique
Béatrice DEMORE	Pharmacie clinique
Joël DUCOURNEAU	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Florence DUMARCAY	Chimie thérapeutique

François DUPUIS.....	Pharmacologie
Raphaël DUVAL.....	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE.....	Hématologie
Luc FERRARI.....	Toxicologie
Stéphane GIBAUD.....	Pharmacie clinique
Françoise HINZELIN.....	Mycologie, Botanique
Thierry HUMBERT.....	Chimie organique
Frédéric JORAND.....	Santé et Environnement
Francine KEDZIEREWICZ.....	Pharmacie galénique
Alexandrine LAMBERT.....	Informatique, Biostatistiques
Brigitte LEININGER-MULLER.....	Biochimie
Stéphanie MARCHAND.....	Chimie physique
Faten MEHRI-SOUSSI.....	Hématologie biologique
Patrick MENU.....	Physiologie
Christophe MERLIN.....	Microbiologie environnementale et moléculaire
Blandine MOREAU.....	Pharmacognosie
Dominique NOTTER.....	Biologie cellulaire
Francine PAULUS.....	Informatique
Christine PERDICAKIS.....	Chimie organique
Caroline PERRIN-SARRADO.....	Pharmacologie
Virginie PICHON.....	Biophysique
Anne SAPIN.....	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER.....	Mycologie, Botanique
Nathalie THILLY.....	Santé publique
Gabriel TROCKLE.....	Pharmacologie
Mohamed ZAIYOU.....	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI.....	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER.....	Sémiologie
-------------------------	------------

PROFESSEUR AGREGÉ

Christophe COCHAUD.....	Anglais
-------------------------	---------

ASSISTANT

Annie PAVIS.....	Bactériologie
------------------	---------------

SERVICE COMMUN DE DOCUMENTATION DE L'UNIVERSITÉ (SCD)

Anne-Pascale PARRET.....	Directeur
Frédérique FERON.....	Responsable de la section Pharmacie- Odontologie

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX
OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES
OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur Bertrand RIHN

**Professeur de Biochimie et Biologie Moléculaire à la Faculté de Pharmacie de
Nancy**

Qui nous a fait l'honneur de bien vouloir présider ce travail et de nous conseiller tout au long de sa réalisation.

Nous avons eu la chance de profiter de ses fins jugements et de ses justes conseils toujours empreints de la plus grande délicatesse.

Nous lui témoignons notre gratitude et notre respect.

A nos juges,

Monsieur le Professeur Vincent PROCACCIO

Professeur de Génétique à la Faculté de Médecine d'Angers

Qui nous a fait l'honneur d'accepter de diriger notre travail de Master et de co-diriger la réalisation de notre Thèse.

Que nous remercions sincèrement de nous avoir fait l'honneur de guider nos premiers pas dans le monde de la Recherche et d'avoir su encourager notre intérêt pour ce domaine.

Que nous admirons pour ses talents de pédagogue au cours de l'encadrement toujours attentif de nos travaux.

En témoignage de notre reconnaissance et de notre respect.

Monsieur le Maître de Conférences Joël COULON

Maître de conférences en Biochimie à la faculté de Pharmacie de Nancy

Que nous remercions vivement d'avoir accepté de co-diriger ce travail malgré toutes les difficultés qui se sont présentées.

Qui a eu la patience de nous initier à la chimie de la vie, si passionnante, et qui a grandement contribué à notre intérêt pour la Biochimie.

En témoignage de notre reconnaissance et de notre respect.

Monsieur le Docteur Philippe LEVY

Docteur en pharmacie

Que nous remercions sincèrement d'avoir accepté de siéger dans notre jury.

Qui a su nous encourager par son enthousiasme pour notre travail de thèse ainsi que dans nos projets personnels.

En témoignage d'affection et de respect.

Nous tenons à remercier les Professeurs Yves MALTHIERY et Pascal REYNIER, pour leur accueil au sein du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire – INSERM U694 dans le cadre de notre Master de Recherche.

Nous remercions le Docteur Marie-Anne POU et le Professeur Vincent PROCACCIO pour leur encadrement, et leurs conseils avisés tout au long de ce travail.

Nous voulons également exprimer notre plus profonde gratitude à Madame Valérie DESQUIRET et Monsieur Arnaud CHEVROLLIER pour tout le temps qu'ils ont bien voulu consacrer à notre travail et notre formation.

Enfin, nous voudrions saluer l'ensemble de l'équipe de recherche du laboratoire, les techniciens, étudiants, pour leurs conseils, leur bonne humeur et leur gentillesse.

*A Papilou, dont j'aime à croire qu'il
partage chaque moment fort de ma vie en
espérant avoir su le rendre fier*

*A Papa, un chapitre s'achève ici, et
comme à tous les grands moments de ma vie je
t'y dédie une place spéciale*

A Maman pour m'avoir guidée et aidée à grandir, mûrir puis encouragée à voler de mes propres ailes, pour m'avoir montré ce qu'est la force de caractère ainsi que l'amour, pour m'avoir appris à reconnaître ce qu'il peut y avoir de meilleur dans chaque chose et chaque situation, pour les millions de fois où tu m'as répété que « la peur n'évite pas le danger » et les milliers d'autres où je l'ai dit à mon tour, parce que tu es mon héroïne et je serais fière qu'on me dise que je te ressemble ne serait-ce qu'un peu.

A Anne-Claire, si la fleur qui s'épanouit dans l'adversité est la plus rare et la plus belle de toutes, à mes yeux tu es cette fleur ; tu as le pouvoir d'ensoleiller la vie des gens autour de toi et tu me donnes chaque jour des raisons d'être fière de t'avoir pour sœur.

A Arthur mon "grand" frère, tous nos rêves peuvent devenir réalité, encore faut-il avoir le courage de les poursuivre. Je quitte la vie étudiante au moment où tu vas y entrer, tu ne manques pas de courage et de talents, tu as le pouvoir de tout réaliser, ne cesse pas de rêver.

A Maminou, notre incroyable grand-mère comment exprimer tout ce que tu m'as offert et appris tant sur la vie que sur moi-même, ton avis et tes conseils me sont précieux quel que soit le domaine.

A Papy et Laurence pour la joie que je ressens à les savoir à mes côtés aujourd'hui et à chaque grande étape de ma vie

A Grande-Mamy, si grande... en mon cœur

A mes oncles et tantes qui ont toujours pris soin de s'intéresser à ma vie personnelle et étudiante et m'ont offert des opportunités fantastiques d'élargir mes horizons et mon esprit. Pour tous les merveilleux moments de mon enfance et de ma jeune vie d'adulte qui n'auraient pas eu lieu sans votre soutien, votre attention et votre amour.

A mes cousins et cousines : Thomas, Renaud, Aymeric, Hannah, et David.

A ma marraine, ma fée, qui apparaît toujours aux bons moments de ma vie et qui a toujours su me soutenir, m'encourager et m'apprendre à relativiser.

A Jean-Pierre « Joli-papa » pour la place très particulière qu'il a su trouver parmi nous, pour m'avoir appris qu'en coupant les oreilles d'un bourricot on en fait pas un cheval de course ...

A toutes celles qui ont toujours été là, les amies de maman qui nous ont vus grandir et ont toujours été attentives à nous comme autant de membres de la famille.

A Marie et ses parents qui ont été ma famille d'accueil dans mes premières années d'étudiante en souvenir de la neige, des litres de glace à la fraise, des cadeaux de Jules le chat et des soirées crêpes.

A toi que j'ai trouvé ...

Aux vrais amis, de 20ans ou de quelques mois qui m'ont suivie, supportée et encouragée et qui, où que j'aille et quoi que je fasse, m'accompagnent dans chacune de mes folies.

Plus particulièrement :

Audrey, ma binôme de choc qui m'a permis de sourire et de rire même dans les situations les plus désespérées, qui n'a (presque) jamais eu honte de moi et que j'admire tant pour sa force et sa joie de vivre

Camille, qui a toujours été là prête à fêter les bons moments comme les mauvais et dont la gentillesse n'a pas de bornes

Lise, sans l'amitié et le soutien de laquelle mon aventure universitaire n'aurait peut être jamais commencé

Coralie, mon lien vers la terre ferme lors de mes plus folles envolées lyriques et qui sait toujours poser un regard calme sur les situations qui me mettent en ébullition

Christophe, qui a toujours été là aussi loin que je me souviens sans jamais manquer à l'appel pour les petits drames et les grands bonheurs

Léonie, ma plus vieille amie, pour nos grands moments de folie et son annonce inoubliable de mes résultats de fin d'études

Sébastien pour nos formidables disputes et notre réelle amitié ainsi qu'Aurélien pour avoir été auprès de moi depuis la première année

Anne et Laure pour leur gentillesse et leur bonne humeur qui n'ont pas faibli pendant ces 6 années, merci au groupe 4.

Florence et Pascal, qui m'ont offert un refuge à Angers, pour m'avoir permis de me sentir à la maison si loin de chez moi et Pierre, mon voisin préféré (malgré ses poissons) parce que le hasard n'existe pas

Mathilde, Mélanie, Mathieu et Nicolas qui ont été des éléments indispensables de l'aboutissement de cette rédaction en souvenir des pique-niques de 15h30, des fous rires et des tartes aux fraises

Aux amis loin d'être virtuels qui m'ont tenu compagnie dans mes folles nuits de rédaction et avec lesquels je planifie régulièrement de nouvelles aventures, pour les conversations improbables, les délires passagers, les nocturnes parisiennes, les déménagements et leur véritable amitié : François-Xavier, Linus, Melissa, Mickael©, Thibaut©.

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici, nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne et personne ne sait pourquoi ! »

Albert Einstein

*« Ne regardez pas en arrière.
Allez de l'avant, pour ouvrir de nouvelles portes, faire de nouvelles choses par curiosité.
La curiosité nous fait découvrir de nouveaux chemins. »*

Walt Disney

« Whatever Works »

Woody Allen

Abréviations

ADH : **A**lcool **D**es**H**ydrogénase

ADNn, mt : **A**cide **D**éoxyribo**N**ucléique **n**ucléaire, **m**itochondrial

ADP : **A**dénoside **D**i **P**hosphate

AMP : **A**dénoside **M**ono **P**hosphate

ARN : **A**cide **R**ibo**N**ucléique

ARNt : **A**cide **R**ibo**N**ucléique de **t**ransfert

ATP : **A**dénoside **T**ri **P**hosphate

BDNF : **B**rain **D**erivated **N**eurotrophic **F**actor

BSA : **B**ovine **S**erum **A**lbumine

CoASH : **A**cétyl**C**oenzyme **A**

DAPI : 4',6' **D**i **A**midino-2-**P**hényl **I**ndole

DEPC : **D**i**E**thyl**P**yro**C**arbonate

DMEM : **D**ulbecco's **M**odified **E**agle's **M**edium

dNTPs : **d**éoxy**N**ucléotides **T**ri**P**hosphates

DTNB : 5,5'-**D**i**T**hiobis(2-**N**itro**B**enzoïque)

EDTA : **A**cide **E**thylène **D**iamine **T**étraacétique

EGTA : **E**thylene-**G**lycol-bis(2-aminoethylether)-**N**,**N**,**N**',**N**'-**T**etra-**A**cetic acid

ERO : **E**spèces **R**éactives de l'**O**xygène

FADH2 : **F**lavine **A**dénine **D**inucléotide **H**ydrogénée

FAM : Carboxyfluorescéine

FCCP : **C**arbonide-**C**yanide-p-(tri**F**luoromethoxy)-**P**henylhydrazone

G6PDH : **G**lucose **6**-**P**hosphate **D**es**H**ydrogénase

IgG : **I**mmunoglobuline **G**

LDH : **L**actate **D**és**H**ydrogénase

MELAS : **M**itochondrial myopathy **E**ncephalopathy, **L**actic **A**cidosis and **S**troke-like episodes

MTT : **M**éthyl **T**hiazole **T**étrazolium

NAD⁺ : **N**icotinamide **A**dénine **D**inucléotide

NADH : **N**icotinamide **A**dénine **D**inucléotide **H**ydrogéné

NADP⁺ : **N**icotinamide **A**dénine **D**inucléotide **P**hosphate

NADPH : **N**icotinamide **A**dénine **D**inucléotide **P**hosphate **H**ydrogéné

nt : **n**ucléotide

pb : **p**aires de **b**ases

PBS : **P**hosphate **B**uffer **S**aline

PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction

PES : **P**henazine **E**thoSulfate

rpm : rotations **p**ar **m**inute

SVF : **S**erum de **V**eau **F**oetal

TMPD : **T**étraméthyl-p-**p**hénylène-**d**iamine

TNB : **T**rin**i**tro**b**enzène

TRIS : **T**ris(hydroxyméthyl)aminométhane

UV : **U**ltra **V**iolet

Table des matières

1. Introduction.....	1
1.1 <u>Généralités sur la mitochondrie.....</u>	4
1.1.1 Structure de la mitochondrie.....	4
1.1.2 Métabolisme respiratoire.....	6
1.1.3 Métabolisme énergétique et équilibre redox.....	10
1.1.4 ADN mitochondrial.....	11
1.2 <u>Syndrome MELAS.....</u>	14
1.2.1 Caractéristiques cliniques.....	14
1.2.2 Caractéristiques génétiques.....	15
1.2.3 Modèle d'étude.....	15
1.3 <u>Lignée cybride SHSY-5Y.....</u>	16
1.3.1 Origines de la lignée parentale.....	16
1.3.2 Construction des cybrides.....	16
1.4 <u>Objectifs du projet.....</u>	19
 2. Matériels et Méthodes.....	 21
2.1 <u>Matériel.....</u>	22
2.2 <u>Culture cellulaire.....</u>	22
2.2.1 Culture des cellules non différenciées.....	22
2.2.2 Culture des cellules différenciées.....	23
2.3 <u>Croissance cellulaire et production de lactate.....</u>	24
2.4 <u>Différenciation et analyse de l'identité neuronale.....</u>	25
2.5 <u>Mesure de l'hétéroplasmie mitochondriale.....</u>	26
2.5.1 Amplification d'une séquence d'ADN : technique de la PCR.....	26
2.5.2 Evaluation du taux d'hétéroplasmie.....	28
2.6 <u>Dosage des quantités de nucléotides pyridiniques (NAD, NADH, NADP, NADPH).....</u>	30
2.6.1 Extraction.....	30
2.6.2 Dosages.....	31
2.7 <u>Mesure d'activités enzymatiques.....</u>	33
2.7.1 Activité aconitase.....	33
2.7.2 Activité fumarase.....	33
2.7.3 Activité citrate synthase.....	34
2.7.4 Activité du complexe IV.....	35

2.8	<u>Oxygraphie</u>	36
2.9	<u>Mesure que la quantité d'ATP</u>	40
2.9.1	Extraction de l'ATP	40
2.9.2	Dosage de l'ATP	40
2.10	<u>Dosage des protéines selon la méthode utilisant l'acide bicinchoninique</u>	41
2.11	<u>Tests statistiques</u>	41
3.	Résultats	42
3.1	<u>Détermination des conditions de culture</u>	43
3.2	<u>Quantification de l'hétéroplasmie</u>	45
3.3	<u>Analyse de la prolifération cellulaire</u>	48
3.4	<u>Métabolisme mitochondrial</u>	49
3.4.1	Lactate et pyruvate	49
3.4.2	Respiration cellulaire	49
3.4.3	Activités enzymatiques	54
3.4.4	Dosage d'ATP	56
3.5	<u>Etude du stress oxydant</u>	58
3.6	<u>Analyse des quantités de nucléotides pyridiniques (NAD, NADH, NADP, NADPH)</u>	60
3.7	<u>Analyse de la différenciation neuronale</u>	63
4.	Discussion	65
4.1	<u>Le métabolisme oxydatif de la lignée hétéroplasmique 70%M est augmenté</u>	67
4.2	<u>Les capacités du métabolisme oxydatif de la lignée homoplasmique mutante 100% M sont diminuées</u>	68
4.3	<u>La prolifération cellulaire augmente en présence de la mutation A3243G de l'ADNmt</u>	70
5.	Conclusion	71
6.	Perspectives	73
	Bibliographie	76

1. Introduction

Le travail exposé dans cette thèse a été effectué à la faveur d'un stage de Master 2 de recherche expérimentale que j'ai effectué au Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (INSERM U694) du 1^{er} janvier au 31 juin 2009 à Angers.

Au cours du cursus que j'ai effectué à la faculté de pharmacie de Nancy j'ai découvert mon intérêt pour la biochimie et j'ai eu envie d'orienter ma formation vers la recherche. C'est dans ce but que j'ai quitté Nancy pour Angers après avoir été acceptée dans un Master qui me semblait le plus adapté à mes vœux intitulé : Biosignalisation cellulaire et moléculaire.

Dans le cadre de ce Master j'ai eu la chance d'effectuer 6 mois de stage dans le Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (INSERM U694) dont les travaux concernent essentiellement les pathologies mitochondriales. Le Professeur Pascal REYNIER, en charge du département de Biochimie Génétique du CHU d'Angers, m'a donné l'occasion de travailler sur ce sujet passionnant regroupant biochimie et génétique sous la direction du Docteur Marie-Anne POU et du Professeur Vincent PROCACCIO.

Les résultats présentés dans cette thèse concernent l'influence d'une mutation de l'ADN mitochondrial sur le métabolisme cellulaire. La mitochondrie est un organe intracellulaire essentiel dans les processus bioénergétiques cellulaires et tissulaires. Un dysfonctionnement mitochondrial va alors avoir comme conséquence une baisse de la production d'énergie, entraînant ainsi l'apparition de symptômes touchant préférentiellement les tissus fortement consommateurs d'énergie comme le cerveau. (*DiMauro, 2004, Wallace, 1999*) Au delà de leur capacité à utiliser les molécules organiques pour synthétiser de l'Adénosine Tri Phosphate (ATP, source principale d'énergie pour la cellule), les mitochondries sont également impliquées dans d'autres mécanismes tels que l'apoptose (mort cellulaire programmée) ainsi que dans la régulation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) impliquées dans le stress oxydant et connues pour leur effet délétère sur la survie cellulaire.

En 1929, le chimiste allemand Karl Lohmann découvrit l'ATP dont la structure fut élucidée quelques années plus tard. En 1948 Sir Alexander Todd (Prix Nobel de Chimie en 1953) réalisa la synthèse de l'ATP. Pendant les années 1939-1941, Fritz Lipmann (prix Nobel de médecine et physiologie en 1953 également) a démontré que la cellule utilise l'ATP comme fournisseur universel de l'énergie contenue dans ses liaisons phosphate qui en sont particulièrement riches.

Les mitochondries constituent ce qu'on a coutume d'appeler « la centrale énergétique » de la cellule. On peut également les considérer comme des organites dans lesquels l'énergie contenue dans les liaisons moléculaires des métabolites provenant des aliments ingérés, est convertie en ATP. L'ATP a un rôle capital puisque son hydrolyse en ADP (Adénosine Di Phosphate) et Pi (Phosphate inorganique) est requise dans un grand nombre de processus cellulaires tels que le transport actif d'ions au travers de la membrane (ATPases), les déplacements des protéines motrices et la polymérisation des filaments d'actine, par exemple. L'ATP a aussi une place essentielle dans la production des autres nucléotides et dans le déroulement de nombreux processus métaboliques. Enfin, l'ATP joue un rôle dans la régulation des cascades de signalisation intracellulaire. Pour chiffrer cette importance, on peut dire que chaque jour un adulte utilise (et recycle) une quantité d'ATP équivalente à 75% de son poids corporel ! On estime que dans les conditions de repos, un tiers du total est utilisé pour le fonctionnement des pompes membranaires comme les Na⁺/K⁺ ATPases. A l'état de repos de l'individu, les organes les plus consommateurs sont le cœur et le foie.

Des mutations génétiques portant sur la mitochondrie induisent des pathologies dites « mitochondriales » touchant principalement les tissus présentant une forte demande énergétique. De telles pathologies mettent en cause un dysfonctionnement biochimique de la mitochondrie en particulier dans le cas du diabète (*Whittaker et al, 2007*) du vieillissement (*Krishnan et al., 2007*), et dans de nombreuses maladies neurodégénératives. Ces pathologies peuvent être associées à des anomalies biochimiques précises relevant pour un certain nombre d'entre elles de mutations affectant l'ADN mitochondrial (ADNmt) dont l'existence a été mise en évidence, en 1963.

En effet, de nombreuses maladies mitochondriales héréditaires sont la conséquence d'une mutation pathogénique de l'ADNmt. Celle-ci peut être associée à une altération du métabolisme mitochondrial, une désorganisation de la chaîne respiratoire (principale source de l'énergie cellulaire située dans la membrane mitochondriale), une production excessive d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO) entraînant le processus apoptotique ou mort programmée des cellules. Parmi ces mutations de l'ADNmt, la mutation A3243G (*Finsterer, 2007*) responsable de 80% des syndromes MELAS est l'une des plus fréquentes dans la population (*Elliott et al., 2008 ; Schaefer et al., 2008*).

Il s'agit d'une mutation de type hétéroplasmique, ceci signifie qu'il y a, dans un même tissu, co-existence de gènes mutés et de gènes normaux. La proportion de mitochondries mutées influence le taux de pathogénicité observé en clinique.

Récemment un nouveau modèle cellulaire issu d'une lignée cancéreuse de neuroblastome SHSY-5Y portant la mutation A3243G à différents niveaux d'hétéroplasmie a été créé dans le laboratoire. Ces lignées pourraient représenter un modèle d'étude de choix pour mieux appréhender les mécanismes moléculaires et biochimiques impliqués dans le syndrome MELAS mais aussi permettre une analyse de l'impact de l'hétéroplasmie sur la physiopathologie cellulaire. Grâce à une caractérisation exhaustive de ces lignées, différentes stratégies de modulation des fonctions mitochondriales pourront par la suite être évaluées in vitro ainsi que les effets thérapeutiques potentiels de molécules candidates agissant sur ces fonctions mitochondriales.

1.1 Généralités sur la mitochondrie

1.1.1 Structure de la mitochondrie

Les mitochondries ont une structure en forme de bâtonnet ou de sphère de 0,5 à 1 μm de diamètre. Leur nombre est variable selon l'activité métabolique. Leur origine semble établie : elle dériveraient de l'endosymbiose d'une bactérie de la classe des α -protéobactéries dans une cellule précurseur.

Ces organites intracytoplasmiques sont limités par deux membranes de propriétés très différentes et dont l'origine n'est pas élucidée. La membrane externe est pauvre en protéines et contient une protéine transmembranaire, la porine, qui permet le passage des ions et des métabolites hydrosolubles de masse molaire $< 10.000 \text{ Da}$. A l'inverse, la membrane interne est très riche en protéines mais elle est quasiment imperméable aux ions et aux métabolites hydrosolubles. Ces substances ne peuvent traverser la membrane qu'à l'aide de protéines membranaires de transport (qu'on appelle "navette") : l'ATP, l'ADP et le P_i sont transportés par ce type de protéines. L'espace entre ces deux membranes s'appelle l'espace intermembranaire.

La zone interne de la mitochondrie (bordée par la membrane interne) s'appelle la matrice. Elle contient les enzymes du cycle de Krebs et la plupart de celles qui catalysent l'oxydation des acides gras. La chaîne respiratoire est localisée dans la membrane interne des mitochondries. Le nombre des crêtes accroît la surface de cette membrane et ainsi chaque mitochondrie contient des milliers d'exemplaires de la chaîne de transport d'électrons. Les crêtes pénètrent dans la matrice. Certaines protéines mitochondriales sont synthétisées par la

mitochondrie, mais la plupart d'entre elles sont codées par le génome nucléaire et importées dans la mitochondrie.

Ce sont des organites semi-autonomes qui possèdent leur propre génome (ADN, gènes), des ribosomes 70S, des ARN, et une trentaine de protéines y sont synthétisées directement. Elles sont particulièrement impliquées dans le métabolisme oxydatif puisqu'elle contiennent la chaîne respiratoire mais également dans le métabolisme glycolytique puisque que le pyruvate issu de la glycolyse est oxydé dans la mitochondrie.

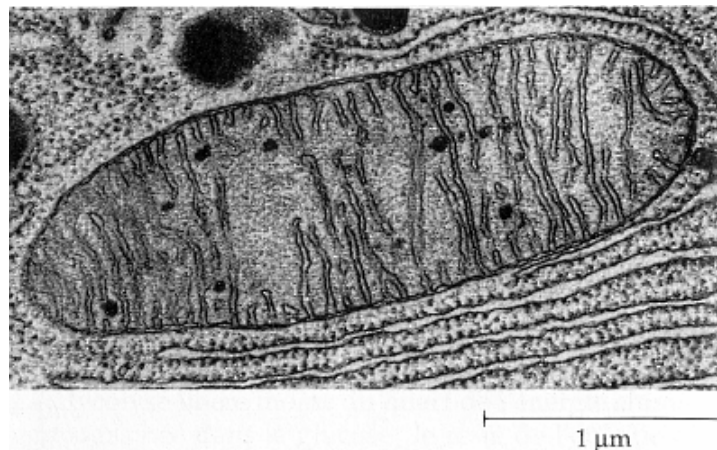
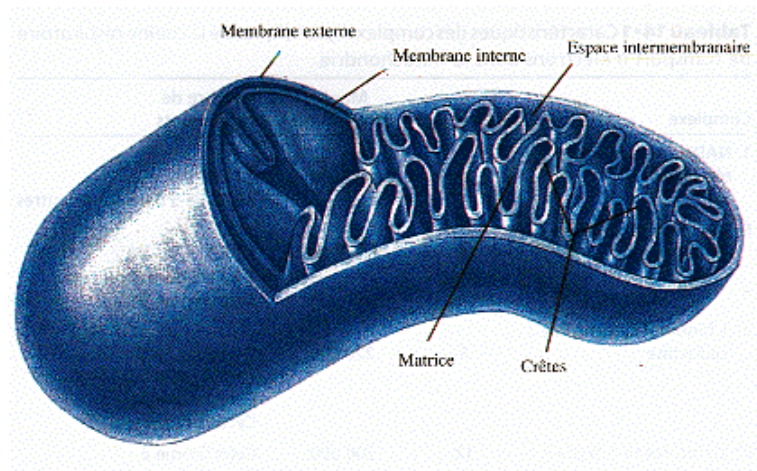


Figure 1 :

Représentation de la structure mitochondriale A : schématique B : en microscopie optique ("*Principes de Biochimie*" Horton, Moran, Ochs, Rawn et Scrimgeour (1994), Ed. DeBoeck Universités)

1.1.2 Métabolisme respiratoire

Les organismes aérobiques synthétisent l'ATP principalement par deux voies, la glycolyse dans le cytosol et la phosphorylation oxydative sur la membrane interne de la mitochondrie chez les eucaryotes. La phosphorylation oxydative représente la source majoritaire d'énergie puisqu'elle fournit dix-sept fois plus d'ATP que la glycolyse pour une même quantité de glucose dégradée.

La synthèse d'ATP par la mitochondrie est donc principalement couplée à la consommation d'oxygène et représente 80% de la consommation d'oxygène au niveau de la mitochondrie. (*Rolfe et Brown, 1997*) De plus, 90% de la consommation d'oxygène de repos (métabolisme de base) chez les mammifères, est d'origine mitochondriale (*Rolfe et Brown, 1997*). Il apparaît donc que la respiration et la synthèse d'ATP au niveau de la mitochondrie sont deux éléments au centre du métabolisme énergétique.

La chaîne respiratoire compte cinq complexes enzymatiques constitués de nombreuses sous-unités protéiques, la plupart enchâssées dans la membrane interne mitochondriale.

Le nombre de sous unités codées soit par l'ADNmt ou l'ADN nucléaire est indiqué dans la figure 2 :

- le complexe I : NADH - ubiquinone oxydoreductase (NUR),
- le complexe II : succinate - ubiquinone oxydoreductase (SUR),
- le complexe III : ubiquinol cytochrome c oxydoreductase (UCCR),
- le complexe IV : cytochrome c oxydase (COX),
- le complexe V : ATP synthase (ATPase).

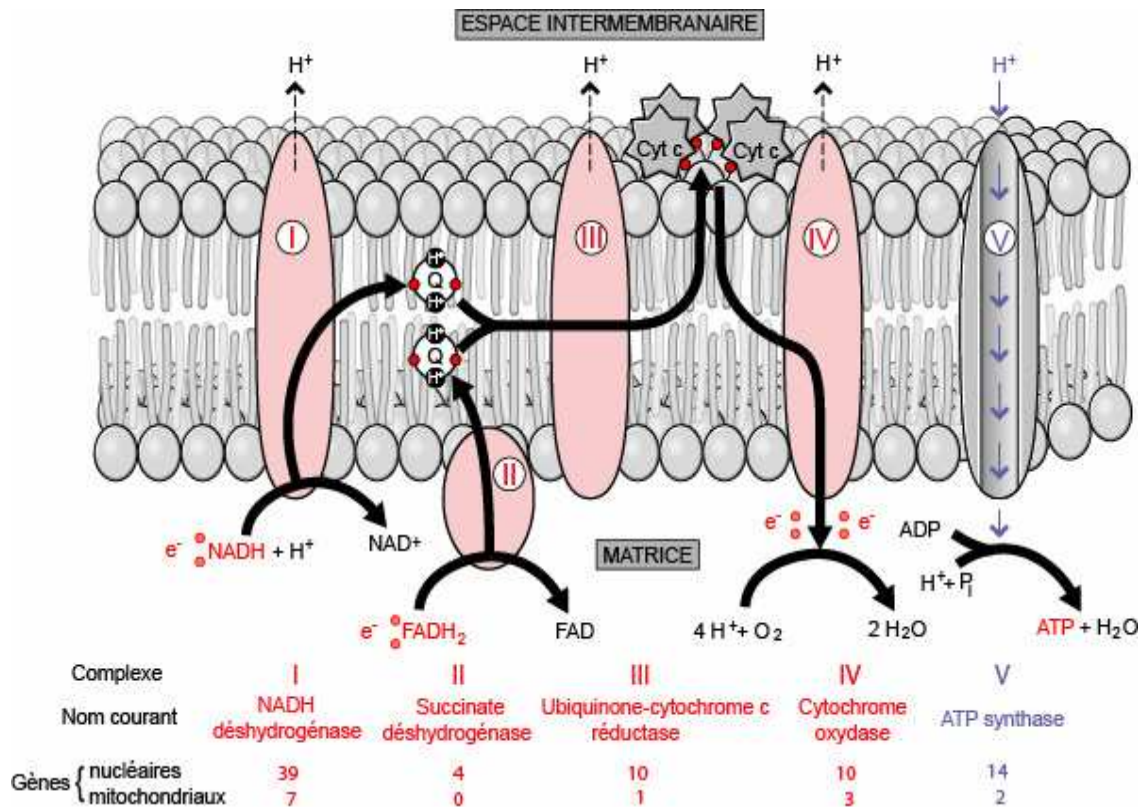


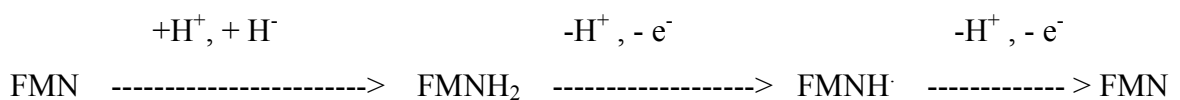
Figure 2 :

Schéma de la chaîne respiratoire (Annales de cours de biologie)

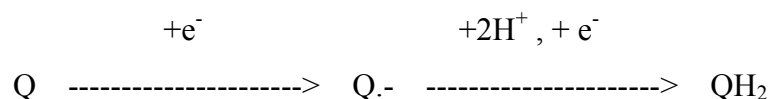
Métabolisme du Glucose <http://herman.denis.club.fr>

le complexe I :

Le $(\text{NADH} + \text{H}^+)$ cède ses électrons par paire (sous forme d'ion hydrure, H^-) alors que le coenzyme Q (ou ubiquinone) les accepte un par un. Le complexe I catalyse la réduction de la FMN ou flavine mononucléotide par le $(\text{NADH} + \text{H}^+)$ selon les étapes suivantes :



La FMN est donc une sorte de "convertisseur" d'un flux bi-électronique en un flux mono-électronique. Elle cède ses électrons à un ensemble de centres Fer - Soufre, accepteurs mono-électroniques, qui eux-même les cèdent au coenzyme Q qui est réduit en passant par un intermédiaire semi-quinone :



Le coenzyme Q est un transporteur mobile de la chaîne respiratoire ; lors du déplacement des électrons au sein du complexe I, celui-ci expulse 3 ou 4 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui crée un gradient de concentration de protons.

le complexe II :

Le complexe II accepte deux électrons du succinate et catalyse la réduction du coenzyme Q en QH₂, le succinate étant transformé en fumarate (c'est l'une des réactions du cycle de Krebs). La réaction met en jeu le FAD, des centres Fe - S et un cytochrome *b*₅₆₀ attaché au complexe II. La variation d'énergie libre de la réaction est faible du fait d'une faible différence de potentiel de réduction entre les donneurs et les accepteurs d'électrons. En conséquence, le complexe II ne contribue pas à l'expulsion de protons

Cependant, le complexe II joue un autre rôle puisque c'est par lui qu'entrent les électrons :

- du FADH₂ issu du cycle de Krebs ;
- porté par le (NADH + H⁺) formé lors de la glycolyse est transféré sous forme de FADH₂ dans la mitochondrie par des systèmes de "navette".

le complexe III

Le complexe III est constitué entre autre d'une protéine Fer - Soufre, d'un cytochrome *b* qui porte les groupes hème *b*₅₆₀ et *b*₅₆₆ et du cytochrome *c*₁. Les électrons sont cédés par le complexe III au cytochrome *c* (attention : différent du cytochrome *c*₁) qui les amène au complexe IV. Le tracé des électrons n'a été résolu que quand un trajet circulaire, appelé cycle Q, fût suggéré par Peter Mitchell puis détaillé entre autres par Bernard Trumpower. Le coenzyme Q et le coenzyme QH₂ diffusent d'une face à l'autre de la membrane mitochondriale interne et l'ensemble des deux hèmes du cytochrome *b* occupe toute l'épaisseur de cette membrane. La variation d'énergie libre liée au parcours des électrons au sein du complexe III est légèrement plus faible que celle générée par le complexe I. Cependant, 2 x 2 protons sont expulsés vers l'espace intermembranaire, le complexe III contribue donc également à la formation du gradient de concentration de protons.

le complexe IV :

Le complexe IV est le dernier de la chaîne de transport d'électrons : il catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire (O_2) en eau (H_2O). Quand les électrons traversent les cytochromes a et a_3 , les atomes de fer et de cuivre des hèmes changent d'état d'oxydation. Le complexe IV contribue à la formation du gradient de concentration de protons en expulsant 2 protons vers l'espace intermembranaire et, du fait de la formation de molécule d'eau, en soustrayant des protons de la matrice.

Le complexe V ou ATP synthase

Le complexe V, appelé ATP synthase F_0F_1 , se sert du gradient de concentration de protons comme source d'énergie pour synthétiser l'ATP. Le sigle "F" désigne un facteur de couplage, selon la nomenclature des enzymes : en effet, l'ATP synthase couple la phosphorylation de l'ADP en ATP à l'oxydation de substrats par la mitochondrie.

- F_1 est l'élément qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP : on l'appelle usuellement l'ATPase F_1 ou ATP hydrolase ;
- F_0 constitue un "tunnel" à protons sur toute l'épaisseur de la membrane interne de la mitochondrie. Il a été baptisé ainsi du fait de sa sensibilité à l'oligomycine, antibiotique qui en se fixant à F_0 empêche la synthèse d'ATP

mécanisme général de la chaîne respiratoire

L'oxydation du NADH ou du $FADH_2$, produits lors du catabolisme des sucres et des acides gras, initie le transfert des électrons de la chaîne respiratoire sur les complexes I et II, respectivement. Ce transfert, incluant deux transporteurs d'électrons mobiles: le coenzyme Q et le cytochrome c, a lieu de manière séquentielle lorsqu'un complexe passe de l'état réduit à un état oxydé. Les électrons des complexes I et II sont ainsi transférés au coenzyme Q (CoQ) puis au complexe III, avant de rejoindre le cytochrome c (cyt c) puis leur accepteur final, l'oxygène moléculaire lequel est réduit en H_2O au niveau du complexe IV.

Au cours de ce transfert d'électrons, les protons sont transloqués dans l'espace intermembranaire à partir des complexes I, III et IV. Leur accumulation permet de générer un

potentiel de membrane compris entre -150 et -180mV. La membrane interne, imperméable aux protons, devient alors chargée positivement sur sa face externe et négativement sur sa face interne. Ceci contribue à créer une force protomotrice qui oriente les protons vers la matrice mitochondriale *via* l'ATP synthase (complexe V) en développant suffisamment d'énergie pour favoriser le couplage réactionnel entre l'oxydation des équivalents réduits (NADH, FADH₂) et la phosphorylation de l'ADP à partir de Phosphate (Pi). Ce couplage est appelé phosphorylation oxydative.

La production d'ATP par la chaîne respiratoire nécessite l'expression coordonnée de deux génomes de la cellule (nucléaire et mitochondrial). La génétique des maladies mitochondriales est complexe en raison de la double origine génétique des protéines mitochondriales. Ainsi, une mutation touchant un gène codant pour des sous unités de la chaîne respiratoire pourra être à l'origine d'un dysfonctionnement mitochondrial.

1.1.3 Métabolisme énergétique et équilibre redox

Les nucléotides pyridiniques (NAD⁺, NADH, NADP⁺, et NADPH) jouent un rôle clé dans la cellule, non seulement comme cofacteurs dans la majorité des réactions d'oxydo réduction, mais aussi comme régulateurs d'un grand nombre de processus cellulaires. Le NAD⁺, présent surtout sous forme oxydée, est essentiel pour la transduction de l'énergie dans les réactions cataboliques, tandis que le NADP⁺, prédominant sous forme réduite, représente le pouvoir réduit majeur dans la plupart des réactions de biosynthèse.

Le NADP(H) est par ailleurs un cofacteur essentiel dans les systèmes de défense oxydatif contre les espèces réactives de l'oxygène. Ces cofacteurs étant donc directement impliqués dans la régulation de l'état redox des cellules, les rapports NAD⁺/NADH et NADPH/NADP⁺ rendent compte du statut redox des cellules (*Beladov and Simon, 2004*).

De plus, le NAD⁺, le NAD(P)⁺ et leurs dérivés servent de molécules substrats dans de nombreuses réactions de modifications covalentes des protéines (*Zhang et al., 2002*), impliquées le vieillissement cellulaire (*Denu, 2005*) et dans les morts cellulaires programmées (*Magni G et al., 2004*). Ainsi, en influençant les rapports intracellulaires NAD/NADH et NADPH/NADP, des modifications des teneurs en nucléotides pyridiniques ont été corrélées à des dommages cellulaires irréversibles aboutissant à différentes pathologies telles les diabètes et les cancers (*Lin et Guarente, 2003*).

1.1.4 ADN mitochondrial

Les mitochondries ont leur propre information génétique : l'ADN mitochondrial (ADNmt).

Le génome mitochondrial humain est composé de 16 569 paires de bases, il est circulaire, bicaténaire, non associé à des histones et ne possède aucun intron contrairement à l'ADN nucléaire (ADNn). L'ADNmt représente 1% environ de l'ADN cellulaire total. Ceci correspond à la présence de 2 à 10 copies d'ADN par mitochondrie. L'ADN mitochondrial est codant sur toute sa longueur, à l'exception d'une région appelée boucle D de 1000 pb environ, contenant l'origine de réplication de la chaîne lourde ainsi que les promoteurs de transcription des brins lourd et léger, et d'une région plus courte, présentant l'origine de réplication de la chaîne légère. Le brin lourd code 14 ARN de transfert, les 2 ARN ribosomiaux et 12 protéines. Le brin léger code les 8 ARN de transfert restant et une sous unité du complexe I.

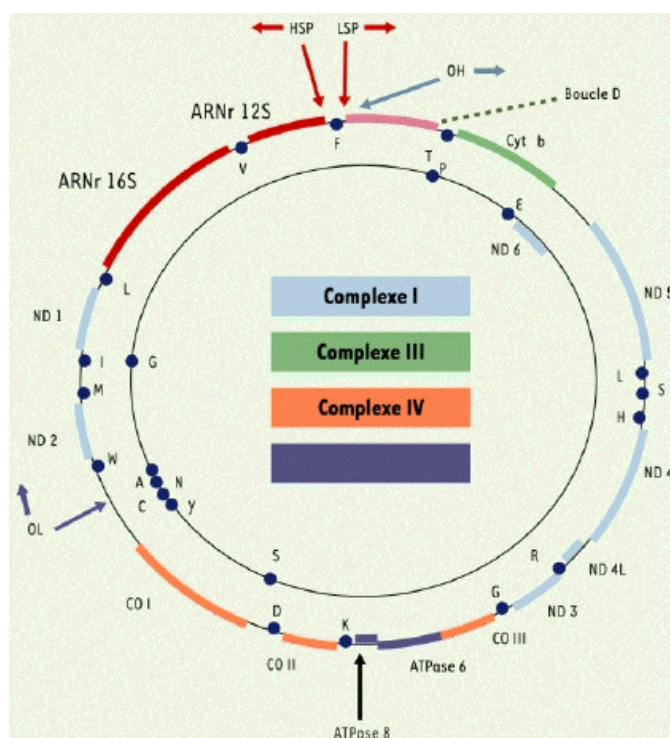


Figure 3 :

Représentation de l'ADN mitochondrial

22 gènes d'ARN de transfert nécessaires à l'expression de l'ADNmt (représentés par les points) et 13 gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire. ND : NADH-déshydrogénase ; Cytb : cytochrome b (ubiquinone-cytochrome c-réductase) ; CO : cytochrome c-oxydase ; ATPase : ATP-synthase. La boucle D est une région de contrôle de la réplication et de la transcription qui comporte deux promoteurs de transcription (HSP et LSP) et une origine de réplication (OH). *May-Panloup et al. (2004)*

Les mitochondries d'un individu sont quasi-exclusivement d'origine maternelle. En effet, lors de la fécondation le capital mitochondrial de la cellule œuf est constitué des mitochondries présentes dans les deux gamètes, or le gamète mâle ne comporte que très peu de mitochondries contrairement au gamète femelle qui possède un cytoplasme plus important. Cette transmission maternelle rend compte de la génétique particulière rencontrée pour les maladies dites mitochondriales (*Wallace et al., 2007*). Les cellules humaines possèdent plusieurs centaines à plusieurs milliers de mitochondries et chaque mitochondrie présente 2 à 10 copies d'ADNmt. Lors des divisions cellulaires, la répartition du capital mitochondrial s'effectue de manière aléatoire. Au sein d'une même cellule, plusieurs ADNmt différents peuvent coexister (phénomène d'hétéroplasmie) (Figure 4). L'expression phénotypique au niveau cellulaire va dépendre en grande partie des proportions d'ADN normal et d'ADN muté. En effet, en fonction du pourcentage d'ADN muté, il y aura une diminution variable des capacités de la chaîne respiratoire à générer de l'ATP mais aussi une augmentation du stress oxydatif mitochondrial entraînant secondairement des phénomènes d'apoptose mitochondriale.

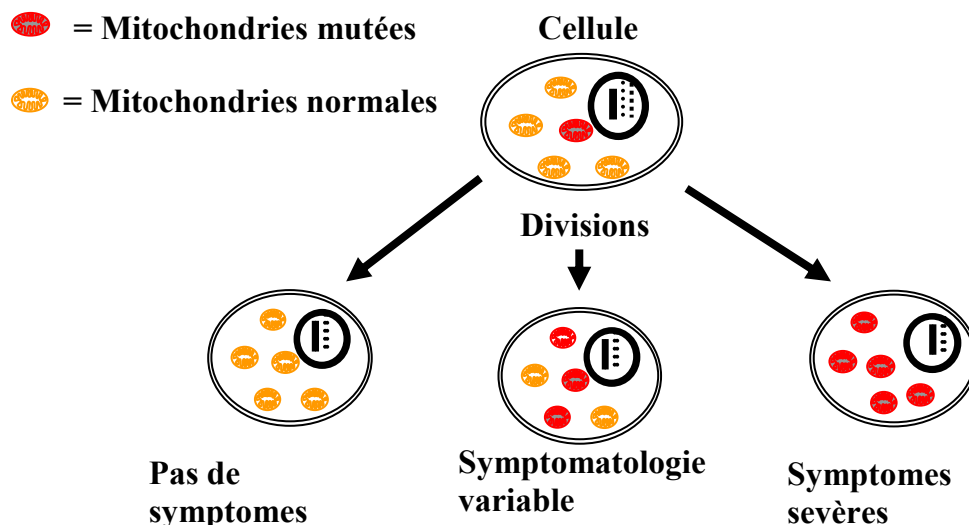


Figure 4 :

Ségrégation mitochondriale stochastique lors des divisions cellulaires. La symptomatologie et les effets cellulaires vont donc dépendre du taux d'hétéroplasmie mitochondriale

La répartition aléatoire des mitochondries lors de la division cellulaire permet d'obtenir différents profils cellulaires à partir d'une cellule hétéroplasmique pour une mutation mitochondriale. Des cellules homoplasmiques ne présentant que l'ADNmt sauvage (non muté) chez lesquelles on n'observe aucun symptôme, des cellules homoplasmiques ne présentant que des mitochondries portant la mutation et entraînant une clinique sévère ainsi que des cellules hétéroplasmique provoquant une clinique dépendant du taux de présence de la mutation.

Les maladies mitochondriales ont été associées avec un large spectre de symptômes appartenant aux maladies neurodégénératives incluant désordres du mouvement, cécité, surdité, épilepsie, accidents vasculaires, diabète et autres pathologies. De plus, un dysfonctionnement mitochondrial représente un élément clé dans les phénomènes dus au vieillissement ou pour les maladies liées à l'âge.

Chez l'homme, les maladies mitochondriales représentent le groupe le plus important des maladies métaboliques. Plus de 200 mutations touchant les gènes de l'ADNmt ont été rapportées à ce jour (<http://www.mitomap.org/>). Cependant une mutation dans un gène codé par l'ADNmt n'est pas nécessairement représentée sur toutes les copies. Il y a en général co-existence de gènes mutés et de gènes normaux, dans le même tissu, dans la même cellule voire dans la même mitochondrie. Cette propriété connue sous le nom d'**hétéroplasmie** de l'ADNmt joue un rôle important dans l'expression des mutations mitochondriales. (*Wallace et al., 2007*) Ce taux n'est pas nécessairement le même d'une cellule à l'autre, et encore moins d'un tissu à l'autre ou entre les membres d'une même famille.

1.2 Syndrome MELAS

1.2.1 Caractéristiques cliniques

La mutation A3243G est responsable de différentes cliniques qui varient en fonction du degré d'hétéroplasmie (*Sproule and Kaufmann, 2008*), et du type du tissu atteint.

Ainsi, il est possible d'observer un diabète le plus souvent associé à une surdité (la mutation est à l'origine de 1 à 2% des diabètes de type 2), une myopathie associée à une intolérance à l'effort et dans les cas plus graves, un syndrome MELAS (Myopathie Encephalopathie Acidose Lactique et « Stroke Like » pseudo accidents vasculaires) (*Goto et al., 1991 ; Van Eijsden et al., 2008*).

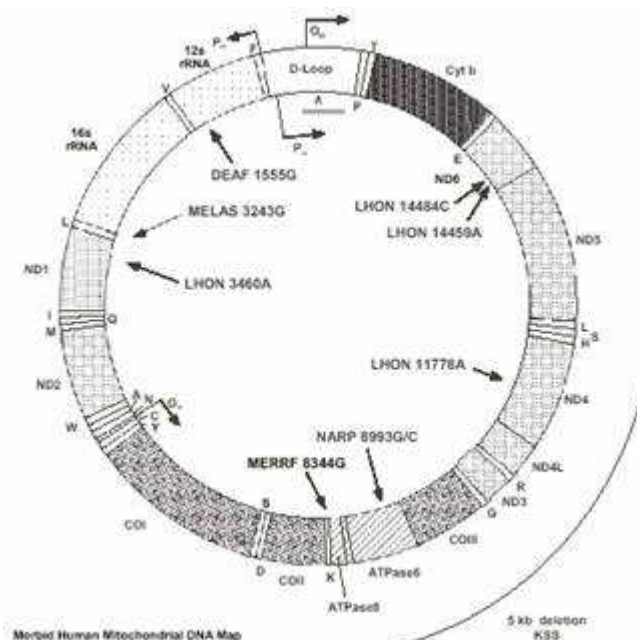


Figure 5 :

Localisation des mutations de l'ADN mitochondrial les plus fréquentes.

La maladie débute le plus souvent dans l'enfance ou chez de jeunes adultes. Les épisodes déclenchés par une infection ou un effort physique, associent céphalées, vomissements et parfois des signes évoquant un accident vasculaire. Il existe souvent des symptômes chroniques comme une myocardiopathie (*Moraes et al., 1992*), une surdité, un diabète (*Meas et al., 2009*), une petite taille, une faiblesse musculaire, un retard mental, des troubles de l'apprentissage, de la mémoire ou de l'attention. Le pronostic du syndrome de

MELAS est sévère. Chacun des épisodes peut entraîner le décès du patient. De plus, les épisodes ont un effet cumulatif qui aboutit à une détérioration mentale graduelle, allant jusqu'à la démence, la perte de la vision et de l'audition (*Wallace et al., 2007*).

1.2.2 Caractéristiques génétiques

Le syndrome de MELAS est communément associé à la présence d'une mutation commune hétéroplasmique de l'ADNmt en position 3243 (Figure 3) avec le remplacement d'une adénine par une guanine qui altère la boucle dihydro-uridine au niveau de l'ARNt de la leucine. Au moins 10 mutations différentes ont été identifiées mais la grande majorité des patients (80%) sont porteurs de la mutation A3243G.

Parmi les variants de l'ADNmt, cette mutation A3243G est l'une des plus communes. D'après des études récentes menées sur 3000 échantillons de sang de cordon ombilical de nouveaux nés, une mutation mitochondriale est détectée dans 1/200 nouveaux nés; et dans 33% des cas, cette mutation correspond plus particulièrement à la mutation A3243G (*Elliott et al., 2008, Schaefer et al., 2008*).

1.2.3 Modèles d'étude

Il n'existe, à ce jour, aucun modèle animal permettant d'étudier le syndrome MELAS. Le modèle cellulaire « cybride » 143B issu de cellules d'ostéosarcome (*King and Attardi, 1989*) est couramment utilisé pour analyser la pathogénicité des variants de l'ADNmt et aussi d'étudier l'impact de ces mutations. Une lignée cybride est issue de la transformation d'une cellule hôte appelée rho0 dépourvue de toutes ses mitochondries par la fusion avec des cytoplastes de cellules énuclées au préalable contenant des mitochondries dont l'ADNmt porte la mutation à analyser (*King and Attardi, 1989*). Dans le travail publié par *Pallotti et al. (2004)* les auteurs ont également entrepris d'utiliser des cybrides 143B comprenant la mutation A3243G et d'analyser les conséquences sur la chaîne respiratoire (consommation d'oxygène, synthèse d'ATP).

1.3 Lignée cybride SHSY-5Y

1.3.1 Origines de la lignée parentale

La lignée SHSY-5Y est initialement issue de la lignée SK-N-SH originaire d'une biopsie d'un patient atteint de neuroblastome (*Biedler et al., 1973 ; Encinas et al., 2000*). Les cellules issues de cette lignée primaire ont développé deux phénotypes distincts de morphologie et de caractéristiques biochimiques différents : neuroblastique (type N) et adhérent au substrat (type S) (*Ross et al., 1983*).

Les cellules de phénotype neuroblastiques ont été retenues pour fabriquer les cybrides transmittochondriaux qui ont servi de modèle dans ce travail.

La lignée SHSY-5Y a déjà été utilisée comme modèle pour l'étude de maladies neurodégénératives (*Gegg et al., 2009*). Ce modèle cellulaire issu de la transformation de cellules de neuroblastome (SHSY-5Y) dépourvues de leurs ADNmt et complémentées par des cytoplastes contenant des mitochondries mutées a été utilisé pour analyser l'impact de la génétique mitochondriale sur des pathologies neurodégénératives de type Alzheimer (*Miller et al., 1996*).

1.3.2 Construction des cybrides

Récemment une lignée de cybrides (hybrides cellulaires) SHSY-5Y portant la mutation A3243G a été créée dans le laboratoire. Issues de la fusion entre des cellules immortalisées d'origine neuronale et des cytoplastes contenant des mitochondries portant la mutation A3243G. Ces cybrides conservent l'information nucléaire de la cellule hôte et ont la particularité d'exprimer la mutation mitochondriale A3243G (Figure 4). En outre cette lignée cellulaire a la capacité de différenciation en cellules de type neuronal et offrent ainsi un modèle d'étude appropriée à l'étude d'une pathologie neurodégénérative.

En fonction de la proportion de mitochondries mutées intégrées on obtient alors des cybrides transmittochondriaux de différents taux d'hétéroplasmie.

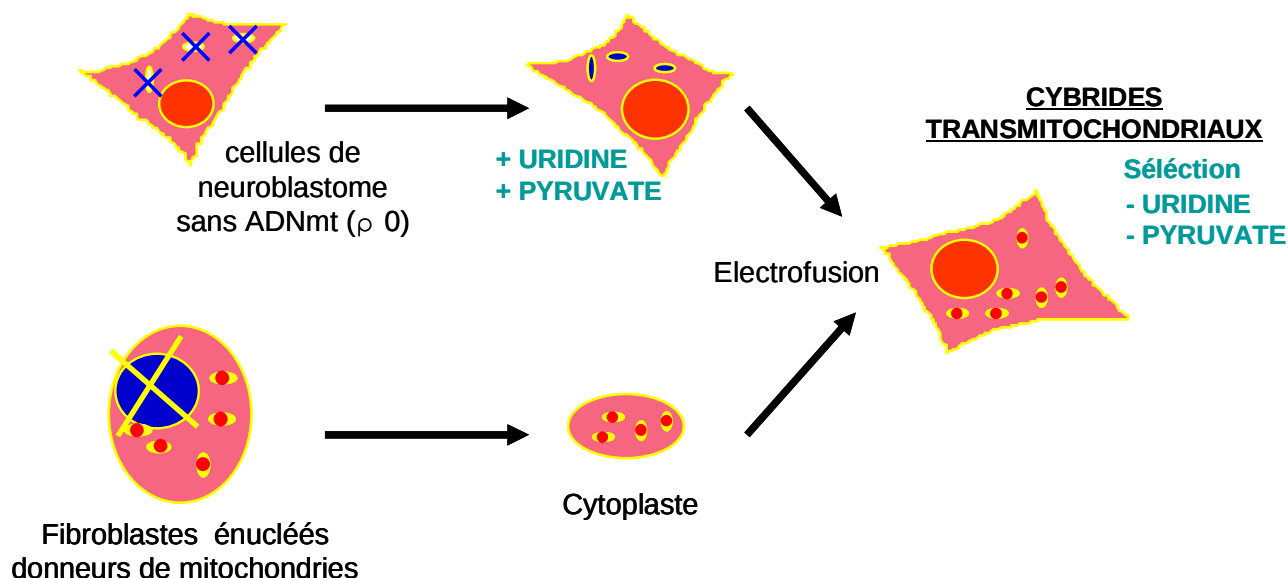


Figure 6 :

Création de la lignée de cybrides transmittochondriaux SHSY5Y portant la mutation mitochondriale A3243G

La lignée SHSY-5Y a été traitée par la rhodamine 6G (R-6G), qui par accumulation sélective intramitochondriale induit leur élimination. Ces cellules appelées ρ 0 sont ainsi dépourvues de leurs mitochondries. La perte de fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale est fatale à la cellule qui deviennent auxotrophes vis-à-vis du pyruvate et de l'uridine afin de pouvoir survivre.

Des cytoplastes contenant des mitochondries présentant la mutation A3243G ont été obtenus à partir de fibroblastes d'un patient porteur de la mutation A3243G, préalablement énucléés afin de ne transmettre que leur information génétique mitochondriale. Les mitochondries mutées ont été incorporées aux cellules ρ 0 par fusion chimique ou électrofusion.

Les cellules ayant internalisées les mitochondries avec succès, sont alors capables de survivre dans un milieu sans uridine ni pyruvate ; ceci permet de sélectionner les cybrides transmitochondriaux. Les cybrides ainsi obtenus portent donc la mutation d'intérêt et conservent le type neuronal (*Gimenez Cassina et al., 2006*) ce qui en fait un modèle d'étude privilégié pour les maladies neurodégénératives (*Jämsä et al., 2004*).

A la suite de cette opération on a obtenu des cybrides de différents taux d'hétéroplasmie en fonction de la proportion de mitochondries mutées et sauvages intégrées à la cellule hôte. Ces cellules ont été clonées séparément et leur taux d'hétéroplasmie a été évalué. Pour ce travail nous avons retenu les cellules parentales ainsi que les cybrides présentant 100% et 70% de mutation.

1.4 Objectifs du projet

L'objectif de mon stage de M2, a été d'étudier les effets de l'hétéroplasmie de l'ADNmt sur la division et la différenciation cellulaire d'une part, sur le métabolisme énergétique d'autre part. Pour cela j'ai travaillé à partir de cybrides SHSY-5Y présentant différents taux de la mutation A3243G: 70%M et 100%M, correspondant respectivement à des cellules hétéroplasmiques et homoplasmiques. Ces cybrides mutantes ont systématiquement été comparées aux cellules SHSY-5Y parentales ne présentant pas la mutation. Les conditions de culture ont été optimisées pour les différentes lignées de cybrides. L'identité neuronale des lignées cybrides a été vérifiée d'un point de vue morphologique et immunohistochimique avec l'expression de caractéristiques de cellules neuronales. L'étude de la croissance et de la différenciation a été réalisée. Puis, à partir des lignées cellulaires différenciées et non différenciées l'analyse du métabolisme énergétique a été effectuée avec les différents paramètres de la chaîne respiratoire mitochondriale incluant les cofacteurs pyridiniques (NAD⁺, NADH, NADP⁺ et NADPH).

Métabolisme énergétique

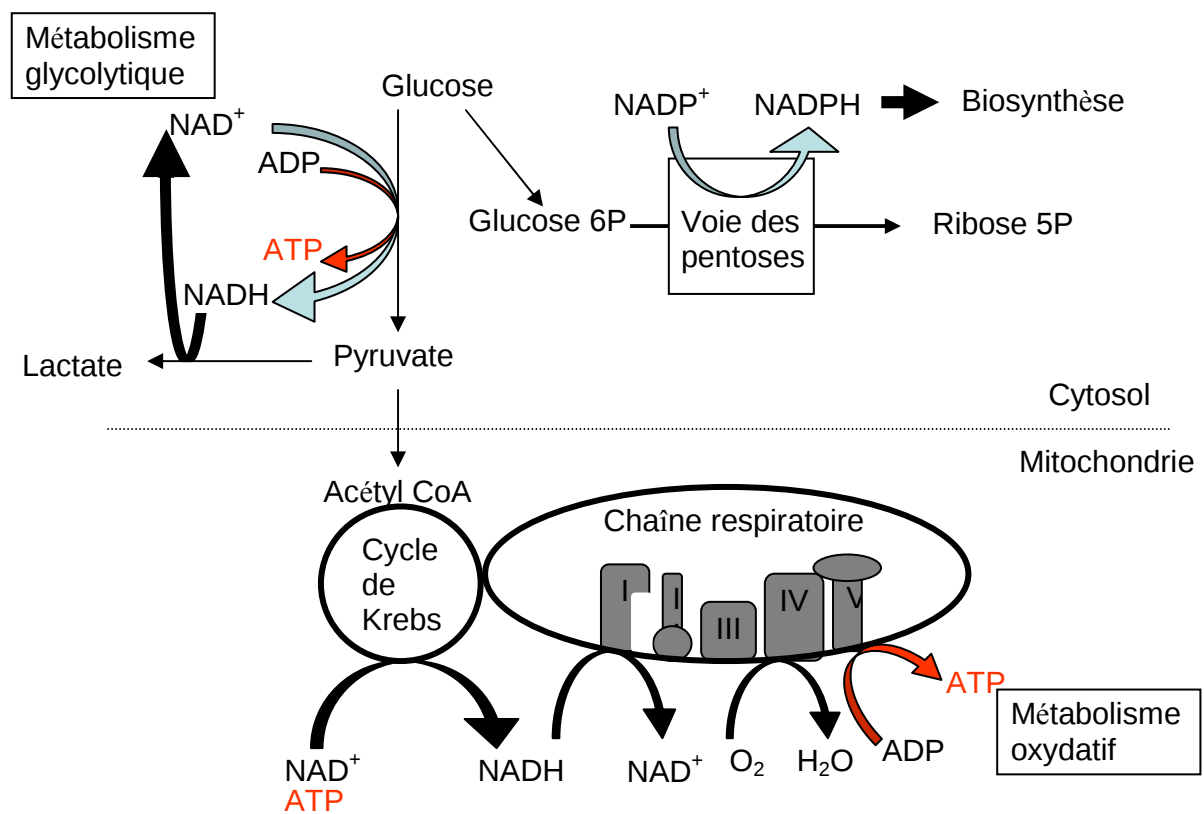


Figure 7 :

Schéma récapitulatif des paramètres étudiés.

2. Matériels et Méthodes

2.1 Matériel

Les milieux de culture, le sérum de veau fœtal, la glutamine et les antibiotiques proviennent de PAA (France). Les réactifs pour les dosages de complexes, l'oxygraphie et les cofacteurs ont été commandés chez Sigma-Aldrich (France).

2.2 Culture cellulaire

Les cellules SHSY-5Y des différentes lignées (parentales, 70%M et 100%M) ont été cultivées dans des flasques de culture stériles et mises à l'étuve à 37°C avec 5% de CO₂, le milieu de culture a été changé tous les deux jours. Les cultures cellulaires ont été menées de deux façons différentes en fonction de leur stade de différenciation.

2.2.1 Culture des cellules non différenciées

Les conditions de culture optimales permettant une croissance correcte pour chaque lignée cellulaire ont été recherchées et mises en place (Tableau 1).

Tableau 1 : conditions optimales de culture cellulaire des différentes lignées

	Parental	70 %M	100% M
Concentration en glucose dans le milieu DMEM	4,5 g/L	0,5 g/L	4,5 g/L
Sérum de Veau Fœtal (SVF)	10%	10%	10%
Uridine 100 µg/mL	-	-	+
Pyruvate 100 µg/mL	-	-	+

NB : les milieux de culture ont tous été additionnés de 2 mM de glutamine et d'un cocktail d'antibiotiques (streptomycine 2 mM, pénicilline G 100 U/mL et amphotéricine B 0,25 µg/mL).

Les cellules 70% M ont été cultivées dans un milieu DMEM contenant 0,5 g/L de glucose afin de limiter la dérive de leur taux d'hétéroplasmie au fur et à mesure des passages. Le milieu de culture des cellules 100% M a été supplémenté en uridine et pyruvate 100µg/mL afin de compenser le déficit de la chaîne respiratoire des cellules mutées.

Pour que les analyses du métabolisme cellulaire soient effectuées à partir de cellules issues de conditions de culture similaires, toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans un milieu de culture similaire : DMEM 4,5 g/L de glucose, 10% de SVF et 100 µg/mL

d'uridine avec 2mM de glutamine, 2mM de streptomycine, 100 U/mL de pénicilline G et 0,25 µg/mL d'amphotéricine B.

Les cellules non différenciées ont été récoltées en phase exponentielle de croissance pour effectuer les différentes analyses.

2.2.2 Culture des cellules différenciées

Un million de cellules ont étéensemencées dans des flasques de culture traitées au collagène I afin d'obtenir une meilleure adhésion des cellules une fois différenciées. Les cellules sont cultivées 2 à 3 jours dans le milieu non différencié avant d'entamer le protocole de différenciation neuronale qui s'effectue de la manière suivante : les cellules sont tout d'abord cultivées pendant 5 jours dans un milieu DMEM 4,5 g/L de glucose avec 5% de SVF, 100 µg/ml d'uridine, 2 mM de glutamine supplémenté en acide rétinoïque (10 µM). Ce dernier a pour rôle d'activer la différenciation neuronale en inhibant la voie Wnt/beta caténine. Le milieu est ensuite remplacé par du DMEM/F12 additionné de 5 % de SVF, 100 µg/ml d'uridine, 2 mM de glutamine et 50 ng/ml de BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) facteur de croissance neuronal.

2.3 Croissance cellulaire et production de lactate

Afin d'étudier la croissance cellulaire, les cellules des différentes lignées (parentales, 70%M et 100%M) ont étéensemencées en duplicat et de façon homogène pour chaque jour de croissance.

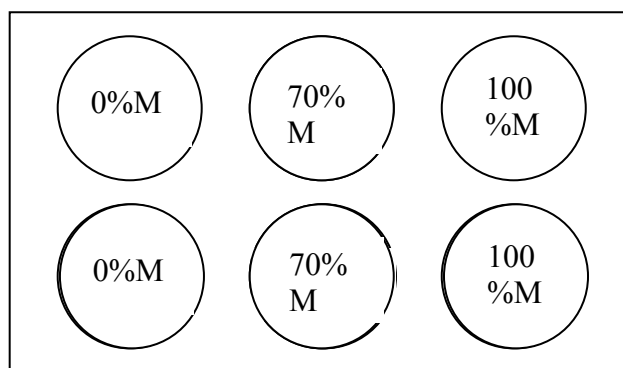


Figure 8 :

Ensemencement d'une plaque « six puits » (une plaque par jour de croissance)

Chaque jour, à heure fixe, les cellules de chaque lignée ont été trypsinées et comptées en triplicat (compteur automatique, Beckman Coulter). De plus, une fraction du milieu de culture de chaque lignée a été conservée pour le dosage de la concentration en lactate et en pyruvate.

La concentration en lactate du milieu a été déterminée par spectrophotométrie à l'aide d'un kit enzymatique (Boehringer) sur un appareil Hitachi-Roche (Roche Diagnostics GmbH). La décroissance de la quantité de NADH en présence de lactate deshydrogénase mesurée à une longueur d'onde de 340 nm a permis de calculer la concentration de pyruvate du milieu. (*Ichai et al., 2000*)

La mesure de la production de lactate et de pyruvate a été normalisée par la quantité de protéines dosée selon la méthode de *Lowry et al. (1951)*.

2.4 Différenciation et analyse morphologique et immunocytochimique de l'identité neuronale

Des cellules à 0% et 100% de mutation ont été mises en culture sur des lames de verres placées au fond des puits d'une plaque 6 puits. Les cellules ont été différenciées, puis un marquage immunohistochimique a été effectué avec un anticorps dirigé contre un isotype de la tubuline ($\beta 3$) présenté comme marqueur spécifique des cellules neuronales (*Dráberová et al., 1998*). Un marquage au DAPI a également été effectué afin d'observer le noyau des cellules.

La différenciation des cellules SHSY-5Y en cellules de type neuronal peut donc être confirmée sur les plans morphologique (présence de dendrites) et par immunohistochimie (hybridation avec l'anticorps) par ces observations en microscopie à épifluorescence.

Lorsque les cellules atteignent 70% à 80% de confluence, les lamelles sont collectées dans les puits de culture et sont lavées dans du PBS 1x à 37°C pendant 2 min puis fixées à l'aide de paraformaldéhyde 4% (15 min) et rinçage en PBS 1x trois fois.

Elles sont ensuite perméabilisées à l'aide d'un traitement de tampon phosphate/Triton x100, lavées en PBS (tampon salin phosphate) et mise à saturation dans de la BSA (Serum Albumine Bovine) 5% (10 min) avant l'incubation avec l'anticorps primaire murin anti- $\beta 3$ tubuline (Santa Cruz Biotechnology, dilution : 1/400) toute la nuit à 4°C.

Les lamelles sont rincées deux fois au PBS et sont incubées avec l'anticorps secondaire : IgG de lapin dirigé contre la souris (Invitrogen, dilution : 1/400, couplé à l'alexa Fluo 488) 1h à température ambiante. Les lamelles sont ensuite rincées à nouveau et incubées avec du DAPI (1mM dilution : 1/300) afin de permettre l'observation du noyau par fluorescence. Le montage est ensuite effectué sur lame de verre et conservé à 4°C jusqu'à l'observation en microscopie.

Ce protocole utilisé en routine au laboratoire a été adapté à l'étude de ces cellules.

2.5 Mesure de l'hétéroplasmie mitochondriale (Sarzi et al., 2007 ; Attardi et al., 1995)

L'extraction d'ADN a été réalisée sur culot cellulaire (un million de cellules) par la méthode de rétention sur billes magnétiques (EZ1 Biorobot, Qiagen).

2.5.1 Amplification d'une séquence d'ADN : technique de la PCR

L'objectif de la Polymérase Chain Réaction (PCR) est d'amplifier in vitro de l'ADN en tirant parti du mode normal de synthèse de l'ADN in vivo.

La synthèse de l'ADN se fait toujours à partir d'une amorce (primer). Cette amorce est une courte chaîne nucléotidique nécessaire à l'accrochage de la polymérase. Donc le choix d'un couple d'amorces va déterminer les extrémités de la séquence synthétisée.

Puis chaque brin de l'ADN sert de matrice pour la synthèse du brin complémentaire

Un cycle de synthèse comprend :

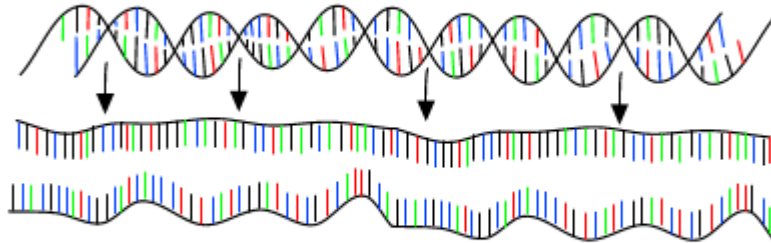
- **la dénaturation** : On chauffe le tube quelques secondes, à 94°C, afin de dénaturer l'ADN, c'est-à-dire que les doubles brins d'ADN se séparent.
- **l'hybridation** : On abaisse rapidement la température à 55°C, pour que les amorces puissent s'hybrider à leur séquence complémentaire, sur les brins d'ADN cibles. Cette étape dure une minute.
- **l'élongation** : synthèse des brins à partir des amorces hybridées. La température du tube est augmentée à 72°C, ainsi la Taq polymérase devient fonctionnelle : la polymérisation se poursuit dans le sens 5'-3', à partir des amorces hybridées. Cette étape dure une minute.

On répète le processus ; après 20 cycles on obtient 10^6 fois le nombre d'exemplaires du fragment désiré !

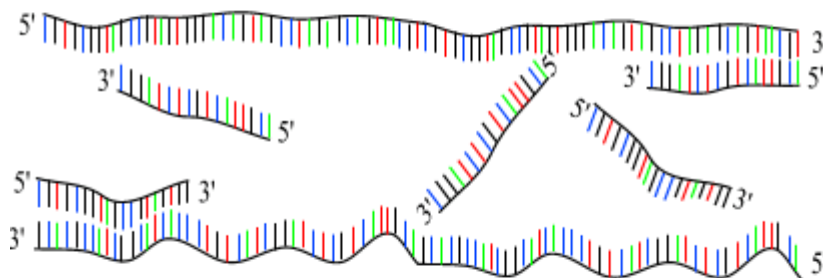
Tout se fait dans un seul tube ; seule la température varie.

Réaction en chaîne par polymérase

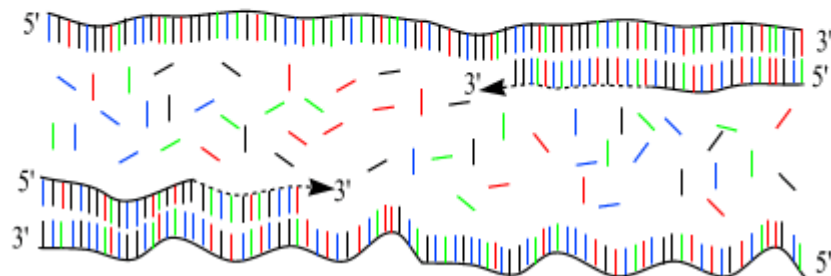
Étape 1 : dénaturation



Étape 2 : hybridation



Étape 3 : synthèse d'ADN



Adapté de Andy Vierstraete (<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcrsteps.gif>)

Figure 9 :

Principe de la PCR

La PCR fluorescente utilisée ici emploie un couple d'amorces encadrant la région avec la mutation ADNmt A3243G. L'amorce sens utilisée (hmtL3117) est couplée à son extrémité 5' au fluorochrome FAM alors que l'amorce antisens (hmtH3381) est non fluorescente (Figure 10).

amorces	Séquence
hmtL3117	5'-FAM- CCCTGTACGAAAGGACAAGAGAAATAACGCC -3'
hmtH3381	5'- CGTTCGGTAAGCATTAGGAATGCCATTGC -3'

Figure 10 :

Séquences des amorces utilisées en PCR fluorescente

Le kit de PCR utilisé est le Hot Gold Star (Eurogentec). Le milieu réactionnel est constitué de 20 µL de Premix (Taq, Tampon, dNTPs, 1mM MgCl₂), 1µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL d'amorce sens (hmtL3117) 20 µM, 1 µL d'amorce antisens (hmtH3381) 20 µM, 25 µL eau DEPC (diethylpyrocarbonate), auquel sont ajoutés 2 µL d'ADN.

Le programme d'amplification utilisé est :

- dénaturation : 94°C 10 min
- hybridation : 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min } * 35 cycles
- élongation : finale 72°C, 7 min

Evaluation du taux d'hétéroplasmie

Une fois la PCR réalisée, les échantillons sont soumis à une digestion enzymatique par Hae III pendant 4h à 37°C (1,5 µL d'ADN, 1,5 µL de tampon 10x, 2 µL d'enzyme Hae III et 10 µL d'eau DEPC). Cette enzyme va cliver l'ADN au niveau de la séquence GGCC. Or, la séquence parentale amplifiée contient un site de restriction interne pour cette enzyme, le clivage par Hae III génère donc 2 fragments (un fragment de 196 paires de bases (pb) fluorescent et un fragment de 66 pb non fluorescent).

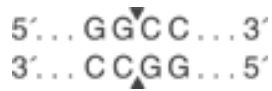


Figure 11 :

Site de restriction de l'enzyme Hae III

La mutation A3243G crée un nouveau site de coupure. Ainsi la digestion par Hae III donne 3 fragments (123 pb fluorescent et deux fragments non fluorescents 73 et 66 pb). L'enzyme est ensuite inactivée par incubation pendant 20 min à 80°C puis les échantillons sont dilués au 1/10ème dans l'eau DEPC. 1,5 µL de cette dilution sont ajoutés à 0,25 µL de marqueur de taille fluorescent (Genescan 600 LIZ, Applied) et 18,25 µL de formamide (pour dénaturer les fragments). La migration des échantillons est ensuite réalisée sur un séquenceur capillaire (Applied 3130) Ainsi les fragments fluorescents ont été séparés en fonction de leur taille. L'analyse de la taille et de l'aire des pics de fluorescence est réalisée grâce au logiciel Peak scanner (Applied).

Le taux d'hétéroplasmie peut être calculé par mesure de l'aire du pic correspondant au fragment sauvage (196 pb) et du fragment muté (123 pb). Le taux de mutation est alors donné par la formule suivante :

$$\text{Taux de mutation} = \frac{\text{Aire du pic ADNmt muté}}{\text{Aire du pic ADNmt muté} + \text{Aire du pic ADNmt parental}}$$

2.6 Dosage des quantités de nucléotides pyridiniques (NAD, NADH, NADP, NADPH)

2.6.1 Extraction

Les dosages ont été réalisés à partir des cellules non différenciées et différenciées, issues des 3 lignées de SHSY-5Y parentales, 70% M et 100% M.

Chaque lignée de cellules a étéensemencée dans 6 flasques de 25 cm² à raison de 1 million de cellules par flasque. À confluence, 4 flasques ont été utilisées pour l'extraction de cofacteurs, la 5^{ème} pour un contrôle du taux d'hétéroplasmie et la 6^{ème} a servi à ensemen- cer 5 T25 destinées à la différenciation. En fin de différenciation, l'une de ces flasques a été récoltée pour en contrôler l'hétéroplasmie, tandis que les 4 autres ont été extraites pour le dosage de cofacteurs.

Avant chaque extraction, les cellules sont trypsinées, récoltées, comptées, centrifugées (1000 rpm, 5 minutes), puis remises en suspension dans du tampon PBS. Un prélèvement d'une fraction aliquote est effectué pour le dosage des protéines avant de séparer en deux la suspension cellulaire. Après une nouvelle centrifugation (1000 rpm, 5 minutes), un culot est repris par un volume d'une solution d'HCl 0,7 M (afin d'extraire les espèces oxydées NAD⁺ et NADP⁺) ; le second culot est repris par un volume d'une solution de NaOH 0,7 M (afin d'extraire les espèces réduites NADH et NADPH). Les échantillons sont ensuite stockés à -80° C jusqu'au jour du dosage.

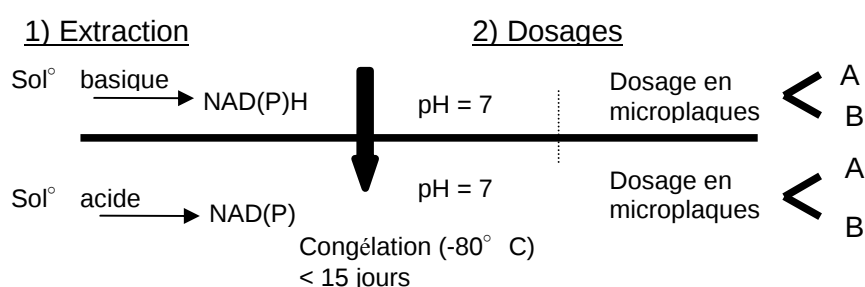


Figure 12 :

Protocole d'extraction et de dosage quantitatif des nucléotides pyridiniques.

2.6.2 Dosages

Le jour du dosage, les extraits cellulaires acides et basiques sont neutralisés par un volume de tampon bicine 0,5 M pH 8, puis incubés 15 minutes à 60°C avant d'être centrifugés (10 000 rpm, 5 minutes). La suite du dosage est menée sur le surnageant.

Les cofacteurs pyridiniques sont quantifiés indépendamment les uns des autres en employant une méthode de dosage par recyclage enzymatique au moyen de deux enzymes auxiliaires la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) et l'alcool déshydrogénase (ADH) (*Gallais et al., 1998*).

Afin de doser les espèces NADP^+ et NADPH, un prélèvement de chaque extrait est déposé en duplicat dans les puits d'une microplaque, puis incubé dans un milieu réactionnel de 125 μL constitué de bicine 100 mM, glucose 6-phosphate (G6P) (SIGMA) 5 mM, Phenazine EthoSulfate (PES) 1 mM, Méthyl Thiazol Tétrazolium (MTT) 0,42 mM. L'ajout extemporané de 0,25 unité de G6PDH déclenche la cinétique de réduction du MTT qui est suivie à 570 nm pendant 20 minutes grâce à un spectrophotomètre lecteur de microplaque informatisé (SAFAS FLX-Xenius). La cinétique de réduction des échantillons est comparée à celle d'une gamme de NADP^+ allant de 0 à 5 pmoles.

Pour doser les espèces NAD^+ et NADH, un nouveau prélèvement de chaque extrait est déposé en duplicat dans les puits d'une nouvelle microplaque, puis incubé dans un milieu réactionnel de 100 μL constitué de TRIS-HCl 1 M, EGTA 4 mM, éthanol 8 %, PES 1 mM, MTT 0,42 mM. L'ajout extemporané de 0,25 unité d'ADH déclenche la cinétique de réduction du MTT qui est suivie à 570 nm pendant 20 minutes au spectrophotomètre SAFAS. La cinétique de réduction des échantillons est comparée à celle d'une gamme de NAD^+ allant de 0 à 50 pmoles.

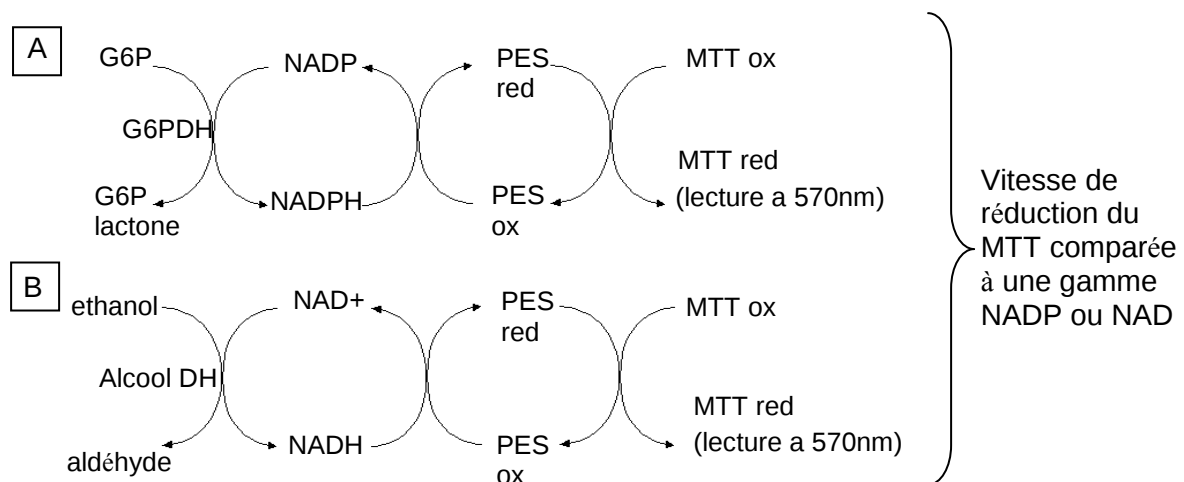


Figure 13 :

Méthode de dosage par recyclage enzymatique des cofacteurs pyridiniques extraits

Les quantités en cofacteurs sont finalement exprimées en picomoles de cofacteurs par minute et par μg de protéines (dosées selon la méthode utilisant l'acide bicinchonique d'après *Lowry et al. (1951)*).

2.7 Mesure d'activités enzymatiques

Ces trois dosages sont effectués sur des culots cellulaires repris par 50µL de Tampon A par million de cellules et les activités sont dosées par spectrophotométrie (Beckman U 640B, Beckman Coulter).

Composition du tampon A : saccharose 250 mM, TRIS base 20 mM, EDTA 2 mM, BSA 1mg/mL.

2.7.1 Activité aconitase (EC.4.2.1.3)

L'aconitase catalyse la formation à partir de l'isocitrate du cis-aconitate qui absorbe les UV à longueur 240 nm. (*Krebs and Holzach, 1952*)



20 µL de suspension cellulaire sont ajoutés dans un milieu réactionnel composé de 500 µL de tampon Tris-HCl (pH 7.4) 100 mM, 50 µL de MnCl₂ 10 mM, 200 µL d'isocitrate de sodium 100 mM, 10 µL de Triton 10%, 220 µL d'eau, préincubé 5 minutes à 37°C. La cinétique d'absorption est suivie au spectrophotomètre à 240 nm à 37°C pendant 240 secondes. L'activité spécifique, déterminée grâce au coefficient d'extinction molaire de l'aconitate ($\epsilon_{\text{Aconitate}} = 3,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est exprimée en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

$$\text{AS} = (\Delta \text{DO}_{240\text{nm}} \times 1000) / (\epsilon_{\text{Aconitate}} \times [\text{c}]) \times (\text{V total} / \text{V essai})$$

AS : activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

$\Delta \text{DO}_{240\text{nm}}$: variation de densité optique par minute à 240nm

$\epsilon_{\text{Aconitate}}$: coefficient d'extinction molaire de l'aconitate à 240nm = $3.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

[c] : concentration protéique en mg/mL

V total : volume final dans la cuve = 1mL

V essai : volume de suspension cellulaire ajouté dans la cuve = 0.020 mL

2.7.2 Activité fumarase (EC.4.2.1.2)

La fumarase métabolise le malate en fumarate qui absorbe les UV à 250 nm. (*Hill and Bradshaw, 1969*)



25 µL de suspension cellulaire sont ajoutés dans du milieu réactionnel composé de 895 µL de tampon KH₂PO₄ (pH 7,4), 10 µL d'EDTA 10 mM, 50 µL de malate 500 mM, 20 µL de triton 10%, préincubé 5 minutes à 37°C. La cinétique d'absorption est suivie au spectrophotomètre à 250 nm à 37°C pendant 240 secondes. L'activité spécifique, déterminée grâce au coefficient d'extinction molaire du fumarate ($\epsilon_{\text{Fumarate}} = 4,88 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est exprimée en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

$$AS = (\Delta DO_{250\text{nm}} \times 1000) / (\epsilon_{\text{Fumarate}} \times [c]) \times (V_{\text{total}} / V_{\text{essai}})$$

AS : activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

$\Delta DO_{250\text{nm}}$: variation de densité optique par minute à 250nm

$\epsilon_{\text{Fumarate}}$: coefficient d'extinction molaire du fumarate à 250nm = $4.88 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

[c] : concentration protéique en mg/mL

V total : volume final dans la cuve = 1mL

V essai : volume de suspension cellulaire ajouté dans la cuve = 0.020 mL

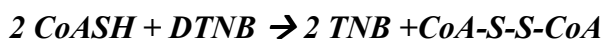
2.7.3 Activité citrate synthase

Cette enzyme localisée dans la matrice mitochondriale catalyse la première réaction du cycle de Krebs. Le dosage de son activité est utilisé comme un témoin de la quantité de mitochondries (*Kirby et al. 1999*)

Selon une méthode adaptée de *Rustin et al. (1994)* l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque ou DTNB est utilisé pour oxyder le CoASH formé par la citrate synthase à partir d'acétyl coA et d'oxaloacétate.



Le DTNB est lui même réduit en trinitrobenzène (TNB) qui absorbe la lumière visible à 412 nm.



5 µL de suspension cellulaire sont ajoutés dans du milieu réactionnel composé de 150 µL de tampon DTNB 1 mM, 50 µL d'acide oxalocétique 10 mM, 30 µL d'acétyl coA 10 mM, 10 µL de triton 10% et 735 µL d'eau, préincubé 2 min à 37°C. La cinétique d'absorption est suivie au spectrophotomètre à 412 nm à 37°C pendant 100 secondes. L'activité spécifique, déterminée grâce au coefficient d'extinction molaire du TNB ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est exprimée en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

$$AS = (\Delta DO_{412nm} \times 1000) / (\epsilon_{TNB} \times [c]) \times (V_{total} / V_{essai})$$

AS : activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

ΔDO_{412nm} : variation de densité optique par minute à 412nm

ϵ_{TNB} : coefficient d'extinction molaire du TNB à 412nm = 13.6mM⁻¹.cm⁻¹

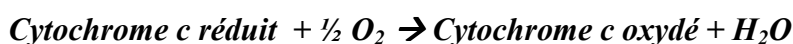
[c] : concentration protéique en mg/mL

V total : volume final dans la cuve = 1mL

V essai : volume de suspension cellulaire ajouté dans la cuve = 0.01 mL

2.7.4 Activité du complexe IV

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



Le dosage consiste à suivre l'oxydation du cytochrome c réduit à 550 nm.

5 µL de suspension cellulaire sont ajoutés dans du milieu réactionnel composé de 200 µL de tampon KH₂PO₄ 100 mM, 20 µL de BSA 50 mg/mL et 300 µL de cytochrome c réduit, préincubé 3 min à 37°C. La réaction est déclenchée par l'ajout de 20 µL de laurylmaltoside à 125 mM. La cinétique de diminution de l'absorbance du cytochrome c réduit à 550 nm est suivie au spectrophotomètre à 550 nm à 37°C pendant 90 secondes. L'activité spécifique, déterminée grâce au coefficient d'extinction molaire du cytochrome c ($\epsilon_{cyt\ c} = 18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est exprimée en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹.

$$AS = (\Delta DO_{550nm} \times 1000) / (\epsilon_{cyt\ c} \times [c]) \times (V_{total} / V_{essai})$$

AS : activité spécifique en nmol.min⁻¹.mg de prot⁻¹

ΔDO_{550nm} : variation de densité optique par minute à 550 nm mesurée sur la zone linéaire de la courbe de décroissance

$\epsilon_{cyt\ c}$: coefficient d'extinction molaire du cytochrome c à 550nm = 18,5 mM⁻¹.cm⁻¹

[c] : concentration protéique en mg/mL

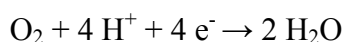
V total : volume final dans la cuve = 1mL

V essai : volume de suspension cellulaire ajouté dans la cuve = 0,005 mL

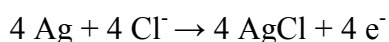
2.8 Oxygraphie

Cette technique consiste à mesurer les vitesses de consommation d'oxygène de cellules intactes dans différents états métaboliques. Les cellules utilisent leur substrats endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour respirer. La mesure est réalisée à l'aide d'un oxygraphe (Oroboros 02k), composé d'une cuve réactionnelle fermée, thermostatée à 37°C et disposant d'une agitation magnétique. La mesure de la consommation d'oxygène est effectuée à l'aide d'une électrode de Clark.

Cette électrode est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent avec une différence de potentiel de -0,7 V, immergées dans une solution de KCl à demi saturée et isolées de la cuve par une membrane semi-perméable laissant diffuser l'oxygène. Ainsi, chaque molécule d'oxygène traversant la membrane va être réduite au niveau de la cathode selon la réaction suivante :



Une oxydation se produit à l'anode :



L'équation bilan de la réaction est donc :



Dans ces conditions, la variation de courant induite par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation. Ces variations de courant sont amplifiées et visibles sur l'écran de l'ordinateur.

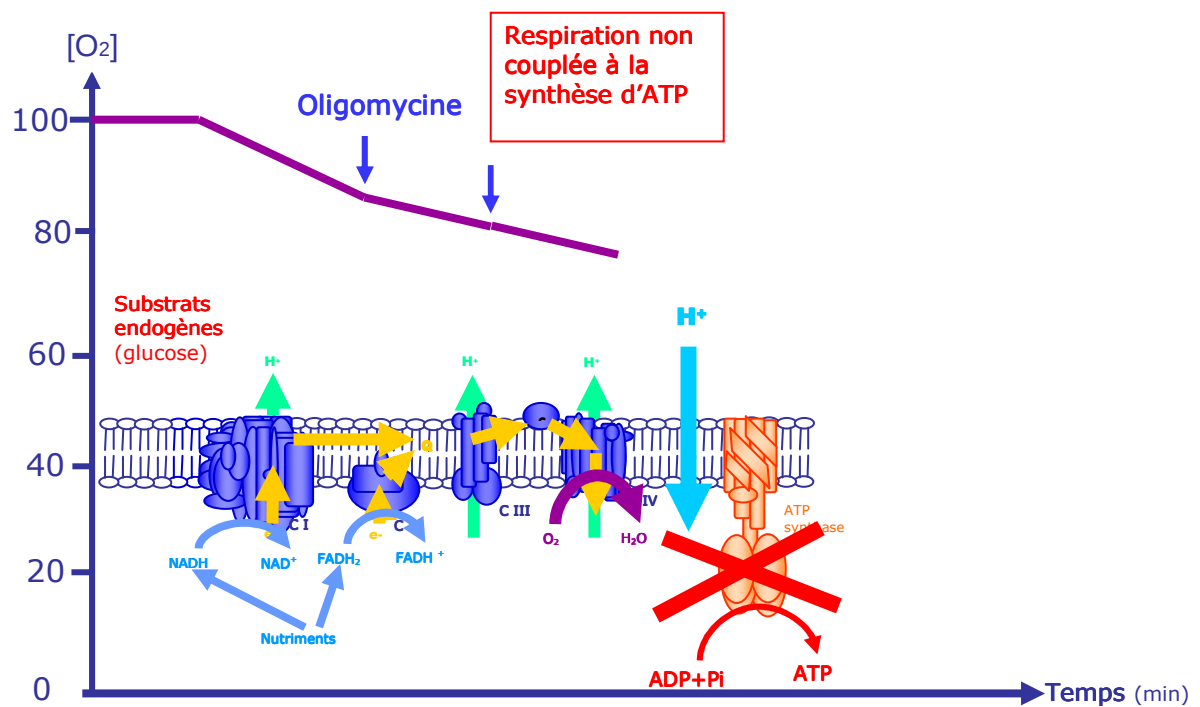
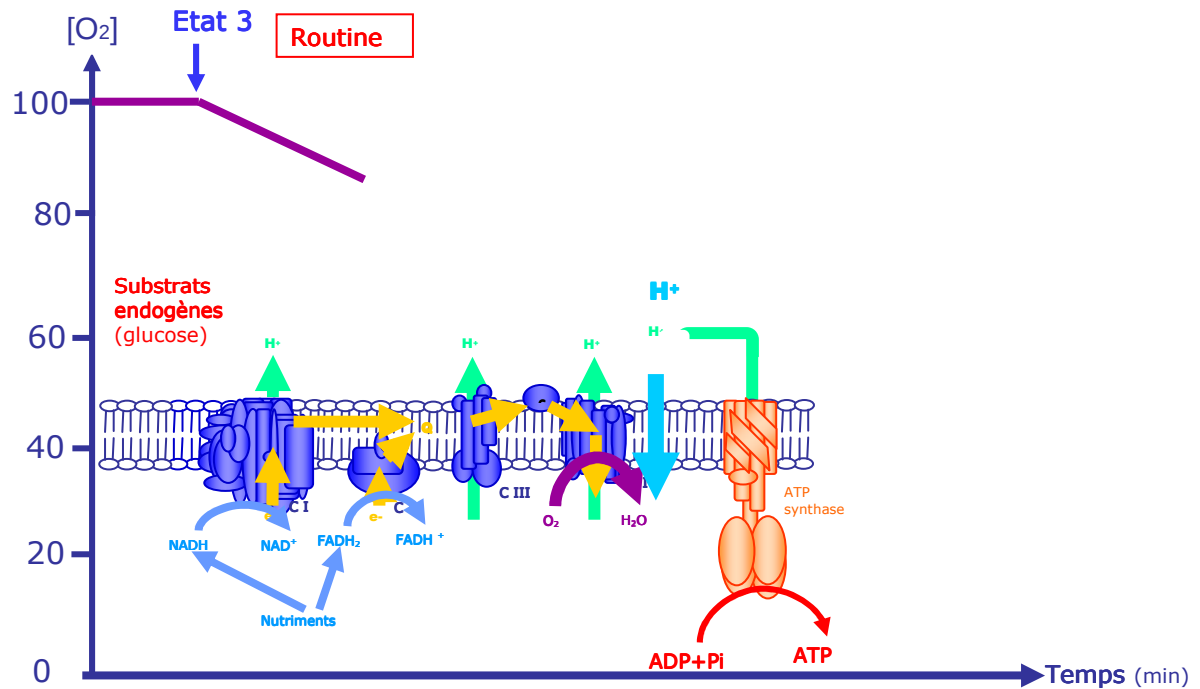
L'électrode est associée à une cuve de mesure thermostatée, disposant d'une agitation magnétique. Elle est calibrée dans le milieu d'incubation équilibré à l'air à 37°C. Pour le 100%, la consommation d'oxygène est mesurée sous agitation, cuve ouverte avec du milieu. Lorsque le tracé est bien stable, le 100 % d'oxygène est réglé sur l'appareil. Ensuite, une solution de dithionite de sodium, un agent réducteur qui va peu à peu consommer l'oxygène contenu dans le milieu, est injectée dans la chambre, donnant ainsi le 0% d'oxygène.

La technique s'effectue sur des cellules perméabilisées selon le protocole de *Greco et al. 2003*.

Les cellules sont trypsinées, comptées et centrifugées à 1000 rpm pendant 5 minutes. Les culots cellulaires sont repris avec 50 $\mu\text{L}/10^6$ cellules de tampon Rustin (KH_2PO_4 10 mM, mannitol 300 mM, KCl 10 mM, MgCl_2 5 mM, pH 7,4). La suspension est incubée avec de la digitonine (15 $\mu\text{g}/10^6$ cellules) sous agitation douce pendant 2 minutes 30. 4 volumes de tampon Rustin additionné de BSA (1 mg/ml) sont ajoutés pour inhiber l'action de la digitonine. Les cellules sont à nouveau centrifugées (800 rpm 2 minutes 30) et reprises dans 200 μL de tampon Rustin+BSA puis injectées dans les cuves. Après stabilisation de la ligne de base de la respiration des cellules, les différents substrats et inhibiteurs sont successivement ajoutés dans la cuve.

- Malate (0,5M) et pyruvate (0,5M) 20 μl : entrent dans le cycle de Krebs et produisent ainsi le NADH qui active le complexe I
- ADP (150mM) et NAD^+ (50mM) 20 μl : substrats du complexe V (ATP synthase)
- Succinate (0,5M) 20 μl : active le complexe II
- Roténone (2,5mM) 8 μl : inhibe sélectivement le complexe I
- Oligomycine (8mg/mL) 2 μl : inhibiteur de l'ATP synthase
- FCCP (1mM) 2 μl : protonophore qui permet une entrée de protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice mitochondriale, obligeant ainsi la chaîne respiratoire à fonctionner au maximum de sa capacité.
- Antimycine (1mg/mL) 2 μl : inhibiteur du complexe III
- Ascorbate (0,4M) et TMPD (20mM) 20 μl : le TMPD est un transporteur d'électrons qui, réduit par l'ascorbate, va transférer ses électrons au cytochrome c ce qui va permettre de mesurer la capacité fonctionnelle maximale du complexe IV
- Cyanure de potassium (200mM) et azide (100 mM) 20 μl : inhibiteurs du complexe IV

4 x 400 μL de suspension sont ensuite prélevés dans chacune des cuves et les protéines sont dosées de manière à pouvoir exprimer les résultats par mg de protéines (dosées selon la de *Lowry et al. (1951)*).



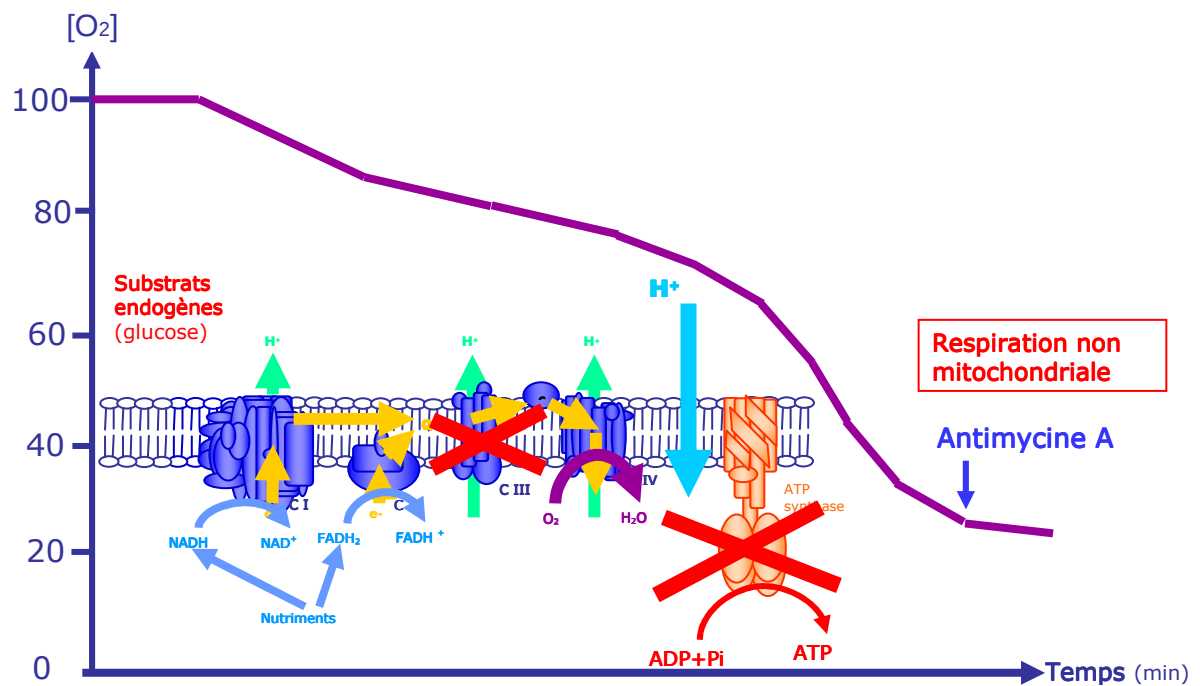
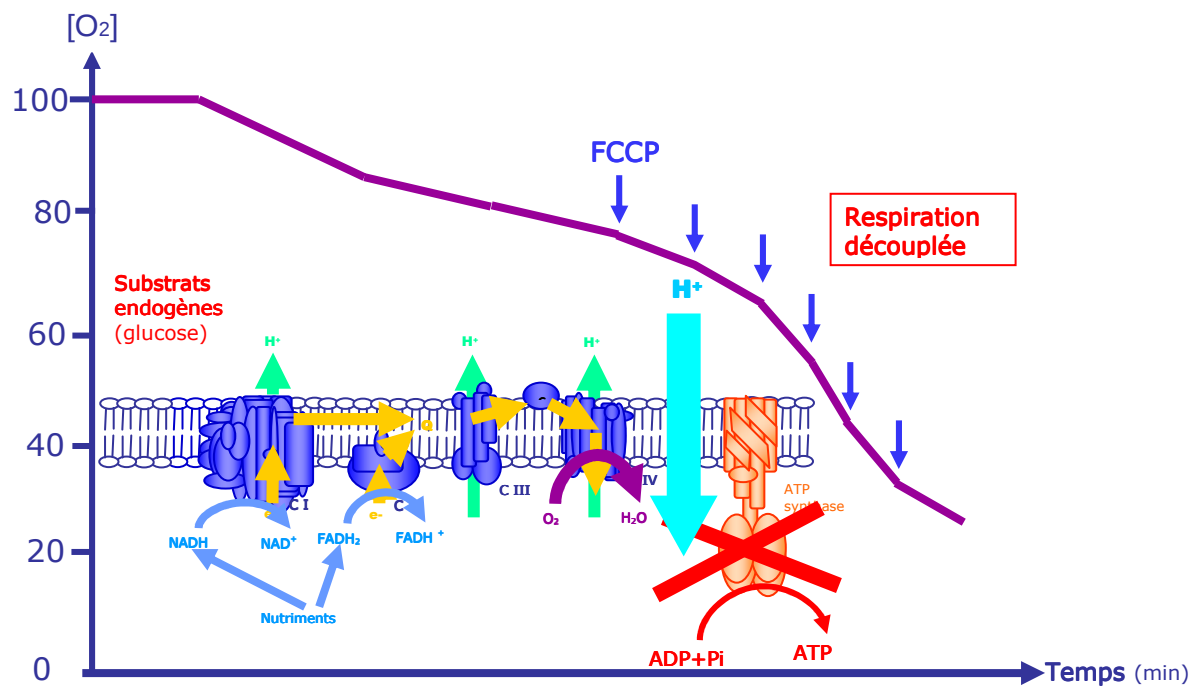


Figure 14 :

Représentation de la consommation d'oxygène mesurée par oxygraphie et de son évolution au cours des différentes étapes du protocole.

2.9 Mesure de la quantité d'ATP

L'ATP a été extrait à partir de 5 cultures cellulaires indépendantes. Dans chaque série, une mesure a été réalisée en présence d'oligomycine afin de bloquer la production mitochondriale d'ATP selon le protocole de Koszegi et al. (*Köszegi et al.*, 2007)

2.9.1 Extraction de l'ATP

Après 24h d'incubation à 37°C, les cellules sont lavées au PBS puis incubées avec 1 mL de tampon d'extraction (acide borique à 0,2 M, MgSO₄ 10mM, triton 0,1% , pH 9.2) pendant 10 min. Ensuite 800µL d'extrait sont centrifugés dans un tube eppendorf à 13000rpm pendant 3 minutes puis congelés à -20°C.

20 µl de solution sont ensuite neutralisés par une solution de neutralisation (Hepes 25 mM, EDTA 2 mM, pH 7,75). Le dosage de l'ATP par bioluminescence est réalisé sur l'échantillon neutralisé non dilué. Une fraction de chaque échantillon a été conservée pour le dosage de protéines selon la méthode de *Lowry et al.* (1951).

2.9.2 Dosage de l'ATP

Le dosage de l'ATP est effectué en utilisant un kit ENLITEN ATP Assay System de chez Promega et un bioluminomètre MiniLumat LB 9506 (Berthold Technologies).

Cette technique utilise la luciférase + luciférine pour catalyser la réaction suivante :



La mesure au bioluminomètre s'effectue à l'abri de la lumière. 10 µL d'échantillon à doser sont mélangés à 90µL de réactif luciférine/luciférase. Le tube est ensuite rapidement inséré dans l'appareil qui affiche, en 10secondes, la valeur correspondant à la quantité de photons émis.

Une gamme standard d'ATP de 10⁻⁷ à 10⁻¹¹ M est réalisée à partir de solution standard 10⁻⁷M diluée en cascade au 1/10^{ème} dans de l'eau « ATP-Free » et mesurée au bioluminomètre afin d'obtenir une droite étalon. L'équation de la droite étalon permet de déduire la concentration d'ATP de chaque échantillon dosé.

2.10 Dosage des protéines selon la méthode utilisant l'acide bicinchoninique d'après Lowry et al. (1951)

Les concentrations protéiques des cellules utilisées dans les différentes analyses et expériences ont été déterminées par la méthode utilisant l'acide bicinchoninique. Cette méthode est basée sur le fait qu'en milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques Cu^{++} en ions cuivreux Cu^+ . Les ions cuivreux et l'acide bicinchoninique vont alors former un complexe coloré en pourpre ($\lambda_{\text{max}} = 562 \text{ nm}$). Le dosage est réalisé à l'aide du kit BC Assay® (Interchim) et les réactifs utilisés sont les suivants :

- Solution d'acide bicinchoninique : réactif A
- Solution de sulfate de cuivre : réactif B
- Solution standard de BSA 1 mg/mL

Le réactif A+B est préparé extemporanément en diluant B au 1/50^{ème} dans A. À 40 μL de ces échantillons à doser sont ajoutés 800 μL du réactif A+B. Pour l'étalonnage, 800 μL de ce même réactif sont ajoutés à 40 μL de solution de BSA à 0,25 et 0,50 mg/mL. De même, un tube « blanc » est réalisé en ajoutant le réactif à 40 μL de NaCl. Chaque mélange est ensuite incubé 30 minutes à 37°C. L'absorbance de chacune des solutions est alors mesurée au spectrophotomètre à 562 nm contre le blanc. La concentration protéique de l'échantillon est calculée à l'aide de la gamme d'étalonnage.

2.11 Tests statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne de n expériences $\pm \text{sem}$. La significativité des résultats a été évaluée par le test non paramétrique de Mann-Whitney. Les comparaisons ont été jugées significatives à $p \leq 0,05$.

3. Résultats

3.1 Détermination des conditions de culture

Les premières études des croissances cellulaires des différentes lignées nous ont rapidement montré que l'évolution du taux d'hétéroplasmie est dépendante des conditions métaboliques sur de longues périodes de culture cellulaires. Différents milieux de culture ont été expérimentés afin d'assurer une croissance optimale et de maîtriser le taux d'hétéroplasmie des cellules 70%M.

La production cellulaire d'ATP à deux origines distinctes : la glycolyse et la chaîne respiratoire. La variation du taux de glucose du milieu de culture nous a permis d'évaluer les besoins spécifiques des cellules en glucose et leur dépendance vis-à-vis de la glycolyse en fonction de leur taux d'hétéroplasmie. Les cellules nécessitant le plus de glucose pour avoir une prolifération optimale sont donc des cellules à métabolisme principalement glycolytique.

Tout d'abord toutes les cellules sontensemencées dans un milieu de culture contenant 4,5g/L de glucose. Les cellules parentales présentent une prolifération satisfaisante, ainsi que les cellules 100%M dont le milieu a été supplémenté en uridine et pyruvate (100 µg/mL) pour compenser les déficiences de la chaîne respiratoire induites par la mutation de l'ADNmt. Les cellules qui présentaient initialement un taux d'hétéroplasmie de 25% ont dérivé jusqu'à 70% après quelques passages en milieu glucose 4,5 g/L.

En mettant les cellules dans un milieu sans glucose mais contenant du galactose on ralentit le métabolisme glycolytique. Le galactose a besoin d'être transformé en glucose pour que la glycolyse puisse avoir lieu et le métabolisme glycolytique se retrouve ralenti. Le ralentissement de la prolifération des cellules dans ces conditions est donc un signe de leur dépendance vis-à-vis de glycolyse dans leur métabolisme. En milieu galactose, on remarque que les cellules de la lignée parentale ne survivent pas et une forte diminution de la prolifération des cellules 100%M. Cependant, dans ces conditions, les cellules 70%M poursuivent leur prolifération cellulaire.

On peut donc en déduire que les cellules parentales ont un métabolisme majoritairement glycolytique. On remarque que les cellules 70%M ont un métabolisme majoritairement oxydatif tandis que le métabolisme des cellules 100%M semble intermédiaire entre les cellules parentales et les cellules mutantes. Ce sont ces observations successives qui ont conduit à cultiver les cellules 70%M dans un milieu pauvre en glucose (0,5 g/L) dans lequel les cellules présentent une plus grande stabilité du taux de mutant sans affecter leur prolifération.

Bien que des conditions de culture spécifiques à chaque type cellulaire aient été définies, pour pouvoir comparer les résultats toutes les lignées (parentale, 70%M et 100%M) doivent être cultivées dans les mêmes conditions. Le fait de modifier les taux de glucose et de pyruvate influence le métabolisme mitochondrial, c'est pourquoi le milieu standard commun retenu pour conduire les études comparatives des différentes lignées est composé de 4.5 g/L de glucose, 10% de SVF et uridine 100 µg/mL.

3.2 Quantification de l'hétéroplasmie

On amplifie par PCR un fragment d'ADN mitochondrial avec une amorce sens couplée à un fluorochrome FAM et une amorce antisens. La région amplifiée encadre la mutation A3243G possède naturellement un site de clivage pour l'enzyme de restriction *HaeIII* formant des fragments fluorescents de 196 pb. La mutation A3243G fait apparaître un autre site de coupure formant un fragment fluorescent plus court de 123 pb (Figure 15). Les fragments obtenus après digestion enzymatique sont ensuite séparés sur un séquenceur analyseur de fragments (Figure 16).

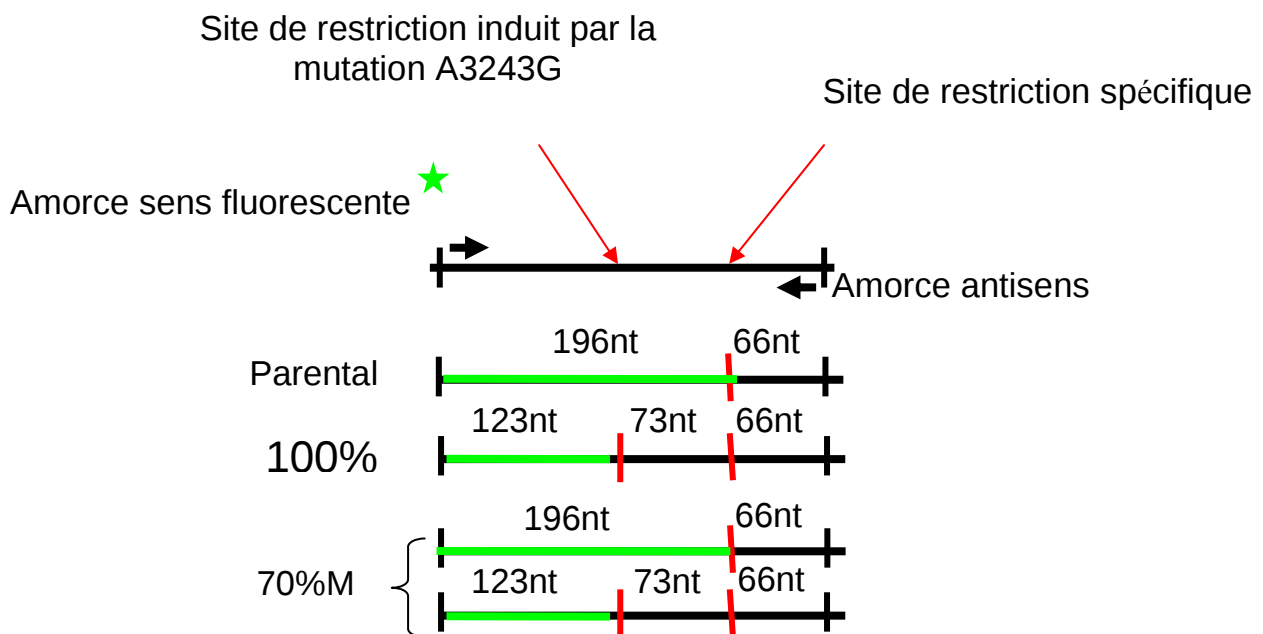


Figure 15 :

Représentation des résultats obtenus après digestion par l'enzyme de restriction *HaeIII*

La quantification de l'hétéroplasmie cellulaire a été effectuée après chaque dosage ou analyse et a donné les résultats suivants.

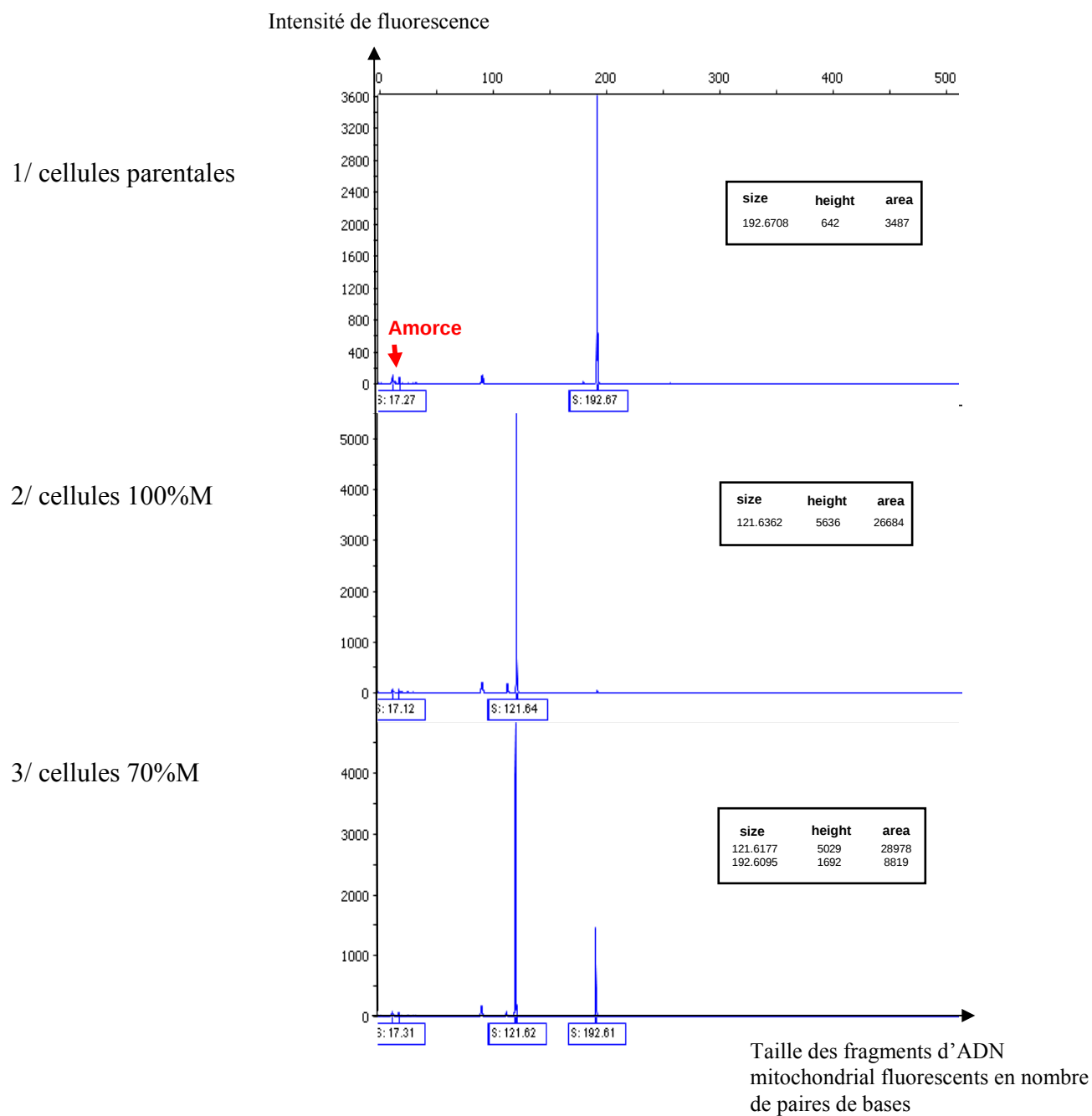


Figure 16 :

Quantification de l'hétéroplasmie des différentes lignées cellulaires par PCR fluorescente

$$\text{Pourcentage d'hétéroplasmie} = \frac{\text{aire du pic mutant}}{\text{aire totale}} \times 100$$

Les cellules parentales présentent effectivement un unique pic de fragment fluorescent mesurant 196 pb. L'absence de fragments de 123 pb prouve l'absence du site de restriction créé par la mutation A3243G. Pour leur part, les cellules décrites comme ayant 100% de mutation ont également une seule taille de fragments fluorescents démontrant que la lignée 100%M est homoplasmique pour la mutation étudiée.

Après digestion par l'enzyme de restriction du matériel issu des cellules de pourcentage d'hétéroplasmie intermédiaire, le résultat de l'analyse des fragments contient deux pics de fluorescence aux tailles de 196 et 123 pb. Ceci est dû au fait que seule une partie des mitochondries portent la mutation A3243G et présentent donc le second site de restriction pour *HaeIII*.

Les aires des pics obtenus après analyse permettent de calculer le pourcentage d'hétéroplasmie précis des cellules sur lesquelles nous travaillons.

Cette analyse nous permet de déterminer que tous les travaux présentés ici ont été effectués sur des cellules parentales comparées à des cellules de 100% et 70% mutantes.

3.3 Analyse de la prolifération cellulaire

Les différentes lignées cellulaires ont été mises en culture dans les mêmes conditions (quantité de cellules et milieu de culture identiques) et en duplicat. Chaque jour, leur croissance a été observée (au microscope) et quantifiée par comptage cellulaire.

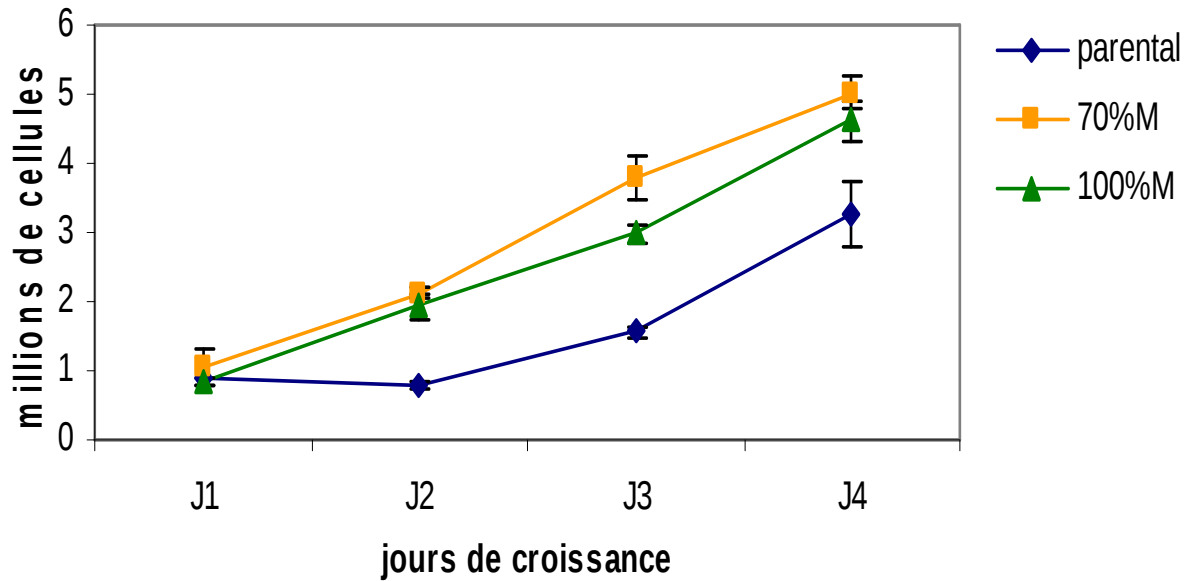


Figure 17 :

Courbes de croissance cellulaire en fonction du taux d'hétéroplasmie (70%M et 100%M) comparée à la lignée parentale.

Les cellules portant la mutation A3243G se multiplient plus rapidement que les cellules parentales (Figure 17). On remarque plus particulièrement que la prolifération à 70% d'hétéroplasmie est plus rapide qu'à 100% de mutation. Populations cellulaires comptées au troisième jour de croissance (J₃)

Pourcentage d'hétéroplasmie des cellules	Nombre de cellules comptées à J ₃
parentales	1,55.10 ⁶
70% Mutantes	3,8.10 ⁶
100% Mutantes	2,97.10 ⁶

3.4 Métabolisme mitochondrial

3.4.1 Lactate et pyruvate

Le pyruvate est révélateur du métabolisme cellulaire de par sa double fonction de produit de la glycolyse et de substrat de la phosphorylation oxydative. Un dysfonctionnement du métabolisme oxydatif pourra se manifester par une augmentation des produits de la glycolyse : lactate et pyruvate.

Le dosage de la production cellulaire de pyruvate et de lactate a été effectué sur des prélèvements du milieu de culture lors de l'étude de la croissance cellulaire (nombre d'expériences N=2).

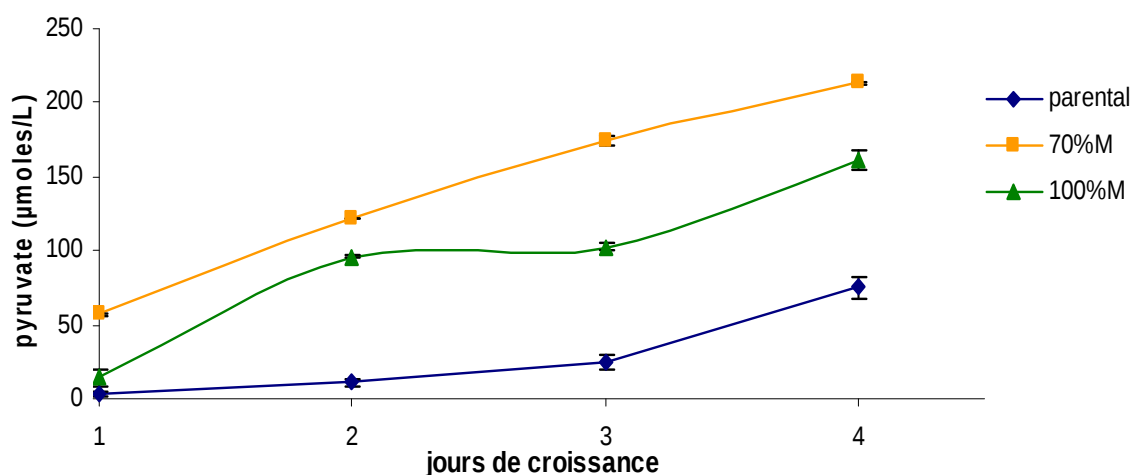


Figure 18 :

Production de pyruvate au cours de la croissance cellulaire en fonction du taux d'hétéroplasmie (70%M et 100%M) comparée à la lignée parentale

Dans toutes les lignées cellulaires, quel que soit leur taux d'hétéroplasmie, la production de pyruvate est croissante avec le temps (Figure 18). On remarque que la quantité de pyruvate produite par les cellules portant la mutation A3243G est beaucoup plus importante que celle produite par les cellules parentales. Les cellules 70%M sont celles dans lesquelles on retrouve la plus grande quantité de pyruvate tout au long de la croissance. Dès le premier jour de la croissance les cellules 70%M produisent 19 fois plus de pyruvate que les cellules parentales, et 4 fois plus que les cellules 100%M.

À J₄, les cellules 70%M produisent 3 fois plus de pyruvate que les cellules parentales et 1,3 fois plus que les cellules 100%M (nombre d'expériences N=2).

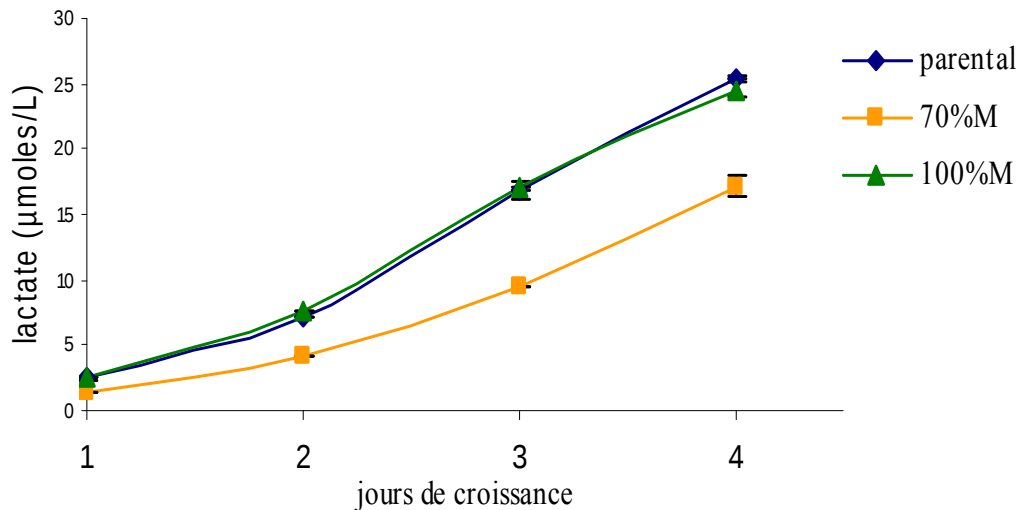


Figure 19 :

Production de lactate au cours de la croissance cellulaire en fonction du taux d'hétéroplasmie (70%M et 100%M) comparée à la lignée parentale

Contrairement à la production de pyruvate, la production de lactate est plus faible dans la lignée 70%M que dans les autres lignées (Figure 19). Des quantités quasiment similaires de lactates ont été dosées dans les lignées parentale et 100%M. Dans le milieu de culture des cellules de la lignée 70%M on décompte à peu près 1,6 fois plus de lactates que dans celui des cellules des lignées parentale ou 100%M.

Dans la lignée 70%M, l'importante quantité de pyruvate dosée et la faible production de lactate démontrent que le pyruvate n'est pas majoritairement transformé en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH).

3.4.2 Respiration cellulaire

Les paramètres respiratoires des cellules des différentes lignées ont été établis par oxygraphie sur des cellules perméabilisées. La mesure de la consommation d'oxygène des cellules en présence de différents substrats et inhibiteurs (ayant les capacités d'activer ou d'inhiber certains complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale) nous a permis d'étudier l'impact du taux d'hétéroplasmie pour la mutation A3243G sur la fonctionnalité de la chaîne respiratoire. (nombre d'expériences N=4)

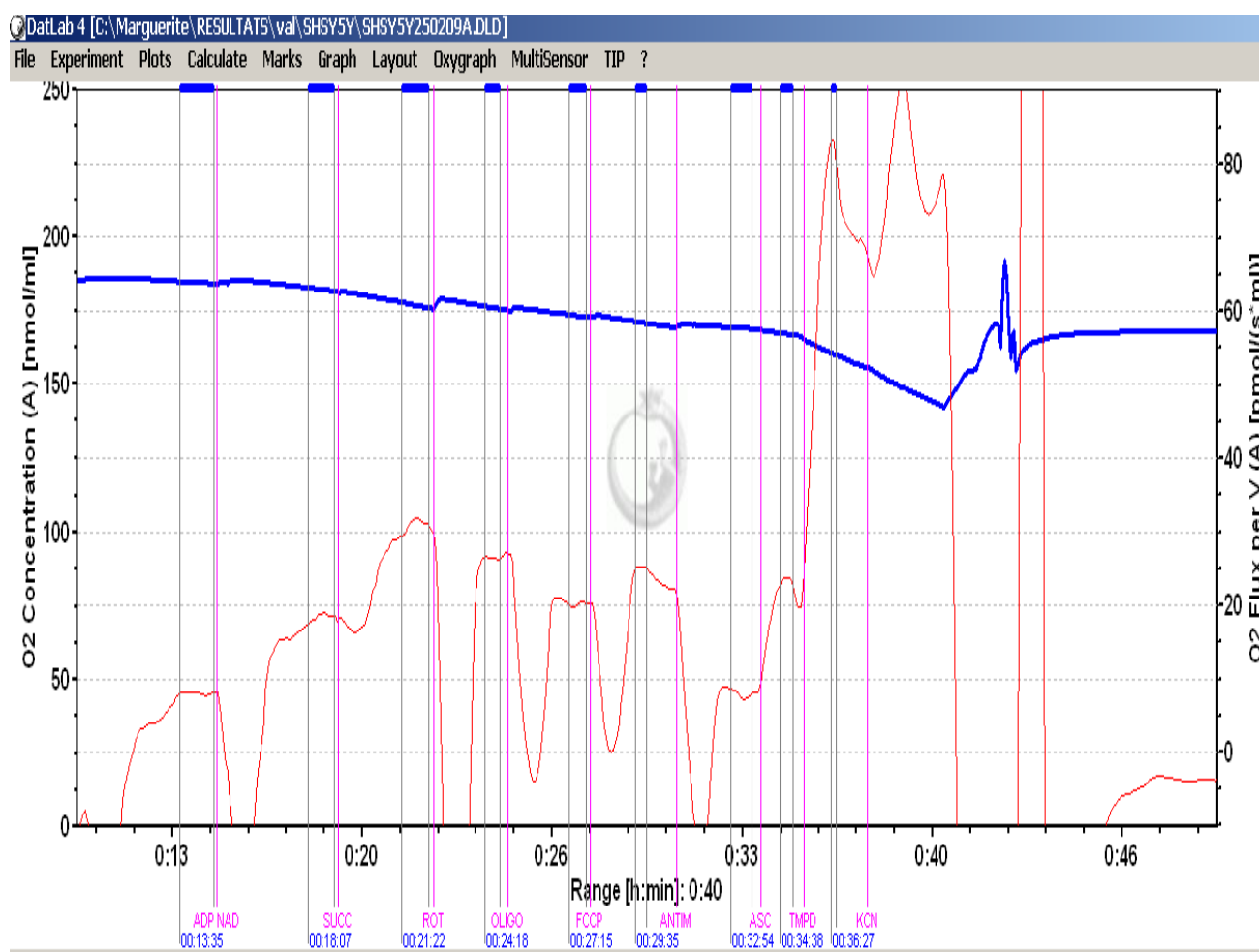


Figure 20 :

Evolution de la concentration (courbe bleue) et du flux (courbe rouge) d'oxygène au sein de la cuve d'oxygraphie au cours des différentes étapes de l'évaluation de la respiration cellulaire ici sur des cellules parentales.

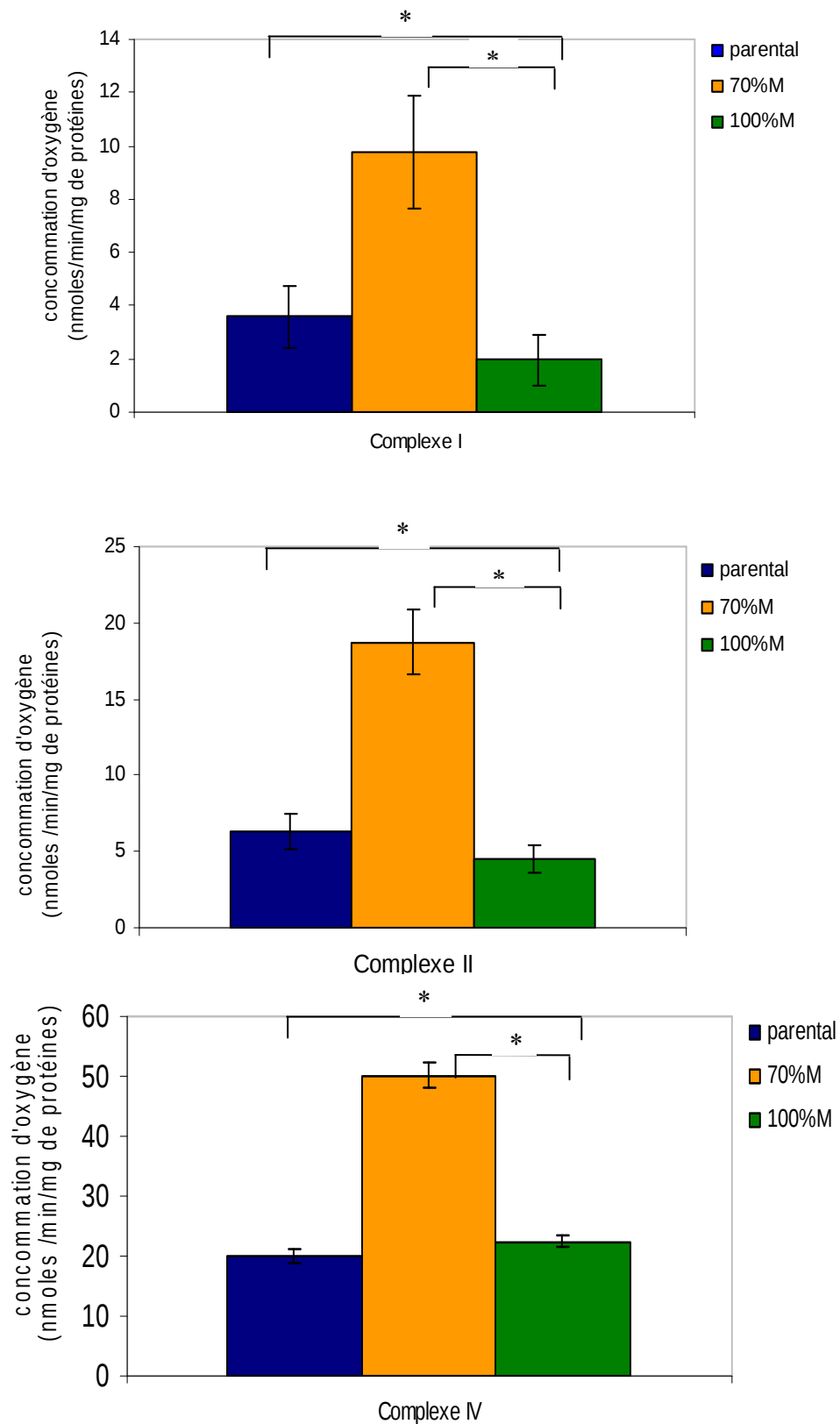


Figure 21 :

Analyse par polarographie de la chaîne respiratoire mitochondriale en fonction du taux d'hétéroplasmie (*= $p \leq 0,05$) (70%M et 100%M) comparée à la lignée parentale

En comparant les résultats obtenus avec les cellules de différents taux d'hétéroplasmie avec ceux des cellules parentales, on remarque une augmentation significative de la respiration liée aux complexes I, II et IV pour les cellules 70%M. Tandis que les cellules 100%M ont une diminution significative de la respiration liée à ces mêmes complexes (excepté le complexe IV).

Cette différence est surtout visible au niveau du complexe I (l'activité du complexe I est 4,2 fois plus importante chez les cellules 70%M que chez les cellules 100%M) et du complexe IV (l'activité du complexe IV est 2,2 fois plus forte chez les cellules 70%M que chez les cellules 100%M). (Figure 21)

Le complexe IV a pour fonction de catalyser la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. L'augmentation de son activité va de paire avec une augmentation du métabolisme oxydatif général. L'augmentation des activités de ces complexes dans la lignée cellulaire 70%M montre donc que ces cellules ont un métabolisme plus oxydatif que les cellules 100%M. Les cellules parentales, ont une respiration liée aux complexes I et II supérieure à celle des 100%M.

3.4.3 Activités enzymatiques

Les résultats d'oxygraphie nous ont amenés à doser spécifiquement l'activité enzymatique du complexe IV dont la capacité est modifiée en fonction du taux d'hétéroplasmie. L'activité spécifique a été rapportée à l'activité de la citrate synthase qui est couramment utilisée comme marqueur de la prolifération mitochondriale. (nombre d'expériences N=4)

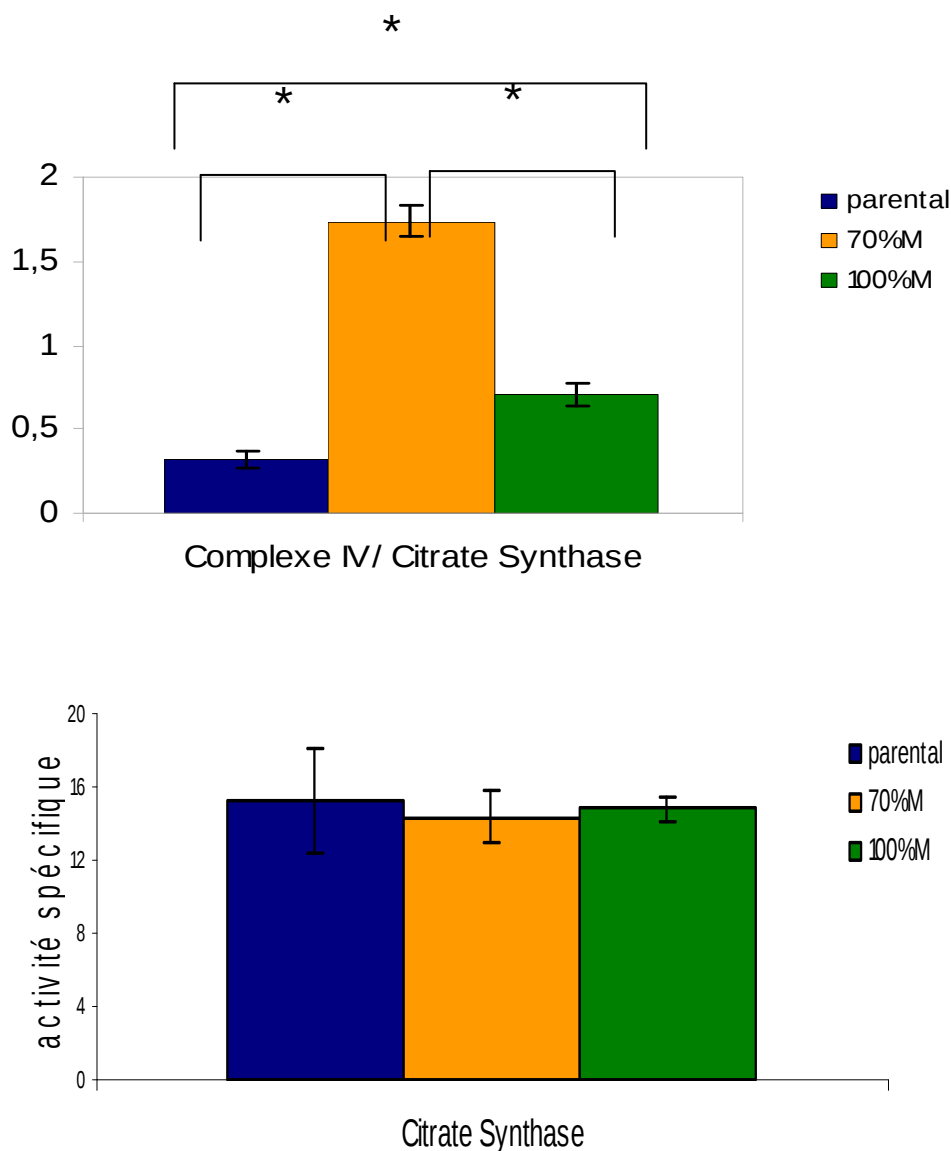


Figure 22 :

activité enzymatique du complexe IV (exprimée par rapport à celle de la citrate synthase) en fonction du taux d'hétéroplasmie (*= $p \leq 0,05$) (70%M et 100%M) comparée à la lignée parentale

On observe que l'activité du complexe IV est augmentée de manière significative pour la lignée 70%M (Figure 22) Les rapports entre les activités mesurées sont de 5,4 entre les lignée 70%M et parentale, et de 2,4 entre les lignées 70%M et 100%M. Les résultats concernant l'étude du complexe IV sont comparables : activité enzymatique mesurée grâce a un apport en excès de cytochrome c et capacité maximale endogène de la cytochrome c oxydase mesurée par oxygraphie. Les rapports des résultats entre les lignées 70%M et 100%M sont du même ordre pour les deux dosages.

On remarque que la citrate synthase ne varie pas entre les lignées suggérant que ces variations d'activités des complexes ne sont pas dues à une augmentation du nombre de mitochondries.

3.4.4 Dosage d'ATP

Le dosage de la quantité d'ATP produite par les différentes lignées a pour but d'étudier l'impact de la mutation A3243G sur la capacité de la chaîne respiratoire à produire de l'ATP. L'ATP cellulaire peut être mitochondrial ou non mitochondrial (majoritairement glycolytique).

L'utilisation d'oligomycine nous permet d'évaluer la quantité d'ATP total due à la production mitochondriale, en effet cet inhibiteur cible spécifiquement le tunnel à proton de l'ATP synthase et va donc inhiber la production mitochondriale d'ATP. (nombre d'expériences N=5)

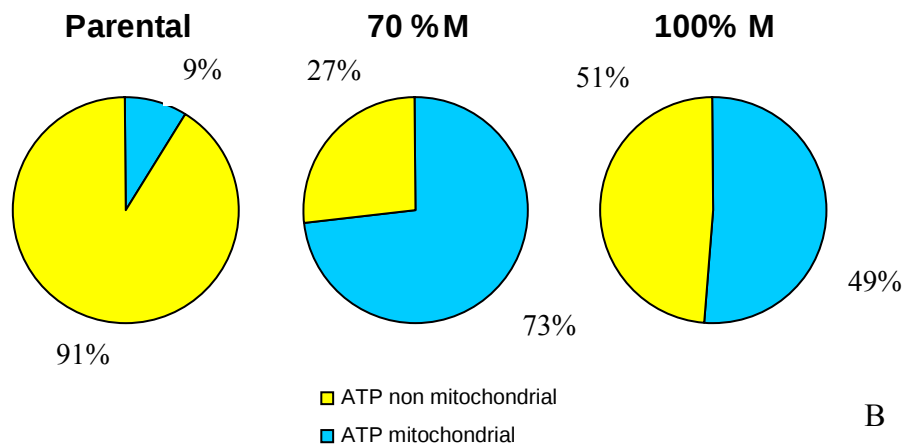
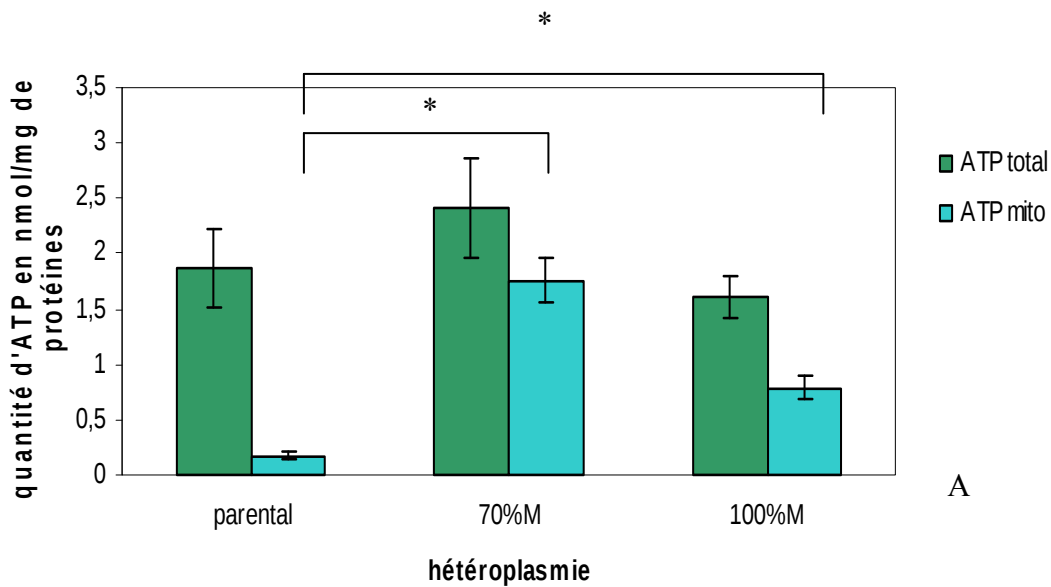


Figure 23 :

A : Dosage et provenance de l'ATP produit (ATP total et mitochondrial) par les différentes lignées cellulaires en fonction de leur hétéroplasmie (*= $p \leq 0,05$)

B : Représentation des proportions ATP mitochondrial et ATP non mitochondrial (%)

La majorité de l'ATP produit par les cellules parentales est d'origine non mitochondriale (Figure 23 A et B), et donc majoritairement glycolytique. Tandis que les cellules possédant la mutation A3243G 70%M ont une production d'ATP majoritairement mitochondriale montrant que leur métabolisme est principalement oxydatif. Concernant les cellules homoplasmiques 100%M leur production d'ATP étant à 50% d'origine mitochondriale, leur métabolisme semble être autant oxydatif que glycolytique.

3.5 Etude du stress oxydant

Les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire mitochondriale peuvent favoriser des réactions entre les électrons et l'oxygène moléculaire créant ainsi des Espèces Réactives de l'Oxygène ou ERO. L'aconitase est une enzyme du cycle de Krebs caractérisée par un centre fer/soufre et donc très sensible à l'oxydation par les ERO, tandis que la fumarase est insensible aux ERO. (nombre d'expériences N=4)



Figure 24 :

Structure 3D de l'Aconitase avec son centre Fer(jaune)-Soufre(violet)

www.chemgapedia.de

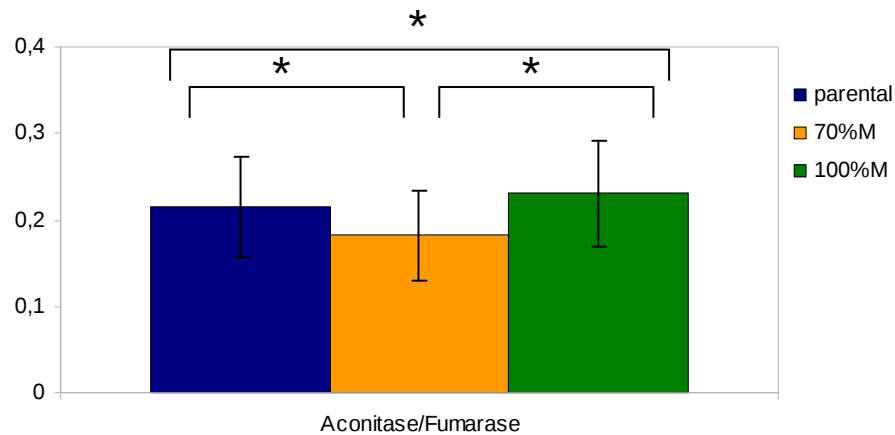


Figure 25 :

Résultats du dosage des activités enzymatiques de l'aconitase et de la fumarase en fonction de l'hétéroplasmie. (70%M et 100%M) comparée à la lignée parentale

On remarque que le ratio aconitase/fumarase n'est pas significativement différent entre les lignées parentales, 70%M et 100%M (Figure 25). On peut en déduire que le stress oxydant n'est pas augmenté par l'intermédiaire des ERO dans les cellules portant la mutation par rapport à la lignée parentale.

3.6 Analyse des quantités de nucléotides pyridiniques (NAD, NADH, NADP, NADPH)

Les quantités en cofacteurs libres et liés (NAD⁺, NADH, NADP⁺ et NADPH) ont été extraits à partir de cellules ND fraîchement récoltées, puis dosées au moyen d'une méthode de recyclage enzymatique. Pour les trois lignées cellulaires, les expériences ont été menées à partir de 4 cultures indépendantes (nombre d'expériences N=4).

Les résultats obtenus sont exprimés en pmoles / µg de protéines (Figure 26).

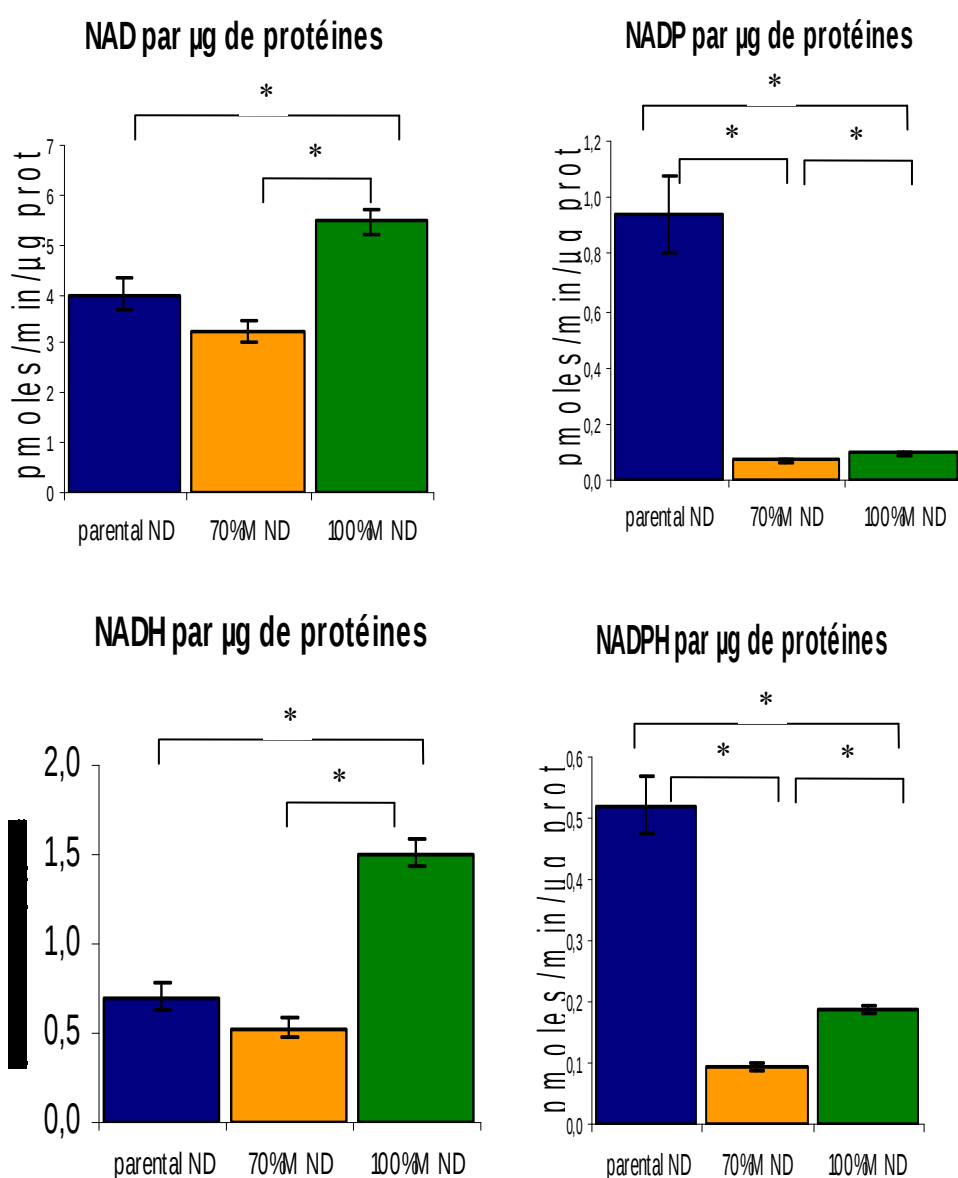


Figure 26 :

Quantités en nucléotides pyridiniques : NAD⁺, NADH, NADP⁺ et NADPH en fonction du taux d'hétéroplasmie des lignées non différenciées. (*) p<0,05.

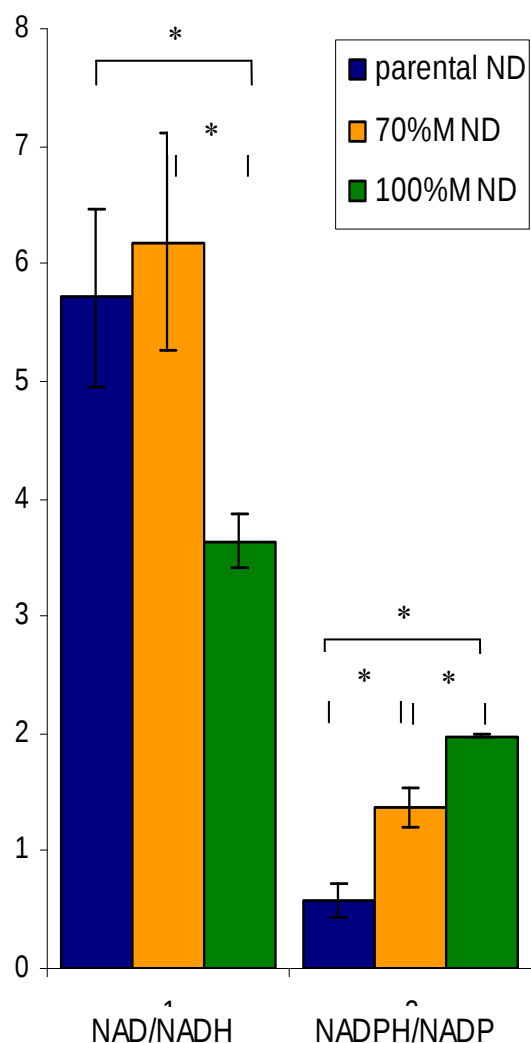


Figure 27:

Rapports NAD⁺/NADH et NADPH/NADP⁺

A partir des valeurs présentées dans la figure 26, nous avons calculé la quantité totale en cofacteurs (NAD⁺ + NADH + NADP⁺ + NADPH) dans les 3 lignées. Ainsi, les 70 %M présentent une quantité totale ($3,9 \pm 0,3$ pmoles / μ g de protéines), deux fois plus faible que celle des 100% M et des cellules parentales, respectivement caractérisées par $7,2 \pm 0,4$ et $6,2 \pm 0,6$ pmoles / μ g de protéines. Ceci peut s'expliquer par une consommation accrue des nucléotides pyridiniques due à une prolifération plus soutenue des 70%M. Comme le montre la figure 26, cette faible quantité totale en cofacteurs dans les 70%M résulte surtout d'une moindre quantité des formes phosphorylées, NADP(H), vraisemblablement consommées à la suite d'une activité de biosynthèse associée à des réactions de détoxification plus intenses dans cette lignée.

Les quantités en NAD(H) des 70 %M sont comparables à celles des parentales ; ceci peut se comprendre de la part de cellules mutantes dont l'activité des complexes II et IV est augmentée et qui ont adopté un métabolisme oxydatif plus intense vraisemblablement pour pallier leur mutation.

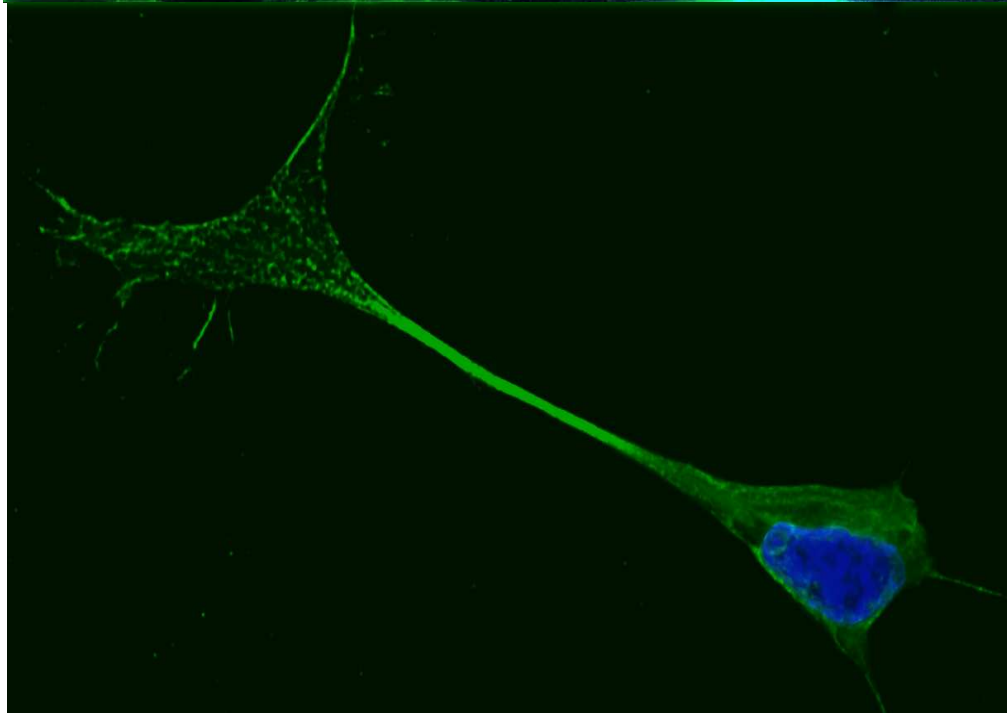
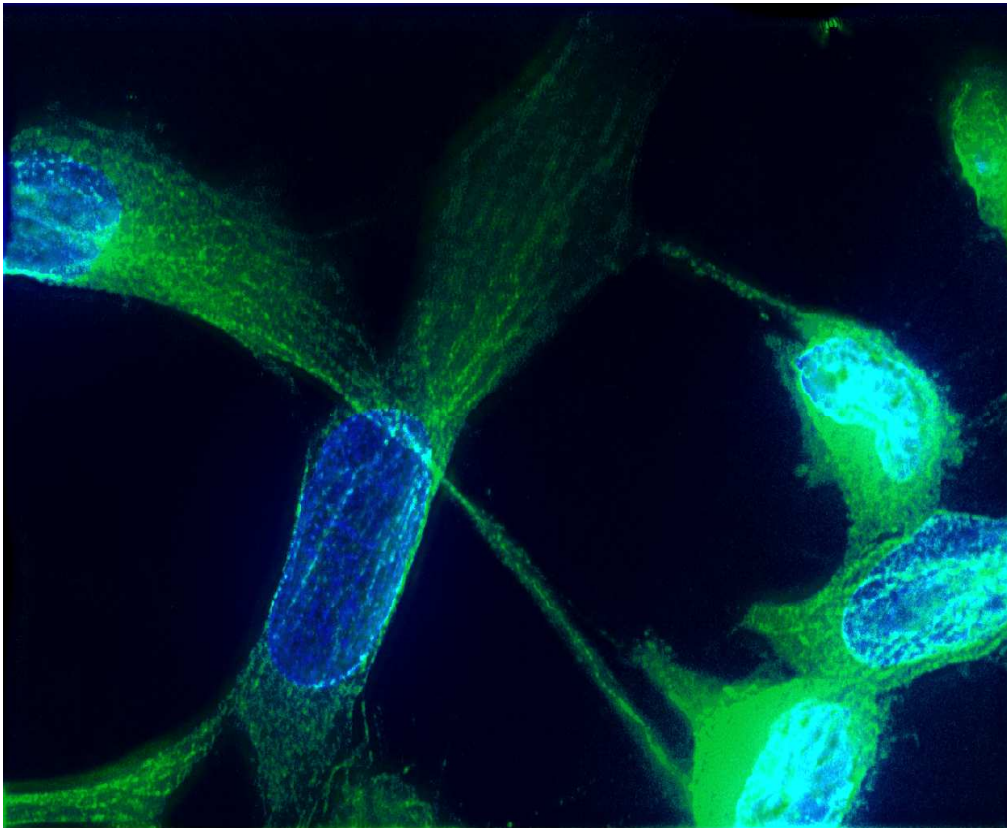
Si les cellules parentales et les 100% M présentent une quantité totale en cofacteurs peu différente ($6,2 \pm 0,6$ et $7,2 \pm 0,4$ pmoles / μ g de protéines), par contre elles se distinguent fortement dans la répartition de chaque cofacteur. En effet, comparées aux cellules parentales, les 100%M ont de plus grandes quantités en NAD⁺ et NADH (40 et 114 % respectivement), et de plus faibles quantités en NADP⁺ et NADPH (90% et 63 % respectivement).

Toutefois, quelque soit le type de cofacteurs, les 100%M restent plus riches que les 70%M ; il est d'ailleurs intéressant de noter que les formes réduites y sont plus élevées, d'un facteur 2,7 pour le NADH, et de 2 pour le NADPH. Le NADH étant le donneur d'électron clé du complexe I de la chaîne respiratoire, le déficit en complexe I observé dans les 100%M permet de comprendre la forte quantité de NADH mal ré-oxydé dans cette lignée.

Les quantités en NAD⁺ et en NADPH ont été rapportées aux quantités en NADH et NADP⁺, respectivement (Figure 27). Le potentiel réduit est de loin le plus important dans les 100%M. Le rapport NAD⁺/NADH dans ces cellules y est 1,6 fois plus faible que celui des parentales et des 70%, dont les rapports NAD⁺/NADH restent similaires. Le rapport NADPH/NADP dans les 100%M est également 3,3 fois plus élevé que celui des parentales et 2,5 fois plus que celui des 70%M. Enfin il est à noter que les 70%M se distinguent des parentales uniquement au niveau du rapport des formes phosphorylées (NADPH/NADP), 2,3 fois plus grand dans les cellules 70%M.

3.7 Analyse de la différenciation neuronale

A



B

Figure 28 :

observation en épifluorescence de cellules parentales marquées pas la β 3 tubuline et le DAPI. A : cellules non différenciées B : cellules différenciées

L'intensité de la fluorescence émise est proportionnelle à l'expression de la $\beta 3$ tubuline dans les cellules. Ces images ont été obtenues à partir de cellules SHSY-5Y de la lignée parentale non différenciées (Figure 28 A) et différenciées (Figure 28 B).

On remarque que la fluorescence émise est plus importante dans les cellules différenciées que dans les cellules non différenciées. Les cellules non différenciées sont positives au marquage de la $\beta 3$ tubuline de par leur origine de type neuronal. On remarque que cette protéine spécifique des cellules neuronales est exprimée de manière prépondérante dans les cellules différenciées.

4. Discussion

Cette étude a analysé l'impact et les conséquences sur le fonctionnement cellulaire et mitochondrial de la mutation A3243G à différents taux d'hétéroplasmies sur un modèle cellulaire de type neuronal. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle animal pour étudier les effets de la mutation A3243G responsables en particulier de manifestations neurologiques. Cette mutation commune de l'ADNmt a fait l'objet de plusieurs études in vitro mais utilisant soit des lignées de type fibroblastique ou des cybrides transmitochondriaux issus de cellules 143B. Les conséquences de la mutation sur la sphère neurologique sont encore très mal connues.

Le variant A3243G de l'ADN mitochondrial est aussi l'une des mutations les plus fréquemment retrouvées dans la population générale (*Elliott et al., 2008*). La clinique associée à cette mutation dépend de la proportion ADN mutant / ADN sauvage ou hétéroplasmie, dans une cellule. A un fort taux d'hétéroplasmie, cette mutation peut entraîner l'apparition d'un syndrome MELAS (*Finsterer et al., 2007*). Il s'agit d'un syndrome combinant myopathie mitochondriale, encéphalopathie et acidose lactique au pronostic sévère. (*Sproule et Kaufmann, 2008*). Afin d'étudier l'impact du taux d'hétéroplasmie sur la prolifération et le métabolisme énergétique, nous avons utilisé un modèle cybride de type neuronal (*Gimenez Cassina et al., 2006*) portant la mutation A3243G à différents taux d'hétéroplasmie.

Les résultats obtenus à partir de cellules SHSY-SY 70%M (hétéroplasmique) et 100%M (homoplasmiqque) ont été comparés à ceux issus des cellules parentales. Ceci nous a permis de montrer par différentes techniques que le taux de mutants influence le métabolisme énergétique et cellulaire.

Le métabolisme oxydatif de la lignée hétéroplasmique 70%M est augmenté

Différentes études montrent qu'il existe un seuil d'ADN mitochondrial muté : seuil critique où les modifications phénotypiques apparaissent, notamment pour des organes dépendant étroitement du métabolisme énergétique, cas du système nerveux central (*Wallace et al, 2007*).

Il apparaît que les cellules hétéroplasmiques (70%M) ont une capacité proliférative beaucoup plus importante, à la différence de la lignée homoplasmiq (100%M) ou de la lignée parentale. Ceci est associé à une augmentation de la production de pyruvate dans ces cellules et une diminution de la production de lactate ainsi qu'une quantité totale en pyridines nucléotides plus faible. Le dosage de l'ATP produit par ces cellules a démontré que la production d'ATP est principalement d'origine mitochondriale. De plus, leur capacité à proliférer dans un milieu à concentration réduite en glucose ou en présence exclusive de galactose conforte l'hypothèse que ces cellules ont un métabolisme oxydatif prédominant contrairement aux cellules parentales qui, elles, sont principalement glycolytiques. La diminution des formes phosphorylées, NADP(H), résultant fort probablement d'une activité de biosynthèse accrue et/ou de réactions de détoxication plus soutenues dans les cellules 70%M renforce l'idée que **l'introduction de la mutation est responsable du changement métabolique observé dans nos lignées mutantes**.

Ceci laisse penser que dans les cellules 70%M, des mécanismes de compensation se mettent en place pour palier le déficit énergétique engendré par la mutation. Bentlage et al. (*Bentlage et al, 1996*) ont également montré sur des modèles fibroblastiques que le passage à plus de 70% d'ADN muté au niveau cellulaire, entraîne l'apparition d'un dysfonctionnement biochimique mitochondrial.

Les résultats obtenus en oxygraphie démontrent que cette compensation se traduit surtout par une augmentation significative de l'activité des principaux complexes de la chaîne respiratoire (complexes I, II et IV) et un rapport NAD^+/NADH similaire à celui des cellules parentales.

Les capacités du métabolisme oxydatif de la lignée homoplasmique mutante 100% M sont diminuées

Les cellules 100%M ont un comportement intermédiaire entre parentales et 70%M. En effet la prolifération des cellules 100%M est plus rapide que celles des cellules parentales mais moindre que celle des cellules 70%M. L'augmentation de la production de pyruvate associée à une forte concentration en lactate montre bien le caractère plutôt glycolytique de cette lignée. D'autant plus que lors de la croissance cellulaire, le milieu de culture de ces cellules jaunit très rapidement. Cette coloration est due au virage de l'indicateur coloré présent dans le milieu (rouge phénol) montrant une acidification de milieu. Une activité lactate déshydrogénase plus élevée (sans changements notables des niveaux d'expression de la protéine) a effectivement été observée dans les cellules 100%M (travaux de M1 de Nicolas Richard). Ceci va dans le sens d'une production de lactate nettement plus importante dans les cellules 100%M. Cependant, si les quantités de lactate mesurées dans les milieux de culture des cellules 100%M sont discordantes, c'est vraisemblablement parce qu'elles ont été sous estimées à cause d'une forte acidité des prélèvements utilisés pour les dosages du lactate. Il serait donc nécessaire de réitérer ces dosages en tamponnant le pH.

Le taux d'hétéroplasmie croissant entraîne une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire provoquant le changement du métabolisme glycolytique vers le métabolisme oxydatif.

Cependant au-delà d'un certain pourcentage d'hétéroplasmie ou effet seuil, les capacités de ce système de compensation sont dépassées et l'activité de la chaîne respiratoire diminue à son tour de façon significative. *Bentlage et al. (1996)* avaient déjà mis en évidence l'existence d'un seuil de 70%M pour la mutation A3243G à partir duquel ils observaient un dysfonctionnement biochimique mitochondrial progressif. Il a été montré pour la mutation A3243G que le passage à un taux supérieur à 95% mutant entraîne une baisse très sévère des capacités de la chaîne respiratoire à produire l'énergie nécessaire pour la cellule (*King et al., 1992*).

L'analyse des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et des rapports NAD^+/NADH montre que les cellules 100%M ont un métabolisme oxydatif proche de celui des cellules parentales et nettement inférieur à celui des cellules 70%M. La mutation à l'état homoplasmique entraîne donc un déficit sévère de la chaîne respiratoire. Un rapport NAD^+/NADH plus faible et des quantités en NADH plus abondantes dans les cellules 100%M

comparées aux cellules parentales, témoignent effectivement d'une chaîne respiratoire d'une plus faible capacité à oxyder le NADH dans les cellules 100%M. Une activité LDH plus importante dans les cellules ne suffit pas à éliminer le NADH, molécule délétère pour les cellules. Enfin, les travaux de Mathieu Baritaud faits parallèlement dans notre groupe, confirment la déstabilisation du métabolisme des cellules 100%M avec notamment une sensibilité plus forte à l'apoptose.

Le changement métabolique des cellules hétéroplasmiques pourrait s'expliquer par la capacité des mitochondries non mutées à compenser le défaut de métabolisme des mitochondries mutées. Cela se traduit par une augmentation des capacités de la chaîne respiratoire et explique le métabolisme majoritairement oxydatif des cellules hétéroplasmiques 70%M et un rapport NAD^+/NADH comparable à celui des cellules parentales. Au-delà de 70% de mutation les capacités de compensation métabolique par les mitochondries sauvages restantes sont dépassées et le métabolisme général de la cellule est altéré. À des taux d'hétéroplasmies supérieurs à 70% les cellules mutantes du modèle SHSY-5Y sont métaboliquement diminuées. Cette altération des capacités énergétiques est corrélée avec le phénotype clinique des patients atteints de MELAS et l'aggravation observée en fonction du degré d'hétéroplasmie mutant (*King et al, 1992*).

La prolifération cellulaire augmente en présence de la mutation A3243G de l'ADNmt

On note que l'introduction de la mutation ADNmt s'accompagne également d'une accélération de la prolifération cellulaire. Cette prolifération pourrait présenter un aspect délétère et semble être favorisée par les mécanismes de compensations énergétiques présents dans les cellules hétéroplasmiques 70%M.

Le rôle de la mitochondrie dans les processus de cancérogenèse fait toujours l'objet d'une intense controverse. Selon *Warburg (1956)*, les déficits de la phosphorylation oxydative pourraient représenter un élément déterminant dans l'initiation et/ou progression des phénomènes de cancérogenèse. La présence de mutations de l'ADNmt a aussi été démontrée dans de nombreuses pathologies tumorales (*Pedersen, 1978 ; Rustin, 2002*). Par exemple cette mutation A3243G a été montrée à l'état homoplasmique dans une biopsie de cancer colique alors que la mutation était absente dans les tissus sains du patient (tissu sain en périphérie de la tumeur ou dans le sang) (*Lorenc et al, 2003*).

Une étude de *Meierhofer et al. (2006)* portant sur des cellules tumorales issue de carcinome rénal et présentant la mutation A3243G à 89%M associée à une diminution des activités des complexes I et IV malgré une prolifération mitochondriale (activité citrate synthase augmentée, et ratio ADNmt/ADN nucléaire élevé) a conclut que la présence de la mutation ne provoquait pas d'augmentation du métabolisme oxydatif. Cette conclusion pourrait être expliquée par un effet seuil de 70% à partir duquel les effets de la mutation vont altérer le métabolisme oxydatif.

Récemment dans un travail sur le rôle de l'ADNmt sur le développement de tumeurs cancéreuses, *Park et al. (2008)* ont démontré qu'une mutation mitochondriale à l'état hétéroplasmique affectant la sous unité ND5 du complexe I favoriserait la tumorigénèse tandis que la même mutation homoplasmique aurait plutôt tendance à inhiber la croissance tumorale.

La production d'ERO et l'apoptose mitochondriale dues à l'impact de l'hétéroplasmie mitochondriale pourraient être responsables de ces variations pathogéniques.

Cet exemple montre l'importance du seuil d'ADN mitochondrial muté et corrobore nos observations sur le rôle délétère de l'hétéroplasmie mitochondriale.

5. Conclusion

Compte tenu de l'absence de modèle animal pour l'étude du syndrome MELAS, une des voies de recherche dans ce domaine utilise des modèles cellulaires reproduisant les pathologies mitochondriales. Ceux-ci permettent, à la fois, de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies et de définir de nouvelles cibles thérapeutiques.

Des études menées précédemment sur le modèle de cybrides 143B avaient déjà porté sur les effets de la mutation A3243G (modèle homoplasmique) et mis en évidence le défaut de la synthèse protéique ainsi que l'altération du complexe IV de la chaîne respiratoire (*Chomyn et al. 1992*).

En utilisant le modèle cybride SHSY-5Y porteur de la mutation A3243G, nous avons mis en évidence l'impact de l'hétéroplasmie mitochondriale sur le métabolisme cellulaire. À un taux de 70% d'hétéroplasmie une activation des principaux complexes de la chaîne respiratoire permet la production significative d'ATP d'origine mitochondriale et une régulation du statut intracellulaire en NAD^+ et NADH. Ce mécanisme de compensation énergétique n'est plus présent pour la lignée homoplasmique 100%M.

En outre nos résultats ont confirmé l'existence d'un effet seuil à 70% d'hétéroplasmie marquant une modification importante du métabolisme cellulaire. *Bentlage et al. (1996)* avaient déjà mis en évidence l'existence d'un seuil de 70% de mutation à partir duquel ils observaient un dysfonctionnement biochimique mitochondrial.

Nous avons pu observer et prouver le type neuronal de notre modèle ainsi que certaines de ses limites. Les différents résultats nous ont permis de mieux comprendre les mécanismes métaboliques mis en place dans le syndrome MELAS.

Les constatations faites quant à la prolifération cellulaire soulèvent la question du rapport bénéfice/risque du système de compensation des lignées hétéroplasmiques. Le bénéfice apporté par l'évolution vers le métabolisme oxydatif afin d'assurer les besoins énergétiques de la cellule. Mais cette activation du métabolisme oxydatif est aussi associée à une prolifération cellulaire. Ces données laissent suggérer que les mutations de l'ADNmt pourraient jouer un rôle important dans les phénomènes de cancérogenèse.

6. Perspectives

* A court terme nous poursuivrons l'étude de l'hétéroplasmie mitochondriale sur les processus de différenciation neuronale de ces lignées et son impact sur leur métabolisme cellulaire.

* De plus un autre projet a débuté dans le laboratoire visant à analyser l'impact de l'hétéroplasmie mitochondriale de la mutation A3243G au niveau transcriptionnel sur l'expression génique notamment lors de la différenciation neuronale. Ce projet nous permettra de savoir si le taux d'hétéroplasmie de l'ADNmt est corrélé avec des variations spécifiques du profil d'expression génique au cours de la différenciation neuronale. En effet la double origine génétique de la chaîne respiratoire implique des processus complexes de co-régulation dans l'expression des deux génomes, d'import et de mise en place des protéines, nécessitant l'intervention de nombreux acteurs nucléaires. Il est donc important de pouvoir analyser les conséquences de l'hétéroplasmie mitochondriale sur la machinerie transcriptionnelle.

Différentes stratégies de modulation des fonctions mitochondriales seront également évaluées in vitro ainsi que les effets thérapeutiques potentiels de molécules candidates agissant sur les fonctions mitochondriales: comme la modulation de la biogenèse mitochondriale par les activateurs des sirtuines.

* Des travaux concernant l'impact du résveratrol sur la biogenèse mitochondriale sont en cours au laboratoire. Le resvératrol, composé polyphénolique naturel stimule la biogenèse et le métabolisme mitochondrial dans des lignées cellulaires neuronales en activant la protéine déacétylase SIRT1 (*Westphal et al, 2007; Kim et al, 2007*). Il serait intéressant d'analyser les effets de l'induction de la biogenèse mitochondriale appliqué aux cellules de forte hétéroplasmie permettrait de stimuler la prolifération des mitochondries sauvages afin de diminuer le taux de mutant au sein des lignées mutantes et de favoriser la production énergétique. Au cours des dernières années, des efforts considérables ont permis d'améliorer le diagnostic des maladies mitochondriales mais leurs traitements font encore cruellement défaut.

Ces six mois d'immersion dans le domaine de la recherche expérimentale ont été une expérience très enrichissante autant sur le plan professionnel qu'humain. L'excitation et l'ébullition permanentes, propres au domaine de la recherche, que j'ai connues au quotidien dans ce laboratoire ont été la source d'une émulsion positive constante.

Cette expérience de recherche a été finalisée par la validation de mon diplôme de Master en juin 2009. Mes directeurs de travail de recherche au Laboratoire de Biochimie et de Biologie Moléculaire (INSERM U694) ont eu la gentillesse d'accepter que j'utilise les résultats obtenus dans le cadre de mon M2 comme base de ma thèse d'exercice en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Ce travail m'a également permis de réaliser l'importance du rôle du pharmacien dans une unité de recherche, j'ai ainsi pris conscience de l'avantage que représenterait la validation du concours de l'internat dans une carrière de chercheur. Les conseils avisés et emprunts de bienveillance de mes encadrants, m'ont confortée dans ma décision de me présenter au concours de l'internat par la suite afin d'orienter ma carrière vers le diplôme d'enseignant-chercheur.

Bibliographie

- Attardi G, Yoneda M, Chomyn A. (1995) Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems. *Biochim Biophys Acta*. 1271(1):241-8.
- Bedalov A. and Simon J.A. (2004) NAD to the rescue. *Science*. 305 : 954-955.
- Bentlage HA, Attardi G. (1996) Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived transmitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with the MELAS encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum Mol Genet*. 5(2):197-205.
- Biedler J.L., Helson L., and Spengler B.A. (1973) Morphology and Growth, Tumorigenicity, and Cytogenetics of Human Neuroblastoma Cells in Continuous Culture. *Cancer Res*. 33 : 2643-2652.
- Campbell "*Biologie*" (1995) Ed. De Boeck Université.
- Chomyn A., Martinuzzi A., Yoneda M., Daga A., Hurkot0., Johns D., Lai S.T., Nonaka I., Angelini C., and Attardi G.. (1992) MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 89 : 4221-4225.
- Denu J.M. (2005) The Sir2 family of protein deacetylases. *Current Opinion in Chemical Biology*. 9:431–440.
- DiMauro S. (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta*. 1658(1-2) : 80-88.
- Dráberová E., Lukás Z., Ivanyi D., Viklický V., Dráber P. (1998) Expression of class III beta-tubulin in normal and neoplastic human tissues. *Histochem Cell Biol*. 109(3) : 231-9.
- Elliott H.R., Samuels D.C., Eden J.A., Relton C.L. and Chinnery P.F. (2008) *Am J hum Genet*. 82(2) : 254-260.
- Encinas M., Iglesias M., Liu Y., Wang H., Muhaisen A., Ceña V., Gallego C., Comella J.X. (2000) Sequential treatment of SH-SY5Y cells with retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor gives rise to fully differentiated, neurotrophic factor-dependent, human neuron-like cells. *J Neurochem*. 75(3) : 991-1003.
- Finsterer J. (2007) Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA^{Leu}(UUR) mutation. *Acta Neurol Scand*. 116 : 1–14.
- Gallais S., Pou de Crescenzo M.A. and Laval-Martin D. (1998) Pyridine Nucleotides and Redox Charges during Germination of Non-dormant and Dormant Caryopses of *Avena sativa* L. *J. Plant Physiol*. 153 : 664-669.

- Gegg M.E., Cooper J.M., Schapira A.H.V., Taanman J.W.. (2009) Silencing of PINK1 Expression Affects Mitochondrial DNA and Oxidative Phosphorylation in Dopaminergic Cells. PLoS ONE. 4(3) : e4756.
- Gimenez-Cassina A., Lim F., Diaz-Nido J. (2006) Differentiation of a human neuroblastoma into neuron-like cells increases their susceptibility to transduction by herpesviral vectors. J. Neurosci Res. 84(4):755-67.
- Goto, Y., Nonaka, I. and Horai, S. (1991) A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. Nature 16, 651-653.
- Greco M, Villani G, Mazzucchelli F, Bresolin N, Papa S, Attardi G. (2003) Marked aging-related decline in efficiency of oxidative phosphorylation in human skin fibroblasts. FASEB J. 17(12) : 1706-8.
- Hill R.L., Bradshaw R.A. (1969) Fumarase. Methods Enzymol. 13 : 91-99.
- Horton, Moran, Ochs, Rawn et Scrimgeour (1994) "*Principes de Biochimie*", Ed. DeBoeck Universités.
- Ichai C., J.P. Guérin , X. Leverve , D. Grimaud. (2000) Le lactate en réanimation. Conférences d'actualisation 2000, Éditions scientifiques et médicales Elsevier SAS, et SFAR p. 503-524.
- Jämsä A., Hasslund K., Cowburn R.F., Bäckström A., Vasänge M. (2004) The retinoic acid and brain-derived neurotrophic factor differentiated SH-SY5Y cell line as a model for Alzheimer's disease-like tau phosphorylation. Biochem Biophys Res Commun. 319(3):993-1000.
- Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, Delalle I, Baur JA, Sui G, Armour SM, Puigserver P, Sinclair DA, Tsai LH. (2007) SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. EMBO J. 26(13):3169-79.
- King M.P., Attardi G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. Science. 246(4929) : 500-3.
- King, M.P., Koga, Y., Davidson, M., Schon, E.A., 1992. Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA^{Leu}(UUR) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. Mol. Cell Biol. 12, 480–490.
- Kirby D.M., Crawford M., Cleary M.A., Dahl H.H., Dennet X., Thorburn D.R. (1999) Respiratory chain complex I deficiency : an underdiagnosed energy generation disorder. Neurology. 52(6):1255-64.

- Koszegi T., Petrik J., Vladimir-Knezević S., Nagy S. (2007) Co-determination of ATP and proteins in Triton X 100 non-ionic detergent-opened monolayer cultured cells. *Luminescence*. 22(5) : 415-9.
- Krebs H.A., Holzach O. (1952) The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *Biochem J*. 52 : 527-528.
- Krishnan K.J., Greaves L.C., Reeve A.K. and Turnbull D. (2007) The ageing mitochondrial genome. *Nucleic Acids Research*. 35(22) : 7399–7405.
- Lin S.J. and Guarente L. (2003) Nicotinamide adenine dinucleotide, a metabolic regulator of transcription, longevity and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 15(2) : 241-6.
- Lorenc A, Bryk J, Golik P, Kupryjańczyk J, Ostrowski J, Pronicki M, Semczuk A, Szolkowska M, Bartnik E. (2003) Homoplasmic MELAS A3243G mtDNA mutation in a colon cancer sample. *Mitochondrion*. (2) : 119-24.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Faar A.L., Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1) : 265-75.
- Magni G., Amici A., Emanuelli M., Orsomando G., Raffaelli N., Ruggieri S. (2004) Structure and function of nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase. *Curr Med Chem*. 2004 Apr;11(7):873-85.
- May-Panloup P., Chrétien MF., Malthiery Y., Reynier P. (2004) Mitochondria and reproduction. *Med Sci (Paris)*. (8-9) : 779-83.
- Meas T., Laloi-Michelin M., Virally M., Ambonville C., Kevorkian J.-P., Guillausseau P.-J. (2009) Diagnostic clinique et biologique du diabète mitochondrial et particularités de sa prise en charge. *Rev Med Interne*. doi:10.1016/j.revmed.2008.11.017
- Meierhofer D, Mayr JA, Fink K, Schmeller N, Kofler B, and Sperl W. *British Journal of Cancer* (2006) Mitochondrial DNA mutations in renal cell carcinomas revealed no general impact on energy metabolism. 94 : 268 - 274.
- Miller S.W., Trimmer P.A., Davis Parker, Jr. W., and Davis R.E. (1996) Creation and Characterization of Mitochondrial DNA-Depleted Cell Lines with « Neuronal-Like » Properties. *J. Neurochem*. 67, 1897-1907.
- Moraes CT, Ricci E, Bonilla E, DiMauro S, Schon EA. (1992) The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am J Hum Genet*. 50(5):934-49.

- Pallotti F., Baracca A., Hernandez-Rosa E., Walker W.F., Solaini G., Lenaz G., Melzi d'Eril G.V., DiMauro S., Shon E.A. and Davidson M. (2004) Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harboring mtDNA mutations. *Biochem J.* 384(Pt 2):287-93.
- Park H, Davidson E, King MP. (2008) Overexpressed mitochondrial leucyl-tRNA synthetase suppresses the A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *RNA.* 14(11):2407-16.
- Pedersen, P.L. (1978) Tumor mitochondria and the bioenergetics of cancer cells. *Proc. Exp. Tumor Res.*, 22, 190-274.
- Rolfe D.F. et Brown G.C. (1997) « Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. » *Physiological Reviews* 77(3) : 731-58.
- Ross R.A., Spengler B.A., Biedler J.L. (1983) Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 71(4) : 741-7.
- Rustin P., Chretien D., Bourgeron T., Gerard B., Rotig A., Saudubray J.M., Munnich A. (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin chim Acta.* 228(1):35-51.
- Rustin, P. (2002) Mitochondria, from cell death to proliferation. *Nat. Genet.*, 30, 352-353.
- Sarzi E., Brown M.D., Lebon S., Chretien D., Munnich A., Rotig A., and Procaccio V. (2007) A Novel Recurrent Mitochondrial DNA Mutation in ND3 Gene Is Associated With Isolated Complex I Deficiency Causing Leigh Syndrome and Dystonia. *American Journal of Medical Genetics* 143A :33 – 41.
- Schaefer A.M., McFarland R., Blakely E.L., He L., Wittaker R.G., Taylor R.W., Chinnery P.F. and Turnbull D.M. (2008) Prevalence of Mitochondrial DNA Disease in Adults. *Ann Neurol.* 63 : 35-39.
- Sproule D.M. and Kaufmann P. (2008) Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Strokelike Episodes Basic Concepts, Clinical Phenotype, and Therapeutic Management of MELAS Syndrome. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1142: 133–158.
- Van Eijsden R.G.E., Eijssen L.M.T., Lindsey P.J., van den Burg C.M.M., de Wit L.E.A., Rubio-Gozalbo M.E., de Die C.E.M., Ayoubi T., Sluiter W., de Coo I.F.F. and Smeets H.J.M. (2008) Termination of damaged protein repair defines the occurrence of symptoms in carriers of the m.3243A>G tRNA^{Leu} mutation. *J. Med. Genet.* 45 : 525-534.
- Wallace D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science.* 283 : 1482-1488.

- Wallace D.C., Lott M.T., and Procaccio V. (2007) Mitochondrial genes in degenerative diseases, cancer and aging. Emery and Rimoin's Principle and Practice of Medical Genetics. Elsevier editor Chapter 13, 194-298.
- Warburg, O. (1956) On the origin of cancer cell. Science, 123, 309-314.
- Westphal CH, Dipp MA, Guarente L. (2007) A therapeutic role for sirtuins in diseases of aging? Trends Biochem Sci. 12:555-60.
- Whittaker R.G., Schaefer A.M., McFarland R., Taylor R.W., Walker M., Turnbull D.M.. (2007) Prevalence and progression of diabetes in mitochondrial disease. Diabetologia. 50:2085–2089.
- Zhang Q., Piston D.W, Goodman R.H. (2002) Regulation of corepressor function by nuclear NADH. Science. 295(5561) : 1895-7.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 24 septembre 2009

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE

présenté par Lucie WILHELM

Sujet : Heteroplasmie Mitochondriale :Impact sur les fonctions
mitochondriales lors de la
différenciation neuronale.Jury :

Président : Professeur Bertrand RICH

Juges : Joël COULON (Directeur)
Philippe LEVY (Pharmacien)

Vu,

Nancy, le 28-08-09

Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

Pr B. Rich

Dr J. COULON

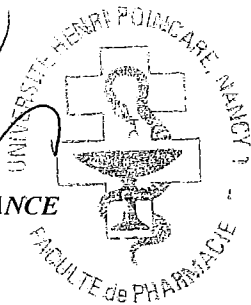
M.

M.

Vu et approuvé,

Nancy, le

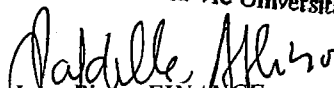
31 AOUT 2009

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,
Chantal FINANCE


Vu,

Nancy, le 3.09.09

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy 1,

Pour le Président
et par Délégation,
La Vice-Présidente du Conseil
des Etudes et de la Vie Universitaire,
Jean-Pierre FINANCE
C. CARDEVILLE-ATKINSON

N° d'enregistrement :

3341

N° d'identification :

TITRE

HETEROPLASMIE MITOCHONDRIALE :
Impact sur les fonctions mitochondriales lors de la différenciation neuronale

Thèse soutenue le 24 septembre 2009

Par **Lucie WILHELM**

RESUME :

De nombreuses mutations touchant les gènes de l'ADN mitochondrial (ADNmt) sont responsables de maladies mitochondriales. L'expression phénotypique au niveau cellulaire dépend en grande partie des proportions d'ADN normal et d'ADN muté (phénomène d'hétéroplasmie). Le syndrome neurologique de MELAS est associé à la présence d'une mutation hétéroplasmique de l'ADNmt en position A3243G.

Ce travail a porté sur l'analyse des effets de l'hétéroplasmie de la mutation A3243G de l'ADNmt sur le métabolisme énergétique mitochondrial lors de la prolifération et de la différenciation neuronale. Deux lignées de cybrides, construites à partir de la lignée neuronale parentale SH-SY5Y, portant 70 % et 100% de la mutation mitochondriale, et capables de différenciation neuronale, ont été analysées et comparées à la lignée parentale. Les résultats présentés mettent en évidence : **1-** un changement métabolique dans les lignées mutantes. En effet, le métabolisme de type glycolytique dans la lignée parentale devient de type oxydatif dans la lignée 70%M, puis présente des capacités considérablement diminuées dans la lignée homoplasmique 100%M. **2-** une prolifération cellulaire plus importante lorsque le taux de mutation augmente suggérant que les déficits de la phosphorylation oxydative seraient déterminant dans l'initiation et/ou la progression des phénomènes de cancérogenèse.

L'ensemble de ces résultats ouvrent des perspectives quant à l'utilisation des cybrides SHSY-5Y comme modèle d'étude pour le MELAS mais aussi pour la recherche de stratégies à visée thérapeutique afin de moduler la fonction mitochondriale.

MOTS CLES : mitochondrie, ADN mitochondrial, hétéroplasmie, mutation A3243G, syndrome MELAS, cybride, lignée SHSY5Y, métabolisme oxydatif et glycolytique.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Professeur Vincent PROCACCIO Professeur Joël COULON		Expérimentale ☒ Bibliographique ☐ Thème ☒

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle