



HAL
open science

Etude des effets mitochondriaux du monoxyde d'azote : Régulation de l'oxydation phosphorylante et de la transition de perméabilité

Pascaline Clerc

► **To cite this version:**

Pascaline Clerc. Etude des effets mitochondriaux du monoxyde d'azote : Régulation de l'oxydation phosphorylante et de la transition de perméabilité. Biochimie [q-bio.BM]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00364967

HAL Id: tel-00364967

<https://theses.hal.science/tel-00364967>

Submitted on 28 Feb 2009

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.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER - GRENOBLE 1

SCIENCES-TECHNOLOGIE-SANTE

Année 2006

N°

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire et Intégrative

présentée et soutenue publiquement le 3 mars 2006

par

Pascaline CLERC

Etude des effets mitochondriaux du monoxyde d'azote :

Régulation de l'oxydation phosphorylante et de la transition de perméabilité

Directeur de thèse : Pr. Eric FONTAINE

JURY

Professeur Michel ROBERT-NICOUD	Président
Professeur Peter RADERMACHER	Rapporteur
Professeur Michel RIGOLET	Rapporteur
Professeur Xavier LEVERVE	Examineur
Professeur Eric FONTAINE	Directeur

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée – INSERM E0221

Sommaire

Sommaire	1
Listes des figures et tableaux.....	6
Abréviations.....	9
Avant propos.....	12
Introduction	15
I. Le monoxyde d'azote.....	16
I.1. Biosynthèse.....	16
I.2. Les NO synthases : structure et fonctions.....	17
I.2.1. <i>nNOS</i> ou <i>NOS I</i>	18
I.2.2. <i>NOS</i> ou <i>NOS II</i>	19
I.2.3. <i>eNOS</i> ou <i>NOS III</i>	20
I.2.4. <i>mtNOS</i>	21
I.3. Effets cellulaires du NO.....	23
I.3.1. <i>Rôle du NO dans le système cardiovasculaire</i>	24
I.3.1.1. Le système cardiovasculaire	24
I.3.1.2. Mécanisme d'action	24
I.3.2. <i>Le NO et le sang</i>	25
I.3.3. <i>Rôle du NO dans le système nerveux</i>	25
I.3.3.1. La plasticité neuronale	25
I.3.3.2. Le NO comme neurotransmetteur.....	26
I.3.4. <i>Rôle du NO dans le système immunitaire</i>	26
I.3.5. <i>Rôle du NO dans le système digestif et urogénital</i>	27
I.4. Pathologies et dysrégulation de la biodisponibilité du NO.....	27
I.4.1. <i>Excès de NO</i>	28
I.4.1.1. Ischémie cérébrale	28
I.4.1.2. Maladies neurodégénératives.....	28
I.4.1.2.1. Maladie de Parkinson.....	28
I.4.1.2.2. La maladie d'Alzheimer	29
I.4.1.3. Choc septique.....	29
I.4.1.4. Diabète de type 2	29
I.4.1.5. Maladies inflammatoires.....	30
I.4.2. <i>Déficit en NO</i>	30
I.4.2.1. Maladies cardiovasculaires – Athérosclérose	30
I.4.2.2. Hypertension	31
I.4.2.3. Angine de poitrine.....	31
II. La mitochondrie.....	33
II.1. Découverte et structure.....	33
II.2. La chaîne respiratoire	34
II.2.1. <i>Complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoréductase</i>	35
II.2.1.1. Structure.....	35
II.2.1.2. Fonction	36
II.2.2. <i>Complexe II ou Succinate-ubiquinone oxydoréductase</i>	36
II.2.2.1. Structure.....	36
II.2.2.2. Fonction	37
II.2.3. <i>Le complexe III ou ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase ou complexe bc1</i>	37

II.2.3.1. Structure	37
II.2.3.2. Fonction.....	38
II.2.4. <i>Le complexe IV ou cytochrome c oxydase</i>	40
II.2.4.1. Structure	40
II.2.4.2. Fonction.....	40
II.2.5. <i>L'ATP synthase</i>	41
II.2.5.1. Structure	41
II.2.5.2. Fonction.....	42
II.3. Les systèmes de transport.....	43
II.4. Transport du calcium.....	45
III. NO et mitochondrie.....	47
III.1. Inhibition de la respiration	47
III.2. Inhibition irréversible : rôle du NO et de ses dérivés	48
III.3. NO et complexe I	49
III.4. NO et cytochrome c oxydase	50
III.4.1. <i>Site de fixation</i>	50
III.4.2. <i>Inhibition de la cytochrome oxydase</i>	53
IV. L'oxydation phosphorylante.....	55
IV.1. Théorie chimio-osmotique de Mitchell.....	55
IV.2. Contrôle de l'oxydation phosphorylante.....	57
IV.2.1. <i>Les concepts</i>	57
IV.2.2. <i>Contrôle de l'oxydation phosphorylante par l'apport en substrats respiratoires</i>	60
IV.3. Modification du rendement de l'oxydation phosphorylante.....	61
IV.3.1. <i>Perméabilité membranaire aux protons : leak</i>	61
IV.3.2. <i>Patinage des pompes à protons : slipping</i>	63
IV.3.3. <i>Nature des équivalents réduits</i>	67
V. Mort cellulaire et mitochondrie	69
V.1. Le pore de transition de perméabilité.....	69
V.1.1. <i>Le phénomène de transition de perméabilité</i>	69
V.1.2. <i>Le PTP et sa régulation</i>	70
V.1.3. <i>La nature du PTP</i>	72
V.2. Rôle de la mitochondrie dans le processus de mort cellulaire	73
V.2.1. <i>Famille Bcl-2</i>	74
V.2.2. <i>Le PTP</i>	75
VI. Le NO et la mort cellulaire	76
VI.1. Effets pro-apoptotiques du NO	77
VI.1.1. <i>La transition de perméabilité</i>	77
VI.1.2. <i>Peroxydation lipidique</i>	78
VI.1.3. <i>Régulation des protéines de la famille Bcl-2</i>	79
VI.2. Effet anti-apoptotique du NO	79
Materiel et Methodes	81
I. Animaux	82
II. Traitement aigu au monoxyde d'azote.....	82
III. Matériel expérimental.....	82
III.1. Mitochondries isolées de foie	82
III.1.1. <i>Préparation des mitochondries isolées</i>	82
III.1.2. <i>Détermination de la concentration protéique mitochondriale</i>	83

III.2. Hépatocytes isolés	83
III.2.1. Principe d'isolement	83
III.2.2. Procédure d'isolement	84
III.2.3. Appréciation de la qualité de la suspension cellulaire	85
III.3. Culture Cellulaire	86
III.3.1. Conditions de culture	86
III.3.2. Lignées cellulaires.....	86
III.3.3. Prélèvement cellulaire.....	87
IV. Méthodes.....	87
IV.1. Perméabilisation des cellules	87
IV.2. Techniques de mesures	88
IV.2.1. Oxygraphie	88
IV.2.2. Détermination du rendement de l'oxydation phosphorylante	89
IV.2.3. Quantification du glucose-6-phosphate	90
IV.2.4. Détermination de l'activité ATPasique	91
IV.2.5. Quantification des nucléotides adényliques par HPLC	91
IV.2.6. Mesure de la capacité de rétention calcique	92
IV.2.7. Détermination de la différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\psi$)	93
IV.2.8. Détermination de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes b, c + c1 et a + a ₃	93
IV.2.9. Mise en évidence de l'activité P-gp.....	94
IV.2.10. Détermination du taux de mortalité cellulaire	95
IV.2.10.1. Exclusion du bleu trypan.....	95
IV.2.10.2. Marquage à l'iodure de propidium.....	95
IV.2.11. Périfusion d'hépatocytes	95
IV.2.12. Fractionnement cellulaire : Séparation du milieu cytosolique et mitochondrial.....	98
IV.2.13. Dosage enzymatique des métabolites extracellulaires par spectrophotométrie	99
IV.2.13.1. Glucose.....	100
IV.2.13.2. Lactate.....	100
IV.2.13.3. Pyruvate	101
V. Statistiques	101
Resultats et Discussion	103
Effets du NO sur le Rendement de l'Oxydation Phosphorylante	104
I. Problématique	105
II. Mise au point expérimentale	108
III. Résultats	112
III.1. Effet du DPTA-NONOate sur la chaîne respiratoire	112
III.1.1. DPTA-NONOate et respiration mitochondriale en présence de TMPD/Asc - Complexe IV.....	112
III.1.2. DPTA-NONOate et respiration mitochondriale en présence de succinate - Complexe II	113
III.1.3. DPTA-NONOate et respiration mitochondriale en présence de glutamate/malate - Complexe I.....	114
III.1.4. Effets du DPTA sur l'activité ATPasique.....	114
III.2. Effets du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante en fonction de la nature des équivalents réduits.....	116
III.2.1. Effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante lors de l'énergisation du complexe II.....	116

III.2.2. Effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante lors de l'énergisation par le complexe I.....	118
III.2.3. Effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante lors d'un apport en NADH et FADH ₂	120
III.3. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice : « leak » ou « slipping » ?.....	125
III.3.1. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice à l'état non-phosphorylant.....	126
III.3.2. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice à l'état-phosphorylant.....	129
III.3.2.1. Effets d'un changement de stoechiométrie et d'un découplage de la chaîne respiratoire sur la force protonmotrice.....	129
III.3.2.2. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice.....	132
III.4. Etat d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire en fonction des substrats.....	135
IV. Discussion et Perspectives.....	139
IV.1. L'effet du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante est contrôlé par l'état redox des cytochromes aa ₃	139
IV.2. Effet du NO sur le métabolisme cellulaire hépatique – Résultats préliminaires.....	141
Regulation du PTP par l'Inhibition des Complexes I et II de la Chaîne Respiratoire.....	148
I. Problématique.....	150
II. Résultats – Discussion.....	150
II.1. Effet du NO sur la mort cellulaire.....	150
II.2. Conséquences de l'inhibition du complexe II sur la mort cellulaire.....	155
II.2.1. Effet du TTFA sur la régulation du Pore de Transition de Perméabilité et la respiration mitochondriale.....	155
II.2.2. Effet du TTFA sur la respiration cellulaire et la mort cellulaire.....	157
II.2.3. Inhibition du complexe II par le TTFA : Effets sur la respiration et la capacité de rétention calcique.....	158
II.2.4. Inhibition du complexe I par le TTFA : Effets sur la respiration et la capacité de rétention calcique.....	160
II.2.5. Effets des inhibiteurs spécifiques des complexes I et II sur la respiration et la capacité de rétention calcique.....	161
II.2.6. Effets d'un traitement au TTFA sur la mort cellulaire.....	165
III. Discussion et perspectives.....	169
III.1. Effets du NO sur le pore de transition de perméabilité.....	169
III.2. Effets du TTFA sur le PTP et la mort cellulaire.....	170
III.3. Régulation de l'ouverture du PTP et inhibition des complexes I et II de la chaîne respiratoire.....	171
Conclusion.....	174
Bibliographie.....	177
Publication.....	197

Listes des figures et tableaux

INTRODUCTION

Figure I- 1 : Réaction de biosynthèse du NO.....	16
Figure I- 2 : Mécanisme fonctionnel des NOS.....	18
Figure I- 3 : Nitric Oxide Synthase neuronale (nNOS).....	19
Figure I- 4 : Nitric Oxide Synthase inductible (iNOS).....	20
Figure I- 5 : Biosynthèse du NO par les cellules endothéliales et ses effets sur les fibres musculaires lisses.....	24
Figure I- 6: Récapitulatif des principaux sites de réaction du NO.....	27
Figure I-7: Ultrastructure mitochondriale.....	33
Figure I- 8 : La chaîne respiratoire et les sites d'action des inhibiteurs.....	35
Figure I- 9 : Structure du Complexe I.....	36
Figure I- 10 : Structure du complexe II.....	37
Figure I- 11 : Structure du Complexe III.....	38
Figure I- 12 : Le cycle des quinones.....	39
Figure I- 13 : Structure du complexe IV.....	40
Figure I- 14 : Réduction du dioxygène au niveau du centre constitué par le cytochrome a ₃	41
Figure I- 15 : Structure de l'ATP synthase.....	42
Figure I- 16 : La catalyse multisite.....	43
Figure I- 17: Les systèmes de transport mitochondriaux du calcium.....	46
Figure I- 18 : Cycle catalytique de la cytochrome c oxydase et interaction avec le NO.....	52
Figure I- 19 : Coefficients de contrôle sur la respiration de mitochondries isolées.....	59
Figure I- 20 : Représentation du phénomène de fuite membranaire.....	62
Figure I- 21 : Relation entre la vitesse de respiration et la force protonmotrice.....	63
Figure I- 22 : Représentation du phénomène de patinage de la chaîne respiratoire.....	65
Figure I- 23 : Modélisation du fonctionnement des pompes à protons.....	66
Figure I- 24 : Phénomène de transition de perméabilité mitochondriale.....	69
Tableau I- 1: Sites d'expression et rôles des NOS.....	22
Tableau I- 2 : Rôles du NO dans l'athérosclérose.....	31
Tableau I- 3: Les systèmes de transports mitochondriaux.....	44
Tableau I- 4 : Récapitulatif des principales études menées sur les effets inhibiteurs de la respiration du NO.....	48
Tableau I- 5: Tableau récapitulatif des effets anti-apoptotiques et pro-apoptotiques du NO sur différents types cellulaires.....	76
Equation I- 1 : Réaction globale au niveau du complexe III.....	40
Equation I- 2: Réaction globale au niveau de la cytochrome oxydase.....	41
Equation I- 3 : Bilan du processus d'oxydation phosphorylante.....	61

MATERIEL ET METHODES

Figure M- 1: Structure chimique du DPTA-NONOate.....	82
Figure M-2 : Schéma du système hexokinase.....	90
Figure M-3: Schéma du système de périfusion.....	97
Figure M-4: Relations entre quelques voies du métabolisme intermédiaire et le métabolisme oxydatif.....	102

Tableau M- 1: Solutions nécessaires à l'isolement des hépatocytes.....	84
--	----

RESULTATS ET DISCUSSION

Figure RI-1: Corrélation entre le rendement de l'oxydation phosphorylante et le contenu en cytochrome aa3.	106
Figure RI-2 : Inhibition de l'état 3 de la respiration mitochondriale par le NO libéré par le DPTA-NONOate.....	109
Figure RI-3 : Effets du NO sur la respiration mitochondriale en présence de magnésium.....	111
Figure RI-4 : Effets du NO et du cyanure sur l'activité ATPasique.	115
Figure RI-5 : Effets du DPTA-NONOate et du cyanure sur le processus d'oxydation phosphorylante de mitochondries isolées de foie de rats en présence de succinate.....	117
Figure RI-6: Effets du DPTA-NONOate et du cyanure sur le processus d'oxydation phosphorylante de mitochondries isolées de foie de rat en présence de glutamate plus malate.	119
Figure RI-7: Effets du DPTA-NONOate sur le rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de succinate plus glutamate/malate.	121
Figure RI- 8 : Effets du succinate sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.	121
Figure RI-9 : Effets du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante de mitochondries isolées de foie de rats en présence de palmitoyl-carnitine.	123
Figure RI-10 : Effets du DPTA-NONOate et du cyanure sur la relation entre la consommation d'oxygène (JO_2) et la force protonmotrice ($\Delta\psi$) sur mitochondries isolées.	127
Figure RI-11 : Effets du « leak » sur la relation entre la consommation d'oxygène et la force protonmotrice.	128
Figure RI-12 : Effets du changement de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire et de l'augmentation du « leak » sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.	130
Figure RI-13 : Effets du changement de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire et de l'augmentation du « leak » sur la relation entre la consommation d'oxygène (JO_2) et la force protonmotrice ($\Delta\psi$).	132
Figure RI-14 : Effets du changement de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire et de l'augmentation du « leak » sur la relation entre la consommation d'oxygène (JO_2) et la force protonmotrice ($\Delta\psi$).	133
Figure RI-15 : Effets des substrats de la chaîne respiratoire sur l'état d'oxydo-réduction des cytochromes c+c1, b et a+a3.....	136
Figure RI-16 : Schéma récapitulatif du métabolisme du DHA et du glycérol.....	142
Figure RI-17: Effets du DPTA-NONOate sur le métabolisme du DHA et du Glycérol.....	143
Figure RI-18 : Effets du DPTA-NONOate sur la glycolyse et la néoglucogenèse.....	144
Figure RI-19 : Effets du DPTA-NONOate sur le potentiel rédox cytosolique.....	144
Figure RI- 20 : Effets du DPTA-NONOate sur le rapport ATP/ADP cytosolique (A) et mitochondrial (B).	145
Figure RI- 21 : Effets du DPTA-NONOate sur la somme des nucléotides adényliques cytosoliques (A) et mitochondriaux (B).	145
Tableau RI-1: Effets du DPTA-NONOate sur la respiration de mitochondries isolées.....	113
Figure RII-1 : Conséquence d'un traitement au DPTA-NONOate sur la mort cellulaire.....	151
Figure RII- 2 : Effets du DPTA-NONOate sur la mort cellulaire des cellules U937.	152
Figure RII- 3 : Effet d'un traitement au DPTA-NONOate sur la capacité de rétention calcique de cellules U937 perméabilisées.....	153

Figure RII- 4 : Effet du DPTA-NONOate sur la respiration de cellules U937 perméabilisées.	154
Figure RII- 5: Effets du TTFA sur la respiration mitochondriale.....	156
Figure RII- 6 : Effets du TTFA sur la capacité de rétention calcique.....	156
Figure RII- 7 : Effet du TTFA sur la respiration et la capacité de rétention calcique de la lignée KB.....	159
Figure RII- 8 : Effets du malonate sur la respiration cellulaire et la capacité de rétention calcique de cellules KB énergisées en succinate.....	162
Figure RII- 9 : Effets de la roténone sur la respiration cellulaire et la capacité de rétention de cellules KB énergisées par le glutamate-malate.	163
Figure RII- 10 : Effets des différents inhibiteurs des complexes I et II sur la relation entre la capacité de rétention calcique et la consommation d'oxygène.	164
Figure RII- 11 : Effets du TTFA sur la mort cellulaire.....	165
Figure RII- 12 : Effets du TTFA sur la respiration cellulaire.....	167
Figure RII- 13 : Activité de la P-gp dans les cellules KB.....	168

Abréviations

$\Delta\mu\text{H}^+$	Gradient électrochimique de protons
$\Delta\psi$	Différence de potentiel électrique de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne
Δp	Force protonmotrice
ΔpH	Différence de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne
Ach	Acétylcholine
ADP	Adénosine-5'-diphosphate
ANT	Transporteur des nucléotides adényliques
Asp	Aspartate
ATP	Adénosine-5'-triphosphate
ATPase	F_0-F_1 ATP synthase
ATP/O	Rendement de l'oxydation phosphorylante
BH ₄	Tétrahydrobioptérine
BSA	Albumine de sérum bovin
cGMP	Guanylate monophosphate cyclique
COX	Cytochrome c Oxydase
CRC	Capacité de rétention calcique
CsA	Ciclosporine A
DEA-NONOate	Diéthylèneamine NONOate
DETA-NONOate	Diéthylènetriamine NONOate
DHA	Dihydroxyacétone
DHAP	Dihydroxyacétone phosphate
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DNP	2,4-dinitrophénol
DO	Densité optique
DPTA-NONOate	Dipropylènetriamine NONOate
E3	Etat respiratoire phosphorylant
E4	Etat respiratoire non-phosphorylant
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EDTA	Acide éthylènediaminetétraacétique
EGTA	Acide éthylène glycol-bis (□-amino-éthyl éther) N,N, N',N'-tétraacétique
eNOS	endothelial Nitric Oxide Synthase

FAD ⁺ /FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite
FCCP	p-trifluorométhoxycarbonylcyanide phénylhydrazone
FMN	Flavine mononucléotide
GC	Guanylate cyclase
G6PDH	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
GSSG/GSH	Glutathion oxydé/réduit
GSNO	Nitrosoglutathion
HK	Hexokinase
HONO	Acide nitreux
HPLC	Chromatographie liquide à haute performance
INF- γ	Interféron- γ
INF-1 β	Interféron-1 β
iNOS	inductible Nitric Oxide Synthase
<i>JATP</i>	Flux de synthèse d'ATP
<i>JO₂</i>	Flux de consommation d'oxygène
LDH	Lactate déshydrogénase
L-NMMA	NG-monométhyl-L-arginine
MOPS	Acide 3 (N-morpholino)-propane sulfonique
NADH + H ⁺ /NAD ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit/oxydé
NADPH +H ⁺ /NADP ⁺	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit/oxydé
NF- κ B	Nuclear Factor- κ B
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartate
nNOS	neuronal Nitric Oxide Synthase
N ₂ O ₃	Trioxyde d'azote
NO	Monoxyde d'azote
NO ₂ ⁻	Nitrite
NOHA	N-hydroxy-L-arginine
NO ₂	Dioxyde d'azote
NOS	Nitric oxide synthase
ONOO ⁻	Peroxynitrite
PBS	Phosphate-buffered saline
Pi	Phosphate inorganique
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLT	Potentialisation à long terme

PS	Poids sec
PTP	Pore de transition de perméabilité
RNS	Espèces réactives dérivées de l'azote
ROS	Espèces réactives dérivées de l'oxygène
SERCA	Sarcoplasmic/Endoplasmic-Reticulum Ca ²⁺ -ATPase
SNAP	S-nitro-N-acetyl-D,L-penicillamine
SNOG	S-nitrosoglutathione
TMPD	N,N,N',N' tétraméthyl-1,4-phenylènediamine
TNF- α	Tumor necrosis factor α
Tris	Tris (hydroxyméthyl) amino méthane
TTFA	2-Thényltrifluoroacétone

Avant propos

En 1847, Ascanio Sobrero réalise la nitration de la glycérine à l'aide d'acides nitrique et sulfurique. Cette réaction, fortement exothermique, conduit à la formation d'un composé très instable, et fâcheusement explosif : la nitroglycérine. Sobrero, en expérimentateur zélé, alla même jusqu'à goûter son composé, ce qui lui provoqua une forte migraine pendant quelques heures qu'il ne put expliquer. Quelques années plus tard, Alfred Nobel, ayant eu connaissance de la découverte de la nitroglycérine, et conscient du potentiel de ce nouveau composé mais également de son instabilité, tenta de mettre au point une forme stable, ce qu'il réussit en 1863.

Dès 1859, les effets d'un premier composé nitré sur l'organisme sont connus et publiés. Guthrie Frederick constata en effet que l'inhalation d'amyl nitrite provoquait une augmentation du flux artériel carotidien, suivi immédiatement d'une rougeur au niveau du cou, des tempes et du front conjointement à une accélération du rythme cardiaque. Thomas Lauder Brunton, en 1867, fit avancer les connaissances sur ces composés nitrés, en observant que l'inhalation de nitrite par un patient souffrant d'une angine de poitrine, provoquait en moins d'une minute une augmentation du pouls et la disparition *quasi* instantanée de la douleur. Ses propriétés anti-angoreuses sont décrites en 1879 par Murrell (Murrell 1879), qui en démontre l'efficacité, par voie sub-linguale, dans le traitement curatif et préventif de l'angor. Malgré ces constats cliniques, ce n'est qu'en 1903, que François Franck suggéra que l'amyl nitrite pourrait être un vasodilatateur coronaire.

Il a fallu tout de même attendre près de 80 ans pour comprendre le mécanisme d'action de la nitroglycérine. Dans les années 70, Ferid Murad et ses collègues étudient l'action de différentes molécules à potentiel vasodilatateur dont la nitroglycérine, et cherchent à comprendre comment elles modifient l'activité guanylate cyclase (GC) (Furchgott *et coll.* 1980, Katsuki *et coll.* 1977). Ils montrèrent ainsi que la GC soluble, extraite de foie de rats, mais aussi de muscles lisses de trachées de bœufs, est stimulée par les nitrites. En effet, ces composés induisent une augmentation de cGMP qui, en retour, induit un relâchement musculaire. Murad suggère alors que l'activation de la guanylate cyclase est sans doute dûe à la formation de monoxyde d'azote (NO) puisqu'il observe le même effet en présence de la forme gazeuse du NO. En 1980, Furchgott et Zawadzki constatent *in vitro* que l'acétylcholine (Ach) n'induit pas toujours le relâchement des muscles lisses entourant les vaisseaux sanguins, contrairement à ce qui avait été démontré *in vivo* (Cherry *et coll.* 1982, Furchgott *et coll.* 1980). Ils mettent alors en évidence que les effets vasodilatateurs de l'Ach sur des préparations d'aortes thoraciques de lapin, ou d'autres vaisseaux sanguins, nécessitent la présence des cellules endothéliales. En effet, l'Ach agit sur les récepteurs muscariniques des cellules endothéliales provoquant alors la libération d'une

substance qui induit le relâchement des muscles lisses des vaisseaux sanguins. Cette substance a été appelée EDRF pour Endothelium-Derived Relaxing Factor.

Deux groupes de recherche ont joué un rôle primordial dans l'étude de cette substance : le groupe d'Ignarro (Ignarro 1989, Ignarro *et coll.* 1987) et celui de Moncada (Palmer *et coll.* 1987). En 1987, deux publications montrent des similitudes entre les effets de l'EDRF et du NO, concluant que l'EDRF n'est autre que le NO (Ignarro *et coll.* 1987, Palmer *et coll.* 1987).

Cette découverte des effets du NO sur le système cardio-vasculaire est la première démonstration du pouvoir régulateur d'un gaz sur l'organisme en tant qu'agent de communication entre les cellules.

Ce n'est qu'en 1998 que Furchgott, Murad et Ignarro furent honorés du Prix Nobel de Médecine pour avoir, respectivement, mis en évidence la production d'une substance à potentiel vasodilatateur par les cellules endothéliales : l'EDRF, démontré que l'effet vasodilatateur de l'EDRF est dû au NO et enfin identifié l'enzyme cytosolique GC soluble comme cible du NO dans le système cardiovasculaire.

La pharmacologie a permis de développer de nombreux médicaments comportant un ou plusieurs groupements NO. Le nitroprusside de sodium, la molsidomine et la linsidomine ainsi que des dérivés nitrés comme la trinitrine sont utilisés dans les cas de poussées hypertensives aiguës, d'insuffisances cardiaques, de traitement préventif de l'angine de poitrine et de spasme artériel coronaire. Pour l'anecdote, Alfred Nobel souffrant d'angine de poitrine, s'est vu prescrire de la nitroglycérine pour lutter contre son insuffisance cardiaque.

Dès lors, la recherche sur les effets du NO a connu un essor grandissant. Les dysrégulations de la biosynthèse du NO se sont révélées être impliquées dans un nombre important de pathologies. Par ailleurs, ces études ont mis en évidence que les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale représentent une cible majeure des effets cellulaires du NO.

Notre travail a pour but de renforcer notre compréhension des mécanismes de régulation des processus mitochondriaux d'oxydation phosphorylante et de transition de perméabilité. Ces fonctions mitochondriales sont primordiales à la survie cellulaire, l'oxydation phosphorylante étant la source majeure d'énergie cellulaire et la transition de perméabilité gouvernant le processus apoptotique.

Différents travaux menés au sein de notre laboratoire ont démontré que l'efficacité de l'oxydation phosphorylante était corrélée au contenu en cytochromes aa₃ constituant la cytochrome c oxydase. Le NO étant un puissant régulateur de la cytochrome c oxydase, nous nous sommes intéressés à ses effets sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.

D'autre part, de récentes études ont mis en évidence que l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire induisait une inhibition de l'ouverture du pore de transition de perméabilité, et par conséquent avait un effet anti-apoptotique. C'est pourquoi nous avons tenté de déterminer les effets du NO sur le pore de transition de perméabilité.

INTRODUCTION

I. Le monoxyde d'azote

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule endogène volatile, de faible poids moléculaire, très lipophile pouvant donc diffuser aisément au travers des membranes cellulaires.

Notre organisme est exposé à deux sources de monoxyde d'azote, l'une endogène *via* la biosynthèse et l'autre exogène provenant de la pollution atmosphérique et des fumées de cigarettes.

I.1. Biosynthèse

Dès la découverte des effets biologiques du NO, Palmer et coll. (Palmer *et coll.* 1988) mettent en évidence la réaction de biosynthèse du NO à partir de L-arginine qui est présente à forte concentration dans le sang (60 – 80 μM) et dans le milieu extracellulaire. La biosynthèse du NO à partir de L-arginine est catalysée par une famille d'enzymes héminiques : les NO synthases (NOS) et nécessite de nombreux cofacteurs qui sont : le NADPH, l' O_2 , la tétrahydrobioptérine (BH_4), le noyau hème (protoporphyrine IX de Fer), et la flavine mononucléotide et la flavine- adénine dinucléotide (FMN et FAD).

La L-arginine est tout d'abord hydroxylée en N-hydroxy L-arginine (NOHA) en présence d' O_2 et de NADPH, puis cet intermédiaire est oxydé en L-citrulline par la réduction du NADPH induisant la libération de NO (Figure I-1).

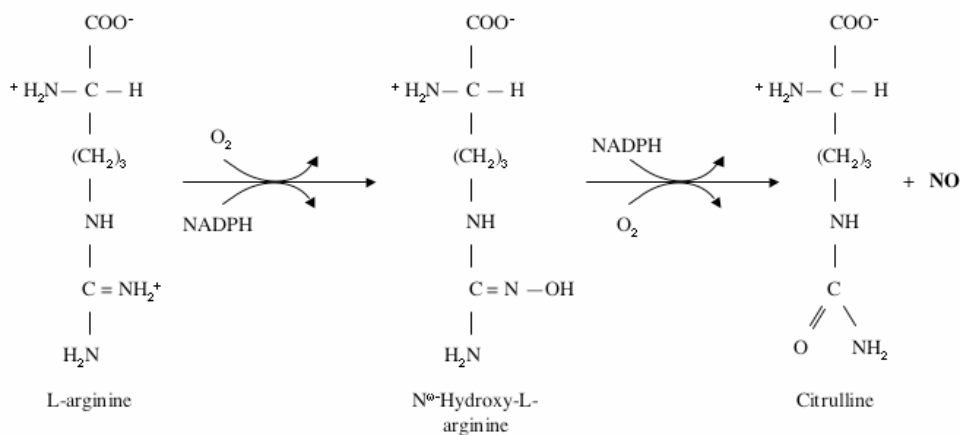


Figure I- 1 : Réaction de biosynthèse du NO.

Le NO peut être généré *in vivo* de façon non-enzymatique, par la réduction de nitrite NO_2^- si le pH est inférieur à 5 comme dans les situations d'ischémie (Zweier *et coll.* 1999).

La L-arginine peut être régénérée par la L-citrulline, puisqu'en présence d'aspartate, l'arginosuccinate synthétase va transformer la L-citrulline en fumarate puis en arginine.

L'arginine provient non seulement du renouvellement endogène mais aussi de l'apport exogène alimentaire (environ 5 g/jour). Le NO issu de sources alimentaires, $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$, peut également participer aux réactions inflammatoires indépendamment de l'activation des NOS.

I.2. Les NO synthases : structure et fonctions

Il existe 3 isoformes de NOS localisées dans le cytosol ou dans les membranes cellulaires : endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS), neuronal Nitric Oxide Synthase (nNOS) et inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS) (Stuehr 1999).

Ces 3 isoformes de NOS présentent de nombreuses similarités :

- elles utilisent toutes le même substrat : L-arginine
- elles nécessitent toutes les mêmes cofacteurs : BH_4 , FMN, FAD, NADPH, hème
- elles forment des dimères d'enzymes
- elles possèdent des sites de fixations spécifiques pour de nombreux cofacteurs nécessaires au transfert d'électrons essentiels à l'activité des enzymes
- elles présentent également une certaine homologie avec la cytochrome P_{450} réductase.

En plus des 3 isoformes déjà identifiées, il existerait également une NOS mitochondriale (mtNOS) dont la nature est encore très controversée.

Les NOS sont constituées d'un domaine oxygénase et d'un domaine réductase possédant chacun une activité catalytique (Figure I-2). Le domaine oxygénase contient le domaine de liaison pour les noyaux hèmes et la BH_4 . Le domaine réductase est quant à lui constitué d'un site de fixation pour les flavines FAD et FMN ainsi que pour le NADPH. Ces deux domaines sont reliés entre eux par un site de liaison à la calmoduline.

Les 2 iso-enzymes eNOS et nNOS sont exprimées de façon constitutive et sont régulées par la calmoduline et par phosphorylation (Schmidt *et coll.* 1992). La troisième isoforme iNOS est très peu exprimée dans des situations physiologiques normales. Elle est essentiellement impliquée dans les processus inflammatoires.

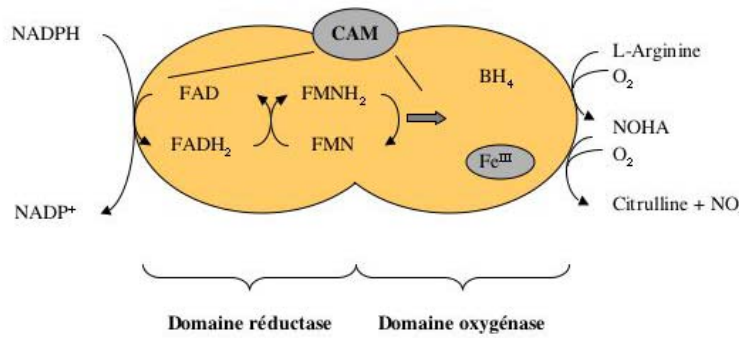


Figure I- 2 : Mécanisme fonctionnel des NOS.

Le NADPH se fixe au domaine réductase des NOS par lequel il est oxydé. Les deux électrons ainsi libérés transitent par le FAD et le FMN avant d'aboutir dans le domaine oxygénase, qui possède les sites de fixation de BH₄ et de l'hème. Ce flux d'électrons n'est possible que si la calmoduline est couplée à la protéine, ce qui rend l'activité des NOS constitutives dépendante de la concentration en ions calcium (la calmoduline étant couplée fortement à l'isoforme inducible). Ce flux est également modulé par la présence de L-arginine. Le substrat est hydroxylé par l'hème du domaine oxygénase en NOHA grâce aux électrons provenant du NADPH et à l'oxygène moléculaire. La NOHA est oxydée à son tour pour donner du NO et de la L-Citrulline. Cette double oxydation est inhibée par le NO lui-même, qui est capable de se fixer à l'atome de fer hémique.

I.2.1. nNOS ou NOS I

La première isoforme de NOS a été caractérisée dans le tissu cérébral. Il s'agit de la nNOS pour « neuronal Nitric Oxide Synthase » (Bredt *et coll.* 1990) (Figure I-3). Nous savons aujourd'hui que cette isoforme est également exprimée dans la macula densa rénale, les cellules β pancréatiques, le muscle squelettique ainsi que dans l'épithélium des poumons, de l'estomac et de l'utérus (Calignano *et coll.* 1992).

Le NO produit agit donc en tant que neurotransmetteur, mais régule également le tonus musculaire dans le tractus gastro-intestinal et les muscles squelettiques.

Cette isoforme est fortement régulée par la concentration en ions Ca²⁺ (200 à 500 nmol/L sont nécessaires), puisque la nNOS n'est active qu'après l'association de la NOS à la calmoduline.

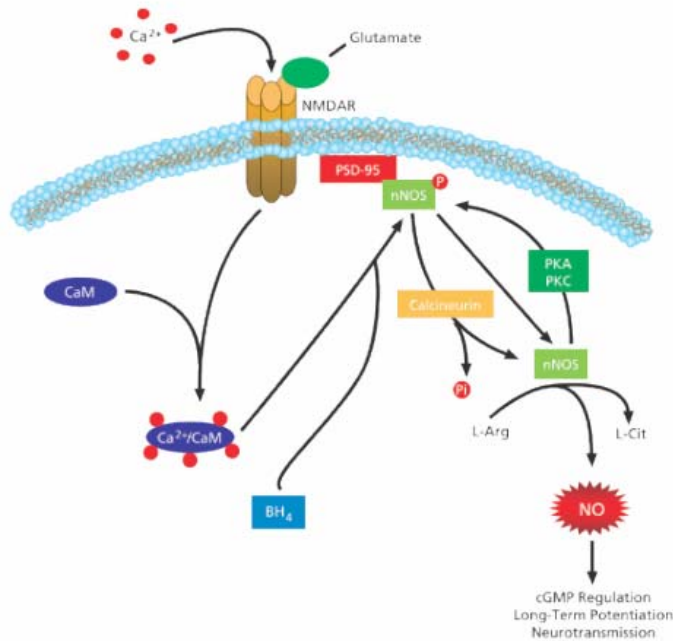


Figure I- 3 : Nitric Oxide Synthase neuronale (nNOS).

Le complexe de Ca^{2+} /Calmoduline, en combinaison avec BH_4 , se lie à la nNOS et induit sa translocation de la membrane plasmique vers le cytoplasme. La déphosphorylation des nNOS par la calcineurine induit la production de NO. Le NO active alors la guanylate cyclase (GC) et donc les diverses voies de signalisation cGMP dépendantes. La nNOS est inactivée par sa phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) ou C (PKC). D'après (Dawson *et coll.* 1998) (Wang *et coll.* 1995)

1.2.2. NOS ou NOS II

La deuxième isoforme qui a été identifiée, est la iNOS pour « inducible Nitric Oxide Synthase ». Cette isoforme est présente dans les macrophages, mais peut être également exprimée dans la presque totalité des types cellulaires de mammifères en réponse à un stress inflammatoire, ou encore surexprimée dans certaines pathologies telles que l'obésité, le diabète ou l'hypertension artérielle (Bredt 1999, Perreault *et coll.* 2001, Wu *et coll.* 1996). La iNOS n'est pas uniquement inducible. Elle est aussi exprimée de façon constitutive dans l'épithélium respiratoire humain et dans les plaquettes.

La iNOS est exprimée sous l'action d'endotoxines (lipopolysaccharides) ou de cytokines ($\text{TNF-}\alpha$, Interleukine- 1β , Interferon- γ) *via* l'activation des facteurs de transcription tels que $\text{NF-}\kappa\text{B}$ (MacMicking *et coll.* 1997, Murphy *et coll.* 1993) (Figure I-4).

L'expression de cette iNOS conduit à son activation immédiate en absence de Ca^{2+} (la calmoduline étant constitutivement fixée à la iNOS) et induit une libération prolongée et importante de NO. Le NO intervient dans les processus impliqués dans la destruction des pathogènes en inhibant la respiration des cellules cibles ainsi que leur division par interaction avec les centres rédox catalytiques. Il agirait également en générant d'autres espèces cytotoxiques oxydantes ou nitrifiantes (NO_2 , N_2O_3 , HONO, ONOO^-).

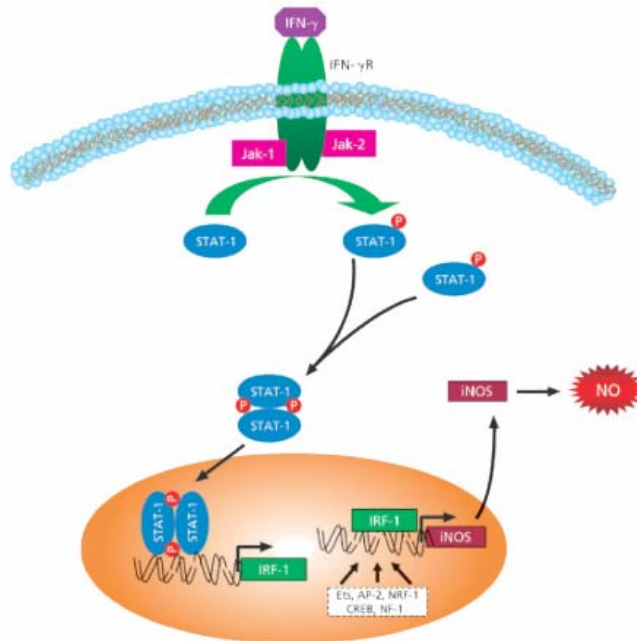


Figure I-4 : Nitric Oxide Synthase inducible (iNOS).

Les macrophages sont importants dans la réponse immunitaire aux microorganismes et la production de monoxyde d'azote y joue un rôle primordial. Les récepteurs aux IFN- γ transduisent le signal *via* la famille des kinases Janus (JAK) et des protéines transductrices de signal et activatrices de la transcription (STAT : signal transducers and activators of transcription). La fixation aux récepteurs et la dimérisation induisent la phosphorylation des STAT. Les STAT actives se dimérisent et sont alors transloquées dans le noyau où elles vont augmenter l'expression du facteur de transcription IRF-1, qui va alors se lier à des domaines spécifiques de l'ADN au niveau des régions promotrices du gène codant pour iNOS, augmentant l'expression de iNOS. D'après (Fehr *et coll.* 1997, Massa *et coll.* 1998)

I.2.3. eNOS ou NOS III

Les eNOS pour « endothelial Nitric Oxide Synthase » sont exprimées dans les caveolae (structures membranaires présentant une accumulation de récepteurs permettant la régulation de l'activité des cellules endothéliales). Elles sont ancrées dans la membrane plasmique et possèdent en leur domaine oxygénase, deux sites d'ancrage hydrophobes myristoilés et

palmitoylés. Ces eNOS sont également retrouvées au niveau des cellules musculaires lisses, des plaquettes, dans les myocytes cardiaques, les ostéoblastes et les neurones.

Les eNOS et nNOS sont dites constitutives puisqu'elles produisent du NO en permanence à de faibles concentrations. Le seul facteur limitant est la disponibilité en substrats et en cofacteurs.

Ces deux isoformes sont activées par la formation du complexe Ca^{2+} /calmoduline, ce qui entraîne une libération de NO immédiate mais de courte durée.

Le NO est synthétisé par les eNOS en réponse à une mobilisation de Ca^{2+} , et intervient dans le maintien de l'homéostasie vasculaire (pression sanguine, prévention de l'adhésion et de l'activation des plaquettes et des leucocytes).

I.2.4. mtNOS

Plusieurs études, basées sur des techniques d'immuno-histochimie, révèlent la présence d'une mtNOS. Cependant l'existence de cette quatrième isoforme de NOS est encore controversée.

Giulivi et Elfering (Elfering *et coll.* 2002, Giulivi *et coll.* 1998) ont en effet mesuré une production de NO au sein de mitochondries isolées de foie et purifiées sur gradient de percoll. Ces auteurs ont montré que cette production était dépendante de la présence de L-arginine et qu'elle pouvait être inhibée par un inhibiteur des NOS, le NG-monométhyl-L-arginine (L-NMMA). De plus, ils ont mis en évidence que cette activité était supérieure dans les particules sub-mitochondriales, suggérant donc que cette mtNOS soit présente au sein de la membrane mitochondriale interne. Tatoyan et Giulivi ont purifié cette protéine responsable de la production mitochondriale de NO. D'après ses paramètres cinétiques, son poids moléculaire, la nécessité de certains cofacteurs, et sa réactivité aux anticorps monoclonaux anti-iNOS de macrophages, les auteurs suggèrent que cette protéine serait similaire ou identique à la iNOS (Tatoyan *et coll.* 1998). En revanche, Ghafourifar et Richter (Ghafourifar *et coll.* 1997b) ont montré que la mtNOS était fonctionnellement active, et que son activité était dépendante de la présence de Ca^{2+} , tout comme le sont les nNOS et eNOS. Enfin, Kanai (Kanai *et coll.* 2001) et son équipe ont récemment mis en évidence, dans des cardiomyocytes de souris KO pour la nNOS, une absence de production de NO mitochondriale. Ils ont donc émis l'hypothèse que la mtNOS ne serait en fait qu'une nNOS. Cette hypothèse a été finalement confirmée par la caractérisation biochimique de l'enzyme isolée.

Il semble donc qu'une NOS soit exprimée au sein des mitochondries, et qu'elle présente, selon le tissu d'intérêt, des caractéristiques moléculaires spécifiques à l'une des trois NOS déjà identifiées. Comme nous pouvons l'observer dans le tableau suivant (Tableau I-1), les sites d'expression des différentes NOS sont très nombreux.

NOM	ORGANE/ TISSU	EXPRESSION	ROLES
NNOS ou NOS I	Cerveau, système nerveux périphérique Rétine Muscle squelettique Poumon Pancréas Rein Endomètre Estomac antérieur	Neurones Cellules photoréceptrices, Cellules épithéliales Îlots de Langerhans Macula densa Epithélium columnaire Muqueuse gastrique	Module réponse au glutamate, Plasticité synaptique, Neurotransmetteur dans le tractus gastrointestinal, Relâchement du sphincter, Flux sanguin
INOS ou NOS II	Os Foie Vaisseaux sanguins Cerveau Sang	Macrophages, lymphocytes, neutrophiles, Ostéoblastes Cellules de Kupffer, Hépatocytes Cellules musculaires lisses, Cellules macrogliales et microgliales Plaquettes iNOS exprimées spontanément : cellules épithéliales et plaquettes	Réponse immune non spécifique aux microorganismes Réponse inflammatoire
ENOS ou NOS III	Vaisseaux sanguins Hippocampe, cervelet, bulbe olfactif Sang Coeur Poumon (nouveau-né) Rein	Endothélium Cellules pyramidales Plaquettes Myocytes Cellules épithéliales Alvéolaires Cellules épithéliales tubulaires	Régule flux et pression sanguine Inhibe l'activation des plaquettes

Tableau I- 1: Sites d'expression et rôles des NOS.

I.3. Effets cellulaires du NO

Le NO, comme le monoxyde de carbone et l'oxygène, présente une très grande solubilité dans l'eau ainsi qu'une très grande affinité pour le fer, ce qui entraîne des modifications de l'activité des enzymes contenant un atome de fer.

L'impact cellulaire de la biosynthèse de NO va principalement dépendre de la quantité produite et des cellules cibles situées à proximité du lieu de synthèse. Aux concentrations physiologiques, comprises entre 0,1 et 100 nM, le NO est peu réactif et la plupart de ses actions est due à sa liaison à l'atome de fer du noyau hémérique de la guanylate cyclase (GC). La réaction du NO avec l'atome de fer va alors activer la guanylate cyclase soluble (sGC), entraînant la transformation de guanosine triphosphate (GTP) en guanosine mono-phosphate cyclique (cGMP). L'augmentation de cGMP va alors moduler l'activité de nombreuses protéines kinases qui, en favorisant la sortie de K^+ et de Ca^{2+} hors de la cellule, provoquent une hyperpolarisation ayant pour conséquence une vasodilatation, une bronchodilatation, une inhibition de l'agrégation plaquettaire et de l'adhésion des plaquettes sur l'endothélium.

Le NO joue aussi le rôle de molécule de « signalling » dans le métabolisme du fer. Il a en effet la capacité de stimuler la biosynthèse des récepteurs de la transferrine et d'inhiber celle de la ferritine et de l'acide aminolévulinique synthase (ALA-synthase) provoquant une anémie (Paraskeva *et coll.* 1996).

Le NO présente également une très forte affinité pour l'hémoglobine (environ 100000 fois supérieure à celle de l'oxygène). Certaines études ont ainsi démontré que l'hémoglobine pouvait servir de transporteur de NO, le fixant au niveau des poumons où elle est alors nitrosylée et le libérant dans le système artérioveineux.

Le NO porte un électron célibataire lui permettant de réagir avec de nombreux composés radicalaires comme l'ion superoxyde et de générer des peroxy-nitrites. Il possède également une très grande réactivité chimique avec d'autres radicaux libres et métaux de transition (Beckman *et coll.* 1990, Beckman *et coll.* 1996). Il peut également réagir avec des groupements thiols comme ceux de la cystéine ou du glutathion et ainsi générer des composés S-nitrosothiols (RS-NO).

Enfin le NO peut également interagir avec les complexes de la chaîne respiratoire comme nous le verrons plus en détail.

I.3.1. Rôle du NO dans le système cardiovasculaire

I.3.1.1. Le système cardiovasculaire

Furchgott a mis en évidence que l'endothélium vasculaire produisait une substance ayant des effets vasodilatateurs. Cette substance appelée dans un premier temps EDRF s'est révélée être le NO (Furchgott *et coll.* 1980).

I.3.1.2. Mécanisme d'action

En amont du mécanisme de libération du NO, les substances vasodilatatrices vont se fixer sur leurs récepteurs se trouvant à la surface de l'endothélium. Ceci déclenche l'entrée d'ions Ca^{2+} , permettant la formation d'un complexe calmoduline/ Ca^{2+} /eNOS. Le NO produit va stimuler l'activité de la guanylate cyclase, comme décrit précédemment entraînant l'augmentation de cGMP au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires. Cette hausse de cGMP active la protéine kinase G (PKG) qui est responsable de la phosphorylation du phospholambane. Le phospholambane phosphorylé se dissocie des SERCA (Sarcoplasmic/Endoplasmic-Reticulum Ca^{2+} -ATPase) favorisant le transport actif du Ca^{2+} dans le réticulum et induisant la relaxation des muscles lisses des vaisseaux sanguins (Figure I-5).

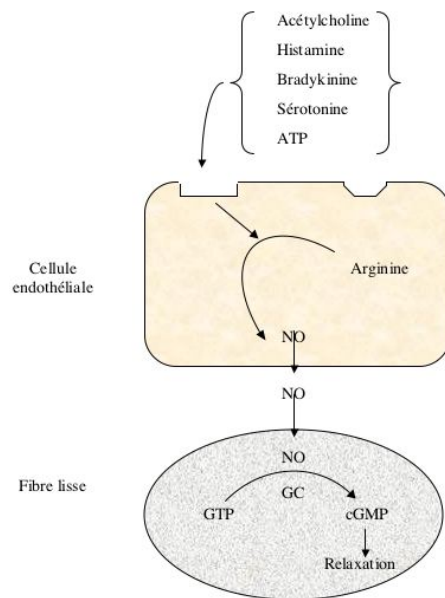


Figure I- 5 : Biosynthèse du NO par les cellules endothéliales et ses effets sur les fibres musculaires lisses.

Les substances vasodilatatrices induisent la production de NO au niveau de l'endothélium. Le NO diffuse et agit sur la guanylate cyclase dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Le cGMP formé est inactivé par des phosphodiesterases qui le transforment en 5'GMP inactif. L'inhibition de ces phosphodiesterases entraîne une augmentation de la concentration de cGMP.

I.3.2. Le NO et le sang

Dans le sang, la durée de vie du NO est de quelques secondes. Une concentration basale de quelques nanomolaires est libérée par l'endothélium, les plaquettes, et éventuellement par les tissus musculaires de la paroi vasculaire. Le NO est essentiellement lié aux composés contenant du fer ou des résidus thiols comme l'albumine, ce qui le protège de l'oxydation. Ces composés ont la capacité de libérer lentement le NO ou de l'échanger avec d'autres molécules, comme la cystéine et le glutathion. Le NO contenu dans le sang est éliminé en grande partie par les globules rouges, sous forme gazeuse dans l'air exhalé et par l'oxydation de l'hémoglobine pour donner du nitrate, lequel est éliminé par les reins.

La synthèse de NO par l'endothélium et les plaquettes empêche l'agrégation et l'adhésion de celles-ci sur l'endothélium. Lors de la coagulation, la thrombine et les sécrétions plaquettaires (sérotonine, ATP) induisent immédiatement une sécrétion de NO par les cellules de l'endothélium sain.

I.3.3. Rôle du NO dans le système nerveux

Les nNOS ont été localisées dans différentes parties du système nerveux central comme le cortex cérébral, le cervelet, l'hippocampe et l'hypothalamus. En tant que neuromédiateur, le NO joue un rôle majeur dans le contrôle de l'activité neuronale de ces régions, mais il intervient également dans la plasticité neuronale (Duncan *et coll.* 2005).

I.3.3.1. La plasticité neuronale

Le NO est très impliqué dans la plasticité neuronale au niveau des neurones glutamatergiques qui représentent plus du tiers des neurones du cerveau. Ces neurones sont notamment responsables de la potentialisation à long terme (PLT) (Arancio *et coll.* 1996, Holscher 1997). La PLT peut être définie comme une augmentation de la réponse post-synaptique suite à une intense activation pré-synaptique. L'entrée importante de Ca^{2+} via le récepteur N-Méthyl-D-Aspartate (NMDA) activé par la fixation de glutamate, entraîne la formation de NO (suite à l'activation des nNOS). Le NO remonte à travers les fentes synaptiques et se rend aux boutons synaptiques des synapses à renforcer, stimulant alors la libération de neurotransmetteur. La transmission synaptique est ainsi renforcée par une autre voie que le processus pré-synaptique habituel.

La PLT permet, à la suite de ces mécanismes moléculaires, de renforcer l'activité électrique d'un neurone et donc d'augmenter sa capacité à stocker une information. La PLT est un processus primordial dans les mécanismes de mémorisation.

I.3.3.2. Le NO comme neurotransmetteur

Le NO en tant que neurotransmetteur diffuse dans une microrégion pendant quelques secondes à travers la membrane post-synaptique et active la GC des cellules environnantes. La concentration en cGMP du milieu cytosolique des neurones va augmenter et activer les protéines contractiles du cytosquelette *via* les protéines kinases. Par conséquent, des vésicules contenant un neuromédiateur ou une neurohormone vont être libérées dans la fente synaptique, favorisant la sécrétion de dopamine au niveau du striatum, de l'aspartate dans le cervelet, et de l'Ach au niveau du cerveau antérieur.

Au niveau de l'hypothalamus, le NO stimule la sécrétion de GH (Growth Hormone), de somatostatine, de LH (Luteinizing Hormone) et de GnRH (Gonadotropine Releasing Hormone). Ces hormones vont alors se fixer à leur récepteur post-synaptique et provoquer la libération de messagers intracellulaires permettant la diffusion de l'influx nerveux.

I.3.4. Rôle du NO dans le système immunitaire

Le NO est également un agent cytotoxique, car il possède une activité anti-virale, anti-bactérienne et anti-parasitaire. Il a la capacité de bloquer la prolifération des cellules cancéreuses lorsqu'il est produit en grande quantité par les iNOS. Cependant, les deux isoformes constitutives (eNOS et nNOS) pourraient jouer un rôle dans l'initiation du processus inflammatoire. Les faibles quantités de NO produites par ces deux isoformes initient le chimiotactisme des polynucléaires, la vasodilatation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et l'inhibition de l'agrégation plaquettaire. De plus, ces faibles quantités de NO pourraient faciliter la production ou la libération d'autres médiateurs comme l'histamine, la sérotonine, la bradykinine et l'activation du complément.

Cependant, l'essentiel de la production de NO lors des inflammations aiguës est, bien entendu, assuré par les iNOS. Comme nous l'avons décrit précédemment, les cellules productrices de NO, *via* les iNOS, sont le plus souvent les cellules de l'immunité (macrophages, cellules de Kupffer, cellules gliales). Les iNOS sont induites par des cytokines et/ou des endotoxines. A forte concentration, le NO va alors inactiver les enzymes possédant un atome de fer non héminique conjugué à un atome de soufre (inhibition de certaines enzymes du cycle de Krebs) ou des radicaux dans les sites actifs (ribonucléase-réductase qui intervient dans la réplication de l'ADN), ce qui va entraîner la mort cellulaire.

I.3.5. Rôle du NO dans le système digestif et urogénital

Dans le système digestif, le NO est produit par des terminaisons nerveuses non adrénérgiques et non cholinérgiques, ainsi que dans les cellules endothéliales. Le NO participe à la régulation de la motricité digestive et à la vasomotricité. Il est impliqué dans le maintien de l'intégrité de la muqueuse gastro-intestinale en modulant la microcirculation de la muqueuse. Le NO produit à forte concentration par les cellules immunitaires exerce également une action immunorégulatrice et cytotoxique indirecte et intervient dans la réponse immunitaire liée à des agents pathogènes.

Dans le système urogénital, le NO entraîne une augmentation de cGMP induisant un relâchement des muscles lisses du corps caverneux et favorisant l'afflux sanguin.

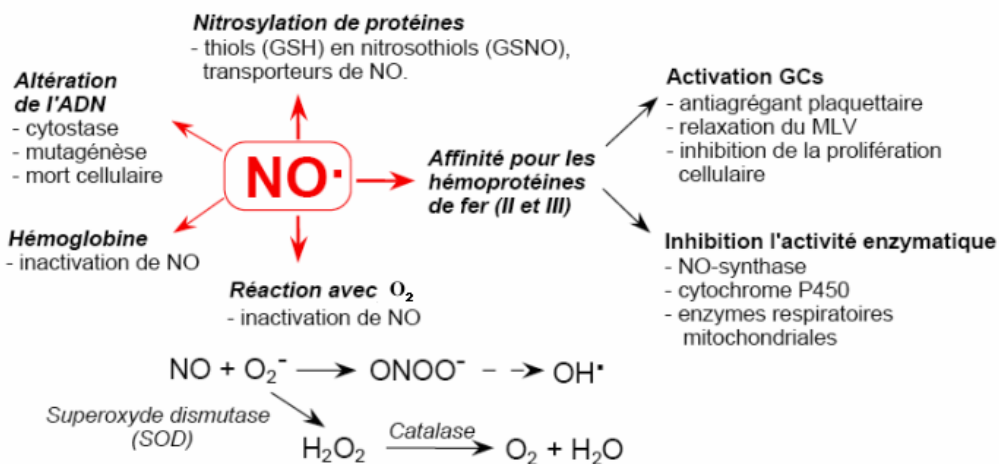


Figure I- 6: Récapitulatif des principaux sites de réaction du NO

Le NO est une molécule très réactive et un agent de communication cellulaire impliqué dans la régulation de processus physiologiques fondamentaux (Figure I-6).

I.4. Pathologies et dysrégulation de la biodisponibilité du NO

Une dysrégulation de la production de NO participe au développement de pathologies neurologiques et cardiaques et engendre également certains troubles du métabolisme ou des processus inflammatoires. Nous avons donc distingué les pathologies liées à une augmentation de la biodisponibilité en NO de celles liées à une diminution de la production de NO.

I.4.1. Excès de NO

De façon générale, les processus induisant l'expression des NOS sont accompagnés d'activation et/ou d'induction d'autres enzymes produisant des radicaux dérivés de l'oxygène. Le peroxydinitrite, issu de la combinaison du NO avec l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), induit l'oxydation et la nitration de molécules d'intérêts biologiques. Les cibles intracellulaires du peroxydinitrite comprennent principalement des résidus thiols et des centres de métaux lourds. Une autre activité, mineure, des peroxydinitrites *in vivo* est la formation de radicaux hydroxyles (OH^{\cdot}) qui peuvent initier une chaîne de réactions radicalaires comme la peroxydation lipidique.

I.4.1.1. Ischémie cérébrale

L'ischémie cérébrale survient lorsque la pression artérielle cérébrale chute en dessous d'un certain seuil, ne permettant plus aux mécanismes d'autorégulation de la circulation cérébrale d'assurer un apport en oxygène suffisant aux neurones. Les neurones ainsi privés d'oxygène, meurent suite à la libération de substances toxiques, comme le NO produit par les nNOS.

I.4.1.2. Maladies neurodégénératives

Pendant de nombreuses années, l'action du NO comme neurotransmetteur a été mise en doute et ce, malgré la connaissance depuis plus de 40 ans de l'existence de nerfs non-adrénergiques non-cholinergiques (NANC) dans le tractus intestinal.

Aujourd'hui, il est accepté par toute la communauté scientifique que le NO agit comme un messager, et que certains nerfs, appelés nerfs nitrergiques, libèrent du NO. De plus, il est désormais admis qu'une production cérébrale excessive ou inappropriée est impliquée dans de nombreuses pathologies telles que les maladies d'Alzheimer, de Parkinson, ou encore la sclérose en plaques.

I.4.1.2.1. Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est liée à une dégénérescence des noyaux gris centraux, qui résulte d'une inhibition de la sécrétion de dopamine. Suite à son oxydation, la dopamine a la capacité de former des radicaux toxiques pour la cellule, ce qui va générer des peroxydes d'hydrogène. Cette genèse de peroxydes d'hydrogène est accrue dans la maladie de Parkinson. Cette augmentation se fait en présence de fer, dont la concentration est également augmentée dans cette pathologie. Cela conduit aussi à former des radicaux hydroxyles. Par ailleurs, le niveau de glutathion réduit

(GSH) est fortement diminué dans le locus niger, suggérant une protection insuffisante contre la formation des radicaux hydroxyles. L'examen post-mortem de la substance niger (SN) de patients atteints de Parkinson révèle une augmentation de la production de NO. De nombreuses études ont également révélé dans cette pathologie une inhibition de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire qui représente une cible du NO (Cleeter *et coll.* 1992, Schapira *et coll.* 1990).

I.4.1.2.2. La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est une démence neurodégénérative qui atteint en premier lieu les fonctions cognitives et se reflète sur le comportement des patients. La nature neurodégénérative de la maladie d'Alzheimer se traduit par des lésions histopathologiques : formation de plaques séniles et dégénérescences neurofibrillaires. Une relation entre des mutations héréditaires de l'ADN mitochondrial et la maladie d'Alzheimer a été observée. Les gènes impliqués appartiennent à la cytochrome c oxydase (COX) faisant partie de la chaîne de transport d'électrons de la mitochondrie. Ces mutations ont pour conséquence de réduire l'activité de la COX et donc de créer une accumulation d'électrons puis secondairement de radicaux oxygénés actifs. Les études post-mortem de cerveaux de patients atteints d'Alzheimer révèlent une inhibition du complexe IV du cortex cérébral (Kish *et coll.* 1992).

La formation de peroxy-nitrites est également impliquée dans cette pathologie.

La production de NO lors d'une neuroinflammation pathologique, comme l'inflammation gliale, entraîne une libération de NO qui va engendrer un relargage de glutamate. Ce relargage peut alors induire un influx de Ca^{2+} qui va à son tour stimuler la libération de NO.

I.4.1.3. Choc septique

Le choc septique est caractérisé par une invasion microbienne du système circulatoire et par une hypotension généralisée. Il a été démontré que lors d'un choc septique, le NO pouvait avoir un effet aussi bénéfique que néfaste (Belcher *et coll.* 2002, Hauser *et coll.* 2005, Springall 1995).

I.4.1.4. Diabète de type 2

L'enzyme iNOS semble être impliquée dans la relation entre l'obésité et le diabète de type 2.

Il a en effet été démontré que l'obésité induite par un régime riche en graisses entraîne la production de cytokines par les cellules adipeuses qui, à leur tour, stimulent l'expression de l'enzyme iNOS. Les quantités anormales de NO produites par l'action de cette enzyme entravent l'action de l'insuline, empêchant le glucose de pénétrer à l'intérieur des muscles, et entraîne donc une insulino-résistance.

I.4.1.5. Maladies inflammatoires

Lors du processus inflammatoire, les cellules du système immunitaire produisent des espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS) ainsi que du NO *via* les NOS. L'augmentation de l'activité NOS a été rapportée dans certaines maladies inflammatoires, ainsi que dans plusieurs types de tumeurs. Par ailleurs, il est maintenant établi que certaines inflammations chroniques prédisposent au cancer.

I.4.2. Déficit en NO

I.4.2.1. Maladies cardiovasculaires – Athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires sont la conséquence de nombreuses pathologies comme l'hypercholestérolémie, l'hypertension ou encore le diabète. Toutefois, la pathologie principalement rencontrée chez les personnes présentant des désordres cardiovasculaires est l'athérosclérose. La genèse de la plaque d'athérome résulte d'une lente métamorphose de l'intima, tunique la plus interne et la plus fine de la paroi des vaisseaux, constituée entre autres de cellules endothéliales. L'athérosclérose, et toutes les pathologies prédisposant à son apparition (hypercholestérolémie, diabète, hypertension), sont caractérisées par un dysfonctionnement des cellules endothéliales. Elles sont à l'origine de la transduction de stimuli induisant la régulation du tonus vasculaire, donc de la pression sanguine. C'est le NO synthétisé et libéré par ces cellules endothéliales qui sert d'agent de communication permettant le contrôle de ces paramètres physiologiques (Naseem 2005). Le NO présente des effets anti-thrombotiques et anti-athérosclérotiques décrits dans le tableau I-2.

De nombreux facteurs sont connus pour affecter la production et la biodisponibilité en NO dans l'organisme. Cependant, les études actuelles ne permettent pas de déterminer si le dysfonctionnement des cellules endothéliales en est la cause ou la conséquence.

Les deux facteurs importants dans la régulation de la production de NO sont (i) l'inhibition de l'expression et de l'activité des eNOS et (ii) la présence de molécules capables de piéger le NO : les ROS. Il est également important de noter que la libération de NO par les plaquettes activées, joue un rôle important dans la prévention des maladies cardiovasculaires. En effet, le NO ainsi produit va contribuer à inhiber l'agrégation plaquettaire et donc limiter la formation de thrombose (Freedman *et coll.* 1997).

CIBLES	ROLES PATHOGENES	EFFETS DU NO
Lipides	Diffusent au travers de l'intima et forment la plaque d'athérome	Inhibition de l'oxydation lipidique par réaction avec les radicaux peroxydes
Monocytes	Infiltration dans l'intima en réponse à la réaction pro-inflammatoire générée par l'oxydation lipidique	Inhibition de l'expression des protéines d'adhésion : VCAM-1, P-Selectin, ICAM –1 Inhibition de l'expression des protéines chémoattractantes
Plaquettes	Adhésion et agrégation après rupture de la plaque d'athérome, genèse d'une thrombose	Inhibition de l'adhésion et de l'agrégation plaquettaires
Cellules musculaires lisses vasculaires	Migration et prolifération activées par des facteurs de croissance et des cytokines générés par les macrophages. Induction de la formation de la chape fibreuse	Inhibition de la prolifération des cellules musculaires lisses

Tableau I- 2 : Rôles du NO dans l'athérosclérose.

I.4.2.2. Hypertension

L'hypertension artérielle est diagnostiquée lorsque la pression artérielle systolique et diastolique dépassent respectivement 140 mmHg et 90 mmHg.

Des médicaments comme des inhibiteurs de l'enzyme de conversion, capables de potentialiser l'effet du NO libéré par l'endothélium vasculaire pourraient avoir des implications cliniques immédiates. De plus, des suppléments alimentaires riches en arginine sont parfois prescrits afin d'augmenter la synthèse de NO et par conséquent potentialiser ses effets vasculaires bénéfiques.

I.4.2.3. Angine de poitrine

L'angor stable ou angine de poitrine est la forme la plus classique et la plus fréquente de l'insuffisance coronarienne. Celle-ci témoigne, dans presque tous les cas d'une athérosclérose des artères coronaires. L'angor stable est défini comme la répétition de douleurs angineuses survenant essentiellement à l'effort. La douleur provient d'une souffrance cardiaque, due à un déficit en oxygène. Ces troubles sont soignés par l'administration de nitroglycérine qui se dégrade en NO au niveau des mitochondries grâce à l'aldéhyde déshydrogénase mitochondriale.

Le NO dilate les vaisseaux sanguins du muscle cardiaque, ce qui augmente l'apport de sang vers le cœur et soulage la douleur.

Outre l'effet vasodilatateur du NO et l'importance des voies cGMP dépendantes dans les processus de régulation, il apparaît qu'une partie des effets du NO dans les pathologies présentées soit due à l'inhibition des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

II. La mitochondrie

II.1. Découverte et structure

Kölliker a initié, il y a près de 150 ans, les premières recherches scientifiques sur la mitochondrie en décrivant la morphologie de ces organites dans le tissu musculaire. Depuis une cinquantaine d'année, ces recherches connaissent un essor grandissant, notamment grâce aux travaux d'Eugène Kennedy et d'Albert Lehninger mettant en évidence, au sein de ces organites, les réactions du cycle de Krebs, de la β -oxydation et de l'oxydation phosphorylante. Les études sur la mitochondrie ont été récompensées par l'attribution de plusieurs prix Nobel, tout d'abord à Peter Mitchell en 1978 pour sa théorie chimio-osmotique, puis à Boyer et Walker pour l'étude de la structure et du fonctionnement de l'ATP synthase.

La mitochondrie, du grec *mitos* (fil) et *chondros* (grain), est un organite contenu dans le cytoplasme des cellules eucaryotes, présentant une grande variété de nombre, de taille et de forme selon le type cellulaire. Cependant, leur ultrastructure reste commune. Toute mitochondrie est constituée de deux membranes : une membrane externe et une membrane interne, délimitant trois compartiments distincts : le compartiment cytoplasmique, l'espace intermembranaire, et la matrice mitochondriale (Figure I-7).

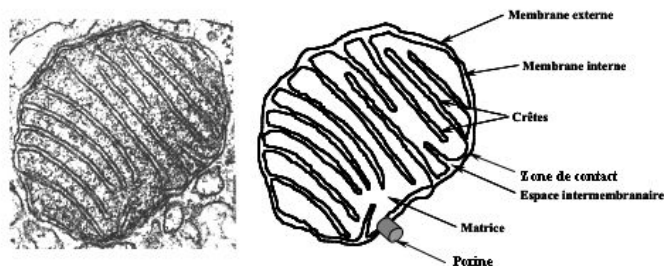


Figure I-7: Ultrastructure mitochondriale.

La matrice mitochondriale, délimitée par la membrane interne, contient le génome mitochondrial et est le siège des réactions du cycle de Krebs et de la β -oxydation.

La membrane interne présente une surface beaucoup plus importante que la membrane externe, et forme des replis appelés crêtes mitochondriales. La membrane interne peut entrer en contact avec la membrane externe, supprimant ainsi l'espace intermembranaire au niveau des zones de contact. Au sein de la membrane interne se trouve enchâssé un lipide particulier : la cardiolipine,

qui lui confère une imperméabilité aux ions. Les échanges se font donc par l'intermédiaire de transporteurs spécifiques.

De nombreuses protéines sont également ancrées dans la membrane mitochondriale interne : les protéines formant les complexes de la chaîne respiratoire, l'ATP synthase, ou encore le transporteur de nucléotides adényliques (ANT : Adenine Nucleotide Translocator).

L'espace intermembranaire renferme également un certain nombre de protéines, dont les protéines apoptotiques comme le cytochrome c ou l'AIF (Apoptosis Inducing Factor).

Contrairement à la membrane interne, la membrane externe ne présente pas de replis. On y trouve une protéine en quantité abondante, la porine ou « VDAC » pour Voltage-Dependant Anion Channel. VDAC forme de grands canaux enchassés dans la bicouche lipidique qui permettent le passage de toutes les molécules de poids moléculaire inférieur à 5kDa.

Malgré la compartimentalisation due à ces deux membranes, externe et interne, les mitochondries sont en étroite relation les unes avec les autres. Les processus de fusion et fission mitochondriale en sont la preuve et sont actuellement très étudiés. Les mitochondries sont également en étroite relation avec le réticulum endoplasmique, le noyau, ou encore le cytosquelette.

II.2. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est une structure multiprotéique dont la nature a été principalement déterminée par 3 méthodes : l'utilisation d'inhibiteurs, l'étude des états respiratoires stationnaires définis par Britton Chance (Chance *et coll.* 1956b) et l'isolement des différents complexes constitutifs (Figure I-8).

L'oxydation des équivalents réduits (NADH et FADH₂) par l'oxygène, au niveau de la chaîne respiratoire, est couplée à un transfert vectoriel de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire générant un gradient électrochimique de protons ($\Delta\mu\text{H}^+$), qui se décompose en une différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\psi$) et en un gradient de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne (ΔpH).

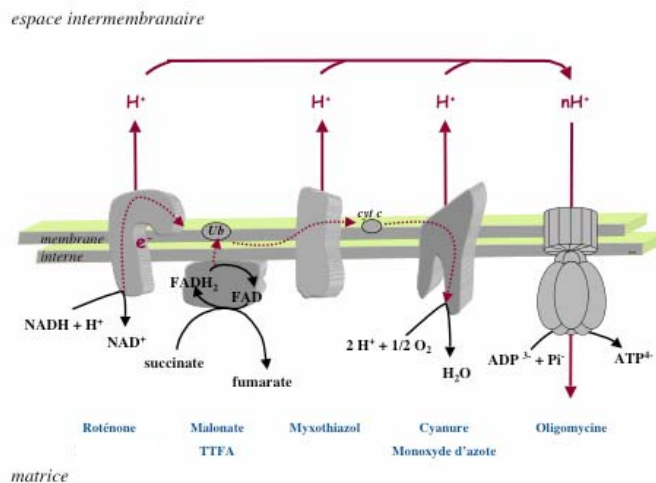


Figure I-8 : La chaîne respiratoire et les sites d'action des inhibiteurs.

II.2.1. Complexe I ou NADH-ubiquinone oxydoréductase

II.2.1.1. Structure

Le complexe I : NADH-ubiquinone oxydoréductase, représente le plus gros complexe de la chaîne respiratoire mais c'est le moins bien connu. Ce complexe multi-protéiques en forme de L (Djafarzadeh *et coll.* 2000, Grigorieff 1999, Guenebaut *et coll.* 1998, Guenebaut *et coll.* 1997, Hofhaus *et coll.* 1991) est enchassé dans la membrane mitochondriale interne, et possède un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe. Le site d'oxydation du NADH se trouve sur la face matricielle de la membrane interne. Il contient une FMN, située à proximité du site de fixation du NADH.

Le complexe I de mammifères est un complexe de 980 kDa, constitué d'un assemblage de 46 sous-unités protéiques, dont 39 sont codées par des gènes nucléaires et 7 codées par des gènes mitochondriaux. Le développement récent de la protéomique a permis de faire de grandes avancées dans la connaissance de la structure des complexes par l'identification de nouvelles sous-unités (Carroll *et coll.* 2003, Hirst *et coll.* 2003). Les 7 sous-unités d'origine mitochondriale identifiées chez les mammifères sont notées ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5 et ND6. Parmi les 46 sous-unités qui constituent le complexe, 14 dont les 7 codées par les gènes mitochondriaux, possèdent leur orthologue chez les procaryotes (Friedrich *et coll.* 1995). Ce complexe procaryotique peut assurer les fonctions du complexe I des mammifères, c'est-à-dire, le transport des électrons de la FMN à la quinone *via* 8 centres Fer-Soufre (Fe-S), ainsi que le transfert des protons à travers la membrane. Le rôle des 32 autres sous-unités « surnuméraires » ou « accessoires » n'est pas encore connu (Figure I-9).

- deux sous-unités hydrophiles qui portent le site de fixation des acides dicarboxyliques : une flavoprotéine (SdhA) de 70 kDa et une protéine Fer-Soufre (SdhB) d'environ 30 kDa qui contient 3 complexes Fer-Soufre,
- deux sous-unités hydrophobes ancrées à la membrane, SdhC (15 kDa) et SdhD (13 kDa), contenant le cytochrome b et le site de fixation à l'ubiquinone qui servent d'ancrage pour le complexe au sein de la membrane mitochondriale interne et qui sont nécessaires à l'oxydo-réduction de l'ubiquinone.

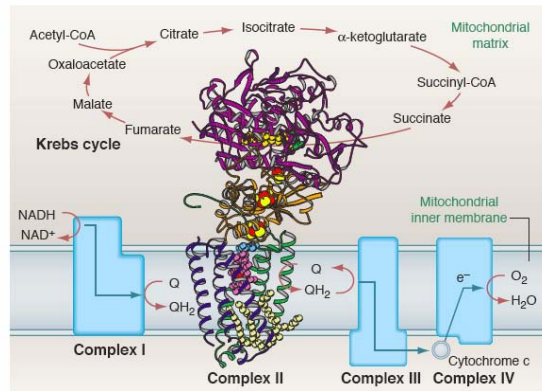


Figure I- 10 : Structure du complexe II.

D'après (Hederstedt 2003a)

II.2.2.2. Fonction

La succinate-ubiquinone oxydoréductase couple l'oxydation du succinate en fumarate, au niveau de la matrice mitochondriale, à la réduction de l'ubiquinone membranaire (Hägerhall 1997, Hägerhall *et coll.* 1996, Ohnishi *et coll.* 2000). La réduction des ubiquinones se fait par l'intermédiaire du FADH_2 et des centres Fe-S. Deux électrons par molécule de succinate sont ainsi transférés au complexe III grâce à la diffusion du pool d'ubiquinone dans la phase lipidique de la bicouche membranaire. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à un efflux de protons (Hederstedt 2003a, 2003b).

II.2.3. Le complexe III ou ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase ou complexe

bc1

II.2.3.1. Structure

Chez les mammifères, le complexe III, ou ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase, est un dimère d'environ 480 kDa dont chaque monomère est constitué de 11 sous-unités. Parmi celles-

ci, trois contiennent des centres rédox et forment le cœur de l'enzyme qui permet le couplage entre le flux d'électrons et le transfert de protons (Figure I-11) :

- (i) le cytochrome b : composé de deux groupements hèmes, l'hème b_L (b566) et l'hème b_H (b560). Cette protéine est constituée de 8 hélices transmembranaires
- (ii) une protéine Fer-Soufre globulaire ou protéine de Rieske [2Fe-2S]
- (iii) le cytochrome c1 qui est également globulaire.

Les autres protéines du complexe entourent le noyau protéique métallique. Deux de ces protéines, appelées Core 1 et Core 2, sont dirigées du côté matriciel et seraient impliquées dans la maturation protéique.

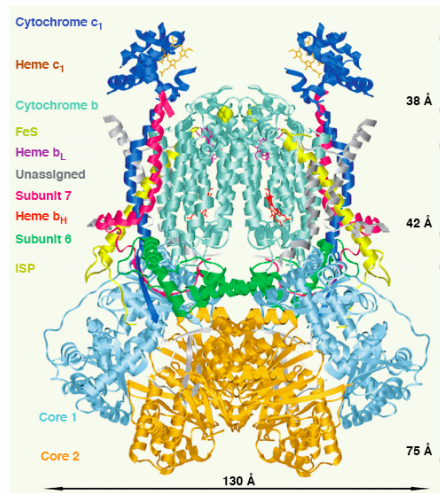


Figure I- 11 : Structure du Complexe III.

D'après (Xia *et coll.* 1997)

II.2.3.2. Fonction

Le complexe III catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol membranaire au cytochrome c soluble situé dans l'espace intermembranaire. Le transfert d'électrons est couplé à un efflux de protons dont le mécanisme repose sur le cycle des quinones décrit par Mitchell, et correspondant à une boucle d'oxydoréduction (Figure I-12). Le fonctionnement hypothétique du cycle des quinones a été récemment validé par l'étude cristallographique de la structure du complexe III (Xia *et coll.* 1997, Zhang *et coll.* 2000).

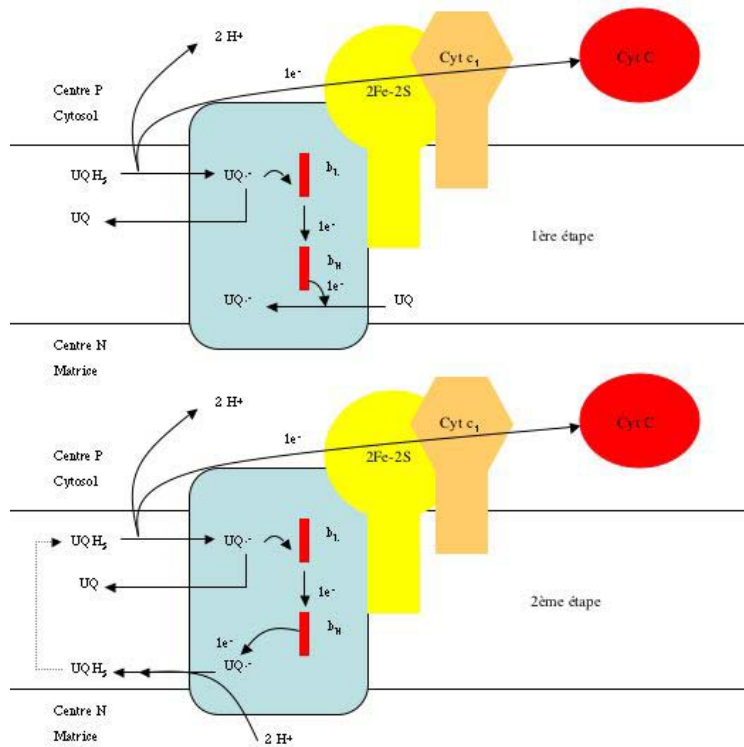


Figure I- 12 : Le cycle des quinones.

Un électron de la molécule de quinol (UQH_2) est transféré à la protéine Rieske, entraînant un relargage de deux protons dans l'espace intermembranaire et la formation d'une semi-quinone (UQ^\cdot) au centre P. La protéine Rieske va ensuite céder son électron au cytochrome c. Il se produit ensuite l'oxydation de UQ^\cdot en UQ par le cytochrome b_{566} (b_L pour low potential, $E_m = -100\text{mV}$). L'électron du cytochrome b_{566} est transféré au cytochrome b_{560} (b_H pour high potential $E_m = 50\text{mV}$). Le cytochrome b_{560} réduit alors la quinone en semi-quinol au site N. Une seconde molécule de UQH_2 est alors oxydée au site P selon le même mécanisme et un électron va alors réduire UQ^\cdot en UQH_2 au site N, réaction suivie d'une protonation.

Deux sites actifs sont présents au sein de ce cycle des quinones : le site P et le site N. Le site P (face positive, site Q_0), situé à proximité de l'espace intermembranaire, est localisé entre la protéine Rieske et le cytochrome b, où va se produire l'oxydation de l'ubiquinol et la libération de protons dans l'espace intermembranaire. Le site N (face dont le potentiel est négatif, appelé aussi Q_i) est situé au sein du cytochrome b, sur la face matricielle de la membrane. Au sein du site N a lieu la réduction de l'ubiquinone qui est couplée à l'entrée de protons de l'espace matriciel (Figure I-12).

Ce cycle des quinones conduit donc à l'oxydation de UQH_2 en UQ , au transfert de 4 protons dans l'espace intermembranaire et à la consommation de 2 protons de l'espace matriciel.

Les étapes de transfert d'électrons sur la protéine Rieske et de réduction de la quinone par le cytochrome b_{560} sont respectivement inhibées par le myxothiazol et l'antimycine.

La réaction globale au niveau du complexe III peut être synthétisée comme suit :



Equation I- 1 : Réaction globale au niveau du complexe III.

II.2.4. Le complexe IV ou cytochrome c oxydase

II.2.4.1. Structure

Le complexe IV est une protéine dimérique, d'environ 400 kDa, dont chacun des monomères est constitué de 13 sous-unités (Figure I-13) (Saraste 1999, Yoshikawa 2002). Deux de ces sous-unités, d'origine mitochondriale, constituent la machinerie du complexe entourée de 10 petites sous-unités d'origine nucléaire. La sous-unité I contient le site actif constitué des cytochromes a/a_3 et d'un atome de cuivre Cu_B . La sous-unité II, orientée du côté de l'espace intermembranaire, contient un atome de cuivre Cu_A . Les électrons transportés par le cytochrome c vont être transférés au site actif *via* le Cu_A et le cytochrome a (Saraste 1999).

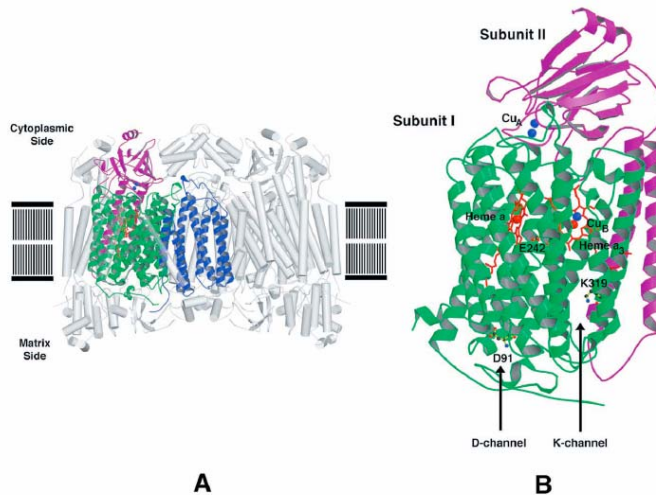


Figure I- 13 : Structure du complexe IV.

D'après (Saraste 1999)

II.2.4.2. Fonction

Les oxydases forment une famille de métalloenzymes capables de créer un gradient de protons $\Delta\mu\text{H}^+$ de part et d'autre de la membrane, en puisant 4 H^+ de la matrice mitochondriale pour former deux molécules d'eau à partir de O_2 réduit, et en couplant la réaction redox à un transfert transmembranaire de protons comme l'a démontré Wikström (Wikstrom 2004, Wikstrom 1977).

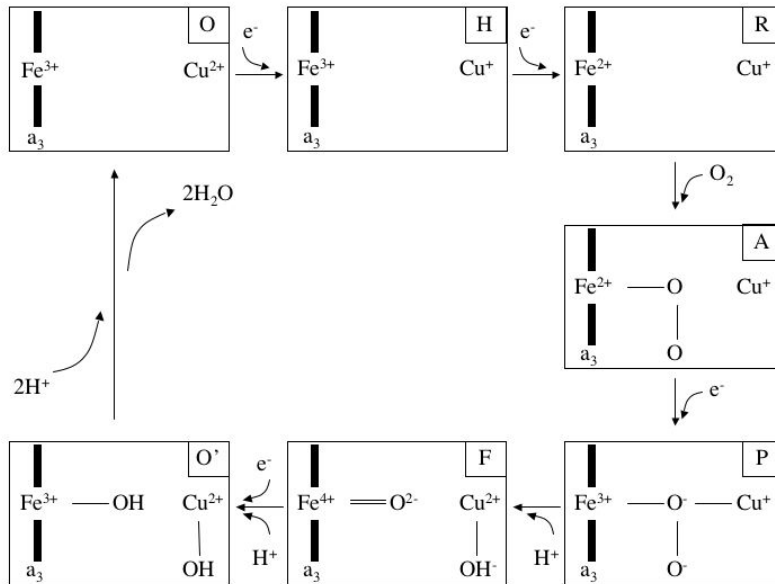


Figure I- 14 : Réduction du dioxygène au niveau du centre constitué par le cytochrome a3.

La voie de réduction est constituée des transitions O→H→R, correspondant à l'acceptation des électrons par le centre binucléaire et à la réduction de l'hème a₃. La seconde catégorie correspondant à la voie oxydative du centre binucléaire est précédée par la fixation de l'O₂ (R→A). Cette voie oxydative est composée de 4 étapes conduisant à la réduction totale de l'O₂ et à la formation de 2 molécules d'eau. D'après Guérin (Guérin 2004)

Le mécanisme de réduction de l'O₂ conduit à la formation de plusieurs intermédiaires que l'on classe en deux catégories, (i) les intermédiaires correspondant à la réduction du centre binucléaire par les électrons provenant de la chaîne respiratoire *via* le cytochrome c et le cytochrome a, (ii) les intermédiaires correspondant à l'oxydation par l'oxygène moléculaire (Figure I-14).



Equation I- 2: Réaction globale au niveau de la cytochrome oxydase.

II.2.5. L'ATP synthase

II.2.5.1. Structure

Les ATP synthases sont présentes dans les membranes transductrices d'énergie, comme les membranes de mitochondries, de chloroplastes ou encore dans la membrane plasmique des procaryotes.

L'ATP synthase est constituée de 3 domaines distincts : un domaine hydrosoluble F1 portant les sites catalytiques, un domaine F0 membranaire formant le canal à protons et un domaine permettant l'ancrage de F1 à la membrane (Figure I-15).

Le domaine membranaire F0 est un oligomère de sous-unités c qui entre en rotation lors du transfert des protons de l'espace intermembranaire à la matrice. 12 sous-unités c sont en contact avec un complexe formé des sous-unités γ et ε qui forment le rotor.

Une sous-unité a, complexée à un dimère de sous-unités b et à une sous-unité δ forment le stator qui interagit avec le domaine F1.

Le domaine F1, purifié en 1961 par Racker (Racker 1961), est constitué de 5 sous-unités différentes : $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$. Les sous-unités α et β , portent les sites de fixation des nucléotides adényliques, les sites catalytiques étant portés par chacune des sous-unités β .

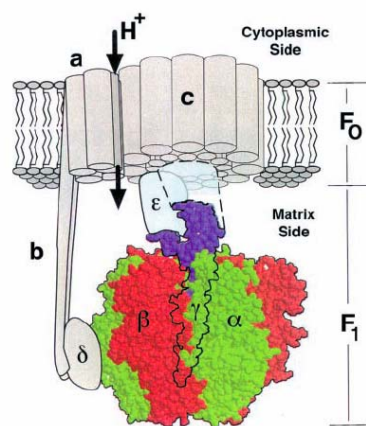


Figure I- 15 : Structure de l'ATP synthase.

II.2.5.2. Fonction

L'ATP synthase couple le mouvement transmembranaire des protons, dans le sens de leur différence de potentiel électrochimique, à la réaction de synthèse de l'ATP. Le mécanisme de synthèse d'ATP est décrit dans la figure I-16 et repose sur une catalyse multisite. La réaction inverse peut également se produire, elle est notamment très importante chez les bactéries en anaérobiose.

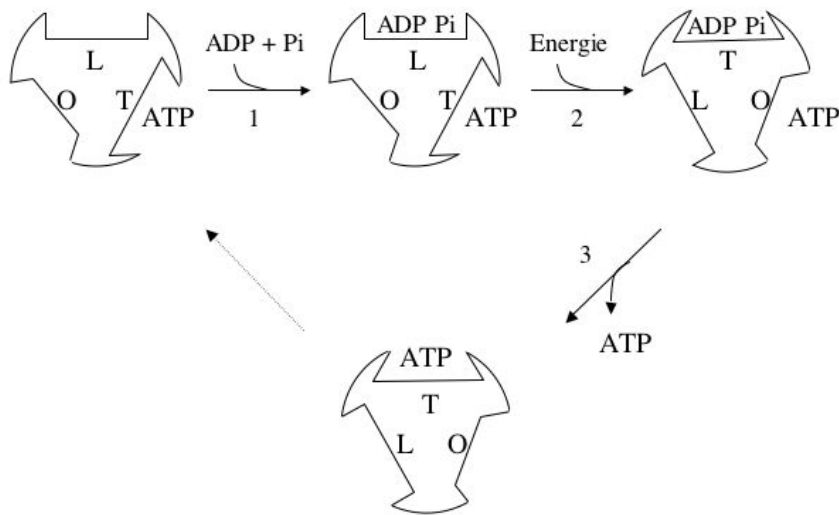


Figure I- 16 : La catalyse multisite.

Ce mécanisme de synthèse de l'ATP fait intervenir trois sites dans des conformations différentes. L'ADP et le Pi se fixent au site L (transition 1) sur une molécule possédant de l'ATP au site T ; l'apport d'énergie transforme le site L en site T (transition 2), ce qui induit l'ouverture du site précédent en site O (transition 2) ; l'ATP quitte l'enzyme et, en T, $\text{ADP} + \text{Pi} \rightarrow \text{ATP}$, et ainsi de suite.

II.3. Les systèmes de transport

Contrairement à la membrane externe qui permet les échanges de molécules grâce à la porine, la membrane interne est imperméable aux solutés chargés. Seules de petites molécules neutres telles que O_2 , CO_2 , H_2O ou NH_3 , ou encore certains lipides (acides gras à chaînes courtes et moyennes) peuvent diffuser au travers de la membrane interne mitochondriale.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la membrane interne est très riche en cardiolipine, qui stabilise la bicouche lipidique et diminue la fluidité membranaire, conférant à la membrane interne son imperméabilité. Les échanges de part et d'autre de la membrane interne se font donc *via* des transporteurs spécifiques. Ces protéines de transports de type **uniport**, **symport** ou **antiport**, utilisent comme source d'énergie soit **la composante chimique (ΔpH)**, soit **la composante électrique ($\Delta\psi$) de la force protonmotrice**, soit les deux.

Il existe 2 types de transport, les transports **électroneutres** et les transports **électrogéniques**. Les transports **électroneutres** permettent le transport du phosphate (Pi) ou encore du glutamate, par l'utilisation du ΔpH comme source d'énergie. L'échange de molécules se fait grâce au transport simultané de H^+ , la résultante des charges électriques transportées étant nulle (Tableau I-3).

Il y a cependant deux types de transporteurs **électroneutres**, les transporteurs **directs** (phosphate, glutamate) et **indirects** (acides tricarboxyliques). Dans le cas des transporteurs indirects des acides tricarboxyliques, l'échange du malate ou du succinate est couplé à l'échange de Pi, lui-même transporté en présence de H⁺.

Le second type de transport est **électrogénique** (Tableau I-3). Dans ce cas, l'échange de molécules est accompagné d'un échange de charges de part et d'autre de la membrane, et le sens du transport est alors imposé par le potentiel de membrane. C'est le cas du transporteur des nucléotides adényliques.

	TRANSPORTEUR	TYPE DE TRANSPORT
ΔpH	Phosphate	Symport : Pi ⁻ /H ⁺
	Glutamate	Antiport : glutamate ²⁻ /aspartate ²⁻ couplé à l'entrée de H ⁺
	Pyruvate	Symport pyruvate ⁻ /H ⁺
	Acides Dicarboxyliques	Antiport : malate ²⁻ /Pi ²⁻ ou succinate ²⁻ /Pi ²⁻ ou malate ²⁻ /succinate ²⁻
	α-cétoglutarate	α-cétoglutarate ²⁻ /malate ²⁻
Δψ	Nucléotides Adényliques	Antiport : ATP ⁴⁻ /ADP ³⁻
	Acides Tricarboxyliques	Antiport : citrate ³⁻ /malate ²⁻
Electrogénique	Calcium	Uniport : Ca ²⁺ /2Na ⁺ Antiport : Ca ²⁺ /2Na ⁺
Electroneutre	Carnitine	Antiport : carnitine ⁺ /acyl-carnitine ⁺

Tableau I- 3: Les systèmes de transports mitochondriaux..

L'ATP généré dans la matrice mitochondriale doit être transporté vers son lieu d'utilisation, le cytosol. Ainsi le transporteur des nucléotides adényliques (ANT) assure la continuité métabolique entre la matrice mitochondriale et le cytosol.

Il existe 3 isoformes d'ANT codées par un gène nucléaire, catalysant l'import d'ADP³⁻ cytosolique et l'export d'ATP⁴⁻ matriciel. Une quatrième isoforme a été récemment identifiée au sein de cellules embryonnaires de souris (Mitchell 1961, Rodic *et coll.* 2005).

Ce transporteur électrogénique, qui utilise la composante électrique Δψ du potentiel membranaire, est hautement spécifique, et seuls l'ATP et l'ADP peuvent être échangés de façon stoechiométrique.

II.4. Transport du calcium

Le calcium est un second messager essentiel dans les processus de signalisation cellulaire, le contrôle de sa concentration intracellulaire est donc primordial. La concentration cytosolique en Ca^{2+} libre est maintenue à un très faible niveau, de l'ordre de 100 nM, alors que la concentration extracellulaire est d'environ 1,2 mM. Le maintien d'une faible concentration en Ca^{2+} dans le compartiment cytosolique, se fait par la présence de « réservoirs » que sont le réticulum endoplasmique et les mitochondries.

Deux systèmes permettent l'entrée de Ca^{2+} dans les mitochondries (Figure I-17).

Le premier est un uniport à Ca^{2+} , fait intervenir un transfert de charges positives de l'extérieur vers l'intérieur et consomme directement la composante électrique du potentiel membranaire ($\Delta\Psi$). Cet uniport est inhibé par le Rouge de Ruthénium (RR) et par certains cations divalents (strontium, manganèse, baryum, lanthanides). Lors d'une baisse de $\Delta\Psi$, le flux de Ca^{2+} est inversé, mais la sortie de Ca^{2+} s'effectue dans ces conditions principalement par le pore de transition de perméabilité dont nous décrivons la régulation ultérieurement.

Le second système permettant l'entrée rapide de Ca^{2+} est appelé RaM (Rapide uptake Mode). Il est également sensible au RR et au Ca^{2+} lui-même. Il serait principalement responsable des entrées de Ca^{2+} lors de changements transitoires de la concentration calcique du cytosol induits par des activations hormonales.

Il existe également des systèmes permettant la sortie du Ca^{2+} : un système de type antiport utilisant le gradient sodique (NCE : Na^+ dependent pathway for Ca^{2+} Efflux) afin de libérer le Ca^{2+} contenu dans la matrice. Ce système est peu actif dans les mitochondries de foie contrairement à celles de tissus excitables et contractiles. Cependant, il existe un système antiport $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (NICE : Na^+ Independant pathway for Ca^{2+} Efflux) très important dans le foie, permettant la sortie de Ca^{2+} .

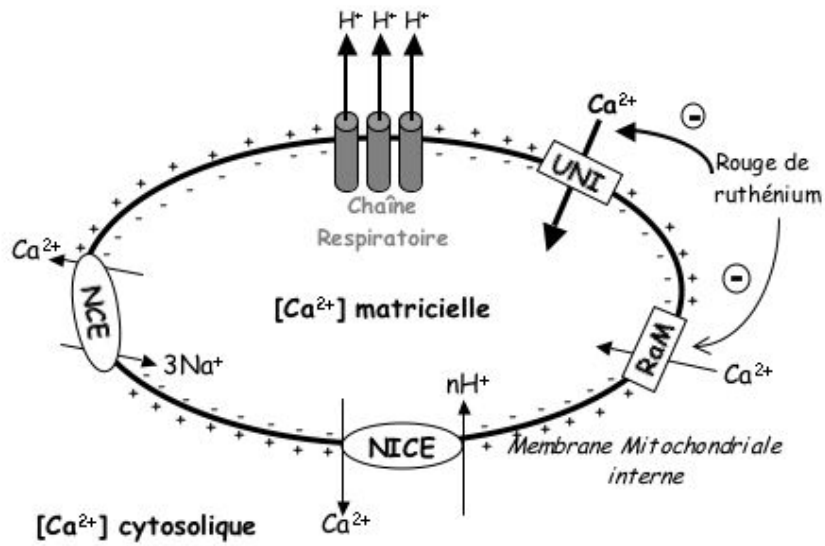


Figure I- 17: Les systèmes de transport mitochondriaux du calcium.

Les voies d'entrées du Ca²⁺ sont représentées par des rectangles, UNI : uniport à Ca²⁺ et RaM : transporteur rapide (Rapid uptake Mode). Ces voies sont inhibées par le rouge de ruthénium. Les voies de sorties du Ca²⁺ sont représentées par des ellipses. NICE: Na⁺ Indépendant Ca²⁺ Efflux et NCE: Na⁺ dépendent Ca²⁺ Efflux.

III. NO et mitochondrie

Comme nous l'avons vu, il existe de nombreux inducteurs de l'expression des NOS, comme les cytokines, les endotoxines, le stress oxydant, l'ATP, la bradykinine. Ces différents facteurs vont induire la production de fortes concentrations de NO dans différents types cellulaires comme les macrophages, astrocytes, hépatocytes et encore myocytes.

De très nombreuses études rapportent les effets inhibiteurs du NO produit par les NOS activées, sur la respiration cellulaire. L'activation de l'expression des iNOS au sein de cultures d'astrocytes par l'INF- γ et les endotoxines, induit une inhibition de la respiration qui est complètement reversée par l'ajout d'oxyhémoglobine ou par l'inhibition de la iNOS. De même, l'activation des macrophages entraîne une activation des iNOS et une inhibition de la respiration de cellules co-incubées avec ces macrophages. L'activation des eNOS de cellules endothéliales en culture primaire inhibe également la consommation d'oxygène de ces cellules.

Cependant, l'étude de la régulation des fonctions mitochondriales, tant *in vitro* qu'*in vivo* par le NO, est très difficile pour diverses raisons telles que :

- la réaction du NO avec des constituants cellulaires, et donc la production de peroxy-nitrites, nitrosothiols ou d'autres espèces réactives dérivées du NO, et qui induisent généralement une inhibition irréversible de la respiration
- la modification de la consommation d'ATP qui va indirectement modifier la consommation d'oxygène
- la réaction du NO avec l'hémoglobine et la myoglobine.

III.1. Inhibition de la respiration

Dans les années 80, Hibbs et son groupe mettent en évidence une molécule libérée par les macrophages activés qui exerce un fort pouvoir cytotoxique sur les cellules cibles, en inhibant leur respiration mitochondriale de façon irréversible (Drapier *et coll.* 1988, Hibbs *et coll.* 1987, Hibbs *et coll.* 1988).

Le NO, ainsi que ses dérivés (peroxy-nitrite, nitrosothiol, dioxyde d'hydrogène), possèdent des effets inhibiteurs de la respiration mitochondriale et ce, en agissant sur différents constituants de la chaîne respiratoire en fonction de la concentration en NO et du temps d'incubation en présence de celui-ci.

Il est maintenant admis que de faibles concentrations de NO, incubées sur de courtes périodes, induisent une inhibition réversible et spécifique de la COX (Brown *et coll.* 1994, Cleeter *et coll.* 1994, Schweizer *et coll.* 1994). En revanche, les fortes concentrations incubées de façon prolongée, induisent la transformation du NO en ses dérivés oxydés, et provoquent une inhibition irréversible de la respiration, voir même des altérations mitochondriales (Gross *et coll.* 1996, Konorev *et coll.* 1998, Poderoso *et coll.* 1996, Welter *et coll.* 1996, Wolosker *et coll.* 1996).

De nombreuses études ont été menées sur différents matériels biologiques : tissus, cellules, mitochondries isolées, particules sub-mitochondriales, comme en témoigne le tableau suivant :

CELLULES						
Synaptosome	Astrocytes	Hépatocytes	β -pancréatiques	Ascites tumeurs	Macrophages	Endothéliales
(Brown <i>et coll.</i> 1994)	(Brown <i>et coll.</i> 1995)	(Richter <i>et coll.</i> 1994)	(Laffranchi <i>et coll.</i> 1996)	(Nishikawa <i>et coll.</i> 1996)	(Brown <i>et coll.</i> 1998)	(Clementi <i>et coll.</i> 1999)

MITOCHONDRIES						
Particules Sub- mitochondriales	Foie	Muscle squelettique	Cerveau	Coeur	Tissu adipeux brun	Cytochrome oxydase isolée
(Lizasoain <i>et coll.</i> 1996) (Poderoso <i>et coll.</i> 1996)	(Nishikawa <i>et coll.</i> 1997) (Richter <i>et coll.</i> 1994)	(Cleeter <i>et coll.</i> 1994)	(Schweizer <i>et coll.</i> 1994)	(Borutaite <i>et coll.</i> 1996) (Poderoso <i>et coll.</i> 1996) (Cassina <i>et coll.</i> 1996)	(Koivisto <i>et coll.</i> 1997)	(Brown <i>et coll.</i> 1994)

Tableau I- 4 : Récapitulatif des principales études menées sur les effets inhibiteurs de la respiration du NO.

III.2. Inhibition irréversible : rôle du NO et de ses dérivés

Des études menées dans les années 80, sur les macrophages, ont montré que ces derniers avaient la capacité d'induire la mort de cellules tumorales, de manière dépendante du NO, et que des modifications à la fois des macrophages et des cellules tumorales cibles étaient associées à cette activité. En effet, une inhibition de l'aconitase mitochondriale, des complexes I et II de la chaîne respiratoire, ainsi qu'une perte du fer intracellulaire ont été constatées (Drapier *et coll.* 1988, Granger *et coll.* 1982, Hibbs *et coll.* 1987, Hibbs *et coll.* 1988, Stuehr *et coll.* 1989). Par la suite, Hibbs et Stuehr ont mis en évidence que les mêmes modifications mitochondriales pouvaient être

observées lors de l'incubation de cellules en condition anaérobie et en présence d'une forte concentration de NO. Toutes les enzymes mitochondriales affectées par la présence de NO possèdent un ion ferreux non-hémique lié à un soufre. Ce centre Fer-Soufre constituerait le site de fixation du NO sur les enzymes. Hibbs and coll. suggèrent alors que ces effets sont dus à une modification des groupements prosthétiques des centres Fer-Soufre de l'aconitase et des complexes I et II de la chaîne respiratoire. Meyer (Meyer 1981) et Reddy (Reddy *et coll.* 1983) émettent l'hypothèse que l'effet inhibiteur du NO soit dû à la dégradation des centres Fe-S, induisant alors une libération d'ions fer et de complexes Fe-nitrosyl.

Actuellement, il est connu que le NO peut induire des modifications dans les centres Fer-Soufre de façon réversible ou irréversible. Cependant, certaines questions subsistent quant aux rôles que jouent ces modifications sur l'inhibition irréversible de la respiration mitochondriale.

Les effets des dérivés du NO sont également source de quelques incertitudes. Il est clairement démontré dans la littérature que les dérivés du NO ont d'importants effets délétères sur les mitochondries, dus à des réactions d'oxydation, et qu'ils sont la cause de certaines pathologies ou encore de l'induction du processus de mort cellulaire.

La formation de peroxyde de nitrite est très rapide, et se fait par réaction du NO avec les ions superoxydes. Les peroxyde de nitrite ainsi générés inhibent et altèrent les complexes I et II de la chaîne respiratoire, l'ATP synthase, la créatine kinase, l'aconitase, la membrane mitochondriale, l'ADN mitochondrial, la superoxyde dismutase. Ils peuvent également induire un gonflement mitochondrial, un découplage, une dépolarisation membranaire, la libération de Ca^{2+} et la transition de perméabilité (Brookes *et coll.* 1998b, Brown 1999, Cassina *et coll.* 1996, Lizasoain *et coll.* 1996). De fortes concentrations de NO (>1 mM) ou de peroxyde de nitrite peuvent aussi agir au niveau de la COX et induire son inhibition irréversible, et donc augmenter son K_m pour l'oxygène (Sharpe *et coll.* 1998).

Malgré de nombreuses études relatant les effets du NO sur la mort cellulaire et sur la respiration mitochondriale, il nous est impossible d'affirmer qu'ils soient en partie médiés par les peroxyde de nitrite.

III.3. NO et complexe I

Plusieurs mécanismes connus peuvent expliquer l'inhibition du complexe I par le NO ou par ses espèces réactives ($ONOO^-$, NO_2 , N_2O_3 , N_2O_4 , S-nitrosothiol) ou encore par les espèces réactives de l'oxygène ROS (O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$). Cependant, certains d'entre eux n'en restent pas moins hypothétiques.

L'équipe de Moncada a publié trois études montrant les effets d'un traitement prolongé d'une culture de cellules avec un donneur de NO le DETA-NONOate (Diethylenetriamine NONOate). Les auteurs constatent une inhibition irréversible de la respiration après plusieurs heures d'incubation, conduisant à une déplétion des cellules en glutathion. Cette inhibition irréversible est principalement due à une inhibition du complexe I et ne fut observée qu'en présence de L-arginine, et était également accompagnée d'une inhibition du complexe II et de l'aconitase (Clementi *et coll.* 1998, Gegg *et coll.* 2003, Riobo *et coll.* 2001).

A l'inverse, Borutaite et coll. ont démontré récemment que l'utilisation des S-nitrosothiols comme donneur de NO tels que SNAP (S-nitro-N-acetyl-D,L-penicillamine) et SNOG (S-nitrosoglutathione), engendre une inhibition du complexe I mais qui peut être rétablie par la lumière ou l'ajout de thiols réduits (Borutaite *et coll.* 2000a). De même, Hibbs and Rachlin (Hibbs *et coll.* 1988) suggèrent que l'inhibition de la respiration ainsi obtenue est un médiateur de mort ou de cytotase des cellules tumorales, et que ce phénomène peut être totalement inversé en présence de glucose, agissant comme une source alternative d'ATP.

Enfin, Bolanos et coll. (Bolanos *et coll.* 1995, Brown *et coll.* 1995) montrent que la régulation de l'activité du complexe I au sein de mitochondries de cerveau est beaucoup moins sensible à l'action directe des peroxy-nitrites. En effet, l'induction des iNOS dans les astrocytes ou une brève incubation de neurones en présence de peroxy-nitrites n'induit aucune perte d'activité du complexe I (Bolanos *et coll.* 1994). En revanche, une incubation de neurones pendant 24h en présence de SNAP entraîne une forte diminution de l'activité des complexes I, II, III et IV (Bolanos *et coll.* 1996). D'autres résultats mettent en évidence une résistance aux peroxy-nitrites plus importante dans les astrocytes par rapport aux neurones, ainsi qu'une inhibition de l'activité du complexe I des astrocytes très importante dans le cas d'une déplétion en GSH (Barker *et coll.* 1996a, Barker *et coll.* 1996b). Ceci laisse penser que l'inhibition du complexe I induite par le NO/peroxy-nitrites/nitrosothiols intervient uniquement après une déplétion en GSH.

III.4. NO et cytochrome c oxydase

III.4.1. Site de fixation

Comme nous l'avons décrit auparavant, la COX est localisée dans la membrane mitochondriale interne. Elle catalyse l'oxydation du cytochrome c et la réduction de l'oxygène, ces deux réactions étant couplées au transfert vectoriel de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. La COX possède un site de fixation pour l'oxygène, qui est également le

centre catalytique de l'enzyme, constitué du cytochrome a_3 (Fe^{2+}) et d'un atome de cuivre Cu_B (Cu^{1+}).

En 1955, Wainio fut le premier à mettre en évidence que le NO se lie à la forme réduite de la COX (Wainio 1955). Ce n'est que quelques années plus tard, que Gibson et Greenwood démontrent que le site de fixation du NO à la COX correspond au site de fixation de l'oxygène (Gibson *et coll.* 1965). Par conséquent, le NO se trouve donc en compétition avec l'oxygène pour son site de fixation (Blackmore *et coll.* 1991, Brudvig *et coll.* 1980). En 1980, Brudvig *et coll.* démontrent que le NO peut également se fixer à la forme oxydée de l'enzyme (Brudvig *et coll.* 1980).

De nombreux groupes de recherche se sont alors intéressés à l'interaction du NO avec la COX, et nous pouvons maintenant affirmer que le NO a la capacité de se lier à tous les intermédiaires de la COX, soit par sa fixation à l'atome de cuivre Cu_B oxydé, soit par sa fixation à l'hème a_3 réduit.

Ces deux réactions conduisent à l'inhibition réversible de la COX, avec la formation soit d'adduits Fe^{2+} -nitrosyl soit de dérivés nitrés, respectivement photosensibles et photoinsensibles. Après une étude menée sur la COX isolée, Torres (Torres *et coll.* 1995) et Giuffrè (Giuffrè *et coll.* 1996) concluent également à une fixation compétitive du NO sur le site de fixation de l' O_2 , et démontrent que cette fixation se fait sur la forme partiellement réduite du centre binucléaire $cyt\ a_3-Cu_B$. En effet, le NO se lie très rapidement au Fe^{2+} du cytochrome a_3 , à savoir à la forme réduite, avec une constante k comprise entre 0,4 et $1 \times 10^8\ M^{-1} \cdot s^{-1}$, et s'en dissocie lentement avec une constante de 0,1 à $0,01\ M^{-1} \cdot s^{-1}$. Ceci témoigne d'une constante d'affinité très élevée du NO pour la COX réduite (K_d de 1 nM). Cependant l'oxygène se lie également très rapidement au Fe^{2+} du cytochrome a_3 ($k=10^8\ M^{-1} \cdot s^{-1}$). Toutefois, dans les situations où les ratios O_2/NO sont supérieurs à 1000/1, il apparaît anormal que le NO puisse inhiber la COX si rapidement (moins d'une seconde) en se liant au cytochrome a_3 . A la lumière de ces travaux, Torres *et coll.* proposent que le NO se lie préférentiellement à la forme oxydée du Cu_B (Cu^{1+}), ce qui donnerait un avantage cinétique au NO par rapport à l' O_2 pour se fixer au Fe^{2+} du cytochrome a_3 , l' O_2 n'étant capable de se fixer qu'à la forme réduite (Torres *et coll.* 1998, Torres *et coll.* 1995). Ils démontrent que le NO en se liant au Cu_B^{2+} forme un ion nitrosonium ($Cu^{1+}NO^+$), qui par une réaction d'hydratation génère des nitrites qui vont alors inhiber la COX. Cette interaction avec l'atome de cuivre Cu^{1+} ou Cu^{2+} est alors présentée comme pouvant être la voie principale permettant une rapide inhibition de la COX.

En revanche Giuffrè *et coll.* proposent que l'inhibition soit due à une liaison rapide entre le NO et le Fe^{2+} du centre binucléaire partiellement réduit. L'oxygène ne se liant qu'à la forme totalement réduite ($Fe^{2+}-Cu^{1+}$) et non à la forme partiellement réduite ($Fe^{2+}-Cu^{2+}$ ou $Fe^{3+}-Cu^{1+}$),

si le NO se lie à une des formes partiellement réduites, cela lui donne alors un avantage cinétique sur l'oxygène pour inhiber le centre binucléaire (Giuffrè *et coll.* 1996).

Le cycle catalytique de la COX comprend deux phases : une phase réduite et une phase oxydée. Elles sont elles-mêmes constituées de plusieurs états intermédiaires partiellement réduits ou oxydés, donnant la possibilité au NO d'interagir avec tous les intermédiaires de ce cycle (Figure I-18).

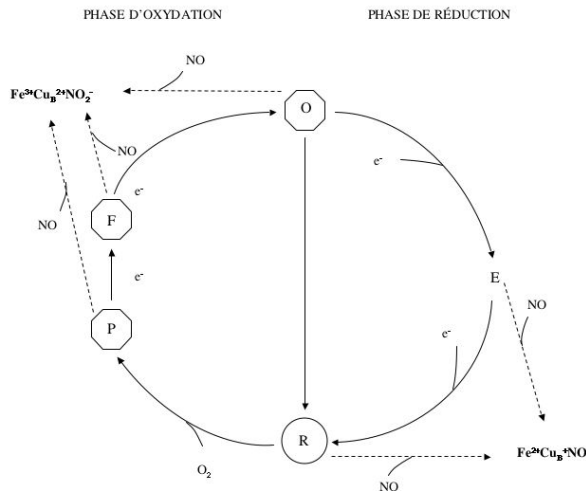


Figure I- 18 : Cycle catalytique de la cytochrome c oxydase et interaction avec le NO.

Dans la phase lente de réduction, la forme totalement oxydée O de l'enzyme est totalement réduite en la forme R, par un gain de deux électrons, passant par un intermédiaire E, partiellement réduit. Dans la phase rapide d'oxydation, la forme R réagit avec du dioxygène pour former l'intermédiaire P puis F, régénérant éventuellement la forme totalement oxydée O. La formation de l'adduit nitrosyl-hème a_3^{2+} ou nitrite-Cu $_B^{2+}$ -hème a_3^{3+} se fait durant le cycle catalytique. Les intermédiaires contenant le Cu $_B^{2+}$ (oxydé) sont représentés par un hexagone, alors que ceux qui contiennent le Fe $^{2+}$ sont représentés par un cercle.

Au vu de ces résultats, une question subsiste : quelle est la forme d'intermédiaire prédominante *in vivo*, et quel est le facteur régulateur ?

Le fait que l'adduit Fe $^{2+}$ -nitrosyl soit sensible à la lumière contrairement à la forme conduisant aux dérivés nitrés, a permis à Sarti de mettre en évidence la voie qui était prédominante. Ainsi, le flux d'électrons passant au travers de l'enzyme semble contrôler la prévalence d'un type de mécanisme par rapport à l'autre. En effet, à faible flux d'électrons, la formation de nitrite inhibe la COX en formant des adduits avec le centre binucléaire sous sa forme oxydée, tandis qu'à flux d'électrons élevés, l'inhibition est médiée par la réaction du NO avec la forme réduite de la COX (Fe $^{2+}$ NO) (Sarti *et coll.* 2000).

Ces résultats, obtenus sur l'enzyme purifiée, ont été confirmés par des études menées sur mitochondries isolées ainsi que sur des suspensions cellulaires.

III.4.2. Inhibition de la cytochrome oxydase

En 1994, paraissent les premières publications démontrant l'effet inhibiteur du NO exogène (présent en concentration de l'ordre du nanomolaire) sur l'activité de la COX. Ces travaux montrent, comme nous venons de le voir, que cet effet inhibiteur est réversible et de surcroît compétitif avec l'oxygène.

Cleeter et coll. sont les premiers à montrer que le donneur de NO SNOG, inhibe de façon réversible la respiration mitochondriale du muscle squelettique, en conséquence de l'inhibition de la COX (Cleeter *et coll.* 1994). Brown et Cooper démontrent que 1 μM de NO est suffisant pour induire une inhibition de la COX isolée. De plus, cette inhibition est totalement réversible si le NO est piégé par une molécule « scavenger » (Brown *et coll.* 1994). Cette étude menée sur des synaptosomes, montre également que l'inhibition de la consommation d'oxygène par le NO est compétitive avec l'oxygène. En effet, l'IC₅₀ varie en fonction de la concentration (pression partielle) en oxygène. Ainsi, 270 nM de NO sont nécessaires pour inhiber la COX en présence d'une concentration en oxygène de 145 μM (correspondant à la PO₂ artérielle), tandis que 60 nM sont suffisants pour induire la même inhibition en présence cette fois de 30 μM d'O₂ (soit la PO₂ tissulaire). Koivisto et coll. ont également étudié la compétition entre le NO et l'O₂ au niveau de mitochondries isolées de tissus adipeux bruns. Ils ont observé qu'en présence de 180 μM d'O₂, 364 nM de NO sont nécessaires pour induire 50 % d'inhibition de la respiration, que 69 nM suffisent à 72 μM d'O₂ et seulement 11 nM à 32 μM d'O₂ (Koivisto *et coll.* 1997, Koivisto *et coll.* 1999).

L'IC₅₀ est donc bien dépendante de la tension en oxygène et augmente avec la PO₂.

Le fait que le NO entre en compétition avec l'oxygène et qu'il agisse en augmentant le Km apparent de l'oxygène, laisse à penser que le NO peut être un régulateur physiologique de la sensibilité à l'oxygène de la respiration tissulaire.

Borutaite et Brown confirment, en 1996, que l'effet du NO sur l'inhibition de la respiration est entièrement dépendant de la concentration en oxygène, démontrant que la sensibilité au NO dépend également des substrats et de l'état respiratoire (état 4 : état non-phosphorylant, état 3 : état phosphorylant) (Borutaite *et coll.* 1996). En effet, la consommation d'oxygène en état 4, est moins sensible à l'inhibition induite par le NO qu'elle ne l'est à l'état 3 respiratoire, et ce certainement en raison du fait que la COX soit moins contrôlante sur la respiration à l'état 4.

Depuis ces travaux, de nombreux autres ont confirmé l'effet inhibiteur du NO sur la chaîne respiratoire par son interaction avec la COX et ce, dans de nombreux modèles d'études : mitochondries isolées (Brown *et coll.* 1994, Cleeter *et coll.* 1994, Schweizer *et coll.* 1994), cellules (Balligand *et coll.* 1993a, Balligand *et coll.* 1993b, Brady *et coll.* 1993, Sarti *et coll.*

1999, Stumpe *et coll.* 2001), tissus (Shen *et coll.* 1995, Xie *et coll.* 1996a, Xie *et coll.* 1996b) et même *in vivo* (Hare *et coll.* 1995, Zhao *et coll.* 1999a, Zhao *et coll.* 1999b).

Il est important de noter que de nombreux travaux rapportent les effets inhibiteurs du NO réalisés en présence de concentrations en donneurs de NO très variables, mais que bon nombre de ces études ne présentent aucune mesure de la concentration réelle en NO ou en O₂.

Le NO est une molécule inhibitrice de la chaîne respiratoire, qui agit soit par un effet direct au niveau du complexe IV par sa liaison à la COX au niveau du site de fixation de l'oxygène, soit par la genèse de peroxy-nitrites et d'espèces dérivées de l'azote qui inhibent tous les complexes de la chaîne respiratoire.

Comme nous l'avons décrit précédemment, la chaîne respiratoire est le site de couplage entre l'oxydation des équivalents réduits (NADH et FADH₂) par l'oxygène et le transfert vectoriel de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire générant un gradient électrochimique de protons ($\Delta\mu\text{H}^+$). Le gradient électrochimique de protons ainsi généré est consommé par l'ATPase qui couple l'entrée de H⁺ à la synthèse d'ATP. Il nous a donc semblé important d'étudier l'effet du NO sur le processus d'oxydation phosphorylante.

IV. L'oxydation phosphorylante

L'énergie, du latin *en* (dans) et *ergo* (j'agis) : qui agit en dedans, est une propriété de la matière indispensable à la vie. Les processus de la vie étant thermodynamiquement défavorables, une source d'énergie est donc indispensable à tout organisme vivant. Les organismes aérobies génèrent de l'ATP par deux mécanismes principaux : la glycolyse mais surtout l'oxydation phosphorylante qui constitue l'ensemble des réactions membranaires par lesquelles l'oxydation des coenzymes et de certains métabolites est couplée à la synthèse d'ATP.

IV.1. Théorie chimio-osmotique de Mitchell

En 1961, Peter Mitchell proposa une théorie appelée théorie **chimio-osmotique délocalisée**, qui s'est révélée être la plus adéquate pour expliquer le processus de transduction d'énergie au niveau de la mitochondrie (Mitchell 1961). Les bases de cette théorie peuvent être résumées par trois postulats :

- (i) la membrane mitochondriale interne a une faible conductivité pour la majorité des substances chargées et reste très peu perméable aux protons,
- (ii) les complexes de la chaîne respiratoire sont disposés de façon asymétrique dans la membrane interne. Ils constituent des entités individuelles et permettent l'établissement d'un gradient électrochimique de protons ($\Delta\mu_{H^+}$) de part et d'autre de la membrane interne, positif à l'extérieur de la mitochondrie,
- (iii) la différence de potentiel entre les deux phases aqueuses ($\Delta\mu_{H^+}$) de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne est le seul intermédiaire énergétique entre les différents systèmes transformateurs d'énergie structurellement indépendants. Il fournit l'énergie nécessaire aux transports actifs et à la synthèse d'ATP.

L'oxydation des équivalents réduits (NADH et FADH₂) par l'oxygène, au niveau de la chaîne respiratoire, est couplée à un transfert vectoriel de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire générant un gradient électrochimique de protons ($\Delta\mu_{H^+}$), qui se décompose en une différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\psi$) et en un gradient de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne (ΔpH). Par analogie avec la force électromotrice, $\Delta\mu_{H^+}$ est exprimé en terme de force protonmotrice (Δp), de telle sorte que $\Delta p = \Delta\mu_{H^+} / F$ (F représente la constante de Faraday).

Les protons entrent à nouveau dans la matrice mitochondriale *via* la sous-unité F_0 de l'ATP synthase. L'énergie, ainsi libérée, est utilisée par la sous-unité hydrosoluble F_1 de l'ATP synthase pour la synthèse d'ATP. La force protonmotrice est également utilisée pour le transport actif d'ions et de métabolites contre leur gradient de concentration, comme pour le phosphate ou encore le pyruvate. De plus, l'imperméabilité aux protons de la membrane mitochondriale interne n'étant pas absolue, une partie du gradient électrochimique de protons est dissipée sous forme de chaleur par le retour passif des protons (leak) dans la matrice sans passer par l'ATP synthase.

Cependant, la théorie chimio-osmotique délocalisée a suscité bon nombre de polémiques et de théories différentes, alternatives à celle proposée par Mitchell, considérant le gradient électrochimique de protons comme n'étant pas le seul intermédiaire entre l'oxydation et la phosphorylation.

Selon Williams (Williams 1978) et sa théorie **chimio-osmotique localisée**, les protons issus des réactions d'oxydoréduction de la chaîne respiratoire sont acheminés par des canaux intramembranaires, permettant de relier les complexes de la chaîne respiratoire à l'ATP synthase. Padan et coll., en 1973, propose la théorie du **couplage parallèle**, selon laquelle, en plus du gradient électrochimique de protons comme intermédiaire entre l'oxydation et la phosphorylation, il existerait un couplage direct de protons entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase au sein de la membrane mitochondriale interne (Padan *et coll.* 1973).

Une synthèse entre la théorie localisée et délocalisée est proposée par Westerhoff (Westerhoff *et coll.* 1983) dans sa **théorie mosaïque**. Des pompes redox de la chaîne respiratoire s'associeraient à des unités d'ATP synthase pour former de petits complexes spatialement distincts au niveau de la membrane mitochondriale interne. Ainsi, des gradients localisés permettraient la transduction d'énergie à l'intérieur de chaque complexe et tous les complexes seraient reliés par des conduits de courants protoniques.

Enfin, Slater (Slater *et coll.* 1985) propose la **théorie des collisions ou du couplage direct**, supposant que le transfert d'énergie entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase se fait grâce à un changement de conformation des protéines, de telle sorte que la synthèse d'ATP dépendrait de la vitesse de collision entre l'ATP synthase et les complexes de la chaîne respiratoire.

Il est maintenant admis par la majorité de la communauté scientifique que le gradient électrochimique délocalisé de protons participe au processus de transduction d'énergie au sein de la mitochondrie.

IV.2. Contrôle de l'oxydation phosphorylante

En 1934, Engelhardt fut le premier à mettre en évidence l'existence d'une relation entre la respiration et la synthèse d'ATP. Cette découverte suscita de nombreuses interrogations quant au couplage des réactions d'oxydation et de phosphorylations et à leur régulation, et fit émerger de nombreux concepts.

IV.2.1. Les concepts

Les premières études sur les mécanismes de régulation de l'oxydation phosphorylante datent des années 1950 et mettent en évidence, sur mitochondries isolées, une relation entre la vitesse de respiration et la concentration en ADP et en phosphate (Pi). Chance et Williams (Chance *et coll.* 1956b, 1956a) émirent ainsi l'hypothèse que la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP seraient sous la dépendance des processus consommateurs d'ATP. Dans cette hypothèse, le mécanisme régulateur ne repose que sur un contrôle cinétique lié à une limitation en substrats. Cela signifie que l'oxydation phosphorylante serait limitée par les concentrations en ADP et en Pi. Ainsi, une augmentation de l'hydrolyse de l'ATP entraînerait une augmentation des concentrations en ADP et en Pi, et donc en retour stimulerait la respiration.

A l'opposé de ce concept purement cinétique, Klingenberg (Klingenberg 1961) puis Erecinska et Wilson (Erecinska *et coll.* 1982), en se basant sur des mesures thermodynamiques, proposèrent que l'ensemble des phénomènes impliqués dans l'oxydation phosphorylante fonctionnerait dans des conditions proches de l'équilibre thermodynamique à l'exception de la COX. Dans cette hypothèse, la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP seraient sous la dépendance directe (i) du rapport NADH/NAD⁺ mitochondrial, (ii) du potentiel phosphate et (iii) de tous les facteurs pouvant influencer sur la COX (comme la concentration en oxygène).

Etant donné que l'ATP, l'ADP et l'AMP jouent le rôle d'effecteurs allostériques au niveau de nombreuses voies métaboliques impliquées dans la fourniture des mitochondries en substrats énergétiques, ainsi que dans les voies consommatrices d'ATP, Atkinson suggéra que le métabolisme énergétique serait contrôlé par un paramètre appelé charge adénylique définie comme étant (Atkinson 1968, Atkinson *et coll.* 1967) :

$$\frac{[ATP]+0,5[ADP]}{[ATP]+[ADP]+[AMP]}$$

D'autres groupes de recherche ont proposé un contrôle de la respiration mitochondriale au niveau d'une étape particulière de l'oxydation phosphorylante. Il fut suggéré une régulation de l'ANT par l'acétyl-CoA (Vignais 1976b, 1976a), un contrôle au niveau de la COX (Kadenbach

1986), la régulation des déshydrogénases matricielles par la concentration en Ca^{2+} intracellulaire (Denton *et coll.* 1980, Hansford *et coll.* 1989, Moreno-Sanchez *et coll.* 1990), ou encore une régulation par le volume mitochondrial (Halestrap 1989).

Historiquement, le concept permettant d'étudier le contrôle d'une voie métabolique est basé sur l'existence d'une **étape limitante**, défini par Blackman (1905) comme suit : « Lorsque la rapidité d'un processus est conditionnée par un nombre élevé de facteurs différents, la vitesse de ce processus est limitée par l'étape la plus lente ». Cette étape limitante serait irréversible et sa vitesse s'imposerait à toute la voie métabolique au sein de laquelle elle se trouve. Ainsi les régulations s'exerceraient uniquement sur cette dernière. De nombreux travaux ont été par la suite basés sur l'identification d'une étape irréversible, limitante, dont les seules caractéristiques cinétiques suffiraient à réguler le flux global de la voie métabolique à laquelle elle appartient. D'après ce postulat, les étapes enzymatiques fonctionnant au voisinage de l'équilibre étant considérées comme dépourvues de tout contrôle thermodynamique, deux sites sont alors proposées comme étant potentiellement contrôlantes :

- **la cytochrome c oxydase** : cette enzyme ne fonctionne pas dans des conditions proches de l'équilibre thermodynamique (Erecinska *et coll.* 1982). Par conséquent les facteurs influençant sa vitesse de réaction sont des régulateurs potentiels de la vitesse de l'oxydation phosphorylante. C'est le cas des variations de concentrations en oxygène, en ATP, en ADP, en Pi mais également les variations de pH (Brown 1992, Kadenbach *et coll.* 1998). Kadenbach suggéra également que la cytochrome c oxydase serait régulée de façon allostérique par l'ATP et/ou l'ADP (Kadenbach *et coll.* 1999).
- **le transporteur de nucléotides adényliques** : l'import d' ADP^{3-} et l'export d' ATP^{4-} dirigés par l'ANT étant une réaction loin de l'équilibre thermodynamique (Wanders *et coll.* 1981), Kunz (Kunz *et coll.* 1981) suggère que l'ANT exerce un contrôle important sur la vitesse de respiration étant donné que l'inhibition de ce transporteur par le carboxyatractylate conduit à une inhibition du même ordre de la respiration d'hépatocytes isolés.

Ce concept d'étape limitante repose sur l'étude *in vitro* de l'activité des enzymes isolées et de leur régulation (Rognstad 1979) mais ne tient aucunement compte du fait qu'il existe des relations entre les différentes étapes d'une voie métabolique, et que leurs régulations pourraient modifier le flux résultant de la voie métabolique.

Kacser et Burns (Kacser *et coll.* 1973) ainsi qu'Heinrich et Rapoport (Heinrich *et coll.* 1974) développèrent une approche alternative permettant l'analyse mathématique rigoureuse du

contrôle exercé par chaque étape de la voie métabolique. Dans cette approche alternative à la notion d'étape limitante, sont prises en compte les caractéristiques de chacune des enzymes, mais également les propriétés globales liées à la structure du réseau métabolique. Cette théorie, appelée **analyse du contrôle métabolique**, intègre différents paramètres comme les coefficients de contrôle et d'élasticité, ainsi que les relations existantes entre les deux. Le coefficient de contrôle des flux représente le rapport entre le pourcentage de variation du flux au travers d'une voie métabolique en état stationnaire et le pourcentage de variation de la quantité d'enzyme responsable de la variation de flux observée. Ce coefficient est donc capable de varier en fonction des conditions métaboliques en présence.

Il est cependant difficile de quantifier l'influence d'une étape enzymatique en particulier, ou d'un pool de métabolites sur le flux global d'un réseau métabolique.

Groen et coll. (Groen *et coll.* 1982) ont été les premiers à appliquer la théorie du contrôle à l'oxydation phosphorylante dans les mitochondries de foie de rats, en proposant que le contrôle de l'oxydation phosphorylante soit distribué au niveau de plusieurs étapes et que cette distribution soit susceptible de varier dans différentes conditions métaboliques. Pour mettre cela en évidence, ils ont mesuré les coefficients de contrôle exercés par différentes étapes de l'oxydation phosphorylante sur la respiration et ce, en utilisant des inhibiteurs spécifiques des transporteurs ou des enzymes impliqués dans ces différentes étapes (Figure I-19).

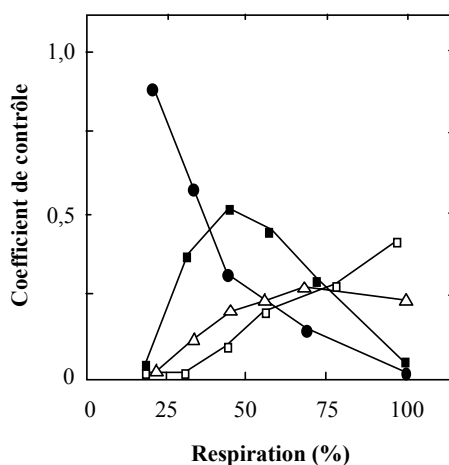


Figure I- 19 : Coefficients de contrôle sur la respiration de mitochondries isolées.

Effet de la translocase (Δ), de la fourniture en substrat énergétique (\square), de la consommation d'ATP (au niveau de l'hexokinase) (ν) et des fuites membranaires (λ), en fonction de la vitesse de respiration. D'après Groen A.K., Wanders R.J.A., Westerhoff H.V., Van der Meer R. & Tagger J.M. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* 1982, 257, 2754-2757.

Deux conclusions se dégagent de cette étude :

- **le contrôle de l'oxydation phosphorylante est attribuable à plusieurs étapes du réseau métabolique et non pas à une seule étape enzymatique.** Lorsque le renouvellement de l'ATP est maximal, c'est-à-dire en présence de succinate en état 3 respiratoire, le contrôle de la respiration est essentiellement dû au transporteur de nucléotides adényliques, aux transporteurs de dicarboxylates et à la COX.
- **la distribution du contrôle n'est pas fixe et varie en fonction de l'état stationnaire considéré.** En état 4 respiratoire, la respiration est essentiellement contrôlée par l'entrée passive de protons dans la matrice mitochondriale (Groen *et coll.* 1982) et par la chaîne respiratoire (Brand *et coll.* 1988, Brown *et coll.* 1988). Lorsque la respiration est intermédiaire entre l'état 4 et l'état 3, c'est-à-dire dans des conditions proches de la situation physiologique, la distribution du contrôle évolue en fonction de l'activité du système consommateur d'ATP, qui prend alors part au contrôle global de la respiration. Dans ces conditions, la vitesse de respiration dépendrait de l'hydrolyse de l'ATP, de l'activité du transporteur de nucléotides adényliques, de la fourniture en substrats de la chaîne respiratoire et du « leak » de la membrane mitochondriale interne.

IV.2.2. Contrôle de l'oxydation phosphorylante par l'apport en substrats respiratoires

Grâce aux travaux de Chance et Williams (Chance *et coll.* 1956b), il est maintenant parfaitement établi au niveau des mitochondries isolées mais également au niveau de la cellule entière, qu'une augmentation de la consommation d'ATP s'accompagne d'une stimulation de la synthèse d'ATP, de la consommation mitochondriale d'oxygène et de l'utilisation des substrats énergétiques au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi, une augmentation de la fourniture en substrat, comme une augmentation de la concentration en NADH matricielle, entraîne une augmentation du rapport NADH/NAD^+ , qui va alors stimuler la respiration mitochondriale, de sorte à augmenter la force protonmotrice. Cette augmentation va avoir pour effet d'augmenter les pertes, représentées par les fuites membranaires, et/ou le patinage des pompes, mais cela va également stimuler la synthèse d'ATP. Il en résulte alors une augmentation du potentiel phosphate et donc une activation des voies consommatrices d'ATP dont l'activité est étroitement régulée par le potentiel phosphate.

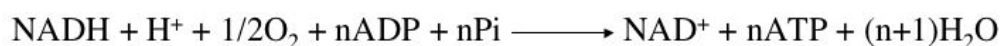
De nombreuses expériences mettent en évidence une étroite relation entre le niveau d'oxydoréduction du couple NADH/NAD^+ et la vitesse de respiration, et ce sur mitochondries

isolées de foie ou de cœur, mais également sur hépatocytes isolés, ou encore sur des tubules proximaux.

De plus, Kratz et coll. ont montré, sur cœur isolé perfusé, que l'augmentation de la concentration en glucose s'accompagne d'une augmentation du NADH mitochondrial, et se traduit par une augmentation modérée du travail cardiaque (Katz *et coll.* 1987).

IV.3. Modification du rendement de l'oxydation phosphorylante

Le couplage entre les réactions d'oxydations et de phosphorylation au sein de la mitochondrie peut-être résumé comme suit :



Equation I-3 : Bilan du processus d'oxydation phosphorylante

n représente le nombre de molécules d'ATP synthétisées lorsque deux électrons sont transférés au niveau de la chaîne respiratoire. L'efficacité stoechiométrique de l'oxydation phosphorylante est appréciée par la mesure du rapport $J_{\text{ATP}}/J_{\text{O}_2}$, plus communément noté ATP/O.

Lors du processus d'oxydation phosphorylante, une dissipation d'énergie se produit et peut être due à deux mécanismes : soit à une perméabilité passive aux protons et/ou aux cations, appelée « *leak* » ou encore **découplage extrinsèque**, soit à une diminution de l'efficacité des pompes à protons, appelée « *slipping* » ou encore **découplage intrinsèque**.

IV.3.1. Perméabilité membranaire aux protons : leak

Contrairement à l'interprétation chimique classiquement avancée pour expliquer la transduction d'énergie au niveau de la mitochondrie, la théorie chimio-osmotique de Mitchell proposée en 1961 est compatible avec les rapports ATP/O rapportés dans la littérature (Mitchell 1961).

La force protonmotrice permet la synthèse d'ATP en générant un flux de protons au travers de l'ATP synthase, cependant une certaine quantité de protons peut court-circuiter l'ATP synthase et entrer de nouveau dans la matrice mitochondriale sans participer à la synthèse d'ATP (Figure I-20). Ainsi, plus les fuites sont importantes, plus l'efficacité de l'oxydation phosphorylante sera diminuée.

L'utilisation d'un découplant protonophore pour augmenter la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons, effondre le gradient électrochimique de protons induisant

une diminution de la force protonmotrice (Steen *et coll.* 1993, Terada 1990). Ceci se traduit par une augmentation de la vitesse de respiration et une diminution du rapport ATP/O suite à une diminution de la synthèse d'ATP sur mitochondries (Luvisetto *et coll.* 1987). Cette baisse subséquente du rapport ATP/ADP se traduit par une inhibition de la néoglucogénèse sur cellules entières.

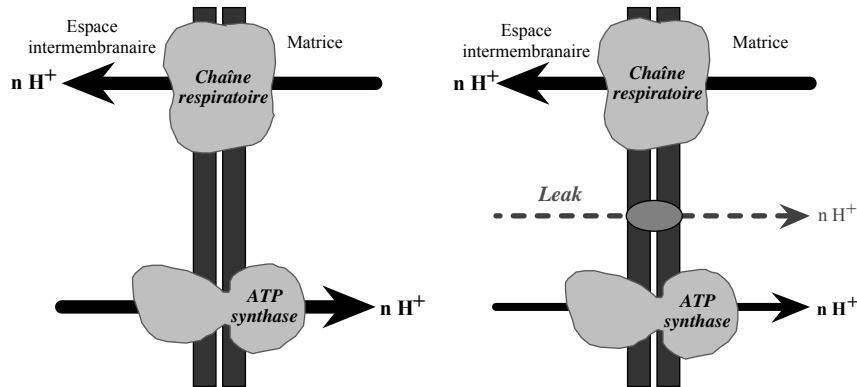


Figure I- 20 : Représentation du phénomène de fuite membranaire.

Dans le cas "idéal" où la membrane est totalement imperméable aux protons (figure de gauche), tout proton sortant sera utilisé pour effectuer un travail. Dans la réalité, la membrane n'est pas totalement imperméable (figure de droite) et un certain nombre de protons retransversent la membrane sans passer par l'ATP synthase donc sans générer de synthèse d'ATP.

L'inhibition de l'ATP synthase, par l'ajout d'oligomycine sur mitochondries isolées ou hépatocytes isolés, n'abolit pas complètement la consommation mitochondriale d'oxygène.

Cette respiration insensible à l'oligomycine a créé de nombreuses discussions au sein de la communauté des biochimistes, et peut être expliquée, en partie ou totalement, par les fuites de protons à travers la membrane mitochondriale interne. Dans la littérature, le terme de « *leak* » est fréquemment utilisé pour rendre compte de cette respiration non couplée à la synthèse d'ATP.

Une analogie entre le flux de protons mitochondrial et un circuit électrique est souvent réalisée : dans un circuit électrique, la conductance d'un composant est calculée par le rapport entre l'intensité du courant et la différence de potentiel électrique. De la même manière, au sein de la mitochondrie, le flux de protons au travers de la membrane mitochondriale interne (J_{H^+}) est fonction de la force protonmotrice (Δp) et de la conductance de la membrane.

Si la loi d'Ohm est utilisée pour relier Δp et le courant de protons, il s'en dégage un facteur de proportionnalité C, représentant la conductance de la membrane mitochondriale interne.

$$J_{H^+} = C \Delta p$$

Les mouvements de protons au travers de la membrane mitochondriale interne peuvent se faire, en théorie, selon 3 modes : (i) par passage au travers de la membrane elle-même, (ii) par

mouvement à l'interface lipides-protéines membranaires, ou (iii) par transfert au travers des transporteurs spécifiques. Ces différents processus sont inclus dans la conductance effective de la membrane mitochondriale interne.

IV.3.2. Patinage des pompes à protons : slipping

En 1967, Mitchell et Moyle (Mitchell *et coll.* 1967), après avoir évalué la conductance de la membrane interne vis-à-vis des protons, la force protonmotrice à l'état 4 et la stoechiométrie de la chaîne respiratoire supposée fixe, conclurent que la respiration à l'état 4 correspondait à la quantité de protons devant être expulsée pour contrebalancer les fuites.

En 1974, Nicholls montra cependant que la relation existant entre la respiration et la force protonmotrice n'est pas linéaire (Nicholls 1974). En effet, lorsque la respiration est diminuée par l'utilisation de concentrations croissantes en inhibiteur de la chaîne respiratoire, la relation entre la consommation d'oxygène (ou le courant de protons) et la force protonmotrice n'est pas strictement linéaire, et présente un profil biphasique (Figure I-22).

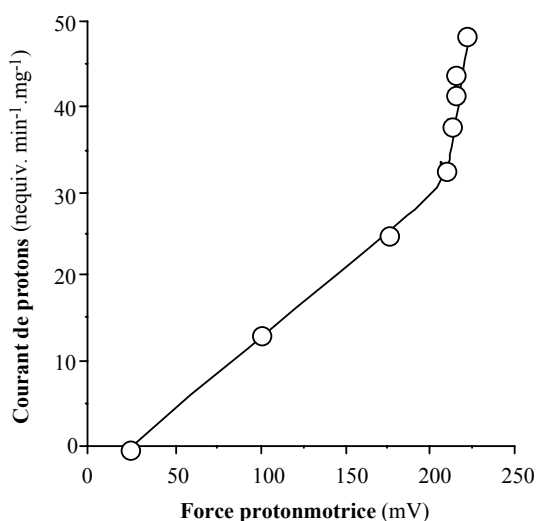


Figure I- 21 : Relation entre la vitesse de respiration et la force protonmotrice.

D'après Nicholls. The influence of respiration and ATP hydrolysis on the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. (Nicholls 1974)

Au dessus d'une valeur seuil de potentiel (fixée à 180 mV ou 220 mV, selon les méthodes de mesure), la relation est linéaire mais l'inhibition de la respiration est beaucoup plus importante que la diminution du potentiel membranaire. En dessous de cette valeur seuil la relation est

également linéaire, mais la diminution du potentiel de membrane suit la diminution de la respiration. Nicholls émit donc l'hypothèse selon laquelle la membrane mitochondriale interne ne se conduirait pas selon la loi d'Ohm, mais que sa conductance serait variable et augmenterait avec la force protonmotrice. Cette hypothèse fut émise en supposant fixe la stoechiométrie de la chaîne respiratoire. Nicholls suggéra aussi qu'une diminution du couplage directement au niveau de la chaîne respiratoire pourrait également expliquer ce phénomène (Nicholls 1974).

Depuis cette étude, d'autres travaux ont confirmé la relation non-linéaire existant entre la consommation d'oxygène mitochondriale et la force protonmotrice, et cela sur différents types de mitochondries et en présence de différents substrats (Brown *et coll.* 1986, Krishnamoorthy *et coll.* 1984, Murphy *et coll.* 1987, Pietrobon *et coll.* 1983, Zoratti *et coll.* 1986). Cette relation biphasique a également été mesurée sur cellules entières, prouvant qu'elle n'est pas dûe à un artefact consécutif à l'isolement des mitochondries (Harper *et coll.* 1993, Nobes *et coll.* 1990) Brown, 1992 #232). Cette relation est essentielle dans la compréhension des mécanismes contrôlant la respiration et la synthèse d'ATP : la respiration non couplée à la synthèse d'ATP dépend donc étroitement de la force protonmotrice. Le rendement de l'oxydation phosphorylante, qui est variable en fonction du ratio entre la respiration couplée et non couplée, est inversement lié à la force protonmotrice nécessaire à la synthèse d'ATP. Il est maintenant admis que la relation entre la respiration et la force protonmotrice n'est pas linéaire. Cependant, de nombreuses hypothèses ont été avancées afin d'expliquer ce phénomène.

L'une de ces hypothèses, émise par Duszynski et Wojtczak (Duszynski *et coll.* 1985), considérait qu'après isolement de mitochondries, plusieurs sous-populations coexistaient, présentant un plus ou moins bon couplage. La population mitochondriale partiellement découplée serait plus sensible aux inhibiteurs, en présence desquels la respiration mitochondriale serait fortement diminuée sans modifier significativement la force protonmotrice. Cette hypothèse a largement été réfutée, étant donné que cette relation existe également sur cellules entières.

Une autre hypothèse, la théorie **chimio-osmotique localisée** (Williams 1978) proposa par ailleurs, que la force protonmotrice mesurée ne soit pas en relation directe avec la respiration et la phosphorylation. Une telle hypothèse remettait totalement en cause la théorie de Mitchell, qui a été étayée par de très nombreux travaux. De plus, (i) aucune synthèse mitochondriale d'ATP n'a été mesurée en l'absence de force protonmotrice mesurable, (ii) et l'ensemble des observations sortant du cadre d'une interprétation stricte de la théorie de Mitchell peut être expliqué par la perméabilité variable et le patinage des pompes à protons.

Quatre hypothèses peuvent finalement expliquer cette relation non linéaire entre la respiration et la force protonmotrice :

- (i) une perméabilité de la membrane variable en fonction de la force protonmotrice (Brand 1990, Brand *et coll.* 1994, Brown 1989)
- (ii) une perméabilité de la membrane variable en fonction du flux d'électrons le long de la chaîne respiratoire (Wrigglesworth *et coll.* 1990)
- (iii) un changement de stoechiométrie des pompes membranaires en fonction de la force protonmotrice (Murphy *et coll.* 1987, Pietrobon *et coll.* 1981)
- (iv) un changement de stoechiométrie (patinage) des pompes membranaires en fonction du flux au travers de ces pompes (Papa *et coll.* 1991).

Pietrobon *et coll.* (Pietrobon *et coll.* 1985) ont été les premiers à mettre en évidence l'existence d'une modification de la stœchiométrie des pompes, bien que Nicholls en eût déjà émis l'hypothèse afin d'expliquer ses observations.

Selon l'hypothèse du « leak » non-ohmique, la membrane interne mitochondriale ne se comporte pas selon la loi d'Ohm. Sa conductance aux protons est variable et augmente avec la force protonmotrice. Cependant, les pertes de protons ne dépendent pas exclusivement de la force protonmotrice, comme Pietrobon l'a démontré, mais dépendent aussi du flux au travers des pompes à protons. Ces démonstrations ont fait émerger une hypothèse proposant un modèle de fonctionnement des pompes à protons comportant un certain degré de découplage intrinsèque ou patinage (« slipping ») (Figure I-21) (Pietrobon *et coll.* 1985, Pietrobon *et coll.* 1986).

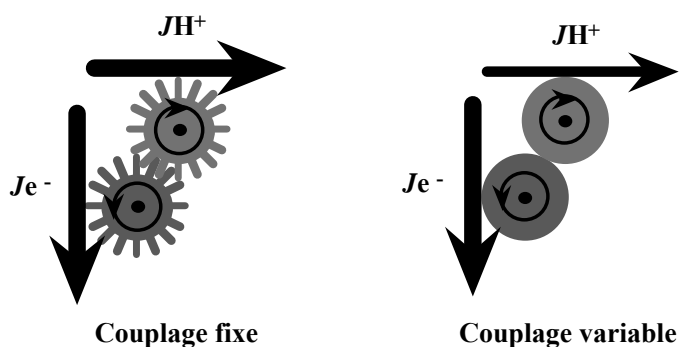


Figure I- 22 : Représentation du phénomène de patinage de la chaîne respiratoire.

Quand la pompe est parfaitement couplée, le rapport entre le flux des protons sortant et le flux d'oxydation des équivalents réduits est constant. Quand la pompe patine, moins de protons sortent pour le même flux d'oxydation des équivalents réduits (la stœchiométrie H^+/e^- diminue).

Par conséquent, lorsqu'une pompe à protons patine cela induit :

- (i) soit une diminution de la stœchiométrie H^+/O au niveau de la chaîne respiratoire. Le transfert d'électrons n'est alors pas couplé à l'éjection de protons : on parle dans ce cas de « redox slipping ».
- (ii) soit une augmentation de la stœchiométrie H^+/ATP de l'ATP synthase. L'entrée de protons dans la matrice n'est alors plus couplée à la synthèse d'ATP : on parle dans ce cas de « proton slipping ».

Pietrobon et coll. ont réalisé un modèle cinétique du fonctionnement des pompes à protons. Ce modèle repose sur un cycle de réactions pouvant fonctionner dans les deux sens (l'expulsion de protons couplée à l'oxydation d'équivalents réduits ou l'entrée de protons couplée à la synthèse d'ATP) (Figure I-23).

Lorsque le cycle fonctionne dans le sens de l'expulsion de protons vers l'espace intermembranaire et présente un couplage parfait nous pouvons observer 6 étapes :

- Etapes 1 → 2 : fixation de $n H^+$ sur la face interne de la pompe redox,
- Etapes 2 → 3 → 4 : couplage de l'oxydation des équivalents réduits avec un changement du niveau énergétique de l'enzyme (E^*)
- Etapes 4 → 5 : transfert de $n H^+$ sur la face externe de la membrane interne et retour à l'état énergétique basal de l'enzyme (E)
- Etapes 5 → 6 : libération de $n H^+$,
- Etapes 6 → 1 : retour du complexe enzymatique à son état initial.

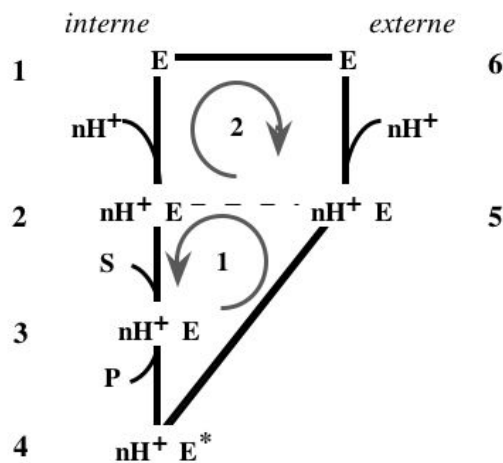


Figure I- 23 : Modélisation du fonctionnement des pompes à protons.

D'après (Pietrobon *et coll.* 1985)

Cependant, il est possible de passer directement de l'étape 2 à l'étape 5 :

(1) soit par la succession des réactions 2, 3, 4, 5 → 2, qui va alors consommer de l'énergie chimique sans générer de gradient de protons (« redox slipping »).

(2) soit par la succession des réactions 5, 2, 1, 6 → 5, qui consomme le gradient de protons sans pour autant créer d'énergie chimique (« proton slipping »).

Il existe donc deux cycles de réactions capables d'aboutir à un patinage des pompes et, dans les deux cas, le nombre de protons expulsés est inférieur à n (nombre de protons directement liés à la réaction $S \rightarrow P$).

Contrairement à la conductance variable qui, par définition, ne dépend que de la force protonmotrice, le patinage subit aussi des contraintes thermodynamiques liées aux forces en présence et des contraintes cinétiques liées aux flux des réactions. Les forces appliquées aux pompes à protons sont donc :

- (i) la force protonmotrice
- (ii) le potentiel rédox intramitochondrial pour la chaîne respiratoire
- (iii) le potentiel phosphate pour l'ATP synthase.

L'ensemble des découplants utilisés dans les études jusqu'au début des années 80 était des protonophores, c'est-à-dire des découplants entraînant l'inhibition de la synthèse d'ATP par l'effondrement de la force protonmotrice avec, comme corollaire, une augmentation de la respiration mitochondriale. Rottenberg, en 1983 (Rottenberg 1983), montra que les anesthésiques volatils, comme le chloroforme et l'halotane, étaient capables de découpler l'oxydation de la phosphorylation sans pour autant effondrer le potentiel de membrane. Dès lors, de nombreuses publications firent état de bon nombre de molécules capables de diminuer le rapport ATP/O sans modifier la force protonmotrice comme les acides gras, la bupivacaïne, et les dérivés de la fluoescamine. L'acide oléique tout comme la bupivacaïne induit un « redox slipping » (Luvisetto *et coll.* 1987, Van Dam *et coll.* 1990), tandis que les dérivés de la fluoescamine augmentent le « proton slipping », et le chloroforme, quant à lui, fait patiner à la fois la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (Luvisetto *et coll.* 1987).

IV.3.3. Nature des équivalents réduits

La membrane mitochondriale interne étant imperméable aux molécules chargées, le NADH cytoplasmique ne peut donc être directement re-oxydé dans les mitochondries. Ainsi, le transfert de son pouvoir réducteur dans la matrice se fait indirectement en réduisant certaines molécules acceptrices qui, elles, ont la capacité de traverser la membrane mitochondriale interne, pour

ensuite céder leurs hydrogènes aux accepteurs matriciels, et revenir dans le cytoplasme à l'état oxydé. C'est ce que l'on appelle le système des navettes. Deux navettes sont connues comme fonctionnant *in vivo* selon le principe précédemment décrit :

- (i) la navette malate/aspartate
- (ii) la navette glycérol-3-phosphate/dihydroxacétone phosphate (G3P/DHAP)

La navette malate/aspartate permet, par des réactions de transamination, une utilisation du NADH cytosolique et une production de NADH dans la matrice mitochondriale. Ce transporteur couple la sortie d'un aspartate à l'entrée d'un glutamate et d'un proton. Le potentiel rédox matriciel étant plus électronégatif, ce processus est thermodynamiquement défavorable et est rendu possible aux dépens de la force protonmotrice. La navette malate/aspartate a donc un fonctionnement unidirectionnel, le transporteur étant électrogénique.

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase catalyse la transformation de G3P en DHAP par l'oxydation du NADH en NAD^+ . Le G3P produit est ensuite re-oxydé dans l'espace intermembranaire par une deuxième glycérol-3-phosphate déshydrogénase située sur la face externe de la membrane mitochondriale interne. Cette enzyme est une flavoprotéine à FAD comme groupement prosthétique qui accepte deux électrons du G3P pour les céder directement à la chaîne de transfert d'électrons de la membrane mitochondriale interne, au niveau des ubiquinones. Ainsi, à chaque molécule de NADH cytosolique oxydée correspond une molécule de FADH_2 formée au niveau de la matrice.

L'oxydation de FADH_2 court-circuite le complexe I, de ce fait le nombre de protons expulsés par molécule d'oxygène consommée baisse par rapport aux nombres de protons expulsés lors de l'oxydation de NADH au niveau du complexe I.

Comme nous venons de le présenter, l'oxydation phosphorylante est un processus finement régulé. De plus, il a été démontré que le NO induisait à la fois une inhibition de la respiration cellulaire et une inhibition de la synthèse d'ATP. Cependant, le couplage entre ces deux phénomènes, à savoir le rendement de l'oxydation phosphorylante, n'a jamais été étudié.

La mitochondrie joue également un rôle essentiel dans les processus de mort cellulaire, par la régulation du pore de transition de perméabilité et des protéines de la famille Bcl-2. Il a été démontré que le NO participe au processus d'apoptose, soit par un effet anti-apoptotique, soit par un effet pro-apoptotique. Cependant, malgré toutes ces études, aucune loi n'a pu être établie pour caractériser les effets du NO sur la mort cellulaire.

V. Mort cellulaire et mitochondrie

V.1. Le pore de transition de perméabilité

V.1.1. Le phénomène de transition de perméabilité

La transition de perméabilité peut se définir comme une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale interne pour toutes les molécules de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa. Ce phénomène se traduit par un effondrement de la force protonmotrice et des principaux gradients ioniques, accompagné d'une déplétion en composés matriciels (substrats, nucléotides adényliques et pyridiniques).

Longtemps le phénomène de transition de perméabilité mitochondrial a été considéré comme un artéfact dû à une altération des mitochondries. Mais de nombreux travaux ont par la suite démontré une régulation de ce processus par la modulation de l'ouverture d'un canal protéique à haute conductance, le Pore de Transition de Perméabilité (PTP).

Hunter et Haworth ont étudié de manière très complète la régulation de ce phénomène de transition de perméabilité par l'utilisation de différents composés physiologiques (Haworth *et coll.* 1979, Hunter *et coll.* 1979a, 1979b, Hunter *et coll.* 1976). Ils ont ainsi mis en évidence que le Ca^{2+} était suffisant pour induire la transition de perméabilité. Les autres composés étant soit potentialisateurs de l'effet du Ca^{2+} (Pi, acides gras libres, atractylosides, oxydation du NADH), soit inhibiteurs (H^+ , magnésium, strontium, ADP, acide bongkrélique, réduction du NAD).

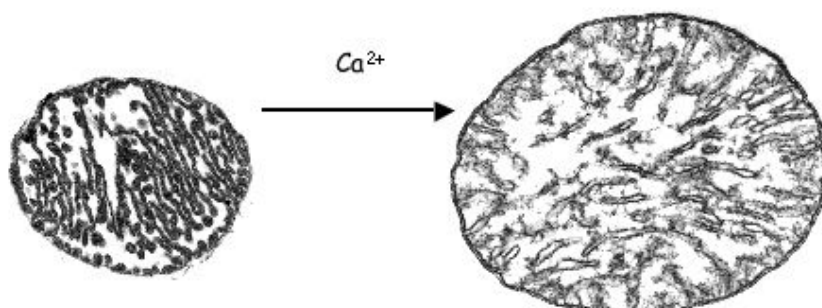


Figure I- 24 : Phénomène de transition de perméabilité mitochondriale.

Le calcium est responsable d'un changement d'état morphologique des mitochondries isolées.

Le gonflement mitochondrial est attribué à l'entrée de molécules osmotiquement actives et d'eau dans la matrice mitochondriale (Figure I-24). En effet, la transition de perméabilité entraîne une

diminution de la pression oncotique liée à la présence des composés de moins de 1,5 kDa. Les composés de poids moléculaires supérieurs comme les protéines mitochondriales, qui ne diffusent pas, vont induire un appel d'eau et donc le gonflement mitochondrial, qui va s'arrêter lorsque la pression osmotique est à l'équilibre.

La libération de Ca^{2+} associée au gonflement mitochondrial ne fait intervenir ni l'uniport, ni l'échangeur $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$. Ce phénomène de transition de perméabilité qui est réversible par l'ajout d'EGTA peut aller jusqu'à une rupture totale de la membrane mitochondriale externe. Les mitochondries répondent de façon hétérogène à la transition de perméabilité donnant à ce processus un caractère auto-catalytique dans lequel le changement d'état d'une mitochondrie semble induire celui de sa voisine.

V.1.2. Le PTP et sa régulation

En 1987, les travaux de Fournier mettent en évidence une inhibition du PTP par la ciclosporine (CsA) (Fournier *et coll.* 1987). Lorsque ce peptide immunosuppresseur est présent à des concentrations de l'ordre du micromolaire, il induit une augmentation de l'accumulation de Ca^{2+} jusqu'à des concentrations qui normalement induisent un effondrement du potentiel membranaire et donc un efflux calcique. De nombreuses études ont ensuite démontré que non seulement la CsA est un inhibiteur puissant de la dépolarisation et du gonflement mitochondrial, deux phénomènes participant au processus de transition de perméabilité, mais elle est également capable d'inverser ces processus. L'action de la CsA n'étant pas due à un ralentissement de l'entrée de calcium dans la mitochondrie, l'existence d'un pore protéique dans la membrane mitochondriale interne, le PTP, a donc été suggérée.

La transition entre les différents états conformationnels du PTP s'avère régulée de façon complexe par différents effecteurs, et ce au niveau de nombreux sites dont peu sont encore connus. En 1995, Zoratti et Szabo publient une revue comprenant une liste complète des molécules connues pour réguler le pore avec leur mécanisme supposé (Zoratti *et coll.* 1995).

L'équipe de Bernardi fait émerger quatre grands mécanismes de régulation du pore :

- (i) les cations divalents
- (ii) le pH matriciel
- (iii) la dépolarisation membranaire
- (iv) l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire

(i) Comme l'avaient déjà avancé Hunter et Haworth (Hunter *et coll.* 1979b), le Ca^{2+} est un inducteur nécessaire et suffisant de l'ouverture du PTP. La quantité de Ca^{2+} requise pour induire l'ouverture du PTP est variable selon les tissus et les organes considérés, mais également

selon la présence d'inhibiteurs ou d'activateurs du PTP. Le Ca^{2+} n'est pas le seul cation divalent à pouvoir moduler l'ouverture du PTP. En effet, des études ont permis de mettre en évidence deux sites de fixation pour les cations divalents au niveau du PTP (Bernardi *et coll.* 1993). Il existe un site matriciel, sur lequel se fixe le Ca^{2+} qui va alors exercer son effet activateur de l'ouverture du PTP. Sur ce site peuvent également se fixer le manganèse et le strontium qui vont favoriser la configuration bloquée du PTP. Le deuxième site de fixation des cations étant sur la face externe de la membrane mitochondriale interne, qui peut être occupé par n'importe quel cation bivalent, dont le Ca^{2+} . Tous induisent une diminution de la probabilité d'ouverture du PTP.

(ii) L'ouverture du PTP est étroitement liée au pH matriciel. Elle est favorisée pour des valeurs de pH proches des valeurs physiologiques (Nicolli *et coll.* 1993), et inhibée pour des valeurs de pH inférieures à 7 (Bernardi *et coll.* 1992). L'inhibition exercée par les pH acides peut être levée en empêchant la protonation de résidus histidine, ce qui suggère la présence d'un ou plusieurs motifs de ce type sur le PTP, responsables de la régulation exercée par les protons matriciels. Il est important de noter que de nombreux inducteurs du PTP entraînent des modifications du pH matriciel comme le phosphate ou le Ca^{2+} .

(iii) Certains effecteurs du PTP, n'ayant aucun effet direct sur le potentiel de membrane, peuvent exercer leur action en modifiant le potentiel seuil induisant l'ouverture du PTP, et en changeant la sensibilité des mitochondries aux découplants. Le mécanisme proposé est l'existence d'un constituant « voltage sensor » du PTP qui serait modifié par les effecteurs physiologiques du PTP de façon totalement indépendante de la valeur du potentiel de membrane. Ce mécanisme permet d'expliquer pourquoi des molécules comme le paraquat peut tout de même exercer un effet inhibiteur sur le PTP bien qu'il ne modifie ni le pH matriciel, ni l'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie, ni le potentiel membranaire, et qu'il n'entre pas dans la matrice (Costantini *et coll.* 1995).

Il semblerait que deux sites participent également à la modulation de la sensibilité du PTP au potentiel de membrane en fonction de l'état redox de la mitochondrie : il s'agit du site S et du site P. Le statut redox d'une double fonction thiol située sur un des composants moléculaires du PTP ferait partie intégrante du « voltage sensor ». L'oxydation de ces thiols vicinaux augmenterait la sensibilité du PTP au potentiel alors que leur réduction la diminuerait (Petronilli *et coll.* 1994a, Petronilli *et coll.* 1994b). Ce type de modulation est à rapprocher de celle des récepteurs N-Méthyl-D-Aspartate du cerveau pour lesquels le statut redox d'une paire de cystéine module l'activité du canal. Ce site de régulation S semble être en équilibre avec le « pool » de glutathion mitochondrial (Chernyak *et coll.* 1996, Halestrap *et coll.* 1997).

Le statut rédox des nucléotides pyridiniques mitochondriaux, NAD(P)H/ NAD(P)⁺ est également un facteur pouvant influencer la probabilité d'ouverture du PTP. L'ouverture du PTP s'accompagne d'un effondrement du « pool » mitochondrial de nucléotides nicotiniques réduits causé par une stimulation de la respiration et par leur sortie vers le cytosol (Fontaine *et coll.* 1998, Leverve *et coll.* 2001). Il semblerait donc qu'il existe un autre « voltage sensor » sensible à l'oxydation des nucléotides pyridiniques présent sur le PTP. Ce site est appelé site P.

Ces deux sites S et P semblent être indépendants, puisque l'activation du pore via le site S peut se faire en présence d'un « pool » de nucléotides nicotiniques très réduit. Leurs effets semblent cependant additifs puisqu'un effondrement simultané des « pools » réduits de nucléotides nicotiniques et de glutathion provoque un gonflement mitochondrial plus important que lorsque seul un des pools est modifié (Chernyak *et coll.* 1996).

(iv) Fontaine *et coll.* ont pu mettre en évidence sur mitochondries isolées de muscle squelettique que l'ouverture du PTP peut également être modulée par le flux d'électrons à travers le complexe I de la chaîne respiratoire et ce, indépendamment de l'effet des cations divalents, du pH matriciel ou du potentiel de membrane mitochondrial (Fontaine *et coll.* 1998). Lors de l'énergisation des mitochondries avec un substrat du complexe I de la chaîne respiratoire, la quantité de Ca²⁺ nécessaire à l'induction de la transition de perméabilité est diminuée. Ce résultat est spécifique au complexe I puisqu'il n'est pas observé en présence des substrats du complexe II ou IV. Il a également été montré sur cellules de carcinome épidermoïques, qu'en présence du substrat du complexe II, l'ajout de roténone ou de metformine, qui inhibe le flux rétrograde des électrons du complexe II vers le complexe I, provoque une inhibition du PTP indépendamment du statut redox des nucléotides pyridiniques (Chauvin *et coll.* 2001, Detaille *et coll.* 2005, Guigas *et coll.* 2004)

V.1.3. La nature du PTP

La nature moléculaire du PTP reste encore, à ce jour, inconnue, même si son existence et son implication dans le processus de mort cellulaire ne sont plus remises en doute.

Il semble cependant que le PTP soit un complexe multiprotéique, avec de très nombreuses protéines candidates, dont VDAC, des protéines de la famille BAX-Bcl2, l'ANT, le complexe I de la chaîne respiratoire et la cyclophiline D. Des travaux récents ont permis d'éclaircir le rôle de certaines protéines candidates.

L'inactivation de deux isoformes d'ANT dans le foie de souris induit une diminution de la sensibilité du pore au Ca²⁺, puisque la quantité de Ca²⁺ à ajouter pour induire l'ouverture du PTP est supérieure à celle qui est nécessaire dans les mitochondries de foie contrôle. Cependant,

l'ouverture du PTP induit la libération de cytochrome c et les hépatocytes isolés de ces souris ANT^{-/-} répondent aux différents inducteurs de mort cellulaire. L'ANT n'est donc pas un constituant essentiel du PTP, mais semble participer à sa régulation (Kokoszka *et coll.* 2004).

Le complexe I de la chaîne respiratoire fait également partie des candidats à la structure du PTP. Deux hypothèses sont avancées quant à son implication dans le PTP : soit le PTP est sensible aux flux d'électrons au travers de ce complexe, soit le complexe I fait partie intégrante du complexe protéique qui constitue le pore (Fontaine *et coll.* 1998). De plus, des travaux ont démontré qu'il existait deux formes du complexe I, une forme active et une forme inactive, et que le passage de la forme active à la forme inactive était dû à un changement conformationnel et était dépendant des concentrations matricielles en Ca²⁺, Mg²⁺ et H⁺ (Fontaine *et coll.* 1999). D'autre part, comme le Ca²⁺ a un effet inhibiteur sur l'activité maximale de la chaîne respiratoire uniquement en présence du substrat du complexe I, les auteurs envisagent l'existence d'un site de fixation pour le Ca²⁺ sur le complexe, permettant de réguler l'oxydation des substrats (Fontaine *et coll.* 1999). De plus, des inhibiteurs du complexe I, comme la roténone, présentent un effet anti-apoptotique sur les cellules de carcinomes épidermoïdes exposées à un inducteur du PTP (Chauvin *et coll.* 2001).

Trois études récentes menées chez des souris CyP-D^{-/-}, révèlent que même en l'absence de CyP-D, la transition de perméabilité a lieu sous l'effet du Ca²⁺, bien que le PTP présente une moindre sensibilité au Ca²⁺. De plus, les mitochondries isolées de souris CyP-D^{-/-} ne présentent aucune sensibilité à la CsA (Baines *et coll.* 2005, Basso *et coll.* 2005). Nakagawa *et coll.* ont mis en évidence que les souris déficientes en CyP-D présentaient une protection face aux dommages causés par une ischémie/reperfusion (Nakagawa *et coll.* 2005).

Les récentes études ont apporté de nombreuses réponses concernant l'implication de certaines protéines dans la régulation du PTP, mais il n'en reste pas moins que sa nature reste encore bien mystérieuse.

V.2. Rôle de la mitochondrie dans le processus de mort cellulaire

De nombreuses études mettent en avant les dysfonctionnements mitochondriaux dans des processus de réactions aux agressions cellulaires, comme l'ischémie, le stress oxydant ou encore les maladies neurodégénératives .

Deux mécanismes de mort cellulaire sont généralement distingués et opposés depuis 1972 : la nécrose et l'apoptose. La nécrose, mort cellulaire désordonnée, provoque une interruption du métabolisme accompagnée d'une déplétion en ATP, d'une dérégulation des équilibres ioniques, d'un gonflement cellulaire et mitochondrial, et d'une activation d'enzymes de dégradation. Elle conduit finalement à la rupture de la membrane plasmique et au déversement des protéines, métabolites et ions à l'extérieur de la cellule. L'apoptose, encore appelée mort cellulaire programmée, est un processus physiologique normal, essentiel au développement et au maintien de l'homéostasie cellulaire. Les mécanismes d'apoptose vont conduire à la dégradation nucléosomale de l'ADN, et à la condensation de la cellule en corps apoptotiques.

Deux mécanismes, non-exclusifs, permettent d'expliquer la libération de protéines mitochondriales pro-apoptotiques. Le premier met en jeu l'ouverture de larges canaux dans la membrane mitochondriale externe, sous la dépendance des protéines de la famille Bcl-2, le second fait intervenir l'ouverture du PTP.

V.2.1. Famille Bcl-2

La famille Bcl-2 regroupe une vingtaine de protéines classées en deux sous-familles, les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-xs) et les protéines anti-apoptotiques (Bcl-xL, Bcl-w...) (Antonsson 2001). Ces protéines possèdent une à quatre régions hautement conservées appelées les domaines BH (pour Bcl-2 Homology). Toutes les protéines anti-apoptotiques possèdent 4 domaines BH. Une plus grande variabilité dans le nombre de ces domaines BH est observée dans les homologues pro-apoptotiques, mais tous ont, au minimum, le domaine BH3 en commun. Cette disparité divise la sous-famille des protéines pro-apoptotiques en deux groupes, le groupe des protéines ayant plusieurs domaines BH, et le groupe des protéines possédant uniquement le domaine BH3 (Antonsson 2001).

Les protéines anti-apoptotiques du type Bcl-2 sont localisées au niveau des membranes intracellulaires (membrane mitochondriale externe, membrane du réticulum endoplasmique, enveloppe nucléaire) (Krajewski *et coll.* 1993). Les protéines pro-apoptotiques ont une répartition plus disparate, Bax étant principalement localisé dans le cytosol sous forme monomérique (Antonsson *et coll.* 2000, Hsu *et coll.* 1998), Bak étant inséré dans la membrane mitochondriale externe (Griffiths *et coll.* 1999). Cependant le principal site d'action des membres de la famille Bcl-2 est la mitochondrie au sein de laquelle ces protéines vont induire une perméabilité de la membrane externe permettant le relargage des facteurs pro-apoptotiques normalement contenus dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Lors d'un stimulus

apoptotique, l'activation de Bax provoque sa translocation dans la membrane mitochondriale externe (Gross *et coll.* 1998, Hsu *et coll.* 1997) et la formation de complexes oligomériques (Gross *et coll.* 1998, Suzuki *et coll.* 2000) qui auront alors le rôle de canaux au sein de cette membrane. Bcl-2 est capable d'inactiver l'activation et l'oligomérisation de Bax (Antonsson 2001).

Au niveau de la mitochondrie, les protéines pro-apoptotiques entraînent le relargage du cytochrome c qui, à son tour, active les voies de la mort cellulaire en aval de la mitochondrie (Li *et coll.* 1997, Liu *et coll.* 1996).

Certaines études ont également montré des interactions entre les membres de la famille Bcl-2 et des protéines de la membrane mitochondriale externe, l'ANT (Marzo *et coll.* 1998), et VDAC (Narita *et coll.* 1998, Shimizu *et coll.* 2000a, Shimizu *et coll.* 1999, Shimizu *et coll.* 2000b) pouvant constituer le PTP.

V.2.2. Le PTP

En réponse à certains stimuli, la mitochondrie peut « décider » du déclenchement d'un processus de mort cellulaire induisant une ouverture du PTP et une transition de perméabilité. Le PTP jouerait un rôle important dans la mort cellulaire. En effet, dans les mitochondries isolées, l'ouverture du PTP, provoquant une diffusion de solutés de poids moléculaire inférieur à 1,5 kDa, est associée à une expansion de l'espace matriciel. Etant donné que la membrane interne mitochondriale présente une surface supérieure à la membrane externe, le gonflement entraîne une rupture mécanique de la membrane externe. Suite à la rupture de la membrane mitochondriale externe, les protéines pro-apoptotiques contenues dans l'espace intermembranaire sont libérées dans le cytosol (Desagher *et coll.* 2000, Loeffler *et coll.* 2000). Une fois le cytochrome c relargué dans le cytosol (Liu *et coll.* 1996), il va interagir avec Apaf-1 (Apoptosis Activating Factor-1), provoquer le recrutement de la pro-caspase 9 puis entraîner l'activation de la cascade de caspases.

D'autres protéines de l'espace intermembranaire sont également relarguées dans le cytosol lors de l'activation de la mort cellulaire : l'adénylate kinase 2, AIF (Apoptosis Inducible Factor), SMAC/DIABLO, des Hsp (Heat Shock Proteins), et certaines caspases mitochondriales (Patterson *et coll.* 2000, Zamzami *et coll.* 1996).

Plusieurs études ont montré que la sortie de ces protéines pouvait être bloquée par des inhibiteurs du PTP, et que l'ouverture du PTP sur mitochondries isolées induit la sortie de cytochrome c (Bradham *et coll.* 1998, Friberg *et coll.* 1998, Pastorino *et coll.* 1998, Pastorino *et coll.* 2000, Petronilli *et coll.* 2001). Le PTP semble donc réguler le relargage des protéines pro-apoptotiques.

VI. Le NO et la mort cellulaire

Les effets du NO sur la mort cellulaire sont encore très discutés et controversés. En effet, comme nous pouvons l'observer dans le tableau I-5, certains auteurs décrivent le NO comme un inducteur d'apoptose et de nécrose, alors que d'autres le présentent comme un inhibiteur de la mort cellulaire.

LIGNEES CELLULAIRES	CONCENTRATION EN NO	EFFET APOPTOTIQUE	REFERENCE
Lymphocytes B	Faible	Protection	(Genaro <i>et coll.</i> 1995, Mannick <i>et coll.</i> 1994)
Hépatocytes	Forte Modérée	Apoptose Protection	(Richter <i>et coll.</i> 1994) (Brune <i>et coll.</i> 1997, Kim <i>et coll.</i> 1997a, Kim <i>et coll.</i> 1997b, Li <i>et coll.</i> 1999, Mannick <i>et coll.</i> 1997, Martin-Sanz <i>et coll.</i> 1996)
Astrocytes	Forte	Apoptose Protection	(Hu <i>et coll.</i> 1997, Nicotera <i>et coll.</i> 1995)
Macrophages	Forte Faible	Apoptose Protection	(Albina <i>et coll.</i> 1998, Nicotera <i>et coll.</i> 1995) (Messmer <i>et coll.</i> 1996b)
Neurones	Modérée Modérée Modérée	Protection (récepteur glutamatergique) Apoptose (activation récepteur NMDA) Apoptose/Protection	(Vincent <i>et coll.</i> 1997) (Kim <i>et coll.</i> 1997a) (Adamson <i>et coll.</i> 1996, Nicotera <i>et coll.</i> 1995, Yoshioka <i>et coll.</i> 1995)
Cellules endothéliales	Forte	Protection Apoptose	(Kwon <i>et coll.</i> 2001) (Lopez-Collazo <i>et coll.</i> 1997)

Tableau I- 5: Tableau récapitulatif des effets anti-apoptotiques et pro-apoptotiques du NO sur différents types cellulaires.

VI.1. Effets pro-apoptotiques du NO

L'induction de la mort cellulaire par le NO est très importante dans 2 situations physiopathologiques particulières :

- la mort des agents pathogènes par les cellules hôtes
- la mort des cellules hôtes dans certaines situations inflammatoires, d'ischémie, ou dans certaines maladies neurodégénératives

Deux mécanismes de mort cellulaire sont mis en jeu : l'apoptose et la nécrose.

La mort cellulaire par nécrose est induite par le NO lorsque les cellules sont soumises à un déficit en ATP qui peut avoir 4 origines : l'inhibition de la respiration mitochondriale, l'induction de la transition de perméabilité mitochondriale, l'inhibition de la glycolyse par les peroxy-nitrites au niveau de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (Brune *et coll.* 1995a, 1995b, Souza *et coll.* 1998) et l'activation de la poly-ADP ribose polymérase (PARP) (Virag *et coll.* 1998, Yu *et coll.* 2002).

Le NO peut également induire le processus apoptotique dans des conditions où la respiration et la production d'ATP sont suffisantes. En effet, il apparaît qu'une des limites entre l'induction de l'apoptose ou la nécrose par le NO soit la présence d'ATP. Les mécanismes par lesquels le NO induit l'apoptose ne sont pas encore bien établis (Bosca *et coll.* 1999, Chung *et coll.* 2001). Cependant, il existe quatre voies principales décrites comme impliquées dans le processus d'apoptose induit par le NO : (i) la transition de perméabilité mitochondriale (Borutaite *et coll.* 2000b, Bosca *et coll.* 1999, Horletano *et coll.* 1997, Jekabsone *et coll.* 2003), (ii) l'oxydation des phospholipides mitochondriaux (Brune *et coll.* 1999, Shidoji *et coll.* 1999, Ushmorov *et coll.* 1999), (iii) l'induction de protéines pro-apoptotiques comme p53 et Bax (Brune *et coll.* 1999, Messmer *et coll.* 1996a), (iv) l'activation de la voie MAP kinase (Ghatan *et coll.* 2000).

VI.1.1. La transition de perméabilité

Il semble maintenant bien établi que l'effet du NO sur le PTP ne soit pas dû à l'effet du NO lui-même mais à la formation de dérivés nitrés, tels que les peroxy-nitrites, puisqu'il a été démontré que l'effet des dérivés est sensible à la ciclosporine (Borutaite *et coll.* 2003b, Borutaite *et coll.* 2003c, Bosca *et coll.* 1999, Horletano *et coll.* 1997).

D'après une étude de Brown et Borutaite, le NO est un activateur de caspases, mais la voie d'activation de ces caspases serait différente selon le type de donneurs de NO utilisés (Borutaite *et coll.* 2000b). En effet, les auteurs ont comparé les effets de donneurs de NO de type nitrosothiol (GSNO, SNAP) qui ont un pouvoir réducteur des groupements thiols

(transnitrosylation), aux effets de donneurs de type NONOate considérés comme des donneurs de NO « pur ». Ils ont ainsi mis en évidence que les deux types de donneurs induisent l'activation de caspases, mais que seuls les donneurs de type nitrosothiol provoquent une libération de cytochrome c en présence de Ca^{2+} qui soit sensible à la CsA. De plus, Hortelano et coll. ont montré une ouverture du PTP en présence de NO libérés par 3 donneurs de NO différents, SNAP et GNSO, et SIN-1, ce dernier étant connu pour libérer du NO et des superoxydes, et donc générer des peroxynitrites (Hortelano *et coll.* 1997). Ces deux études ont été réalisées sur différents types cellulaires : cardiomyocytes, macrophages et thymocytes. Il ne semble donc pas que les effets des nitrosothiols sur l'ouverture du pore de transition de perméabilité soient spécifiques du type cellulaire considéré.

De plus l'apoptose induite par la présence de donneur de NO « pur » (NONOates) est beaucoup moins sensible à la CsA mais est en revanche inhibée par l'ajout d'anti-oxydants (NAC, catalase, SOD, ascorbate). Il semblerait donc que dans ce cas l'apoptose soit due à un stress oxydant suite à la formation de ROS ou d'espèces réactives d'azote (RNS) (Borutaite *et coll.* 2003a, Moriya *et coll.* 2000, Packer *et coll.* 1994, Vercesi *et coll.* 1997, Yabuki *et coll.* 2000).

En 2002, Piantadosi décrit sur le modèle des mitochondries isolées de foie, une régulation de l'ouverture du PTP dépendante de la concentration en NO. Les faibles concentrations en NO induisant une inhibition de l'ouverture du PTP, tandis que l'augmentation de la disponibilité en NO l'active (Piantadosi *et coll.* 2002).

VI.1.2. Peroxydation lipidique

L'incubation de cellules en présence de NO peut entraîner une peroxydation des lipides de la membrane mitochondriale, et notamment de la cardiolopine, par les peroxynitrites ou les nitrites qui peuvent être produits. Ushmorov a démontré que cela entraînait une inhibition irréversible de la chaîne respiratoire qui conduisait à l'apoptose (Ushmorov *et coll.* 1999).

Suite aux travaux de Gadelha (Gadelha *et coll.* 1997), qui démontrent un gonflement mitochondrial induit par les peroxynitrites, par l'intermédiaire d'un mécanisme insensible à la CsA, Brookes confirme que l'action des peroxynitrites sur le PTP passe par la peroxydation des phospholipides de la membrane mitochondriale et augmente la perméabilité de la membrane interne aux protons (Brookes 1998, Brookes *et coll.* 1998a). De plus, dans une étude menée par Ghafourifar en 1999, consistait à ajouter du Ca^{2+} sur des mitochondries et à stimuler les mtNOS, il est démontré que la production de peroxynitrites entraîne la libération de cytochrome c de façon insensible à la CsA, associée à une peroxydation des lipides mitochondriaux (Ghafourifar *et coll.* 1999).

La peroxydation lipidique semble être importante dans le déclenchement du processus apoptotique induit par le NO.

VI.1.3. Régulation des protéines de la famille Bcl-2

Il a été mis en évidence que le NO induisait une activation de Bax ainsi que sa translocation dans la membrane mitochondriale externe. En 2003, Pervin et coll. observent que des oligonucléotides antisens de Bax préviennent l'apoptose induite par le NO (Pervin *et coll.* 2003). Cependant, le mécanisme permettant ce phénomène n'est pas encore défini. De plus, Gathan et coll. ont mis en évidence que le NO pouvait également induire l'activation de la MAP kinase p38, connue pour activer Bax et induire sa translocation (Ghatan *et coll.* 2000).

D'autres études se sont intéressées à la relation pouvant exister entre l'inhibition de la respiration médiée par le NO et l'activation de Bax. Deux équipes ont suggéré qu'étant donné que l'inhibition de la respiration cellulaire, induite par des découplants mitochondriaux ou des inhibiteurs de la chaîne respiratoire, provoque une translocation de Bax et l'apoptose, alors la diminution du potentiel de membrane serait suffisante pour induire cette translocation (Ghatan *et coll.* 2000).

VI.2. Effet anti-apoptotique du NO

Les premiers effets anti-apoptotiques du NO ont été mis en évidence sur les lymphocytes B (Genaro *et coll.* 1995, Mannick *et coll.* 1994) puis dans de nombreuses autres lignées cellulaires comme les hépatocytes (Tableau I-5). Le mécanisme le mieux caractérisé est l'inactivation de caspases par la S-nitrosylation de leur centre catalytique (Melino *et coll.* 1997).

Toutefois de nombreux autres mécanismes sont suggérés mais aussi controversés :

- Inhibition via le cGMP en amont du relargage de cytochrome c (Estevez *et coll.* 1998, Takuma *et coll.* 2001)
- Inhibition de l'accumulation des céramides (Sciorati *et coll.* 1997)
- Inhibition de la formation de l'apoptosome
- Hyperpolarisation de la membrane mitochondriale dans certaines lignées cellulaires (Almeida *et coll.* 2001, Beltran *et coll.* 2000, Hortelano *et coll.* 1999)
- Déplétion en ATP
- Activation de la voie MAP kinase
- Activation de facteurs de transcription NF- κ B

- Régulation positive de l'expression des protéines de choc thermiques et de Bcl-2 (Chung *et coll.* 2001)

Le débat sur les effets apoptotiques (Brune *et coll.* 1999, Nicotera *et coll.* 1999) et anti-apoptotiques (Liu *et coll.* 1999) du NO est complexe. Il semble difficile au regard de tous ces résultats qui démontrent un effet dépendant du type de donneur, de la concentration et de la lignée cellulaire, que la question puisse être définitivement tranchée. Toutefois, il est intéressant de constater que le NO joue un rôle protecteur primordial dans les situations de stress physiologique comme l'ischémie/reperfusion cardiaque ou hépatique (Hines *et coll.* 2005, Wang *et coll.* 2005).

MATERIEL ET METHODES

I. Animaux

Toutes les expériences menées chez l'animal ont été réalisées sur une souche de rats Wistar mâles afin d'éviter les variations d'origine hormonale. Les animaux sont sacrifiés entre leur 8^{ème} et 12^{ème} semaines. Les animaux sont élevés dans des conditions standard avec accès *ad libitum* à la nourriture et à l'eau avec un cycle lumière-obscurité 12h/12h et une température comprise entre 21 et 23°C.

II. Traitement aigu au monoxyde d'azote

Les expériences ont été réalisées en présence de NO par l'ajout de donneur de monoxyde d'azote, le DPTA-NONOate (dipropylènetriamine-NONOate). Chaque traitement sera décrit dans les conditions d'expérimentations.

L'absorbance maximale du DPTA-NONOate est située à 252 nm et, comme l'on connaît son coefficient d'extinction molaire : $7640 \text{ nM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, il est possible de connaître la concentration de donneur ajoutée et d'estimer la concentration de NO libéré, sachant que 2 moles de NO sont libérées par mole de donneur.

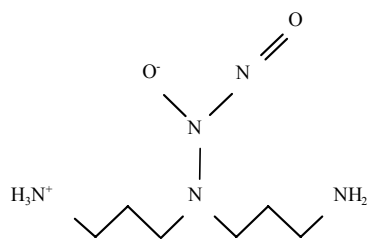


Figure M- 1: Structure chimique du DPTA-NONOate

III. Matériel expérimental

III.1. Mitochondries isolées de foie

III.1.1. Préparation des mitochondries isolées

Le principe d'isolement des mitochondries repose sur la technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle. La procédure d'isolement se fait entièrement à 4°C, en chambre froide ou sur la glace. L'anesthésie modifiant les propriétés des

mitochondries, les rats sont tués par dislocation cervicale (Cohen 1973, Dabadie *et coll.* 1987, Rottenberg 1983, Van Der Meer *et coll.* 1976). Après laparotomie médiane, le foie est immédiatement prélevé et refroidi par immersion dans le tampon d'homogénéisation à 4°C (saccharose 250 mM, Tris 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2). Il est alors fractionné en petits morceaux qui sont rincés abondamment avec le même tampon froid afin d'éliminer les hématies. Le foie fractionné est ensuite homogénéisé à l'aide d'un broyeur de Potter. L'homogénat est centrifugé à 800 g durant 10 min à 4°C. A la suite de cette première centrifugation à basse vitesse, permettant d'éliminer les gros débris cellulaires, le surnageant contenant les mitochondries est prélevé et centrifugé à 8000 g 10 min à 4°C. Le culot mitochondrial ainsi obtenu est remis en suspension dans le tampon d'homogénéisation froid. Cette suspension est à nouveau centrifugée à 8000 g 10 min à 4°C. Après élimination du surnageant, le culot mitochondrial est remis en suspension dans un minimum de tampon d'homogénéisation froid (500 µl) et conservé à 4°C dans la glace.

III.1.2. Détermination de la concentration protéique mitochondriale

La mesure de la concentration protéique de la suspension mitochondriale est effectuée par la méthode du Biuret. 25 µl de suspension mitochondriale sont diluées dans 200 µl de cholate de sodium 4 %. Après 10 min, les échantillons additionnés de soude 10 % (qsp 3 ml) et de 300 µl de sulfate de cuivre 1 % sont incubés pendant 15 min à température ambiante à l'abri de la lumière. La densité optique est ensuite lue à 540 nm. La quantité de protéines contenues dans l'échantillon est déterminée à l'aide d'une courbe d'étalonnage réalisée à l'aide de concentrations connues de BSA en solution dans du tampon d'homogénéisation. L'ensemble des résultats obtenus à partir de mitochondries isolées est exprimé en mg de protéines par ml de suspension mitochondriale.

III.2. Hépatocytes isolés

III.2.1. Principe d'isolement

Le principe de cette technique d'isolement, mise au point par Berry et Friend (Berry *et coll.* 1969), repose sur la digestion enzymatique sélective des liaisons intercellulaires de collagène. Les hépatocytes sont isolés à partir de foie de rat placé 24 h à jeun et un accès *ad libitum* à l'eau de boisson. Le jeûne de 24 h permet de dépléter le glycogène hépatique et donc d'étudier uniquement l'effet des substrats exogènes sur le métabolisme. Le foie est dans un premier temps

perfusé avec une solution de Krebs sans Ca^{2+} (solution I). Cette première perfusion en absence de Ca^{2+} va altérer les jonctions de type « desmosome » dépendantes du Ca^{2+} , et permettre une meilleure action de la collagénase. Dans un second temps, le foie est perfusé à l'aide d'une solution de Krebs additionnée de collagénase et de Ca^{2+} (solution III), l'action de la collagénase étant dépendante du Ca^{2+} .

Solution I	120 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,4 mM MgSO_4 , 1,2 mM KH_2PO_4 , 24 mM NaHCO_3 , pH 7,4
Solution II	Solution I additionnée de 1,3 mM Ca^{2+} , pH 7,4
Solution III	100 ml de solution II additionnée de 25 mg de collagénase

Tableau M- 1: Solutions nécessaires à l'isolement des hépatocytes.

III.2.2. Procédure d'isolement

Les rats sont anesthésiés par injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (5 mg/100 g). Après laparotomie médiane, une ligature non serrée est placée sur la veine cave inférieure au-dessus de la veine rénale droite. Afin d'éviter la formation de micro-thromboses intra-hépatiques, qui nuiraient à l'oxygénation de l'organe, une solution d'héparine (500 U.I. diluées dans 0,3 ml de solution I) est injectée dans la veine cave inférieure en amont de la ligature placée au-dessus de la veine rénale droite. Un cathéter est alors placé dans la veine porte permettant de perfuser le foie en circuit ouvert dans le sens antérograde avec la solution I thermostatée à 37°C et saturée en carbogène (95 % O_2 – 5 % CO_2), et ce durant 2 minutes à un débit de 25 ml.min⁻¹. Cette perfusion permet de rincer l'organe de ses hématies et d'éviter la formation de caillots. Immédiatement après la pose du cathéter, les vaisseaux pelviens sont sectionnés afin d'éviter une hyperpression intra-hépatique. Lorsque le foie est parfaitement décoloré, une thoracotomie est pratiquée pour mettre en place une ligature non serrée sur la veine cave inférieure sus-hépatique. L'oreillette droite est alors incisée et le cathéter précédemment placé dans la veine porte est mis en place dans la veine cave inférieure sus-hépatique. Les deux ligatures, placées sur la veine cave, sont rapidement serrées pour maintenir une pression de perfusion intra-hépatique suffisante. Le foie est ainsi perfusé, dans le sens rétrograde, pendant 20 min en circuit ouvert à un débit de 25 ml.min⁻¹ avec la solution I maintenue à 37°C et saturée en carbogène. Cette première étape de la procédure d'isolement des hépatocytes permet de rincer le foie de ses hématies, d'éviter l'anoxie cellulaire et d'altérer les jonctions intercellulaires. Pendant la perfusion dans le sens rétrograde, le foie est isolé du reste de l'organisme par dissection puis placé sur une potence. Au terme de ces 20 min de perfusion, le foie est perfusé en circuit fermé à un débit de 40 ml.min⁻¹ avec la solution III contenant la collagénase à 0,375 U/ml (préalablement

thermostatée à 37°C et saturée en carbogène). Cette étape permet la digestion enzymatique des liaisons de collagène par la collagénase. Le temps nécessaire à la digestion des liaisons intercellulaires et à une dissociation satisfaisante des hépatocytes, dépend de l'activité de la collagénase qui varie selon les lots commerciaux. Généralement une perfusion avec la solution III comprise entre 10 et 12 min est suffisante. L'état de digestion est évalué par l'observation de la texture et de la morphologie du foie. Lorsqu'une digestion satisfaisante des liaisons intercellulaires est obtenue, le foie est séparé des structures vasculaires et du diaphragme, puis placé dans un bécher et fragmenté rapidement par plusieurs coups de ciseaux afin de rompre la capsule de Glisson et de libérer les hépatocytes. Les fragments sont agités durant 2 min en présence de carbogène. La suspension est ensuite filtrée afin d'éliminer les fragments non digérés. Le filtrat obtenu est centrifugé à 50 g pendant 2 min à 4°C. Le surnageant obtenu est éliminé rapidement en une seule fois en retournant totalement le tube de centrifugation et le culot est repris délicatement dans la solution II (préalablement saturée en carbogène et conservée à 4°C dans la glace). La suspension est de nouveau centrifugée à 50 g pendant 2 min à 4°C. Le surnageant obtenu est éliminé de la même manière que précédemment et le culot est repris dans la solution II supplémentée avec 1 % d'albumine délipidée (BSA), puis centrifugé une dernière fois 2 min à 50 g à 4°C. Ces centrifugations successives à basse vitesse permettent de laver les cellules de la collagénase et d'éliminer les débris cellulaires, les cellules mortes et les cellules non-parenchymateuses. Enfin, le culot cellulaire obtenu est remis en suspension avec un faible volume de solution II additionnée de BSA, filtré une nouvelle fois et saturé en carbogène durant 2 min. La suspension cellulaire est alors laissée au repos à 4°C durant une heure, avant son utilisation.

III.2.3. Appréciation de la qualité de la suspension cellulaire

Les hépatocytes obtenus à la suite de cette procédure d'isolement sont principalement d'origine périportale (environ 85 %). Leur intégrité et le rendement de la préparation dépendent de la technique opératoire, de la bonne oxygénation des cellules durant tout le processus de préparation, de la température, du pH, ainsi que du débit et du temps de perfusion (particulièrement en présence de la collagénase), de la rapidité de la pose du cathéter dans la veine porte et de l'absence d'hyperpression hépatique. Durant la préparation, il est possible d'apprécier visuellement la qualité du foie. La formation de micro-thromboses intra-hépatiques induit l'apparition de plaques brunâtres sur les lobes hépatiques. De même, un foie anoxique présente des plaques blanchâtres, ce qui se traduit par un faible rendement de la préparation. L'intégrité des hépatocytes peut être appréciée par un test d'exclusion au bleu trypan 0,1 % où

un taux de plus de 85 % de cellules vivantes excluant le colorant atteste de la bonne qualité de la préparation. Les paramètres fonctionnels comme la respiration cellulaire ou le rapport ATP/ADP sont de meilleurs indicateurs de la qualité des cellules mais ne peuvent être évalués qu'à posteriori. En admettant que les cellules sont composées à 75 % d'eau, la concentration cellulaire est évaluée par la pesée du culot d'hépatocytes obtenu après centrifugation (7600 g, 2 min) de 250 µl de suspension cellulaire. La concentration est alors exprimée en mg de poids sec d'hépatocytes par ml de suspension cellulaire. Cette approximation a l'avantage de donner une valeur immédiate, à 5 % près, du poids sec de la suspension cellulaire. Le poids sec précis final est obtenu par la différence, après dessiccation à l'étuve (24 h à 100°C), entre le poids d'un volume de 500 µl de suspension d'hépatocytes et celui du même volume de solution II additionnée de BSA ayant servi à reprendre le culot cellulaire. Nous obtenons habituellement 500 à 700 mg de poids frais d'hépatocytes par foie isolé, soit au total 250 à 400 millions d'hépatocytes (1 mg de poids sec d'hépatocytes isolés de rat contenant approximativement 500000 cellules). Tous les résultats obtenus sur hépatocytes isolés sont exprimés en mg de poids sec (mg PS) d'hépatocytes.

III.3. Culture Cellulaire

III.3.1. Conditions de culture

Toutes les manipulations sont réalisées en conditions stériles sous une hotte à flux laminaire vertical. Les cellules sont mises en culture dans une étuve à atmosphère contrôlée enrichie à 5 % de CO₂, maintenue à 37°C et humidifiée. Les cellules sont maintenues en phase exponentielle de croissance par repiquage tous les 2 ou 3 jours suivant leur vitesse de croissance.

III.3.2. Lignées cellulaires

Les expérimentations ont été réalisées sur la lignée U937 et la lignée KB. Les cellules de la lignée U937 sont issues d'un lymphome. Ce sont des cellules non-adhérentes qui poussent en suspension. La lignée KB est quant à elle issue d'un carcinome épidermoïde buccal humain. Cette lignée forme des monocouches adhérentes. Ces deux lignées sont entretenues dans un milieu RPMI 1640 supplémenté de 10 % (v/v) de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 50 U.ml⁻¹ de pénicilline et 50 µg.ml⁻¹ de streptomycine.

III.3.3. Prélèvement cellulaire

Les cellules U937 (non-adhérentes) sont directement prélevées avec leur milieu de culture, puis elles sont centrifugées pendant 5 min à 100g. Le milieu est ensuite éliminé et le culot est rincé avec du PBS. Les cellules sont à nouveau centrifugées, puis mises en suspension dans du milieu complet ou dans du tampon de mesure.

Après avoir éliminé le milieu de culture des cellules KB (adhérentes), les cellules sont rincées au PBS, puis détachées de leur support de culture par l'action de la trypsine-EDTA (concentrée 1 fois) à 37°C.

La trypsine est une protéase qui digère partiellement les protéines matricielles extracellulaires responsables de l'adhérence des cellules. L'EDTA, quant à lui, chélate les ions Ca^{2+} qui sont nécessaire au maintien des jonctions de type « desmosome » entre les cellules. L'action de la trypsine est arrêtée par l'ajout de milieu de culture contenant du sérum de veau foetal. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée pendant 5 min à 100 g à température ambiante. Le surnageant contenant les cellules mortes est éliminé, et le culot cellulaire est remis en suspension dans du PBS. Les cellules sont à nouveau rincées et centrifugées 5 min à 100 g.

Lorsque les cellules (U937 ou KB) sont remises en culture, le culot final est repris dans le milieu de culture complet à 37°C. Les boîtes de culture (75 cm²) sontensemencées à faible densité cellulaire, soit environ 2,5 millions de cellules dans 40 ml de milieu. Selon le type d'expérimentation, le culot est remis en suspension dans le tampon adéquat et les cellules sont concentrées à environ 50 millions par ml après la dernière centrifugation.

Le pourcentage de cellules vivantes est ensuite estimé par comptage sur cellule de Malassez après coloration au bleu trypan 0,1 %.

IV. Méthodes

IV.1. Perméabilisation des cellules

L'utilisation de cellules entières pour l'étude de paramètres mitochondriaux comme la capacité de rétention calcique nécessite une étape préalable de perméabilisation. En effet, l'entrée de Ca^{2+} dans les cellules intactes est un processus hautement régulé qui ne permet le passage que de petites quantités de Ca^{2+} . De même, certains composés utilisés, comme les substrats énergétiques (succinate, glutamate) ou des modulateurs de l'activité respiratoire (ADP), sont incapables de traverser la membrane plasmique.

La perméabilisation de la membrane plasmique des cellules est réalisée par la digitonine, un détergent qui détruit les membranes en fonction de leur richesse en cholestérol.

A la concentration utilisée ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de DMSO), les membranes mitochondriales, plus pauvres en cholestérol que les membranes plasmiques, restent intactes.

IV.2. Techniques de mesures

IV.2.1. Oxygraphie

Les mesures de consommation d'oxygène sur mitochondries isolées ou sur cellules sont réalisées dans une chambre d'oxygraphie thermostatée (37°C), fermée et agitée, munie d'une électrode de Clark qui est composée d'une cathode en platine polarisée à $-0,7$ volts et d'une anode en argent, immergées dans une solution de KCl à demi-saturée et isolées de la cuve de mesure par une membrane en Téflon laissant diffuser l'oxygène. Le dioxygène diffusant à travers la membrane est réduit en eau par les électrons libérés à la cathode et le courant qui s'établit entre les deux électrodes est proportionnel à la concentration en dioxygène dans le milieu. Le très faible courant produit est amplifié et converti en une tension proportionnelle à la concentration en dioxygène.

Toutefois, la mesure de la concentration en dioxygène dépend non seulement de la saturation du milieu mais aussi de la vitesse de diffusion à travers la membrane, qui est influencée par les facteurs externes tels que la température, la pression et la concentration en sels. Il est donc nécessaire de déterminer la concentration en oxygène du milieu utilisé. Pour cela, le milieu est oxygéné et placé à la température souhaitée (37°C dans nos expérimentations). Des mitochondries sont soumises à plusieurs cycles de congélation/décongélation qui vont provoquer une rupture de la membrane mitochondriale et rendre la NADH déshydrogénase accessible. Le milieu de respiration est alors additionné de mitochondries ($4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) et de NADH en faibles quantités. La consommation d'oxygène est proportionnelle à la quantité de NADH oxydé. Dans ces conditions, la concentration en oxygène de notre milieu KCl à 37°C est de $406 \text{ ng atome d'oxygène par ml}$ (noté $\text{natom O}\cdot\text{ml}^{-1}$). La même démarche a été réalisée pour déterminer la concentration en oxygène à 37°C du milieu saccharose ($370 \text{ natom O}\cdot\text{ml}^{-1}$).

Les mesures de consommation d'oxygène sont réalisées dans un milieu composé de : KCl 125 mM, Tris 20 mM, EGTA 1 mM, pH 7,2. A ce milieu de respiration sont ajoutés : les mitochondries ($0,5$ à $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), 0,1 % de BSA délipidée, 5 mM de phosphate, les substrats respiratoires en concentrations saturantes, divers inhibiteurs (en fonction des expérimentations) permettant d'isoler les différents sites de couplage de la chaîne respiratoire. Pour énergiser les mitochondries au niveau du complexe I, nous ajoutons du glutamate-Tris 5 mM, et du malate-

Tris 2,5 mM comme substrats respiratoires. Le malate génère du NADH dans la matrice mitochondriale, par l'intermédiaire de la malate déshydrogénase du cycle de Krebs. Il est associé au glutamate pour permettre son entrée dans la mitochondrie par la navette malate/aspartate et empêcher l'accumulation d'oxaloacétate. Pour le complexe II, nous ajoutons du succinate-Tris 5 mM et de la roténone 1,25 μ M. Le succinate est réduit en fumarate par la succinate déshydrogénase, générant par cette réaction du FADH₂. La roténone inhibe le complexe I en empêchant le flux rétrograde d'électrons. Les mitochondries sont énergisées directement au niveau du complexe IV grâce au TMPD (N,N,N',N' tétraméthyl-1,4-phenylènediamine) 1 mM, à l'ascorbate 5 mM, et au myxothiazol 3,6 μ M. L'ascorbate cède ses électrons au TMPD qui va réduire le cytochrome c, substrat de la COX. Le myxothiazol empêche un flux rétrograde d'électrons en inhibant le transfert des électrons au niveau du complexe III, et l'ajout de 2,4-Dinitrophénol (DNP, 75 μ M) par la suite permet d'apprécier la vitesse maximale de la COX.

En présence des substrats, les mitochondries respirent sous un état appelé état 4 (E4 appelé aussi état 2). L'état 3 (E3) qui correspond à l'état phosphorylant est obtenu par ajout d'ADP-Tris 1 mM. L'ajout d'oligomycine, inhibiteur de l'ATP synthase, à une concentration de 1,25 μ g.mg⁻¹ de protéines permet de mesurer l'E4. Enfin, l'addition de DNP (2,4-Dinitrophénol) 75 μ M permet d'obtenir l'état découplé.

Lors des expérimentations menées en présence de DPTA-NONOate, le donneur de NO est ajouté au milieu de respiration à une concentration de 10 μ M, et les substrats sont mis en présence du donneur 15 min avant l'ajout des mitochondries. Nous décrirons dans la partie « Résultats » la mise au point de ces conditions d'incubation.

IV.2.2. Détermination du rendement de l'oxydation phosphorylante

La mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante est obtenue en établissant le rapport entre le flux de synthèse d'ATP et le flux d'oxygène consommé. Nous mesurons ainsi l'efficacité avec laquelle l'énergie rédox provenant de l'oxydation des substrats est convertie en énergie permettant la synthèse d'ATP. Les mesures sont réalisées dans une chambre d'oxygraphie thermostatée contenant le milieu KCl supplémenté par les substrats respiratoires comme précédemment décrit, et par du Pi-Tris 5 mM, MgCl₂ 1 mM, glucose 20 mM, et ATP 125 μ M. La respiration est mesurée à l'état 4 puis elle est stimulée par l'ajout de concentrations croissantes en hexokinase (0,2 – 2 U.ml⁻¹). La consommation d'oxygène étant constante durant la période de mesure, des prélèvements de suspension mitochondriale sont effectués régulièrement dans le temps afin de pouvoir quantifier la synthèse d'ATP (prélèvement toutes les 15 ou 30 secondes en fonction du substrat utilisé). Ces échantillons sont immédiatement

précipités dans un mélange d'acide perchlorique 10 % et d'EDTA 25 mM et maintenus à 4°C pendant au moins 30 min, afin d'arrêter les réactions enzymatiques. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 13000 g pendant 2 min. Le surnageant de chaque échantillon est prélevé puis neutralisé avec un mélange de KOH 2 M et d'acide porpholinopropanesulfonique 0,3 M, et à nouveau centrifugé à 13000 g pendant 2 min. Le surnageant obtenu est conservé à 4°C jusqu'au dosage (dans les 12 h). La production d'ATP est mesurée en présence d'un système à flux d'ADP variable, de façon indirecte par la détermination de la production de glucose-6-phosphate. Il s'ensuit la réaction suivante décrite dans la figure M-2.

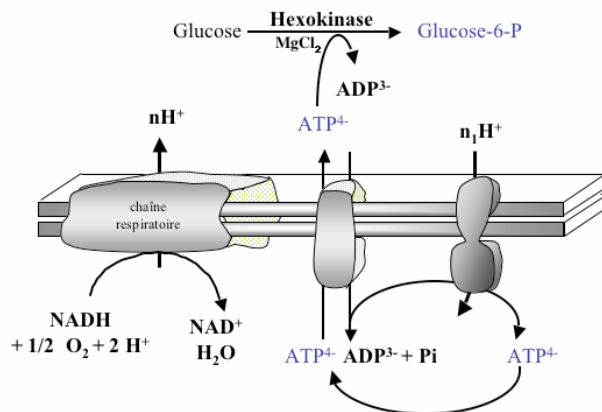


Figure M-2 : Schéma du système hexokinase.

IV.2.3. Quantification du glucose-6-phosphate

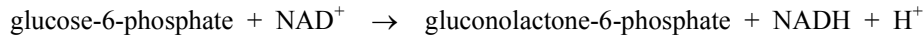
Le dosage du glucose-6-phosphate est réalisé selon la réaction décrite par Bergmeyer (Bergmeyer 1974). Le principe de ce dosage spectrophotométrique est basé sur la mesure de l'apparition de NADH dans le milieu, consécutivement à la réduction du NAD⁺. Le NADH dont le pic d'absorption est situé à 340 nm est facilement mesuré par spectrophotométrie. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) du NADH est de 6,22 mM.cm⁻¹. Selon la loi de Beer-Lambert, la densité optique (DO) est proportionnelle à la concentration (C) du NADH :

$$C = \frac{DO}{\epsilon \cdot l}$$

$$\epsilon \cdot l$$

Où l est la longueur du trajet optique (1 cm).

Pour le dosage du glucose-6-phosphate, la réaction est catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase selon :



La réaction s'effectue dans le milieu suivant : triéthanolamine chlorhydrate 50 mM, MgCl_2 7,5 mM, EDTA 3,75 mM, pH 7,4, NAD^+ 0,5 mM. 250 μl d'échantillon sont prélevés et placés dans 1 ml de milieu de dosage. La lecture de la DO se fait avant et après 30 min d'incubation en présence de glucose-6-phosphate déshydrogénase (0,5 U.I./échantillon). Les résultats sont exprimés en nmol d'ATP/min/mg de protéines.

IV.2.4. Détermination de l'activité ATPasique

La mesure de l'activité ATPasique consiste à mesurer la quantité de Pi ou d'ADP libérée lors de l'hydrolyse de l'ATP.

Les mitochondries (2 mg.ml⁻¹) sont incubées 2 min en présence de Triton X100 0,35 % afin d'isoler l'ATP synthase de la membrane et d'éliminer son inhibiteur (IF1) permettant ainsi de mesurer l'activité maximale de l'enzyme. Après ces 2 min d'incubation, le milieu est complété à 2 ml avec le milieu de respiration KCl thermostaté à 37°C. La réaction est démarrée par l'ajout d'ATP-Tris 5 mM et de MgCl_2 5 mM en présence ou non d'oligomycine (1,25 $\mu\text{g.mg}^{-1}$ protéines). Pour chaque mesure, 4 fractions du milieu d'incubation sont prélevées au cours du temps et précipitées dans un mélange d'acide perchlorique 10 % et d'EDTA 25 mM. L'hydrolyse de l'ATP sensible à l'oligomycine est alors déterminée par la mesure du Pi ou de l'ADP produit.

IV.2.5. Quantification des nucléotides adényliques par HPLC

La technique de chromatographie liquide à haute performance est utilisée pour le dosage des nucléotides adényliques (ATP, ADP, AMP). Cette technique est à la fois quantitative et qualitative car les nucléotides de l'échantillon sont séparés en fonction de leur polarité (temps de rétention), puis détectés par un spectrophotomètre à 254 nm, relié à un enregistreur-intégrateur. L'échantillon contenant les nucléotides à doser est mobilisé au travers d'un milieu adéquat ralentissant plus ou moins les molécules en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. La séparation s'effectue sur une phase solide non-polaire constituée d'une colonne de silice (greffée en C18, de 25 cm de long et 4,6 mm de diamètre) thermostatée à 30°C et traversée par une phase mobile liquide polaire à un débit de 1 ml.min⁻¹. Cette phase mobile liquide est un tampon pyrophosphate de sodium/acide pyrophosphorique (25 mM) ajusté à un pH de 5,75 par une solution saturée en pyrophosphate de sodium, qui est filtré sur une membrane de 0,22 μm .

Les échantillons à doser, préalablement neutralisés entre 6,5 et 7,5 lors des prélèvements initiaux, sont acidifiés à un pH proche de 3 avant d'être injectés dans la colonne d'HPLC. En effet, à pH neutre, deux pics d'ATP apparaissent car le pKa d'une des fonctions acides de l'ATP est proche de 6,5 et existe donc sous deux formes (50 % sous la forme dissociée et 50 % sous la forme non dissociée). Dans nos conditions, après passage dans la colonne de séparation, le temps de rétention diffère significativement entre les trois composés dosés : l'ATP est élué à environ 3 min, l'ADP à 4 min et l'AMP vers 9 min. L'intervalle entre chaque pic chromatographique est suffisamment long pour permettre un retour à la ligne de base pour chacun des composés. Un étalonnage (entre 7,5 μM et 30 μM) est réalisé à l'aide de standards d'ATP, d'ADP et d'AMP pour chaque série d'échantillons. L'aire sous la courbe de chacun des pics correspondant aux échantillons est alors mesurée, et la concentration en nucléotides est déterminée à l'aide des nucléotides standards. La concentration est exprimée en μmol de nucléotides/min/mg de protéines dans les expérimentations réalisées sur mitochondries ou en μmol de nucléotides par mg de PS dans le cas d'expérimentations réalisées sur hépatocytes.

IV.2.6. Mesure de la capacité de rétention calcique

La capacité de rétention calcique représente la quantité exacte de Ca^{2+} nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du PTP. Cette mesure permet donc d'analyser dans différentes conditions, la réponse du PTP à son inducteur le plus puissant : le Ca^{2+} . En pratique, le Ca^{2+} est ajouté à la suspension mitochondriale à concentrations et temps fixes. Le nombre d'injections de Ca^{2+} nécessaire pour déclencher la perméabilité transitionnelle mitochondriale représente la capacité de rétention calcique (CRC). Cette méthode d'ajouts successifs de Ca^{2+} est particulièrement appropriée pour mesurer et quantifier l'action de composés susceptibles de favoriser ou au contraire d'inhiber l'ouverture du PTP. Ainsi, une molécule inhibitrice augmente la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du PTP, alors qu'une molécule inductrice la diminue. En d'autres termes, une molécule inhibitrice diminue la sensibilité du PTP au Ca^{2+} contrairement à une molécule inductrice qui l'augmente. Les mitochondries isolées sont incubées à une concentration de 1 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ dans un tampon à pH 7,4 contenant 250 mM de saccharose, 1 mM de Pi-tris, 10 mM de Tris-MOPS. Ce tampon est passé sur une résine Chelex afin d'éliminer le Ca^{2+} de la solution. Le tampon est ensuite additionné soit de 5 mM de glutamate-Tris et 2,5 mM de malate-tris, soit de 5mM de succinate-Tris en présence ou non de 1,25 μM de roténone, ou de 1 μM de CsA. Les mouvements de Ca^{2+} de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne sont mesurés grâce à la fluorescence de la sonde calcium green® (0,15 μM) (λ_{exc} 506 nm, λ_{em} 531 nm). Après 2 min de stabilisation, le Ca^{2+} est ajouté à raison de 25 μM toutes les

minutes. Les mesures sont réalisées à 30°C car la probabilité d'ouverture du PTP augmente avec la température.

La mesure de la CRC sur cellules en culture, se fait dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les mitochondries isolées. Les ajouts de Ca^{2+} se font toutes les 2 minutes à raison de 12,5 μM .

La valeur de CRC obtenue en fonction du nombre d'ajouts de Ca^{2+} est alors exprimée en nmol de Ca^{2+} par mg de protéines ou par million de cellules, selon le matériel biologique utilisé.

IV.2.7. Détermination de la différence de potentiel électrique transmembranaire

($\Delta\psi$)

Les variations du potentiel de membrane mitochondrial sont mesurées à l'aide d'une sonde fluorescente, la Rhodamine 123 (λ_{exc} 498 nm, λ_{em} 524 nm). La Rhodamine est un cation lipophile qui s'accumule dans la matrice mitochondriale en fonction du $\Delta\psi$. La fluorescence de cette sonde diminue lorsque sa concentration augmente par le phénomène d'extinction (quenching) lors duquel une partie de l'énergie fluorescente est perdue par interaction entre les molécules de Rhodamine confinées dans la mitochondrie. Ainsi, plus le potentiel de membrane est élevé, plus le cation s'accumule dans l'espace matriciel et plus le signal de fluorescence est faible. Une augmentation de la fluorescence correspond donc à une diminution du potentiel de membrane. Les mitochondries isolées (1,5 mg.ml⁻¹) sont incubées dans le milieu KCl (utilisé pour les mesures de consommations d'oxygène) supplémenté en 5 mM de glutamate-Tris et 2,5 mM de malate-Tris, ou avec 5 mM de succinate-Tris plus 1,25 μM de roténone. Après deux minutes d'incubation (permettant d'atteindre un équilibre thermique), 0,2 μM de Rhodamine sont ajoutés. Les variations de $\Delta\psi$ sont calculées de manière relative par rapport à la valeur du potentiel (-180 mV) déterminée expérimentalement grâce à l'équation de Nernst. Il est important de noter que nous n'avons pas ajouté de Nigericine pour effondrer le ΔpH dont nous avons considéré la valeur comme négligeable.

Les mesures de $\Delta\psi$ en présence de NO ont été réalisées dans une cuve pleine et fermée afin de nous rapprocher des conditions d'oxygraphie. Dans le but d'éviter une accumulation de NO dans la cuve de mesure, nous n'avons pas réalisé de titration continue sur le même échantillon, mais un nouvel échantillon de suspension mitochondriale était utilisé pour chaque concentration.

IV.2.8. Détermination de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes b, c + c1 et a

+ a₃

La détermination de la concentration en cytochromes de la chaîne respiratoire a été réalisée par spectrophotométrie (Ohnishi 1966, Vanneste 1966). L'intensité du spectre d'absorption des cytochromes varie selon leur degré d'oxydoréduction. La suspension mitochondriale (5 mg.ml⁻¹) est placée dans du tampon KCl, et répartie dans deux cuves maintenues à 37°C. Dans la cuve échantillon, les cytochromes sont entièrement réduits par l'ajout de quelques cristaux de dithionite de sodium. Dans la cuve référence, les cytochromes sont totalement oxydés par l'ajout de peroxyde d'oxygène (0,06 %).

Les mesures de l'état d'oxydoréduction des cytochromes se font dans les mêmes conditions en présence de différents substrats.

La différence de DO entre les deux spectres réduits et oxydés à des longueurs d'ondes précises, permet de calculer la concentration en cytochromes des mitochondries. La concentration de chacun des cytochromes (pmol/mg protéines) est déterminée selon la loi de Beer-Lambert:

$$\text{Cytochrome a+a}_3 : \quad DO_{605\text{nm}} - DO_{630\text{nm}} \text{ avec } \epsilon = 24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Cytochrome b} : \quad DO_{563\text{nm}} - DO_{575\text{nm}} \text{ avec } \epsilon = 18 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\text{Cytochrome c+c}_1 : \quad DO_{550\text{nm}} - DO_{540\text{nm}} \text{ avec } \epsilon = 18 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

IV.2.9. Mise en évidence de l'activité P-gp

La P-gp possède la propriété d'expulser à l'extérieur de la cellule un grand nombre de composés notamment de nombreuses drogues cytotoxiques utilisées couramment en chimiothérapie. La rhodamine 123 est une sonde fluorescente capable de s'accumuler dans les cellules, mais elle est également un substrat de la P-gp.

Les cellules sont incubées en présence de rhodamine 123 en association ou non avec un inhibiteur de la P-gp, la CsA. Puis les niveaux de fluorescence des populations cellulaires sont mesurés en cytométrie de flux.

Les cellules ont été prélevées comme décrit précédemment (cf. Culture cellulaire), rincées dans du PBS et comptées sur cellule de Malassez. Ensuite, 10⁶ cellules sont incubées dans des boîtes de 25 cm³ dans du milieu RPMI complet en présence ou non de 130 nM de rhodamine 123. Selon les cas, une dose de 10 µM de CsA est ajoutée ou non afin d'inhiber complètement l'activité de la P-gp des cellules. Les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C pendant une heure. A l'issue de l'incubation, les cellules sont passées dans un cytomètre afin de mesurer le niveau de fluorescence de la rhodamine 123 ($\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 560 \text{ nm}$) des cellules. Pour chaque condition, 10000 cellules ont été analysées.

IV.2.10. Détermination du taux de mortalité cellulaire

Lors de nos travaux, la viabilité cellulaire a été évaluée par différentes techniques. La plupart d'entre elles repose sur des propriétés de la membrane plasmique lors du processus de mort cellulaire que ce soit la perte de son intégrité ou une modification dans sa composition. Deux marqueurs de mort cellulaires ont été utilisés : le bleu trypan et l'iodure de propidium.

IV.2.10.1. Exclusion du bleu trypan

Le bleu trypan est un colorant vital qui s'accumule dans les cellules lorsque ces dernières perdent l'intégrité de leur membrane plasmique. Une visualisation au microscope optique permet de compter aisément les cellules mortes qui apparaissent bleues à la différence des cellules vivantes qui restent réfringentes à la lumière.

Pour cela, les cellules ayant subi ou non un traitement sont prélevées et resuspendues dans du tampon PBS contenant 5% (v/v) de bleu trypan. Un comptage du nombre de cellules n'excluant pas le bleu trypan par rapport au nombre de cellules totales nous permet ainsi d'évaluer le pourcentage de mortalité.

IV.2.10.2. Marquage à l'iodure de propidium

L'iodure de propidium est un intercalant fluorescent de l'ADN ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$). Comme le bleu trypan, ce marqueur voit son entrée dans la cellule dépendante de la perméabilité de la membrane plasmique. Cette sonde une fois dans la cellule se localise au niveau du noyau. Ainsi, sous un microscope à fluorescence les noyaux des cellules mortes apparaissent en rouge. Techniquement, les cellules soumises à un traitement d'induction de mort cellulaire sont placées en présence de $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'iodure de propidium et observées sous un microscope à fluorescence. Des photos de cellules issues du même champ sont prises à 550 nm et en contraste de phase afin d'obtenir le pourcentage de mortalité.

IV.2.11. Périfusion d'hépatocytes

La technique de périfusion a été décrite initialement par Van der Meer et Tager (Van Der Meer *et coll.* 1976) et modifiée par Groen *et coll.* (Groen *et coll.* 1983). La périfusion schématisée sur la figure M-3, est un système ouvert, pair et symétrique permettant la réalisation d'expérimentations en mode apparié dans des conditions de temps, de milieu, de pression et de température strictement identiques. Ce système comprend deux chambres, thermostatées à 37°C et parfaitement symétriques, où sont placées les cellules en suspension. Ces chambres de

périfusion sont alimentées en permanence par l'intermédiaire de deux pompes péristaltiques, avec un milieu de périfusion (solution II – Tableau M-1) provenant d'un réservoir central où il est maintenu à 37°C et saturé avec un mélange de carbogène (95% O₂ - 5% CO₂). En amont des deux chambres, sont placés des « poumons de réoxygénation » où le milieu de périfusion est à nouveau saturé en carbogène. Les chambres possèdent une entrée et une sortie pour le périfusé, la sortie étant obstruée par un filtre en acétate de cellulose empêchant la sortie des hépatocytes. Les chambres de périfusion sont également équipées d'entrées annexes qui permettent l'apport continu en substrats et/ou produits d'intérêt, par l'intermédiaire de pousse-seringues électriques. L'avantage de ce système original est que la composition du milieu d'incubation des cellules dans les chambres de périfusion est constante, ce qui permet d'obtenir des états métaboliques très proches de l'état stationnaire. En effet, les substrats étant fournis aux cellules de manière continue et le milieu étant renouvelé en permanence, il n'y a ni limitation en substrats, ni accumulation de produits.

L'atout de la périfusion par rapport à d'autres techniques comme l'incubation en pot, réside dans la possibilité d'utiliser des concentrations non saturantes de substrats et de les faire varier à volonté afin d'obtenir différents états stables de la voie métabolique étudiée. Le débit de périfusion est de 5 ml.min⁻¹ et est ajusté précisément avant le début de l'expérimentation de façon à être rigoureusement identique dans les deux chambres.

En aval des pompes péristaltiques sont placés des capteurs de pression (Research Grade Blood Pressure Transducer 72-4489, Harvard Apparatus, GB) permettant de mesurer en permanence la pression dans chacune des chambres de périfusion. Cette pression, qui est normalement faible, est un bon indice de la mortalité cellulaire. En effet, lorsque l'état des cellules est altéré ou lorsqu'une condition d'expérimentation particulière (drogues, inhibiteurs) a un effet délétère sur celles-ci, des débris cellulaires provenant des cellules mortes peuvent obstruer les pores des filtres présents à la sortie des chambres de périfusion et entraîner ainsi une augmentation progressive de la pression. Les deux pré-requis pour éviter ce type de problème sont, bien évidemment, l'utilisation d'une préparation d'hépatocytes isolés de bonne qualité, mais également le changement de filtre de manière préventive à la fin de la période de stabilisation, juste avant le début de l'expérimentation.

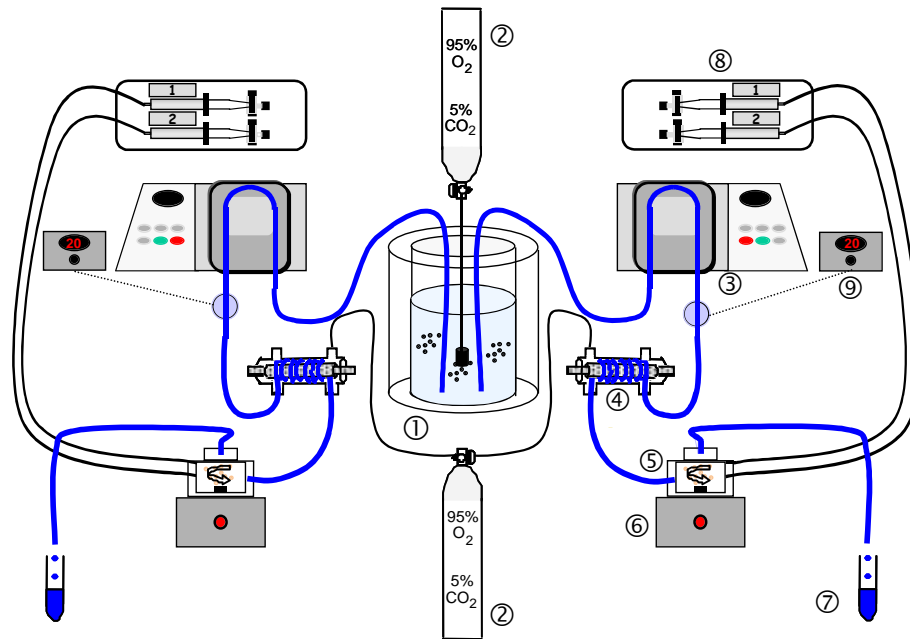


Figure M-3: Schéma du système de perfusion.

1 : cuve thermostatée contenant le milieu de perfusion ; 2 : mélange de carbogène assurant la saturation en oxygène du milieu de perfusion au niveau de la cuve et des poumons de réoxygénation ; 3 : pompe péristaltique ; 4 : poumons de réoxygénation ; 5 : chambre de perfusion ; 6 : agitateur magnétique ; 7 : recueil du perfusat ; 8 : poussoir-seringue ; 9 : capteur de pression.

Toutefois, si un problème de pression survient, un changement de filtre peut être réalisé en cours d'expérimentation. Bien que le milieu de perfusion soit continuellement saturé en carbogène au niveau du réservoir central, son passage dans les tubulures se traduit par une perte d'oxygène et de CO_2 par diffusion à travers le plastique. La teneur en CO_2 étant cruciale pour le maintien du pH cellulaire, il est donc indispensable de saturer à nouveau le milieu en carbogène avant l'entrée dans les chambres de perfusion.

Au début de l'expérimentation, la suspension d'hépatocytes (100 à 250 mg d'hépatocytes selon le type d'expérimentation) est déposée par le puits d'accès situé sur le haut de chaque chambre. Les cellules sont alors perfusées en absence de substrat pendant environ 35-40 minutes pour leur permettre de s'équilibrer. A la fin de cette première période de stabilisation, les filtres des deux chambres sont systématiquement changés, afin d'éliminer les cellules mortes présentes dans la préparation initiale. La facilité et la précision avec laquelle les substrats et/ou les produits sont administrés dans ce système de perfusion, rend possible la réalisation de plusieurs types d'expérimentations : ajout de concentrations croissantes de substrats en présence d'une concentration fixe de drogues, d'hormones ou d'inhibiteurs, cinétique avec des concentrations

fixes de substrat et/ou de produit à tester ou encore cinétique en présence de concentrations fixes de substrat et variables de produit à tester. Pour chaque concentration de substrat étudiée lors des expérimentations de titration, un temps de stabilisation de 15 et 20 minutes, selon les conditions, est nécessaire pour permettre l'obtention d'un nouvel état stationnaire. Ce dernier peut être apprécié à *posteriori* par la stabilité du flux de production de glucose. A chaque état stationnaire, ou tout au long de l'expérience lorsqu'une cinétique est réalisée, le péricusat est prélevé à la sortie des chambres afin de doser les différents métabolites extracellulaires (glucose, lactate, pyruvate et corps cétoniques) et de quantifier le flux de production de ces derniers en fonction des différentes conditions. Pour les expériences de titration, 1 ml de péricusat est prélevé en triplicate et immédiatement placé à 4°C afin d'arrêter toute activité enzymatique contaminante. En fin d'expérimentation, ces tubes sont chauffés à 80°C pendant 10 minutes, afin de dégrader les protéines éventuellement présentes, puis centrifugés pendant 10 minutes à 8000 g et enfin conservés à 4°C. Les dosages enzymatiques des métabolites sont effectués dans les 12h. Des échantillons de la suspension d'hépatocytes peuvent également être prélevés directement dans les chambres par les puits d'accès afin de réaliser la séparation des compartiments extracellulaire et intracellulaire permettant le dosage des métabolites intracellulaires, ainsi que mitochondriaux et cytosoliques après fractionnement cellulaire.

IV.2.12. Fractionnement cellulaire : Séparation du milieu cytosolique et mitochondrial

La technique de fractionnement cellulaire d'hépatocytes permet d'avoir accès à différents compartiments dans lesquels on peut ensuite mesurer la concentration en certains métabolites ou nucléotides.

La séparation des milieux mitochondrial et cytosolique est obtenue par fractionnement cellulaire à la digitonine. Le principe de cette méthode repose sur la perméabilisation sélective de la membrane plasmique de l'hépatocyte par la digitonine qui forme des complexes avec le cholestérol qu'elle contient. En utilisant une concentration de 2,5 mg.ml⁻¹ et une incubation de 30 secondes, une destruction de la membrane plasmique est obtenue sans altération de la membrane mitochondriale, plutôt pauvre en cholestérol.

Avant le début de l'expérimentation, des tubes eppendorf de 2 ml, conservés ensuite à 4°C, sont préparés avec 3 couches superposées :

- 250 µl d'un mélange d'acide perchlorique 10% et d'EDTA 25 mM. L'EDTA chélate le magnésium et permet ainsi de limiter la dégradation de l'ATP cellulaire par des activités ATPasiques magnésium-dépendantes contaminantes.
- 800 µl d'huile de silicone (Wacker, 200 centipoises) avec une densité permettant uniquement le passage des mitochondries
- 800 µl d'une solution de digitonine (2,46 mg.ml⁻¹) dissoute par chauffage dans un tampon isotonique permettant de préserver l'intégrité mitochondriale (250 mM sucrose, 3 mM EDTA-Na²⁺ et 20 mM MOPS ; pH 7,2)

Un échantillon (300 µl) d'hépatocytes périfusés ou incubés est prélevé puis déposé délicatement dans la couche supérieure de l'éppendorf. Après 30 secondes d'action de la digitonine, une centrifugation à 13500 g est effectuée pendant 30 secondes permettant aux mitochondries, libérées des cellules par l'action du perméant, de traverser la couche d'huile de silicone et d'être précipitées dans l'acide perchlorique.

Dans un premier temps, le surnageant (800 µl) correspondant au compartiment cytosolique et au milieu extracellulaire, est immédiatement prélevé et précipité dans l'acide perchlorique 4% puis centrifugé pendant 5 minutes à 13500 g. Enfin, ce second surnageant est finalement prélevé (700 µl) et neutralisé avec un mélange de KOH 2 M et MOPS 0,3 M.

Dans un second temps, après élimination du surnageant résiduel et d'une partie de l'huile, le compartiment mitochondrial solubilisé dans la couche inférieure d'acide perchlorique est minutieusement remis en suspension à travers la couche d'huile grâce à une pipette Pasteur bouchée. Une centrifugation à 13500 g pendant 5 minutes est ensuite effectuée afin de sédimenter les débris membranaires. Le compartiment mitochondrial soluble dans l'acide (200 µl) est alors prélevé à travers la couche d'huile et également neutralisé.

Les échantillons finaux neutralisés sont conservés à - 20°C pour un dosage ultérieur du contenu cytosolique et mitochondrial en nucléotides adényliques.

IV.2.13. Dosage enzymatique des métabolites extracellulaires par spectrophotométrie

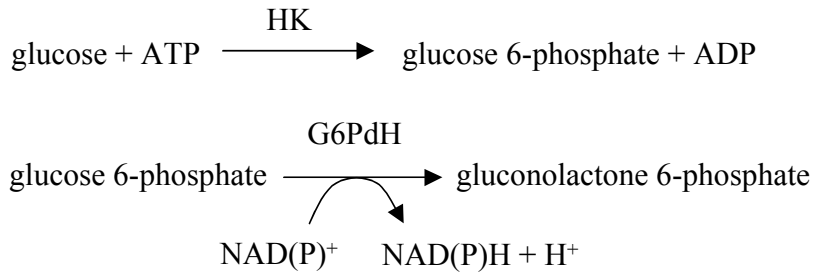
Les dosages des principaux métabolites extracellulaires sont réalisés par les méthodes enzymatiques décrites par Bergmeyer reposant sur la réduction de NAD⁺ en NADH ou inversement (Bergmeyer 1974).

La détermination de la concentration de NADH est réalisée par spectrophotométrie (voir IV.2.3) avant et après l'action d'enzymes dans des milieux de dosage de composition standardisée

contenant les échantillons à analyser. Après soustraction de la DO du blanc, réalisé sur du milieu de dosage sans enzyme, à celle de l'échantillon, la quantité de NADH calculée correspond stoechiométriquement à celle du produit transformé par l'enzyme utilisée. Les concentrations des métabolites dans la cuve sont rapportées au poids sec d'hépatocytes, en tenant compte de toutes les dilutions effectuées. Les résultats pour chacun des métabolites sont exprimés en $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g PS}$.

IV.2.13.1. Glucose

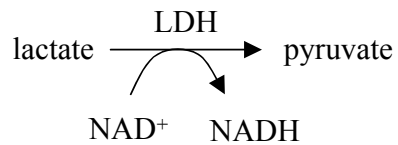
Le dosage du glucose repose sur la transformation du NAD^+ en NADH lors d'une réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6Pdh).



L'échantillon à doser (1 ml) est placé dans une cuve contenant 1 ml de milieu de dosage standardisé (0,5 mM NAD^+ , 0,625 mM ATP, 0,5 U.I. G6Pdh NAD^+ -dépendante, 50 mM Triéthanolamine-HCl, 7,5 mM MgCl_2 et 3,75 mM EDTA ; pH 7,4 avec NaOH). Une première lecture est réalisée puis la réaction est initiée par adjonction de 10 μl d'HK à 60 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$. La cuve est agitée puis une seconde lecture est réalisée 60 minutes plus tard.

IV.2.13.2. Lactate

Le dosage du lactate repose sur la transformation du NAD^+ en NADH lors d'une réaction catalysée par la LDH.

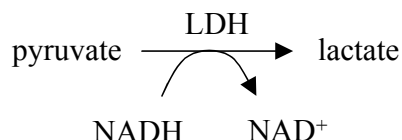


L'échantillon à doser (1 ml) est placé dans une cuve contenant 1 ml de milieu de dosage standardisé (0,75 mM NAD^+ , 0,4 M d'hydrate d'hydrazine et 0,4 mM glycine). La présence de

glycine rend le milieu de dosage basique (pH 9) et permet ainsi d'orienter la réaction vers le pyruvate, puisque l'hydrazine piège le pyruvate et évite la réaction inverse. Une première lecture est réalisée puis la réaction est initiée par adjonction de 10 μl de LDH à 33 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Le mélange est homogénéisé puis une seconde lecture est réalisée 90 minutes plus tard.

IV.2.13.3. Pyruvate

Le dosage du pyruvate repose sur la transformation du NADH en NAD^+ . On mesure donc une diminution de la DO du NADH lors de la réaction inverse de celle du dosage du lactate, également catalysée par la LDH.



L'échantillon à doser (1 ml) est placé dans une cuve contenant 1 ml de milieu de dosage standardisé (0,2 mM NADH ; pH 7,4 avec un tampon $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM qui induit un changement la constante d'équilibre de la réaction, par variation pH, et favorise la formation de lactate. Une première lecture est réalisée puis la réaction est initiée par adjonction de 10 μl de LDH à 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Le mélange est homogénéisé puis une seconde lecture est réalisée 15 minutes plus tard.

V. Statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart standard à la moyenne (sem). Les différentes comparaisons statistiques ont été réalisées soit par un test d'analyse des variances (ANOVA) à mesures factorielles, suivi d'un test *post hoc* de Fisher, soit par un test t de Student. Les analyses ont été réalisées grâce au logiciel Sigma Stat®. Le seuil de significativité a été défini *a priori* à 0,05.

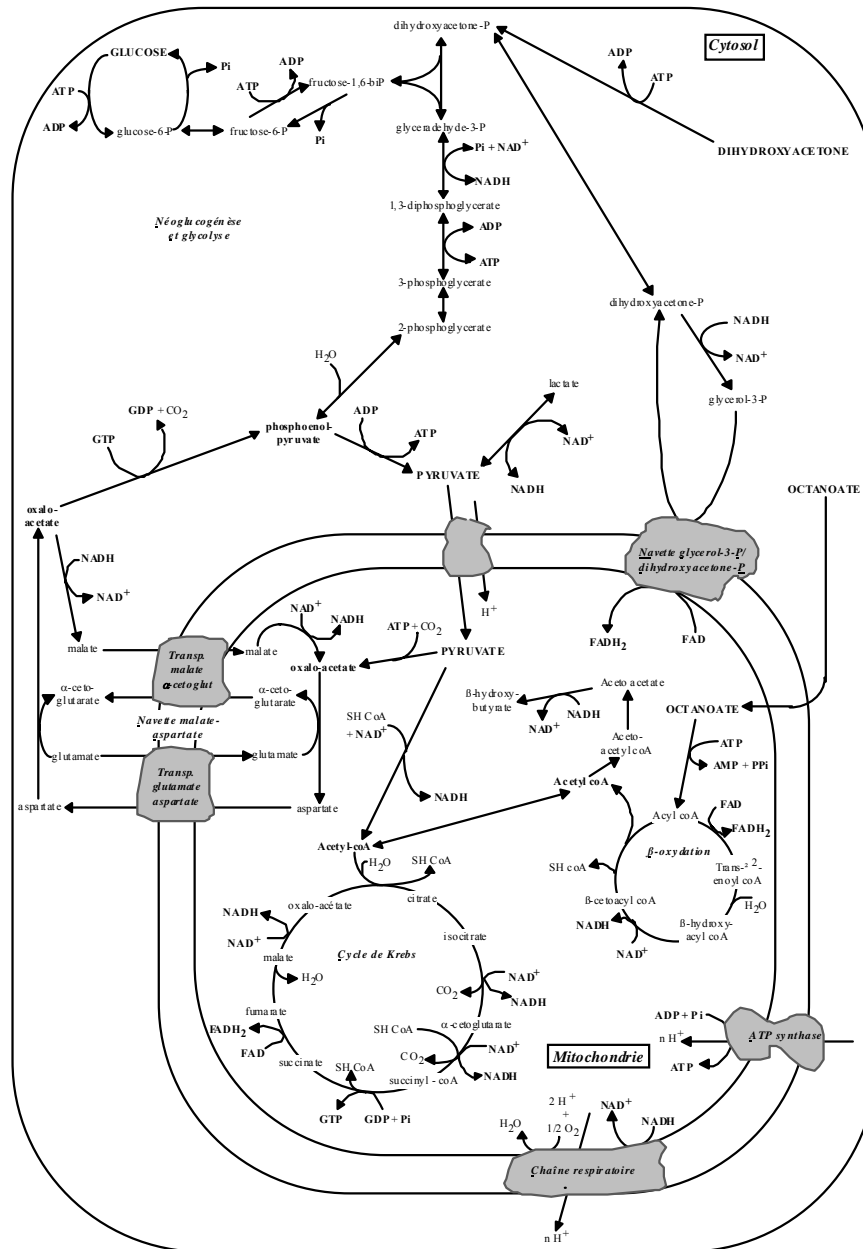


Figure M-4: Relations entre quelques voies du métabolisme intermédiaire et le métabolisme oxydatif.

RESULTATS ET DISCUSSION

**EFFETS DU NO SUR LE
RENDEMENT DE L'OXYDATION
PHOSPHORYLANTE**

I. Problématique

De nombreuses études ont mis en évidence des modifications de l'oxydation phosphorylante, en réponse à des traitements chroniques. Ainsi il a pu être démontré que le rendement de l'oxydation phosphorylante, c'est-à-dire la quantité d'ATP produite par molécule d'oxygène consommée (ATP/O), pouvait varier en fonction de l'état physiologique.

Différents travaux ont mis en évidence, sur mitochondries isolées et sur hépatocytes isolés, une diminution du rendement de l'oxydation phosphorylante en réponse à une carence en acides gras poly-insaturés (AGPI) (Fontaine *et coll.* 1996, Nogueira *et coll.* 2001, Piquet *et coll.* 1996). Une diminution du rendement a également été observée à la suite d'un traitement conduisant à l'apparition d'une hyperthyroïdie (Nogueira *et coll.* 2002), et en réponse à un traitement au dexaméthasone (Roussel *et coll.* 2004).

Cependant, d'autres situations physio-pathologiques peuvent induire une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante. Cela a notamment été démontré au sein de mitochondries isolées de foie de rats hypothyroïdiens ou traités chroniquement à l'éthanol (Nogueira *et coll.* 2002, Piquet *et coll.* 2000). Ce sont les deux seules études qui font part d'une augmentation de l'efficacité de l'oxydation phosphorylante dans le foie.

Les mécanismes permettant ces adaptations sont encore mal connus et il apparaît intéressant de les préciser lors de ces situations physio-pathologiques.

Nogueira *et coll.* se sont alors intéressés à ces différents cas physio-pathologiques au sein desquels ont été observées des modifications du rendement de l'oxydation phosphorylante. Les auteurs ont ainsi mis en évidence des changements dans le contenu en cytochrome aa₃ mitochondrial. En effet, au sein des mitochondries isolées de foie de rats hypothyroïdiens ou traités chroniquement à l'éthanol, le contenu en cytochrome aa₃ est diminué. Au contraire, dans les situations d'hyperthyroïdisme et de carence en AGPI qui entraînent une diminution du rendement de l'oxydation phosphorylante, les auteurs ont mesuré une augmentation du contenu en cytochrome aa₃ mitochondrial. Ainsi, comme le montre la figure RI-1, ces résultats ont permis d'établir une corrélation inverse entre le rendement de l'oxydation phosphorylante et le contenu en cytochrome aa₃ mitochondrial (Nogueira *et coll.* 2001).

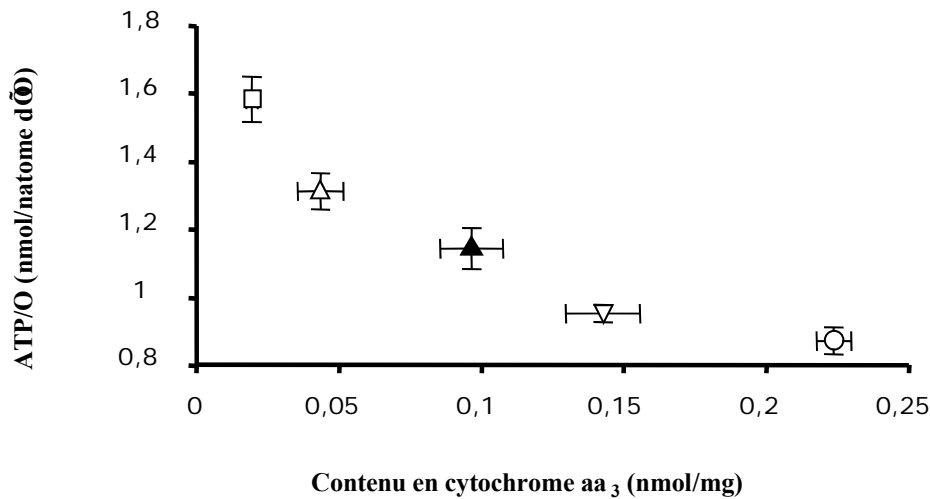


Figure RI-1: Corrélation entre le rendement de l'oxydation phosphorylante et le contenu en cytochrome aa₃.

Les mitochondries (4 mg.ml^{-1}) isolées de foie de rats sont suspendues dans le milieu de respiration maintenu à 37°C et composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Pi-Tris 5 mM, Tris-HCl 20 mM (pH 7,2), succinate 5 mM, malate 0,5 mM et roténone $1,25 \mu\text{M}$. Le flux respiratoire et la synthèse d'ATP sont déterminés en parallèle. Le contenu de la chaîne respiratoire en cytochrome aa₃ des mitochondries est déterminé par spectrophotométrie par la mesure de la différence de densité optique entre les spectres réduit/oxydé ($A_{605 \text{ nm}} - A_{630 \text{ nm}}$ avec $\epsilon = 24 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Hypothyroïdien (□), éthanol (Δ), contrôle (σ), carencé en AGPI (▽), hyperthyroïdien (○). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, $n=5$ pour chaque groupe. D'après (Nogueira *et coll.* 2001)

De plus, il a été démontré que l'inhibition de l'activité de la cytochrome c oxydase un de ses inhibiteurs comme l'azide, utilisé en traitement aigu, induisait également une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante (Piquet *et coll.* 2000).

La cytochrome c oxydase est connue pour être un site majeur de « slipping » (Azzone *et coll.* 1985, Fitton *et coll.* 1994, Luvisetto *et coll.* 1991, Papa *et coll.* 1991, Papa *et coll.* 1987, Sarti *et coll.* 1985, Wikstrom *et coll.* 1994). De plus, le rapport ATP/O augmente avec la diminution de l'activité et/ou du contenu en cytochrome aa₃ mitochondrial. Ainsi, il semble que la cytochrome c oxydase, quantitativement (contenu en cytochromes) et qualitativement (activité), joue un rôle majeur dans la régulation de l'efficacité du processus de régulation de l'oxydation phosphorylante de la chaîne respiratoire. Afin d'approfondir notre compréhension de ce processus d'oxydation phosphorylante, il nous a paru intéressant d'étudier l'effet d'une molécule physiologique impliquée dans de nombreux processus de signalisation cellulaire et également inhibitrice de la cytochrome c oxydase : le monoxyde d'azote (NO).

Le NO est une molécule inhibitrice de la cytochrome c oxydase (COX), par sa liaison au site de fixation de l'oxygène. Les effets du NO sur la respiration cellulaire et mitochondriale, mais également sur la synthèse d'ATP, ont déjà fait l'objet de nombreuses études (Kaasik *et coll.*

1999, Saavedra-Molina *et coll.* 2003, Zhang *et coll.* 2005). Toutes les études aboutissent à la même conclusion : le NO inhibe à la fois la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP. Toutefois, une étude menée sur le cobaye a démontré que l'inhibition de la eNOS induit une augmentation de la respiration sans changer ni la synthèse d'ATP, ni le travail cardiaque (Shen *et coll.* 2001). Les auteurs ont ainsi mis en évidence que le NO libéré par les eNOS augmente le couplage entre la consommation d'oxygène et la synthèse d'ATP.

Il est également important de noter que dans la plupart des travaux, les mesures de la synthèse d'ATP et de la consommation d'oxygène sont effectuées de façon indépendante, et surtout en présence de concentrations saturantes en ADP. Or, il a été préalablement démontré, dans l'étude menée sur les effets de la carence en AGPI, que le rendement de l'oxydation phosphorylante n'était pas modifié lorsqu'il était mesuré en présence de concentration saturante en ADP, tandis qu'une diminution du rendement a été mise en évidence lors de la mesure en présence de concentrations sous-saturantes en ADP *via* le système faisant intervenir l'hexokinase (Fontaine *et coll.* 1996).

Le but de cette première étude est donc de reconsidérer les effets aigus du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de concentrations sous-saturantes en ADP.

Après avoir mis au point les conditions expérimentales en présence de DPTA-NONOate, nous avons déterminé l'effet du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de différents substrats de la chaîne respiratoire. Afin de vérifier que l'effet du NO sur le rapport ATP/O est bien dû à l'inhibition de la COX, nous avons étudié en parallèle l'effet du cyanure, un inhibiteur spécifique de la COX, sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.

Dans un second temps, nous avons tenté d'identifier lequel des mécanismes de « leak » ou de « slipping », connus pour augmenter les pertes d'énergie, est impliqué dans la régulation induite par le NO et le cyanure.

Enfin, nous nous sommes attachés à comprendre pourquoi les effets du NO et du cyanure diffèrent en fonction du substrat utilisé, en étudiant l'état d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire en présence de ces différents substrats.

II. Mise au point expérimentale

Les effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante ont été étudiés par l'utilisation d'un donneur de NO : le DPTA-NONOate (dipropylènetriamine NONOate). Le DPTA-NONOate se dissocie spontanément en un groupement amine et deux groupements NO. Sa vitesse de dissociation dépend du pH et de la température du milieu d'incubation. Ainsi, le donneur possède une demi-vie de 5h dans un tampon phosphate (pH 7,4) thermostaté à 22°C, alors qu'elle est de 3h dans la même solution thermostatée à 37°C. Le NO n'étant pas libéré instantanément par le donneur, nous nous sommes heurtés à un phénomène d'accumulation dans le système d'oxygraphie, puisque la chambre de mesure est un système clôt. En contrôlant la concentration en donneur, nous avons pu contrôler indirectement la concentration de NO

Dans un premier temps, nous avons titré la concentration en DPTA-NONOate afin de déterminer une concentration en NO physiologique qui inhibe la consommation d'oxygène de façon significative. Nous avons donc ajouté le NO en début de mesure, en même temps que les substrats et les mitochondries. Dans ces conditions, nous avons constaté que les faibles concentrations en donneur (de l'ordre du micromolaire) étaient insuffisantes pour induire une inhibition significative de la respiration à l'état 3. Nous avons donc utilisé des concentrations plus élevées de DPTA-NONOate, mais dans ce cas, il nous était impossible de mesurer la consommation d'oxygène, puisque le phénomène d'accumulation de NO dans la chambre d'oxygraphie était tel, qu'au cours de la mesure, l'inhibition de la respiration à l'état 4, comme à l'état 3, était augmentée. Nous avons alors incubé le DPTA-NONOate dans la chambre du système d'oxygraphie avant le début de l'expérimentation, afin que la quantité de NO progressivement libérée pendant la mesure soit négligeable par rapport à la quantité de NO libérée pendant la période d'incubation pré-expérimentale. Il nous a donc fallu titrer la concentration en DPTA-NONOate en fonction du temps d'incubation. Comme nous pouvons l'observer dans la figure RI-2A, en présence de 25 μ M de DPTA-NONOate incubé pendant 15 min (c) avant l'ajout des mitochondries et des substrats, la respiration en présence de succinate plus roténone est inhibée à l'E4 et à l'E3 par rapport à la respiration contrôle (a). Cependant, la respiration à l'E3 n'est pas constante mettant en évidence l'accumulation de NO dans la chambre d'oxygraphie reflétant une augmentation de l'inhibition de la respiration. En revanche, en présence de 10 μ M, incubé au préalable 15 min (b), la respiration à l'E4 et à l'E3 est également inhibée, l'E3 restant constante pendant les premières minutes de l'expérience.

Parallèlement à la titration de la concentration en DPTA-NONOate, nous avons testé différentes périodes de pré-incubation du donneur. Comme nous pouvons l'observer sur la figure RI-2B, pour la même concentration en DPTA-NONOate (10 μ M) plus la période de pré-incubation est longue plus l'inhibition est importante (b et c).

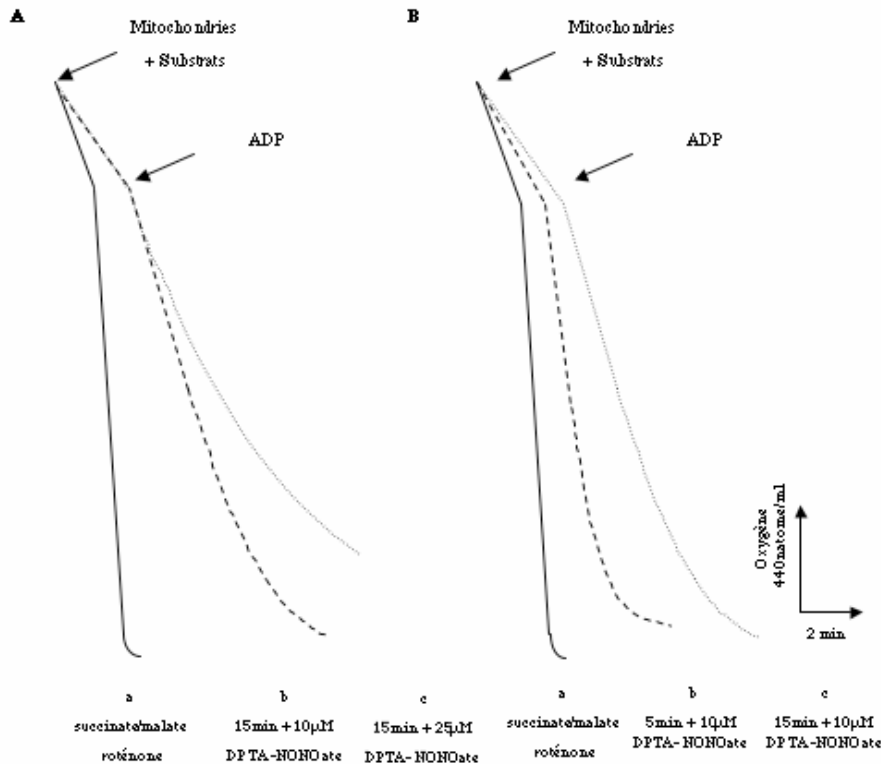


Figure RI-2 : Inhibition de l'état 3 de la respiration mitochondriale par le NO libéré par le DPTA-NONOate

Le donneur de NO DPTA-NONOate (10 μ M) est incubé dans le tampon de respiration KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, succinate/malate 5 mM, roténone 1,25 μ M, phosphate 5 mM, pH 7.2, 37°C. A : les mitochondries de foies de rats (1,5 mg.ml⁻¹) sont ajoutées au tampon en absence de DPTA-NONOate (a), en présence de 10 μ M (b) ou 25 μ M (c) de DPTA-NONOate pré-incubé dans le tampon de respiration 15 min. B : les mitochondries de foies de rats (1,5 mg.ml⁻¹) sont ajoutées au tampon en absence de DPTA-NONOate (a), en présence de 10 μ M (b) de DPTA-NONOate pré-incubé 5 min ou 10 μ M (c) de DPTA-NONOate préincubé dans le tampon de respiration 15 min. L'état 3 respiratoire est généré par l'ajout d'ADP 1 mM. Représentation typique de plusieurs tracés obtenus.

Nous avons donc choisi des conditions expérimentales dans lesquelles le phénomène d'accumulation est minimisé tout en ayant une inhibition significative de la respiration. Nous avons dû établir un compromis entre la concentration en donneur et le temps d'incubation pré-expérimental de la molécule (Figure RI-2). Ainsi, dans un environnement clôt, une pré-

incubation de 15 min de 10 μ M de DPTA-NONOate induit une inhibition significative de la respiration à l'E4 en présence de succinate, nous permettant de mesurer la consommation d'oxygène sans que l'accumulation de NO dans la chambre d'oxygraphie ne modifie la linéarité de la consommation d'oxygène pendant le temps nécessaire à nos mesures.

Toutes les mesures présentées dans cette étude ont donc été effectuées sur mitochondries isolées de foie de rats dans ces conditions, en environnement fermé.

L'utilisation d'un donneur de NO nous permet de contrôler indirectement la concentration de NO, puisque 1 mole de donneur libère 2 moles de NO. Si nous considérons que le NO est libéré de façon constante par le DPTA-NONOate et que dans nos conditions expérimentales (milieu de respiration KCl, pH 7,4, 37°C) le donneur a une demi-vie de 3h, alors nous pouvons estimer 1 μ M de NO devait être libéré pendant les 15 min de pré-incubation.

Afin d'éviter l'ouverture répétée de la chambre d'oxygraphie à la fin de l'incubation du DPTA-NONOate pour ajouter les différents substrats et les mitochondries, nous avons choisi d'incuber le donneur dans le milieu de respiration nécessaire pour la mesure de la synthèse d'ATP, décrit dans la légende de la figure RI-3. Comme le montre la figure RI-3A (tracés a et b), pré-incubant le DPTA-NONOate en présence d'ATP, de glucose et de magnésium, nécessaires au système hexokinase, nous n'avions plus aucun effet inhibiteur du NO sur la respiration. Nous avons alors constaté qu'en retirant le magnésium de la période de pré-incubation et en l'ajoutant en même temps que les mitochondries, l'effet inhibiteur du NO sur la respiration était restauré (Figure RI-3B tracés a et b).

Nous avons alors proposé que le magnésium piège le NO ou inhibe la libération du NO par le DPTA-NONOate.

Il ne semble pas que le magnésium soit un « scavenger » du NO puisque l'ajout de magnésium pendant la mesure ne modifie pas l'inhibition de la respiration. Grâce aux propriétés d'absorbance du DPTA-NONOate, nous avons vérifié que le magnésium n'empêchait pas la dissociation du donneur, en suivant l'évolution de la densité optique à 252 nm. Aucune modification n'a pu être observée, le magnésium ne serait donc pas un inhibiteur de la dissociation du donneur. Cependant, il n'est pas exclu que le magnésium empêche la dissociation des deux groupements NO.

Nous n'avons pas poursuivi l'étude de ce phénomène et nous avons choisi d'incuber le DPTA-NONOate dans le milieu de respiration sans magnésium, mais de l'ajouter au début de la mesure en même temps que les mitochondries.

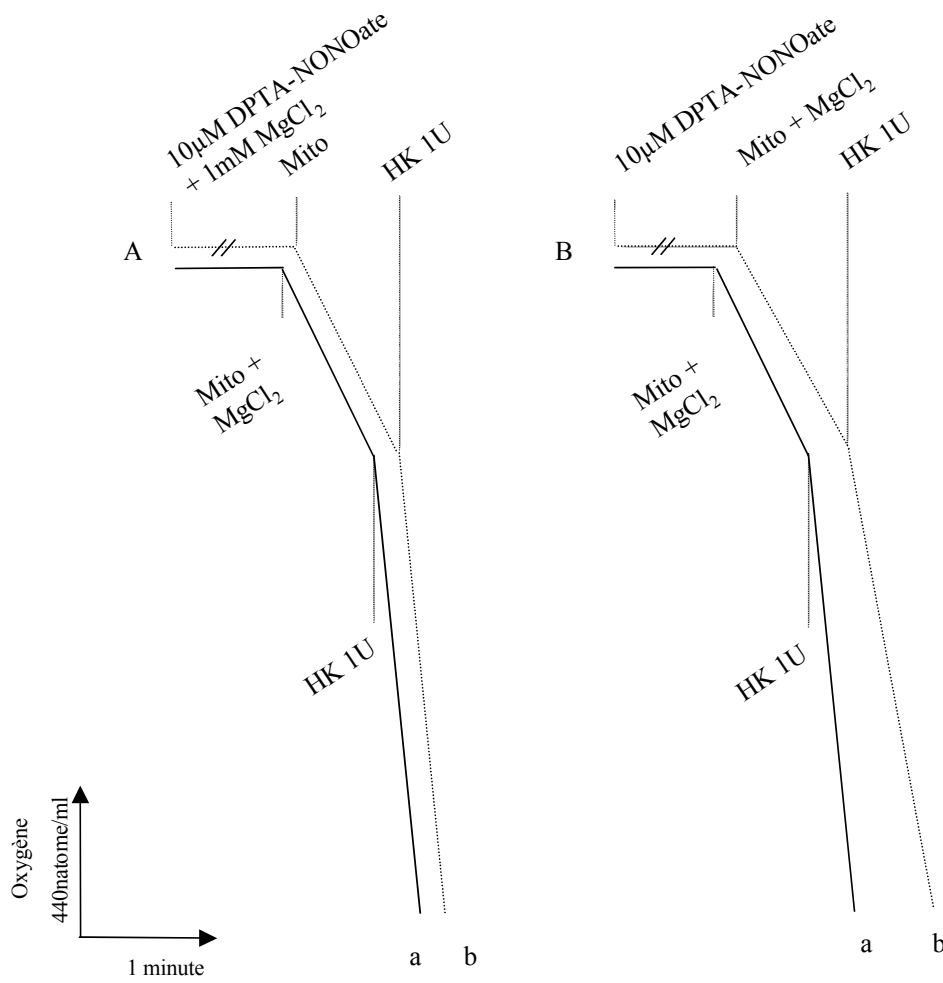


Figure RI-3 : Effets du NO sur le respiration mitochondriale en présence de magnésium.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, et supplémenté en Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1 %, glucose 20 mM, ATP-Tris 125 μM , MgCl_2 1 mM, succinate-Tris 5 mM, malate-Tris 0,5 mM plus roténone 1,25 μM .

La mesure de la respiration est démarrée par l'ajout des mitochondries au milieu complet (Aa –Ba) en présence de DPTA-NONOate 10 μM incubé 15 min dans le milieu de respiration complet (Ab), ou en présence de DPTA-NONOate 10 μM incubé 15 min dans le milieu de respiration auquel le MgCl_2 est ajouté avec les mitochondries (Bb). La respiration à l'état 3 est modulée par l'ajout d'hexokinase 1U. Représentation typique de plusieurs tracés obtenus.

III. Résultats

III.1. Effet du DPTA-NONOate sur la chaîne respiratoire

Dans un premier temps, nous avons procédé à une mesure systématique de l'inhibition de la respiration mitochondriale induite par le NO à l'E4 et l'E3, en présence des substrats des complexes I, II et IV.

III.1.1. DPTA-NONOate et respiration mitochondriale en présence de TMPD/Asc - Complexe IV

Nous avons déterminé l'inhibition induite par le NO sur la cytochrome c oxydase, en mesurant la consommation d'oxygène mitochondriale en présence de TMPD/Ascorbate. Le TMPD est un transporteur d'électrons réduit par l'ascorbate et qui transfère ses électrons directement au cytochrome c.

Le DPTA-NONOate (10 μ M) a été incubé 15 min dans la chambre d'oxygraphie avant l'ajout des mitochondries isolées et des substrats. Nous avons observé une inhibition de la cytochrome c oxydase, se traduisant par une diminution significative de la consommation d'oxygène (Tableau RI-1). L'état 3 respiratoire en présence de TMPD/Asc est inhibé de **18,5 %** ($344,08 \pm 26,89$ pour la situation contrôle *versus* $280,27 \pm 18,19$ natome d'O/min/mg protéines pour la situation en présence de NO ; n = 5 ; p<0,05). Quant à la respiration à l'état 4, elle est inhibée de **17,5 %** ($233,16 \pm 17,35$ pour la situation contrôle *versus* $192,57 \pm 9,42$ pour la situation en présence de NO ; n = 4 ; p<0,05) (Tableau RI-1).

Nous avons également mesuré l'inhibition induite par la même concentration de DPTA-NONOate sur des mitochondries énergisées par l'ajout de substrats du complexe II et du complexe I de la chaîne respiratoire.

Substrats	Stade Respiratoire	JO ₂ – Contrôle (natome d'O/min/mig protéines)	JO ₂ – DPTA-NONOate (natome d'O/min/mig protéines)
TMPD/Asc	E4	233,16 ± 17,35	192,57 ± 9,42 *
	E3	344,08 ± 26,89	280,27 ± 18,19 *
Glutamate/Malate	E4	19,21 ± 1,05	16,8 ± 0,6
	E3	112,18 ± 7,93	93 ± 7,1
Succinate/Roténone	E4	50,58 ± 1,54	39,47 ± 1,38 \$
	E3	235,91 ± 9,77	146,45 ± 14,11 \$

Tableau RI-1: Effets du DPTA-NONOate sur la respiration de mitochondries isolées.

Les mitochondries de foie de rat (1,5mg.ml⁻¹) sont incubées à 37°C, dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1%. Les mitochondries sont énergisées soit avec du TMPD 1 mM plus ascorbate 5 mM plus myxothiazol 3,6 µM, soit avec du succinate-Tris 5 mM plus malate-Tris 0,5 mM plus roténone 1,25 µM, soit avec du glutamate-Tris 5 mM plus malate-Tris 2,5 mM. La respiration est mesurée par oxygraphie en présence ou en l'absence de 10 µM de DPTA-NONOate incubé 15 min avant le début de l'expérimentation en absence des substrats et des mitochondries ; l'état 3 est obtenu par l'ajout d'ADP 1 mM.

Les résultats sont exprimés en moyenne ± sem avec n = 4 mesures en TMPD/Asc, n = 8 mesures en succinate/malate/roténone, et n = 4 mesures en GM. * p<0,05 *versus* le groupe contrôle, \$ p<0,0001 *versus* le groupe contrôle.

III.1.2. DPTA-NONOate et respiration mitochondriale en présence de succinate - Complexe II

La mesure de la consommation d'oxygène en présence de substrats du complexe II (Tableau RI-1), se fait systématiquement en présence de roténone (1,25 µM), inhibiteur du complexe I, dans le but d'inhiber le flux inverse d'électrons à travers le complexe I.

En présence de succinate, nous avons mesuré une inhibition significative de **13%** de l'état 4 respiratoire (50,58 ± 1,54 pour la situation contrôle *versus* 39,47 ± 1,38 en présence de NO, n=8, p<0,001) et une inhibition de **39%** de l'état 3 (235,91 ± 9,77 pour la situation contrôle *versus* 146,45 ± 14,11 dans la situation en présence de NO ; n = 8 ; p<0,0001).

III.1.3. DPTA-NONOate et respiration mitochondriale en présence de glutamate/malate - Complexe I

La respiration en présence de glutamate/malate est également inhibée par le NO (Tableau RI-1), de **12,5 %** pour l'état 4 respiratoire ($19,21 \pm 1,05$ pour la situation contrôle *versus* $16,8 \pm 0,6$ dans la situation en présence de NO ; n=4) et de **17 %** pour l'état 3 ($112,18 \pm 7,93$ pour la situation contrôle *versus* $93 \pm 7,1$ en présence de NO ; n = 4). Cependant, la respiration à l'état 4 comme à l'état 3, en présence de DPTA-NONOate, n'est pas significativement différente de la respiration mesurée en situation contrôle (glutamate/malate).

Il est tout de même surprenant d'observer que le NO a un effet inhibiteur plus puissant sur l'état 3 respiratoire en présence de succinate qu'en présence de TMPD/Asc.

III.1.4. Effets du DPTA sur l'activité ATPasique

Dans la perspective d'étudier l'effet du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante, nous avons mesuré l'activité ATPasique en sa présence, afin de nous assurer que l'inhibition de la respiration à l'état 4 ne soit pas due à une inhibition de l'activité ATPasique.

Nous avons alors mesuré l'activité ATPasique en présence de DPTA-NONOate et de cyanure. Ce dernier, en tant qu'inhibiteur de référence du complexe IV, nous servira de contrôle tout au long de l'étude.

Comme le montre la figure RI-4, l'activité ATPasique mesurée en présence de ces deux inhibiteurs n'est pas significativement différente de l'activité ATPasique mesurée au sein de mitochondries incubées en présence de succinate seul.

Nous avons donc observé une inhibition, par le NO, de la respiration de mitochondries isolées, incubées en présence de succinate et de TMPD/Asc. En revanche, en présence de glutamate/malate, l'inhibition de la respiration n'est pas significative. De plus, nous avons confirmé que cette inhibition de respiration par le NO n'est pas due à une modification de l'activité ATPasique.

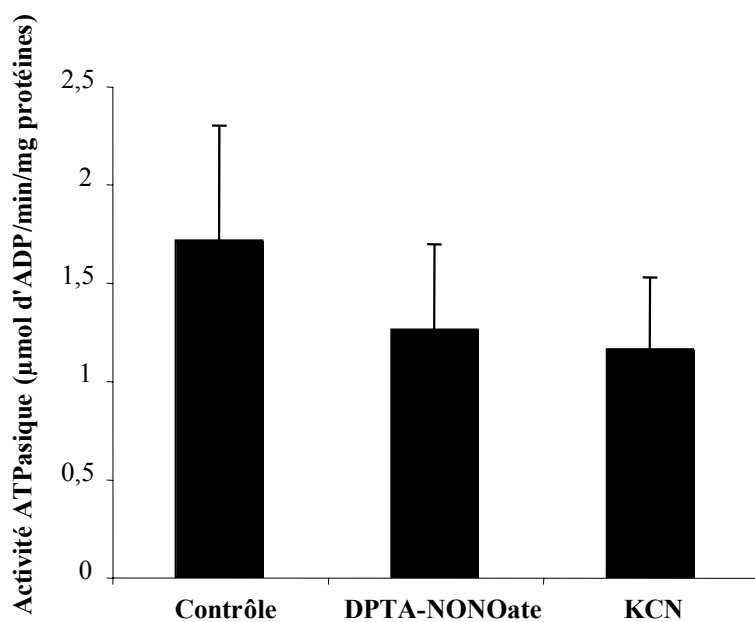


Figure RI-4 : Effets du NO et du cyanure sur l'activité ATPasique.

Les mitochondries (2 mg.ml^{-1}) sont incubées en présence de Triton X-100 0,35 % pendant 2 min, puis le milieu est complété avec le tampon de respiration, ATP 5 mM et MgCl_2 5 mM. L'hydrolyse de l'ATP sensible à l'oligomycine est déterminée par la mesure de l'ADP formé. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, n = 5).

III.2. Effets du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante en fonction de la nature des équivalents réduits

L'efficacité de l'oxydation phosphorylante est évaluée par le rapport entre la synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène, noté ATP/O. Nous avons mesuré le rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de concentrations sous-saturantes d'ADP, établies par ajout de concentrations croissantes en hexokinase (0 - 3 U) (se référer à IV.2.2. du matériel et méthodes). Ce système nous permet de mesurer le rendement de l'oxydation phosphorylante à des niveaux intermédiaires de sollicitation de la chaîne respiratoire. La nature des équivalents réduits modifiant le rendement de l'oxydation phosphorylante nous avons mesuré les effets du NO et du cyanure sur ce rendement, en présence de différents substrats de la chaîne respiratoire.

III.2.1. Effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante lors de l'énergisation du complexe II

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés au rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de succinate, et aux modifications engendrées par la présence de DPTA-NONOate et de cyanure.

Comme le montre la figure RI-5A, l'augmentation de la consommation d'oxygène induite par l'ajout de concentrations croissantes en hexokinase s'accompagne d'une augmentation de la synthèse d'ATP.

Les relations entre le flux d'ATP et le flux d'oxygène, établies en présence de succinate ou non de DPTA-NONOate, sont linéaires et parallèles. La relation décrite en présence de DPTA-NONOate est déplacée vers la gauche signifiant que pour une même consommation d'oxygène, le flux d'ATP mesuré en présence de DPTA-NONOate est supérieur au flux mesuré en présence de succinate seul. Autrement dit, les mitochondries incubées en présence de DPTA-NONOate consomment moins d'oxygène pour générer un flux d'ATP identique aux mitochondries de la situation contrôle.

Cette modification de la relation entre le flux d'ATP et le flux d'oxygène par le NO se traduit par une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante, au sein de mitochondries énergisées par le FADH₂ (Figure RI-5B). En effet, la relation entre le rendement de l'oxydation phosphorylante (ATP/O) et la consommation d'oxygène est également décalée vers la gauche, et la différence entre la condition contrôle et la condition NO a tendance à s'accroître avec l'augmentation de la respiration.

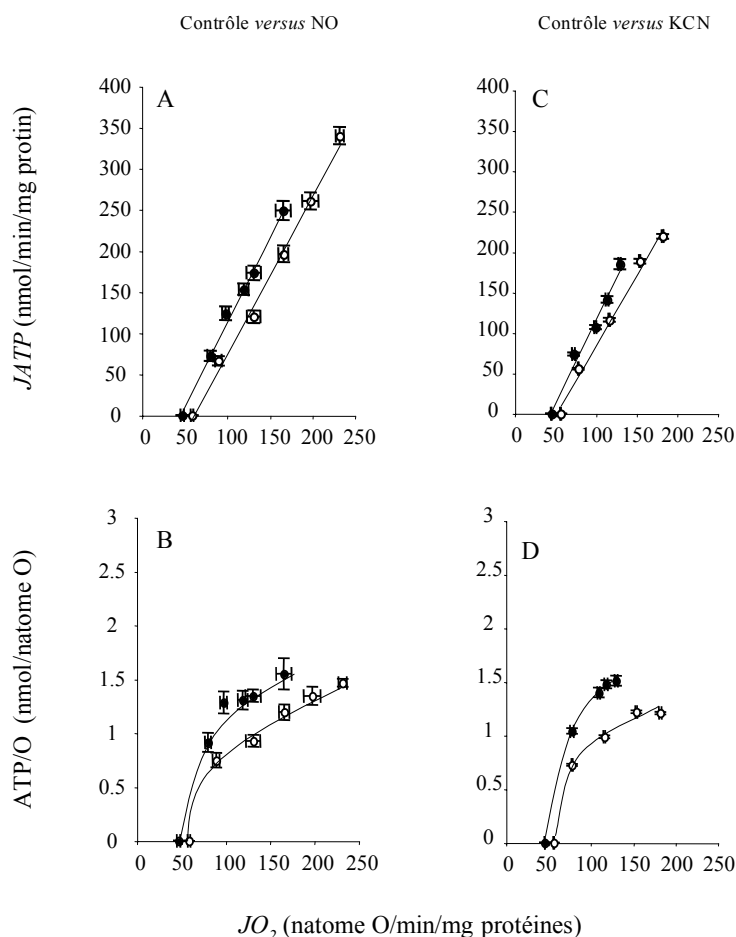


Figure RI-5 : Effets du DPTA-NONOate et du cyanure sur le processus d'oxydation phosphorylante de mitochondries isolées de foie de rats en présence de succinate.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, et supplémenté en Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1 %, glucose 20 mM, ATP-Tris 125 μM , MgCl_2 1 mM, succinate-Tris 5 mM, malate-Tris 0,5 mM plus roténone 1,25 μM .

La mesure de la respiration par oxygraphie est démarrée par l'ajout des mitochondries et du MgCl_2 en absence de DPTA-NONOate (○), ou après 15 min de pré-incubation du milieu de respiration avec 10 μM de DPTA-NONOate (■) (figures A et B), en absence (○) ou en présence de KCN 15 μM (■) (figures C et D). La synthèse d'ATP et la respiration sont modulées par l'ajout de concentrations croissantes d'hexokinase (0 – 3 U). Le flux d'ATP est calculé à partir du flux de glucose-6-phosphate. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, $n=12$ (A et B), $n=10$ (C et D).

Il est important de noter que l'ajout de DPTA-NONOate induit une contrainte cinétique au niveau de la chaîne respiratoire. En effet, nous pouvons remarquer sur la figure RI-5A, qu'en présence de la concentration maximale en hexokinase, la respiration atteinte en présence de DPTA-NONOate est inférieure à la respiration mesurée en présence de succinate seul. L'ajout

d'une concentration supérieure ne permet pas d'atteindre la respiration maximale obtenue en situation contrôlée.

Afin de nous assurer que l'effet médié par le NO est bien dû à l'inhibition de la cytochrome c oxydase, nous avons reproduit l'inhibition de 20% de l'état 4 respiratoire par l'ajout de cyanure (15 μ M). Nous avons alors constaté que les relations entre le flux d'ATP et le flux d'oxygène, établies au sein de mitochondries énergisées par le FADH₂, en absence et en présence de cyanure, étaient parallèles et linéaires, comme c'est le cas en présence de NO. De plus, la relation obtenue en présence de cyanure est décalée vers la gauche (Figure RI-5C) démontrant que le cyanure, comme le NO, entraîne donc une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante de mitochondries incubées en présence de succinate (Figure RI-5D).

III.2.2. Effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante lors de l'énergisation par le complexe I

Au vu des résultats obtenus en présence de succinate, et bien que le NO n'induit pas d'inhibition significative de la respiration en présence de glutamate/malate (Tableau RI-1), nous avons tout de même réalisé les mesures de rendement en présence de NO ou de cyanure sur des mitochondries énergisées par le glutamate/malate. En effet, étant donné que la différence de rendement entre la situation contrôlée succinate et la situation NO a tendance à augmenter avec le niveau de sollicitation de la chaîne respiratoire, nous nous attendions à observer un effet en présence de GM pour les plus fortes concentrations en HK.

La titration de la respiration, par l'ajout de concentrations croissantes en hexokinase, ne révèle aucune différence entre la situation contrôlée et la condition en présence de NO (Figures RI-6A, RI-6B) ou de cyanure (Figures RI-6C, RI-6D). La relation entre le flux d'ATP et le flux d'oxygène de même que celle entre le rendement de l'oxydation phosphorylante (ATP/O) et le flux d'oxygène, sont superposées.

Cependant, contrairement aux mesures effectuées en présence de succinate, le NO n'induit pas de contrainte cinétique sur la chaîne respiratoire. En revanche, le cyanure impose une contrainte (Figure RI-6C) qui n'entraîne pas d'augmentation de rendement (Figure RI-6D).

Des résultats similaires ont été obtenus au sein de notre laboratoire, lors d'une étude menée sur des rats traités chroniquement à l'éthanol. En effet, suite à ce traitement, Piquet et coll. ont constaté une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante uniquement sur les

mitochondries énergisées en présence de succinate et non sur celles énérgisées avec le glutamate/malate (Piquet *et coll.* 2000).

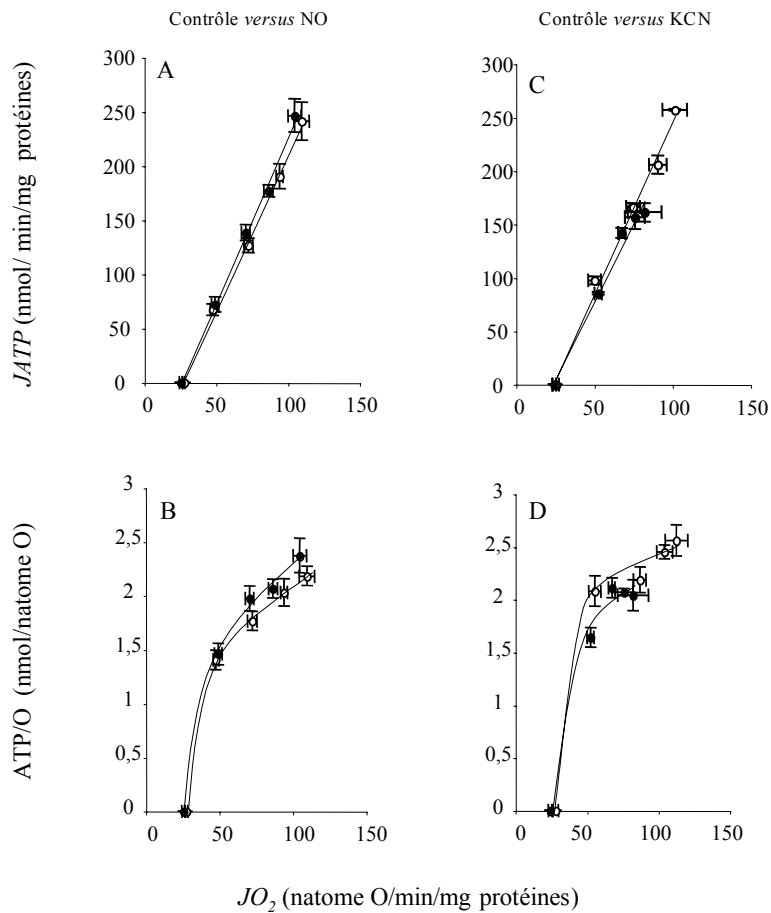


Figure RI-6: Effets du DPTA-NONOate et du cyanure sur le processus d'oxydation phosphorylante de mitochondries isolées de foie de rat en présence de glutamate plus malate.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, et supplémenté en Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1 %, glucose 20 mM, ATP-Tris 125 μM , MgCl_2 1 mM, glutamate-Tris 5 mM, malate-Tris 2,5 mM.

La mesure de la respiration par oxygraphie est démarrée par l'ajout des mitochondries et du MgCl_2 en absence de DPTA-NONOate (O), ou après 15 min de pré-incubation du milieu des respiration avec 10 μM de DPTA-NONOate (λ) (figures A et B), en absence (O) ou en présence de KCN 15 μM (λ) (figures C et D). La synthèse d'ATP et la respiration sont modulées par l'ajout de concentrations croissantes d'hexokinase (0 – 3 U). Le flux d'ATP est calculé à partir du flux de glucose-6-phosphate. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, $n = 10$ (A et B), $n = 3$ (C et D).

Nous constatons un effet du NO, comme du cyanure, uniquement lorsque les mitochondries sont énergisées par le FADH₂. Nous avons alors émis l'hypothèse que l'augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante par le NO et le cyanure soit dépendante du flux d'électrons dans la chaîne respiratoire.

III.2.3. Effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante lors d'un apport en NADH et FADH₂

Afin de vérifier l'hypothèse émise, nous avons mesuré le rendement de l'oxydation phosphorylante dans des conditions d'apport en substrats se rapprochant des conditions physiologiques, c'est-à-dire en fournissant simultanément du NADH et du FADH₂ à la chaîne respiratoire. Pour cela, les mitochondries sont énergisées par un mélange de glutamate (5 mM) malate (2,5 mM) et succinate (5 mM) qui génère un apport en équivalents réduits au niveau du complexe I et du complexe II.

Dans ces conditions, nous nous attendions à mesurer une respiration à l'état 4 qui soit intermédiaire entre la respiration mesurée en présence de succinate seul et de glutamate/malate. Or, nous avons constaté que la respiration à l'état 4 n'était que très faiblement inférieure à l'état 4 respiratoire mesuré en présence de succinate (46,16±0,5 *versus* 50,58±1,54 natome d'O/min/mg protéines). Ceci met en exergue une « priorité » au complexe II, lorsque les substrats des complexes I et II sont présents dans ces proportions.

En présence de glutamate/malate/succinate (GMS), nous observons, comme dans la condition succinate, une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante lorsque les mitochondries sont incubées en présence d'une concentration physiologique de NO (Figure RI-7). La différence de flux entre la condition succinate et la condition GMS étant très faible, nous n'avons pu conclure quant à l'implication du flux d'électrons au sein de la chaîne respiratoire, dans le contrôle de l'effet du NO ou du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante. Nous avons alors procédé à la mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante en supplémentant le glutamate/malate avec des concentrations croissantes de succinate, afin de modifier significativement le flux d'électrons au travers de la chaîne respiratoire. De cette manière, nous modifions l'apport en FADH₂ tout en gardant un apport en NADH constant.

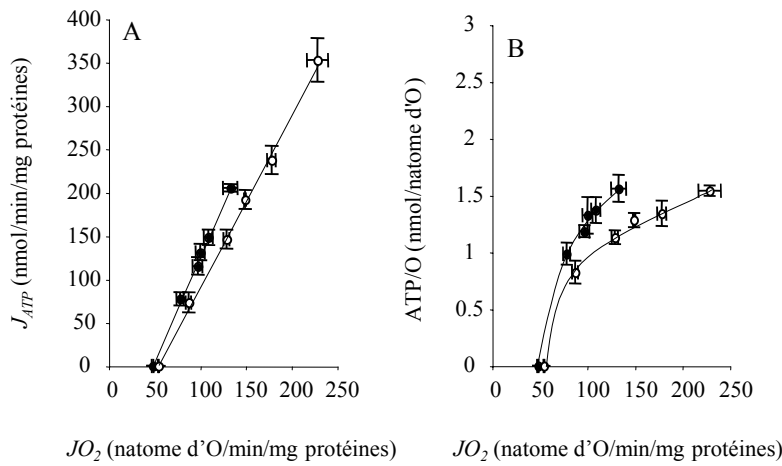


Figure RI-7: Effets du DPTA-NONOate sur le rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de succinate plus glutamate/malate.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, et supplémenté en Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1 %, glucose 20 mM, ATP-Tris 125 μM , MgCl_2 1 mM. La mesure de la respiration par oxygraphie en présence de succinate 5 mM, glutamate-Tris 5 mM, malate-Tris 2,5 mM, est démarrée par l'ajout des mitochondries et du MgCl_2 en absence de DPTA-NONOate (○), ou après 15 min de pré-incubation du milieu de respiration avec 10 μM de DPTA-NONOate(λ). La synthèse d'ATP et la respiration sont modulées par l'ajout de concentrations croissantes d'hexokinase (0 – 3 U). Le flux d'ATP est calculé à partir du flux de glucose-6-phosphate. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, n = 4.

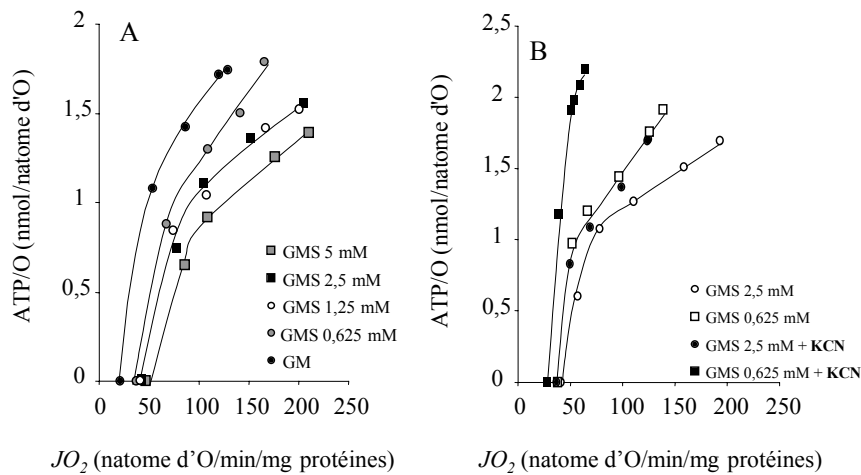


Figure RI-8 : Effets du succinate sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, et supplémenté en Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1 %, glucose 20 mM, ATP-Tris 125 μM , MgCl_2 1 mM. (A) : La respiration est mesurée par oxygraphie en présence de glutamate-Tris 5 mM plus malate-Tris 2,5 mM (●), plus succinate-Tris 0,625 mM (□), 1,25 mM (○), 2,5 mM (v), 5 mM (●). (B) : Les mitochondries sont incubées dans le milieu de respiration en présence de glutamate-Tris 2,5 mM plus malate-Tris 1,25 mM supplémenté avec du succinate-Tris 2,5 mM (○) plus KCN 15 μM (λ) ou 0,625 mM (□) plus KCN 15 μM (v). La synthèse d'ATP et la respiration sont modulées par l'ajout de concentrations croissantes d'hexokinase (0 – 3 U). Le flux d'ATP est calculé à partir du flux de glucose-6-phosphate. Une expérience représentative de trois mesures et représentée.

Comme nous pouvons l'observer sur la figure RI-8A, l'ajout de concentrations croissantes de succinate (0,625 mM à 5 mM) déplace la relation entre le rapport ATP/O et la consommation d'oxygène. Nous obtenons des relations intermédiaires entre celle obtenue en présence de GM seuls et celle établie en présence de succinate seul. Ainsi le rendement maximum de l'oxydation phosphorylante est progressivement diminué avec l'augmentation de la concentration en succinate.

Il est également intéressant d'observer que l'E4 augmente avec la concentration en succinate. Il semble donc que l'oxydation du FADH₂ dépende du rapport entre le NADH et le FADH₂ fournis.

L'effet du NO étant identique à l'effet du cyanure, nous avons alors choisi d'étudier uniquement l'effet de ce dernier sur le rendement de l'oxydation phosphorylante, en présence de deux concentrations intermédiaires de succinate : 0,625 mM et 2,5 mM.

La chaîne respiratoire est fournie en équivalents réduits, essentiellement par l'oxydation de glucides et la β-oxydation des acides gras. Le catabolisme d'une molécule de glucose génère 10 NADH et 2 FADH₂ et l'oxydation d'une molécule de palmitoyl-CoA libère 31 NADH pour 15 FADH₂. L'ajout de 2,5 mM de succinate correspond à un apport en NADH et FADH₂ proche de l'apport en équivalents réduits obtenu lors de l'oxydation des acides gras. Alors que la présence de 0,625 mM de succinate se rapproche plutôt des conditions rencontrées lors du catabolisme du glucose.

L'étude de la relation entre le rapport ATP/O et la consommation d'oxygène, en présence de GMS 0,625 mM et 2,5 mM supplémenté en cyanure, révèle un changement notable (Figure RI-8B). En effet, dans les deux conditions, l'ajout de cyanure décale la relation vers la gauche, suggérant donc une augmentation du rendement quelle que soit la concentration en succinate présente (Figure RI-8B).

Il semble donc que le flux d'électrons à travers de la chaîne respiratoire ne soit pas le paramètre contrôlant l'effet du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.

Toutefois, il nous a semblé important de confirmer ces résultats par l'utilisation de substrats physiologiques comme les acides gras, fournissant à la chaîne respiratoire 1/3 de FADH₂ et 2/3 de NADH. Nous avons utilisé le palmitoyl-carnitine.

La respiration à l'état 4 en présence de palmitoyl-carnitine (50 μM) est supérieure à la respiration obtenue en présence de glutamate/malate ($28,88 \pm 1,19$ versus $21,86 \pm 2,056$ natome d'O/min/mg protéines) mais n'en est pas significativement différente.

La mesure de la synthèse d'ATP et de la consommation d'oxygène, en présence de DPTA-NONOate ou de cyanure (Figures RI-9A, RI-9C), révèle un déplacement de la relation vers la gauche par rapport à la situation contrôle. Ceci indique une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante (Figures RI-9B, RI-9D).

Ces résultats, obtenus en présence d'un substrat physiologique, confirment que l'effet du NO (et du cyanure) sur le rendement de l'oxydation phosphorylante n'est pas lié au flux respiratoire à l'E4. De plus, ils apportent la preuve que le NO peut physiologiquement avoir un effet sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.

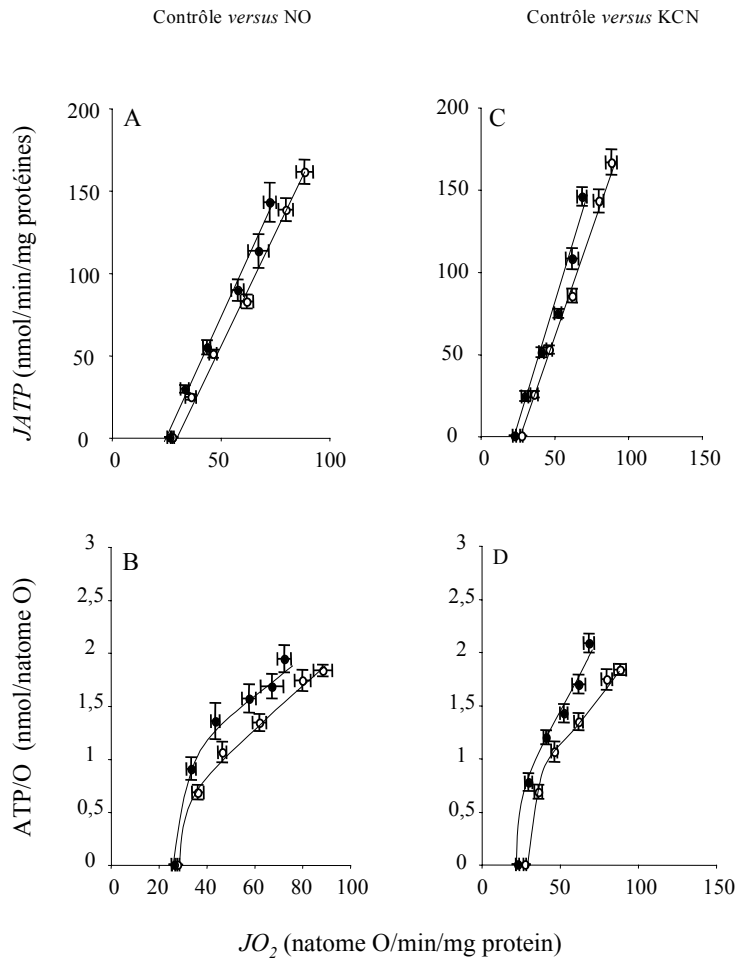


Figure RI-9 : Effets du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante de mitochondries isolées de foie de rats en présence de palmitoyl-carnitine.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, et supplémenté en Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1 %, glucose 20 mM, ATP-Tris 125 μM , MgCl_2 1 mM, palmitoyl-carnitine 50 μM .

La mesure de la respiration par oxygraphie est démarrée par l'ajout des mitochondries et du MgCl_2 en absence de DPTA-NONOate (O), ou après 15 min de pré-incubation du milieu de respiration avec 10 μM de DPTA-

NONOate(λ) (figures A et B), en absence (O) ou en présence de KCN 15 μ M (λ) (figures C et D). La synthèse d'ATP et la respiration sont modulées par l'ajout de concentrations croissantes d'hexokinase (0 – 3 U). Le flux d'ATP est calculé à partir du flux de glucose-6-phosphate. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, n = 7 (A et B), n = 7 (C et D).

Le NO présent à concentration physiologique (estimée à 1 μ M) induit une inhibition de la consommation d'oxygène ainsi qu'une inhibition de la synthèse d'ATP à la fois dans les mitochondries énergisées par le FADH₂ seul ou associé au NADH. Cependant, le rendement de l'oxydation phosphorylante est augmenté.

Nous pouvons suggérer que l'effet du NO est bien dû à une inhibition de la cytochrome c oxydase, puisque nous obtenons les mêmes effets en présence de cyanure.

Toutefois, le NO comme le cyanure, n'a aucun effet sur le rapport ATP/O au sein de mitochondries énergisées par le NADH seul.

De plus, l'effet du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante n'est pas contrôlé par le flux d'électrons .

Ainsi, une faible contrainte cinétique imposée à la cytochrome c oxydase engendre une diminution de son activité, qui est associée à une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante.

III.3. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice : « leak » ou « slipping » ?

Comme nous l'avons précédemment décrit, les modifications de rendement de l'oxydation phosphorylante peuvent être expliquées par deux phénomènes : le « leak » et le « slipping ». Nous nous sommes donc intéressé aux modifications induites par le NO et le cyanure sur le potentiel de membrane mitochondrial dans le but de discriminer ces deux processus.

III.3.1. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice à l'état non-phosphorylant

En 1974, Nicholls montrait que la relation existant entre la respiration et la force protonmotrice n'était pas linéaire lorsque la respiration était progressivement diminuée par l'ajout d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire (Nicholls 1974). Dans son étude, Nicholls a titré la respiration à l'E4 en présence de succinate par l'ajout de concentrations croissantes de malonate, inhibiteur de la succinate déshydrogénase compétitif du succinate.

Afin d'explorer la relation entre la respiration et la force protonmotrice des mitochondries isolées à l'état non-phosphorylant, nous avons dans un premier temps établi la courbe de Nicholls. La respiration à l'état non-phosphorylant en présence de succinate a donc été titrée par l'ajout de concentrations croissantes de malonate (Figure RI-10, □).

Comme cela est habituellement rapporté, la relation entre la respiration et la force protonmotrice est non linéaire et biphasique. Elle présente une phase ohmique pour de faibles niveaux de potentiel membranaire et une phase non-ohmique pour les plus fortes valeurs de potentiel membranaire. Il apparaît donc que la consommation d'oxygène n'est pas un paramètre proportionnel à la force protonmotrice.

Deux hypothèses, non mutuellement exclusives, permettent d'expliquer cette relation biphasique :

- soit **la stoechiométrie de la chaîne respiratoire est considérée comme étant constante**, alors **il existe un processus consommateur du gradient de protons, qui n'est pas dû à une synthèse d'ATP**, mais qui est un « **proton leak** ». Dans ce cas, la perméabilité de la membrane mitochondriale interne aux protons augmente de façon non-linéaire pour les hauts potentiels.
- soit **la conductivité de la membrane mitochondriale interne est considérée comme étant constante**, alors **c'est la stoechiométrie de la chaîne respiratoire qui change avec le potentiel de membrane**. Nous parlerons alors de « **redox slipping** ».

Afin de vérifier l'effet du NO et du cyanure sur cette relation, nous avons reproduit l'expérience en titrant la respiration à l'état non-phosphorylant par l'ajout de concentrations croissantes, non plus de malonate, mais de DPTA-NONOate ou de cyanure. Nous avons ainsi évalué les modifications de la relation entre la respiration et le potentiel de membrane, induites par la présence d'inhibiteur du complexe IV (Figure RI-10).

Les courbes obtenues en présence de DPTA-NONOate ou de cyanure sont superposables à la courbe obtenue en présence de malonate.

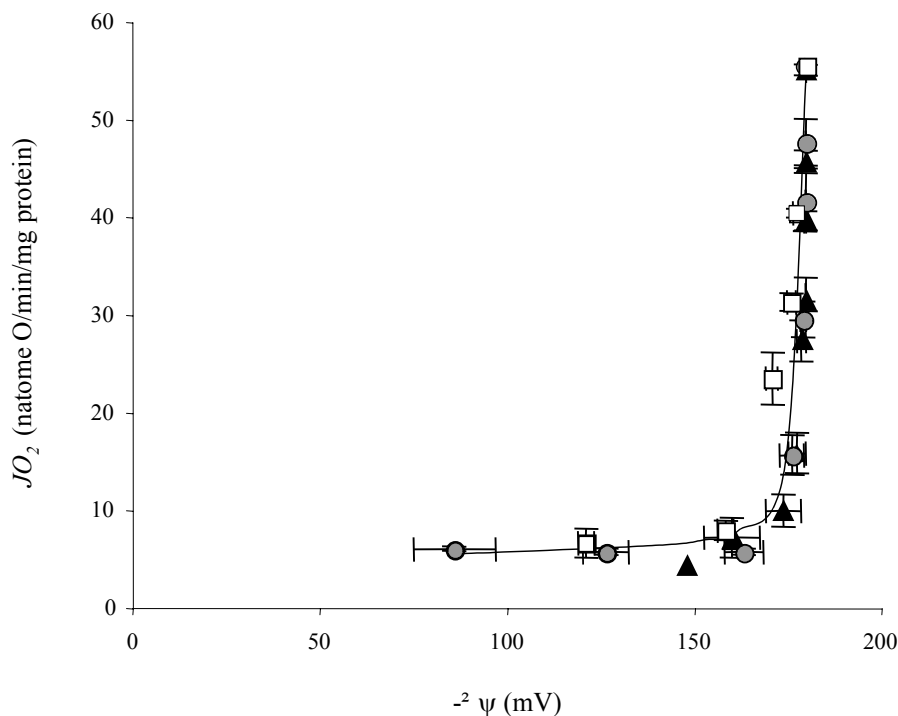


Figure RI-10 : Effets du DPTA-NONOate et du cyanure sur la relation entre la consommation d'oxygène (JO_2) et la force protonmotrice ($\Delta\psi$) sur mitochondries isolées.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration composé de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 7,2, et supplémenté en Pi-Tris 5 mM, BSA 0,1 %, oligomycine 1,25 $\mu\text{g/mg}$ de protéines, succinate-Tris 5 mM, malate-Tris 0,5 mM plus roténone 1,25 μM .

La respiration, mesurée par oxygraphie, est inhibée par l'ajout de malonate (\square : 0-20 mM), de cyanure (\circ : 0-500 μM) et de DPTA-NONOate (\triangle : 0-200 μM). Le potentiel de membrane est mesuré en parallèle dans le même milieu supplémenté avec de la rhodamine (0,2 μM). Les courbes sont le résultat de 3 expériences moyennées (\pm sem) dans chaque groupe.

L'ajout d'une faible concentration de donneur de NO (10 μM) ou de cyanure (15 μM), induit une diminution de la consommation d'oxygène de l'ordre de 20%, comme nous l'avons précédemment observé, mais qui n'induit pas de diminution du potentiel de membrane.

Nous nous proposons de représenter dans la figure RI-11, la relation entre la consommation d'oxygène et la force protonmotrice que nous devrions théoriquement obtenir dans une situation perméabilité membranaire aux protons accrue (par l'ajout de DNP par exemple).

Si nous émettons l'hypothèse que le NO comme le cyanure, diminue ce phénomène de « leak », la relation entre JO_2 et $\Delta\psi$ devrait donc être déplacée vers la droite. Nous constaterions alors une diminution de la respiration à l'état 4 accompagnée d'une augmentation de la force protonmotrice.

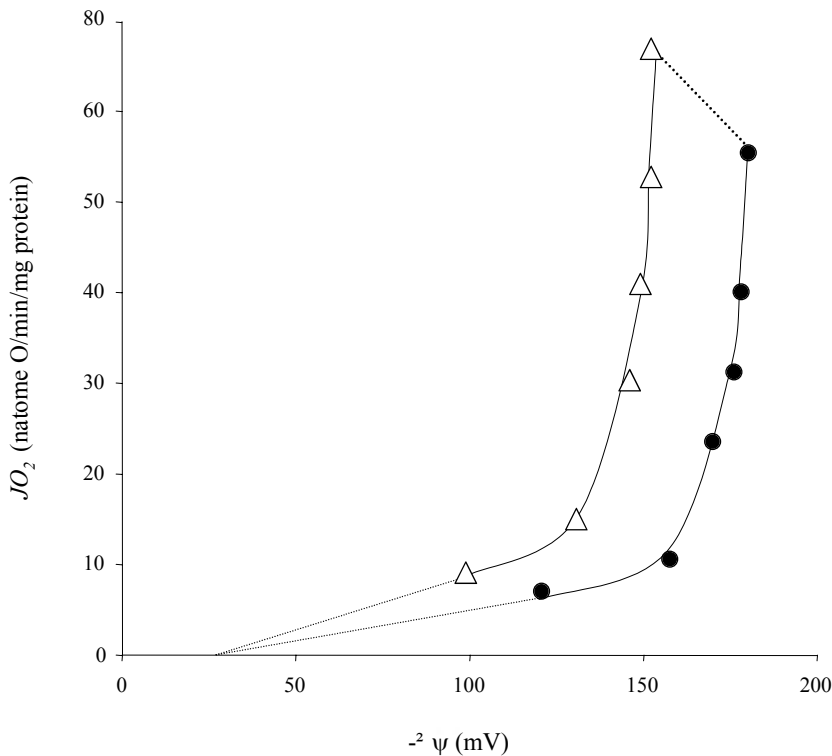


Figure RI-11 : Effets du « leak » sur la relation entre la consommation d'oxygène et la force protonmotrice.

Comparaison des courbes de Nicholls théoriques obtenues en situation contrôle avec titration de la concentration en malonate en présence de succinate (λ) et en présence de succinate plus une molécule augmentant la perméabilité membranaire aux protons, comme le DNP (Δ).

Or, nous remarquons que les courbes contrôles, NO et cyanure décrites dans la figure RI-10, sont parfaitement superposées. Le cyanure et le NO induisent donc une inhibition de la respiration sans modifier le potentiel membranaire mitochondrial.

Malgré l'inhibition de la respiration à l'état 4 d'environ 20%, par le DPTA-NONOate (10 μ M) ou le cyanure (15 μ M), le potentiel de membrane n'est pas affecté. De plus, en présence de ces mêmes concentrations en DPTA-NONOate et en cyanure, nous avons

mesuré une augmentation de rendement sur des mitochondries isolées énergisées par le succinate.

Nous avons précédemment décrit deux mécanismes connu pour modifier le rendement de l'oxydation : le « leak » et le « slipping ».

Afin de déterminer lequel de ces deux mécanismes est responsable de l'augmentation de rendement d'oxydation phosphorylante en présence d'inhibiteurs de la cytochrome c oxydase (NO et cyanure), nous avons comparé les effets d'un découplage aux effets d'un changement de stoechiométrie de la chaîne respiratoire.

III.3.2. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice à l'état-phosphorylant

III.3.2.1. Effets d'un changement de stoechiométrie et d'un découplage de la chaîne respiratoire sur la force protonmotrice

Afin de mieux comprendre l'effet du « leak » et du « slipping » sur la force protonmotrice et tenter d'établir une relation avec les effets du NO et du cyanure, il nous a paru intéressant d'étudier l'évolution du potentiel de membrane à l'état phosphorylant en présence de concentrations croissantes d'hexokinase. N'ayant pas la capacité par un procédé chimique de diminuer le « leak », nous avons, dans un premier temps, comparé les effets d'une molécule augmentant le « leak » (DNP) sur la respiration, la synthèse d'ATP et le potentiel de membrane, aux effets d'une molécule induisant un « slipping ». D'après la littérature, plusieurs molécules sont connues pour leur propriété de « slipping », notamment le chloroforme et la bupivacaïne (Chien *et coll.* 1996, Dabadie *et coll.* 1987, Luvisetto *et coll.* 1987, Pietrobon *et coll.* 1987, Terada 1990).

L'étude de l'effet de chacune de ces molécules sur la respiration, la synthèse d'ATP et la force protonmotrice n'a pas été concluante. Nous n'avons pu reproduire aucun des résultats de la littérature. Les concentrations de chloroforme nécessaires pour induire le « slipping » sont très élevées (10 - 30 mM) (Chien *et coll.* 1996). Nous ne pouvons assurer qu'à cette concentration, le chloroforme n'a pas un effet sur la fluidité membranaire et sur la perméabilité membranaire. Concernant la bupivacaïne, les effets obtenus n'ont pas été reproductibles d'une expérience à l'autre. Il apparaît que le pouvoir de « slipping » de la bupivacaïne soit dépendant du milieu de respiration et de la température. En effet, la bupivacaïne augmente le « slipping » dans un milieu composé de sucrose (25 mM) et maintenu à 30°C ; augmentation que nous n'avons pas mesurée dans nos conditions d'expérimentations (milieu KCl 125 mM, 37°C) C'est pourquoi, afin de pallier à l'impossibilité de modifier directement le « slipping », nous avons comparé les effets du

DNP aux effets d'une augmentation de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire observée en présence de glutamate/malate.

Le résultat de la comparaison des relations entre la synthèse d'ATP et la consommation d'oxygène, établies en présence de succinate plus DNP, de succinate seul et de GM, n'a pas été surprenant (Figure RI-12A). Comme attendu, nous avons mesuré une baisse du rapport ATP/O en présence de succinate plus DNP, et une augmentation du rendement d'oxydation phosphorylante en présence de GM, comparativement au rapport ATP/O obtenu en présence de succinate (Figure RI-12B).

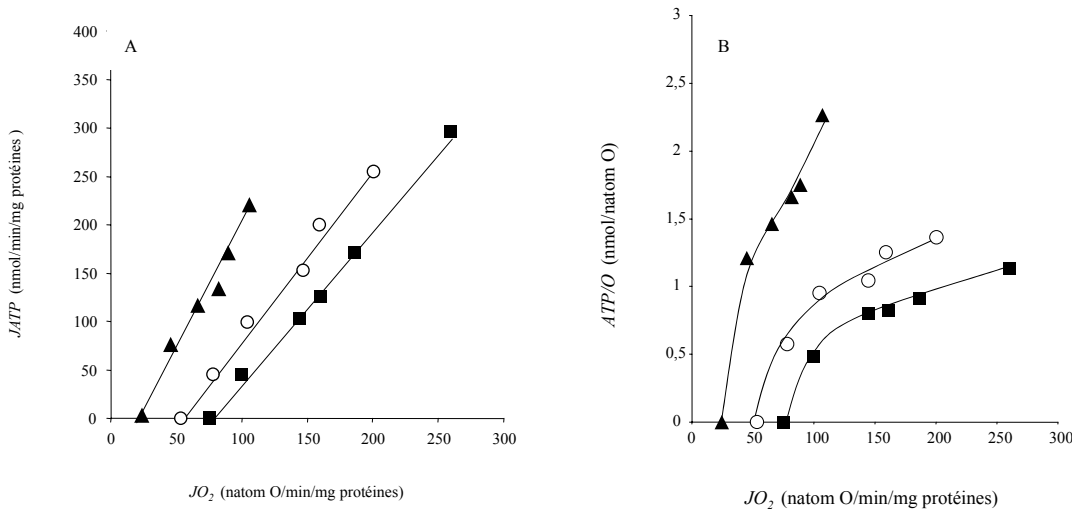


Figure RI-12 : Effets du changement de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire et de l'augmentation du « leak » sur le rendement de l'oxydation phosphorylante.

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration décrit dans la figure RI-5, additionné de glutamate-Tris 5 mM plus malate-Tris 2,5 mM (σ), ou de succinate-Tris 5 mM, malate-Tris 0,5 mM plus roténone $1,25 \mu\text{M}$ (\circ), ou de succinate-Tris 5 mM, malate-Tris 0,5 mM plus roténone $1,25 \mu\text{M}$ plus DNP $2,5 \mu\text{M}$ (ν). La respiration et la synthèse d'ATP sont modulées par l'ajout de concentrations croissantes d'hexokinase ($0 - 3 \text{ U.ml}^{-1}$). Le flux d'ATP est calculé à partir du flux de glucose-6-phosphate. La figure montre une expérience représentative effectuée en triplicate.

Cependant, il nous est impossible de discriminer les processus de « leak » et de « slipping » par ce résultat, puisque à la fois une diminution hypothétique du « leak » et une augmentation de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire induisent une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante.

Nous avons alors mesuré les effets du découplage et de l'augmentation de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire sur la force protonmotrice à l'état phosphorylant en présence de concentrations sous-saturantes en ADP.

Comme nous pouvons l'observer dans la figure RI-13, l'ajout de concentrations croissantes en hexokinase induit une augmentation de la consommation d'oxygène conjuguée à une diminution progressive du potentiel de membrane.

Comme précédemment, nous avons comparé les effets du DNP et du glutamate/malate à la situation standard représentée par le succinate seul.

L'ajout de 2,5 μM de DNP à la suspension mitochondriale induit une augmentation de 38% de la consommation d'oxygène à l'état 4, et une diminution de 5% de la force protonmotrice, par rapport à la condition standard succinate. Dans cette situation, la titration à l'hexokinase entraîne comme dans notre situation standard succinate, une diminution de la force protonmotrice accompagnée d'une augmentation de la respiration (Figure RI-13).

Il est important de noter que les relations entre la consommation d'oxygène et la force protonmotrice obtenues en condition standard succinate et supplémentée en DNP sont superposées, mais que la droite obtenue en présence de succinate plus DNP est décalée vers le haut au point d'origine (E4), en raison de l'augmentation de la consommation d'oxygène et de la baisse de la force protonmotrice à l'état 4.

En revanche, la relation entre le flux respiratoire et la force protonmotrice en présence de GM est totalement différente de la relation obtenue en présence de succinate. La consommation d'oxygène à l'état non-phosphorylant étant moindre en présence de GM et le potentiel étant identique à la condition contrôle, la relation est décalée vers le bas, et la différence entre ces relations augmente avec la concentration en HK. De plus, pour une consommation d'oxygène identique à la condition contrôle succinate, la force protonmotrice mesurée en présence de GM est inférieure à celle mesurée en présence de succinate, cette différence entre les deux conditions augmentant avec la consommation d'oxygène.

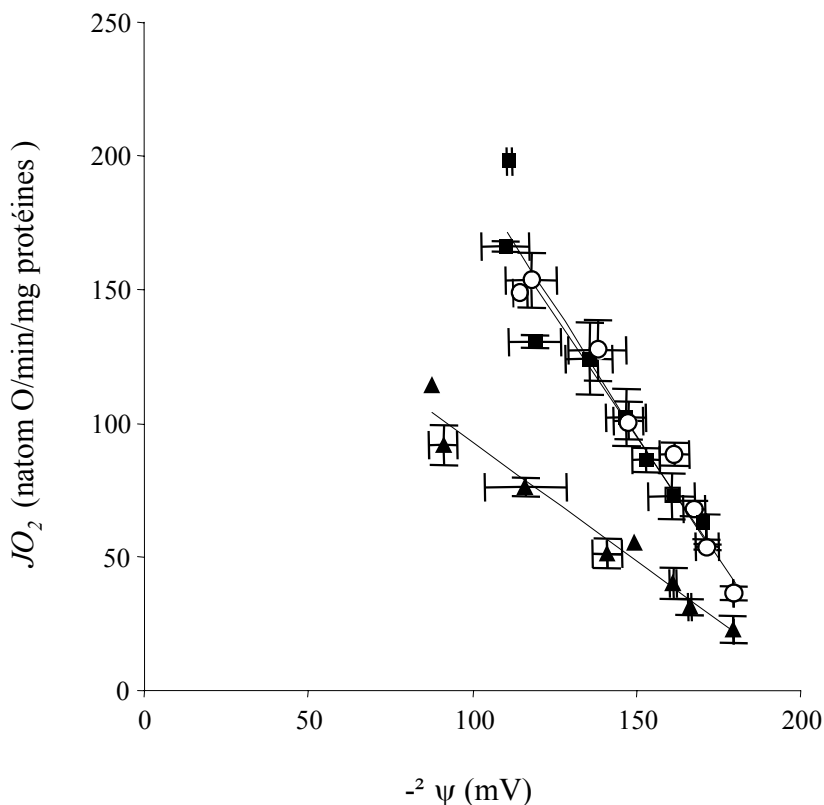


Figure RI-13 : Effets du changement de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire et de l'augmentation du « leak » sur la relation entre la consommation d'oxygène (J_{O_2}) et la force protonmotrice ($\Delta\psi$).

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration décrit dans la figure RI-9, supplémenté de $0,2 \mu\text{M}$ de rhodamine 123 pour la mesure du potentiel de membrane. Le milieu est additionné de glutamate-Tris 5 mM plus malate-Tris $2,5 \text{ mM}$ (σ), de succinate-Tris 5 mM plus malate-Tris $0,5 \text{ mM}$ plus roténone $1,25 \mu\text{M}$ (\circ), ou de succinate-Tris 5 mM plus malate-Tris $0,5 \text{ mM}$ plus roténone $1,25 \mu\text{M}$ plus DNP $2,5 \mu\text{M}$ (∇). La consommation d'oxygène et la force protonmotrice sont mesurées en parallèle en présence de concentrations croissantes d'hexokinase ($0 - 3\text{U}$). Les courbes sont le résultat d'au moins 3 expériences moyennées ($\pm \text{sem}$) dans chaque groupe.

III.3.2.2. Effets du NO et du cyanure sur la force protonmotrice

Nous avons réalisé la même expérience en présence des deux inhibiteurs de la cytochrome c oxydase, le NO et le cyanure, sur des mitochondries énergisées par le succinate. Comme le montre la figure RI-14, la relation entre la consommation d'oxygène et la force protonmotrice établie en présence de DPTA-NONOate est parfaitement identique à celle obtenue en présence de cyanure. De plus, elles présentent toutes deux la même allure que la relation obtenue en

présence de glutamate/malate présentée dans la figure RI-13. Elles sont donc totalement différentes de la relation établie à partir de mitochondries énergisées par le succinate. Par conséquent, le flux d'oxygène nécessaire au maintien d'une même force protonmotrice est moindre en présence de cyanure et de NO.

Nous proposons que l'augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante observée en présence de NO et de cyanure, soit due à une augmentation de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire résultant de la diminution du processus de « slipping »

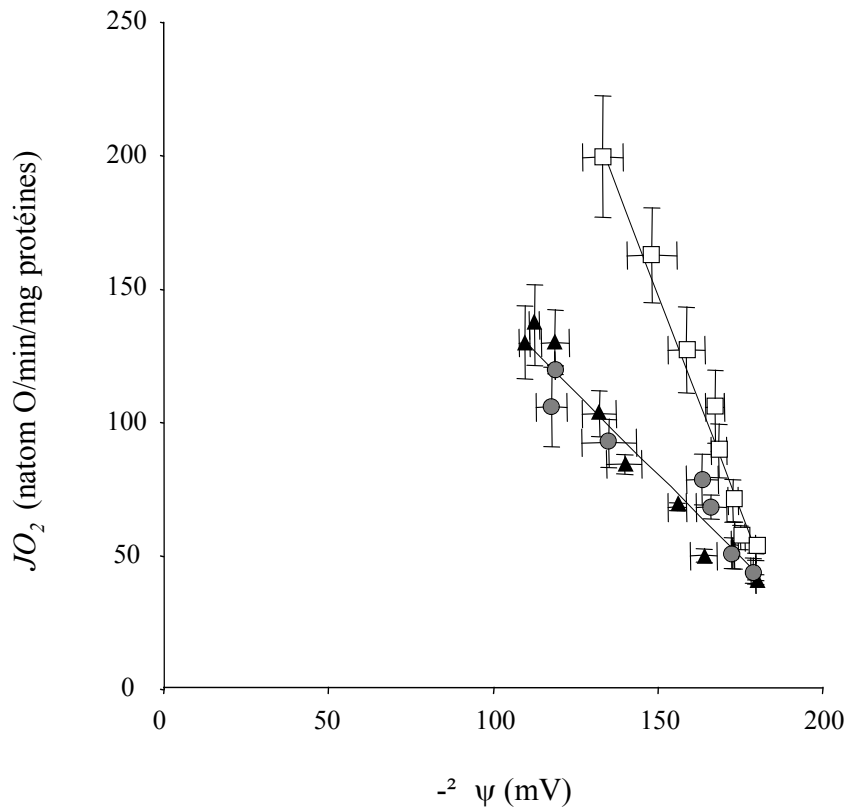


Figure RI-14 : Effets du changement de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire et de l'augmentation du « leak » sur la relation entre la consommation d'oxygène (JO_2) et la force protonmotrice ($\Delta\psi$).

Les mitochondries de foie de rat ($1,5 \text{ mg.ml}^{-1}$) sont incubées à 37°C dans le milieu de respiration décrit dans la figure RI-9, supplémenté de $0,2 \text{ }\mu\text{M}$ de rhodamine 123 pour la mesure du potentiel de membrane. Le milieu est additionné de succinate-Tris 5 mM plus malate-Tris $0,5 \text{ mM}$ plus roténone $1,25 \text{ }\mu\text{M}$ (□), en présence de KCN $15 \text{ }\mu\text{M}$ (●) ou de DPTA-NONOate $10 \text{ }\mu\text{M}$ pré-incubé pendant 15 min (▲). La consommation d'oxygène et la force protonmotrice sont mesurées en parallèle en présence de concentrations croissantes d'hexokinase ($0 - 3U$). Les courbes sont le résultat d'au moins 3 expériences moyennées ($\pm \text{sem}$) dans chaque groupe.

En présence de succinate et de NO ou de cyanure, comme en présence de glutamate/malate, la consommation d'oxygène nécessaire au maintien d'un même niveau de potentiel est moindre en comparaison de la condition standard succinate.

Nous pouvons donc suggérer que la contrainte cinétique imposée par le NO ou le cyanure sur la cytochrome c oxydase, induit une augmentation de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire en présence de FADH₂ avec ou sans NADH. Il apparaît ainsi que le cyanure et le NO inhibent le « slipping » de la cytochrome c oxydase.

Cependant, cette contrainte cinétique ne peut s'expliquer par une diminution du flux d'électrons au travers de la chaîne respiratoire, étant donné qu'en présence de palmitoyl-carnitine, le rendement de l'oxydation phosphorylante est augmenté par le NO et le cyanure, alors que la respiration à l'état non-phosphorylant est quasiment identique à celle obtenue en présence de glutamate/malate.

Nogueira et coll. ont montré dans des situations chroniques que le rendement de l'oxydation phosphorylante augmente avec la diminution du contenu en cytochrome aa₃ (Nogueira *et coll.* 2001). Le NO et le cyanure étant en aigu, ils ne peuvent induire de modification du contenu. En revanche, leurs effets pourraient être dépendants de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes de la chaîne respiratoire.

III.4. Etat d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire en fonction des substrats

L'étude de situations physio-pathologiques induisant une modification du rendement de l'oxydation phosphorylante, a révélée une relation inverse entre le rendement et le contenu en cytochromes aa₃ de la COX. De plus, nous savons que le NO et le cyanure inhibent le complexe IV en se liant à la COX, de façon compétitive avec l'oxygène pour son site de fixation.

D'après les résultats présentés, il apparaît que le NO et le cyanure ont un effet sur l'oxydation phosphorylante qui dépend de la nature des équivalents réduits oxydés au niveau des complexes de la chaîne respiratoire.

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'état d'oxydo-réduction des cytochromes de la chaîne respiratoire, et plus particulièrement des cytochromes aa₃, varie en fonction de la nature du substrat oxydé, et que cela contrôle l'effet du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante. En effet, contrairement aux études préalablement réalisées, nous utilisons le NO de façon aiguë, et il ne peut donc y avoir de modifications du contenu en cytochromes. C'est pourquoi nous avons mesuré l'état d'oxydo-réduction des cytochromes c+c₁, b et a+a₃, en fonction de l'apport en équivalents réduits.

Pour cela, nous avons établi les spectres d'absorbance des cytochromes en présence des différents substrats et les mêmes spectres en condition totalement oxydée par la présence de peroxyde d'hydrogène. La différence de densité optique entre le spectre obtenu en présence des substrats et le spectre des cytochromes totalement oxydés nous informe sur le contenu en cytochromes mitochondriaux réduits (Figure RI-15A).

Nous observons dans la figure RI-15, que le contenu en cytochromes c+c₁ réduits ne varie pas quel que soit le substrat utilisé. Il en est de même concernant le contenu en cytochromes b. En revanche, la quantité en cytochromes a + a₃ réduits est significativement différente entre la condition GM et les trois autres conditions étudiées : succinate, GMS, palmitoyl-carnitine. Le contenu en cytochromes a + a₃ réduits en présence de GMS, est significativement supérieur de 35 % à celui de la condition de GM ($65,83 \pm 4,46$ versus $43,06 \pm 8,45$ pmol/mg protéines, n = 4, p<0,05). De même, en présence de succinate ou de palmitoyl-carnitine, le contenu en cytochromes a + a₃ est significativement augmentée de 53 % et 42 %, par rapport à la condition GM (succinate $91,79 \pm 5,52$, n=7 versus GM $43,06 \pm 8,45$ pmol/mg protéines, n = 4 ; et palmitoyl $74,44 \pm 3,67$, n = 3 versus GM $43,06 \pm 8,45$ pmol/mg protéines, n = 4 ; p<0,0001).

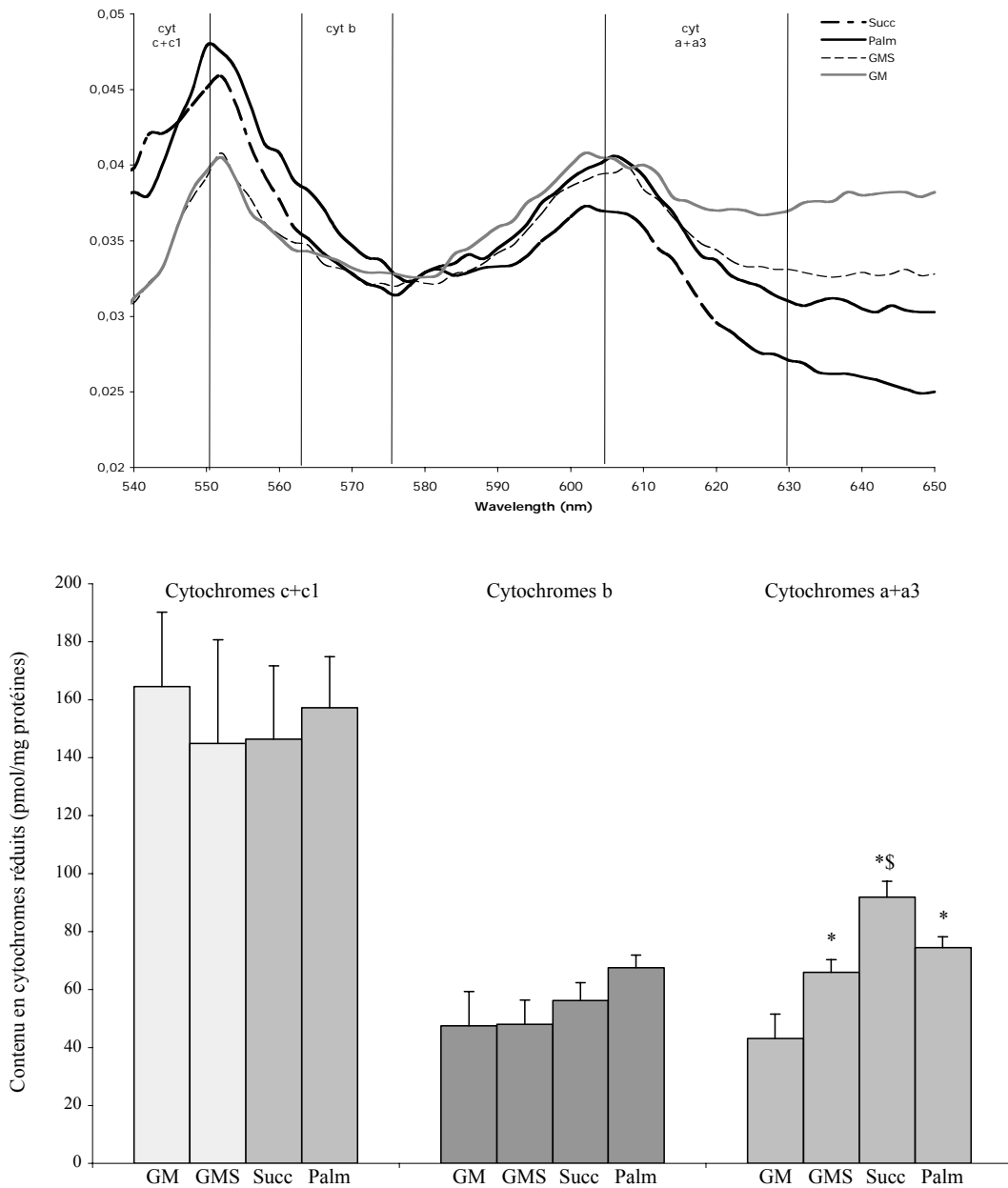


Figure RI-15 : Effets des substrats de la chaîne respiratoire sur l'état d'oxydo-réduction des cytochromes c+c1, b et a+a3.

Les mitochondries (5 mg.ml^{-1}) sont incubées dans le milieu de respiration précédemment décrit et supplémenté soit en succinate-Tris 5 mM , soit en glutamate-Tris 5 mM plus malate-Tris $2,5 \text{ mM}$, soit en succinate-Tris $2,5 \text{ mM}$ plus glutamate-Tris $2,5 \text{ mM}$ plus malate-Tris $1,25 \text{ mM}$, soit en palmitoyl-carnitine $50 \text{ }\mu\text{M}$. Le contenu en cytochromes réduits est déterminé par spectrophotométrie en mesurant la différence de densité optique entre les spectres obtenus en présence des substrats respiratoires et les spectres obtenus en condition totalement oxydée. La mesure de densité optique se fait entre 500 et 650 nm selon les cytochromes. Le coefficient d'extinction molaire étant de $24 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour le cytochrome aa3, et de $18 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ pour les cytochromes b et c+c1. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem ($n=7$ en succinate, $n = 4$ en GM et GMS, $n = 3$ en palmitoyl-carnitine). * différent de GM, \$ différent de GMS.

Nous avons ainsi mis en évidence que l'état d'oxydo-réduction de la cytochrome c oxydase était variable en fonction de la nature des substrats oxydés. En mettant en parallèle les résultats de l'étude des effets du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de différents substrats, avec les résultats concernant l'état d'oxydo-réduction des cytochromes, nous constatons que le NO et le cyanure n'ont un effet sur le rendement de l'oxydation phosphorylante qu'en présence d'équivalents réduits qui maintiennent un niveau de réduction élevé des cytochromes aa₃.

Nous avons alors émis trois hypothèses pouvant expliquer les effets du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante :

- (i) le cyanure et le NO induisent une modification de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa₃ de façon dépendante des substrats oxydés par le mitochondrie
- (ii) le cyanure et NO ont une affinité pour les cytochromes aa₃, qui dépend de leur état d'oxydo-réduction.
- (iii) le « slipping » de la cytochrome c oxydase varie avec l'état d'oxydo-réduction de ses cytochromes.

(i) Nous avons donc mesuré l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa₃ en présence des différents substrats et de cyanure. Bien que la littérature soit très importante sur l'effet du cyanure sur l'état d'oxydo-réduction des cytochromes de la chaîne respiratoire (Antonini *et coll.* 1971, Chance 1952, Hill *et coll.* 1983, Hollis *et coll.* 2003, Nicholls *et coll.* 1972, van Buuren *et coll.* 1972a, van Buuren *et coll.* 1972b), peu d'études ont été réalisées sur des mitochondries ou des cellules énergisées. Toutefois, Hollis et Moncada ont démontré sur cellules entières que l'ajout de 250 µM de cyanure ou de 5 µM de Diéthylèneamine NONOate (DEA-NO), avait un effet réducteur sur les cytochromes b, cc₁ et aa₃ (Hollis *et coll.* 2003).

Dans notre étude, nous avons utilisé 15 µM de cyanure, et il apparaît que cette faible concentration n'induit pas de changement d'état d'oxydo-réduction des cytochromes de mitochondries énergisées par les différents substrats (GM, GMS, Succinate, Palmitoyl-carnitine). Etant donné que les mesures sont réalisées avec 5 mg.ml⁻¹ de protéines mitochondriales, nous ne pouvons pas nous placer en cuve fermée pour ne pas induire une situation d'anoxie, connue pour réduire les cytochromes. Nous n'avons donc pas mesuré l'effet du NO sur l'état d'oxydo-réduction des cytochromes. Hollis met en évidence une réduction des cytochromes en présence de 5 µM DEA NO, cependant ce donneur utilisé à cette concentration induit une inhibition de 95 % de la consommation d'oxygène cellulaire (Hollis *et coll.* 2003). Donc il serait intéressant de vérifier l'effet du DPTA-NONOate qui a une concentration de 10 µM induit une inhibition de 20 % de la respiration mitochondriale à l'état non-phosphorylant.

(ii) Il est également possible que l'effet du NO et du cyanure sur la cytochrome c oxydase, soit dû à une sensibilité et/ou une affinité différente de l'enzyme pour ses inhibiteurs, qui dépende de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes.

En effet, Chance a été le premier en 1952, à mettre en évidence que la cytochrome c oxydase sous sa forme réduite était plus sensible au cyanure que la forme oxydée (Chance 1952). Or, dans notre étude, il ne semble pas y avoir de modification de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa_3 en présence de cyanure. Cela suggère aussi que la concentration de cyanure que nous avons utilisée n'induit pas de modification de l'état d'oxydo-réduction.

(iii) Enfin, il est possible que le « slipping » de la cytochrome c oxydase soit dépendant de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa_3 . Cela serait concordant avec le fait qu'en présence de NADH seul, le « slipping » soit limité par rapport au « slipping » mesuré en présence de $FADH_2$ avec ou sans NADH. D'après nos résultats, nous pouvons exclure la possibilité que le « slipping » soit régulé par l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa_3 . En effet, si tel était le cas, l'ajout de cyanure inhibant le « slipping », devrait induire une oxydation des cytochromes aa_3 , or nous n'avons mesuré aucune différence. Nous proposons alors que le « slipping » soit dépendant d'un seuil d'oxydo-réduction des cytochromes aa_3 à partir duquel le processus est mesurable, pour autant dans cette situation l'inhibition du « slipping » ne change pas l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa_3 .

Il semble y avoir une relation entre la nature des équivalents réduits oxydés au niveau de la chaîne respiratoire et l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa_3 .

Nous constatons que les cytochromes aa_3 sont plus réduits en présence de $FADH_2$ avec ou sans NADH et que le cyanure, utilisé à faible concentration, ne modifie pas l'état d'oxydo-réduction des cytochromes. Nous proposons que le « slipping » dépende de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa_3 .

IV. Discussion et Perspectives

IV.1. L'effet du NO et du cyanure sur le rendement de l'oxydation phosphorylante est contrôlé par l'état redox des cytochromes aa₃

Cette partie du travail avait pour but de redéfinir les effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante. En effet, si beaucoup d'études se sont intéressées à ce phénomène, outre le fait qu'elles aient été réalisées en présence d'ADP à concentrations saturantes, aucune d'entre elles n'a considéré le rapport entre le flux d'ATP et le flux d'oxygène, seul reflet du rendement de l'oxydation phosphorylante.

Grâce à ce système régénérant l'ADP, permettant ainsi de solliciter la chaîne respiratoire à des niveaux intermédiaires, plus proches des conditions physiologiques, nous avons pu mettre en évidence une augmentation importante du rendement de l'oxydation phosphorylante en présence de NO et de cyanure (Figures RI-5, 8) sur des mitochondries énergisées par du FADH₂ seul ou associé au NADH.

Nous avons bien sûr tenté de définir lequel des phénomènes de « leak » ou de « slipping » était impliqué dans cette augmentation d'efficacité.

Le processus que nous avons inhibé par le NO et le cyanure se traduit à l'état non-phosphorylant par une diminution de la respiration sans modifier la force protonmotrice (Figure RI-9). Une littérature importante fait état des effets des molécules augmentant le « leak » ou le « slipping ». Pietrobon et coll., ont d'ailleurs comparé les effets de l'acide oléique, du FCCP (p-trifluorométhoxycarbonylcyanide phénylhydrazone) et du chloroforme, sur la relation entre la consommation d'oxygène et la force protonmotrice (Pietrobon *et coll.* 1987). Ils ont ainsi mis en évidence que les molécules comme le chloroforme induisaient une augmentation de la partie non-ohmique. C'est-à-dire que la consommation d'oxygène est augmentée sans modifier, ou très peu, le potentiel de membrane. En revanche, en présence de FCCP ou d'acide oléique, la partie non-ohmique est également augmentée par rapport au contrôle, mais dans ce cas elle est plus inclinée et décalée vers la gauche à des niveaux de potentiel inférieurs. Ceci, montre bien que le FCCP et l'acide oléique augmentent la perméabilité membranaire en augmentant la consommation d'oxygène pour maintenir un potentiel membranaire qui est cependant toujours plus bas que celui pouvant être mesuré en situation contrôle.

D'après les résultats présentés dans la figure RI-9, il semblerait donc que le NO et le cyanure inhibent le « slipping », ce que nous avons d'ailleurs pu confirmer dans les figures RI-11 et RI-12 en comparant les effets sur le potentiel de membrane induits par une augmentation du

découplage et de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire aux effets induits par le NO et le cyanure.

Le deuxième résultat important et novateur de cette étude est la différence d'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa₃ en fonction des substrats utilisés pour énergiser les mitochondries. Les résultats, présentés sur l'étude du rendement de l'oxydation phosphorylante, ont révélé une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante induite par le NO et le cyanure, dépendante du substrat utilisé pour énergiser les mitochondries. Il apparaît que la présence de FADH₂ est nécessaire, soit seul, soit associé au NADH, pour observer l'effet du NO et du cyanure (Figures RI-5, 6, 7, 8).

Contrairement à la première hypothèse que nous avons émise, ce n'est pas le flux d'électrons traversant la chaîne respiratoire qui contrôle l'effet de nos deux inhibiteurs. En effet, le glutamate/malate et le palmitoyl-carnitine fournissent respectivement des équivalents réduits au complexe I et aux complexes I et II, et présentent un flux respiratoire à l'E4 non significativement différent. Pourtant l'effet du NO et du cyanure n'a pu être mis en évidence en présence de glutamate/malate.

En revanche, l'étude de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes a révélé que l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa₃ était différent selon le substrat utilisé.

En présence de GM, les cytochromes aa₃ sont beaucoup plus oxydés qu'en présence de succinate, de GMS ou encore de palmitoyl.

Nous savions déjà, que la quantité en cytochromes aa₃ jouait un grand rôle dans les adaptations de l'oxydation phosphorylante aux traitements chroniques. Nous pouvons à présent suggérer que leur état d'oxydo-réduction semble également être un régulateur important du rendement de l'oxydation phosphorylante.

Il nous faudrait maintenant, comprendre le mécanisme d'action du NO et du cyanure sur la régulation intrinsèque de la cytochrome c oxydase, sachant qu'elle représente un site privilégié de « slipping » (Azzone *et coll.* 1985, Fitton *et coll.* 1994, Luvisetto *et coll.* 1991, Papa *et coll.* 1991, Papa *et coll.* 1987, Sarti *et coll.* 1985, Wikstrom *et coll.* 1994). Les effets du NO et du cyanure, sur les cytochromes de la chaîne respiratoire, ont été étudiés ; cependant, les études ont été réalisées avec des concentrations très supérieures à celles que nous avons utilisé (100 fois supérieures). Le NO comme le cyanure présentent un effet réducteur très important à des concentrations de l'ordre du millimolaire, tandis que la concentration de 15 µM de cyanure n'a aucun effet sur l'état d'oxydo-réduction des cytochromes. Bien évidemment, il est indispensable que l'effet du NO sur l'état d'oxydo-réduction des cytochromes, en présence de différents substrats, soit étudié au même titre que l'effet du cyanure. Moncada *et coll.* ont développé un

système ingénieux de chambre comprenant une électrode à NO et une électrode à oxygène. La chambre de mesure est reliée à une source lumineuse et à spectrophotomètre permettant ainsi de suivre l'évolution de l'état d'oxydo-réduction des cytochromes de la chaîne respiratoire, tout en mesurant la consommation d'oxygène et la concentration en NO (Hollis *et coll.* 2003). Ce système est suffisamment sensible pour suivre des changements d'état rédox des cytochromes sur cellules entières. Il serait intéressant de pouvoir grâce à ce système, mesurer l'effet du cyanure et du NO en fonction des substrats sur mitochondries isolées et sur cellules, à l'état non phosphorylant (E4) et de surcroît à l'état phosphorylant (E3).

Cette étude ouvre de nombreuses perspectives quant à l'intérêt physiologique du NO. Il peut être un régulateur physiologique du rendement de l'oxydation phosphorylante de façon aiguë, dans des situations physio-pathologiques. De plus, la découverte d'une quatrième isoforme de NO synthase, la NO synthase mitochondriale, est un argument majeur. En effet, l'activation des NOS mitochondriales dans des situations de stress physiologiques, permettrait une libération rapide et un effet instantané du NO sur la chaîne respiratoire.

Une étude récente a mis en évidence sur le cœur de cobaye que l'inhibition de la eNO synthase induisait une augmentation de la consommation d'oxygène sans modifier la synthèse d'ATP. Dans ce cas, l'inhibition de la eNOS provoque une diminution du rapport ATP/O. De plus, la corrélation entre la consommation cardiaque d'oxygène et le travail cardiaque, révèle que dans la situation où la eNOS est inhibée la consommation d'oxygène nécessaire à maintenir un travail cardiaque identique à la situation contrôle est augmentée (Shen *et coll.* 2001). Ces résultats sont en accord avec notre travail, mettant ainsi en évidence une amélioration du couplage de l'oxydation phosphorylante en présence de NO.

IV.2. Effet du NO sur le métabolisme cellulaire hépatique – Résultats préliminaires

Il serait intéressant dans la continuité de ce travail, d'étudier les effets du NO sur le métabolisme cellulaire hépatique. Dans un travail préliminaire, nous avons étudié l'effet d'une titration au DPTA-NONOate sur le métabolisme hépatique.

Pour cela, nous avons utilisé le système de périfusion d'hépatocytes isolés. Ce système nous permet d'établir des états stationnaires métaboliques soit par la titration avec des concentrations sous-saturantes croissantes en substrat exogène, soit par la titration de concentrations croissantes de drogues ou d'inhibiteurs. Dans ce travail préliminaire, nous nous avons utilisé une

concentration saturante en substrats (5 mM) et nous avons réalisé une titration de la concentration en DPTA-NONOate.

Nous avons étudié la régulation de la néoglucogenèse et de la glycolyse à partir de Dihydroxyacétone (Bradham *et coll.* 1998) contrôlé par le potentiel phosphate, et de Glycérol contrôlé à la fois par le potentiel phosphate et le potentiel rédox (Figure RI-15).

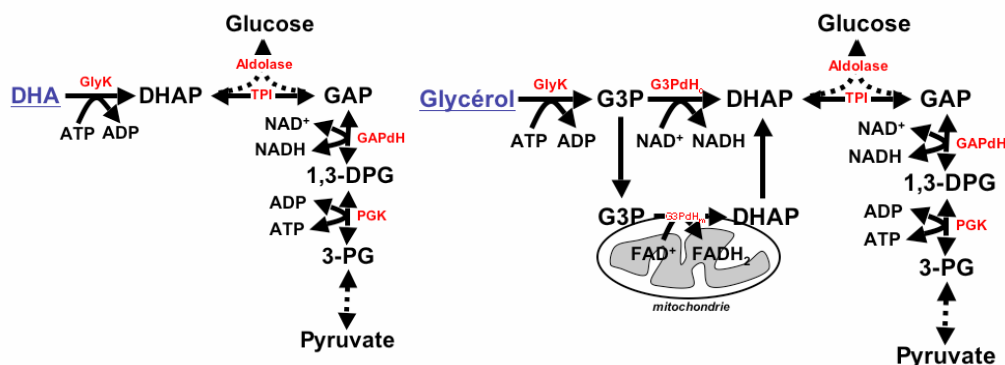


Figure RI-16 : Schéma récapitulatif du métabolisme du DHA et du glycérol.

La DHA est un substrat non physiologique qui est très intéressant pour l'étude de la régulation du métabolisme hépatique, car ses carbones empruntent la voie de la néoglucogenèse et de la glycolyse en fonction de l'état énergétique cellulaire (Leverve *et coll.* 1994).

Deux enzymes ont été caractérisées comme étant impliquées dans la phosphorylation du DHA en DHAP : la glycéról kinase (Gly K) et la triokinase. Cependant il est admis que la réaction est plutôt catalysée par la GlyK. Cette enzyme ne subit pas de rétrocontrôle négatif par l'accumulation de son produit le DHAP. Le contrôle du métabolisme du DHA est principalement exercé au niveau d'étapes dépendantes de l'état énergétique cellulaire, c'est-à-dire du rapport ATP/ADP cytosolique. Ces étapes correspondent à la phosphorylation du substrat par la GlyK, à la réaction catalysée par la 3-phosphoglycérate kinase (PKG) et par la pyruvate kinase (PK).

Le glycérol entre dans la voie de la glycolyse/néoglucogenèse au même niveau que le DHA mais son métabolisme diffère d'une étape supplémentaire qui contrôle l'oxydation du G3P en DHAP par l'isoforme cytosolique de la glycéról-3-phosphate déshydrogénase (G3PdH) et nécessite la présence de NAD^+ comme cofacteur.

Le contrôle de la néoglucogenèse à partir du glycérol est majoritairement exercé par l'étape catalysée par la G3PdH dépendante du potentiel rédox cytosolique, évalué par le rapport $NADH/NAD^+$. En effet, le flux à travers la GlyK n'est limité que par des diminutions importantes du rapport ATP/ADP cytosolique. En présence de glycérol, la réoxydation des équivalents réduits s'effectue majoritairement par l'intermédiaire de la navette G3P/DHAP, qui est étroitement liée à la chaîne respiratoire par l'isoforme mitochondriale de la G3PdH.

La figure RI-16 montre que lorsqu'on augmente les concentrations en DPTA-NONOate de 50 nM à 50 μ M, en présence de DHA à concentration saturante, le métabolisme du DHA qui est exprimé en équivalents 3 carbones ($J_{DHA} = 2 \times J_{\text{glucose}} + J_{\text{Lactate+Pyruvate}}$) diminue significativement à partir de 250 nM. En revanche, le métabolisme du glycérol n'est pas modifié même pour les plus fortes concentrations en DPTA-NONOate.

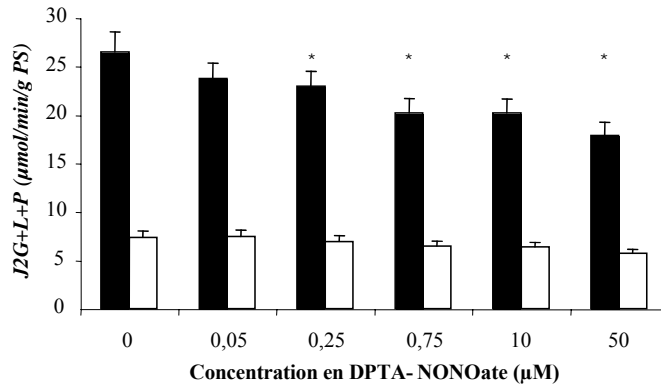


Figure RI-17: Effets du DPTA-NONOate sur le métabolisme du DHA et du Glycérol.

Les hépatocytes (200 mg de poids sec dans 15 ml), isolés à partir de rats Wistar mâles à jeun 24h, sont périfusés à 37°C dans du Krebs-Bicarbonate-Calcium saturé en carbogène (95 % O₂ – 5 % CO₂) à un débit de 5 ml/min. Après une période de stabilisation de 45 min, le DHA (\blacktriangledown) et le glycérol (\square) sont perfusés à 5 mM dans les chambres, et le DPTA-NONOate est perfusé à concentrations croissantes (0,05 ; 0,25 ; 0,75 ; 10 et 50 μ M). A chaque état stationnaire, le métabolisme du DHA et du glycérol (J2G+L+P) est quantifié à partir des concentrations de glucose, de lactate et de pyruvate mesurées dans le périfusat récolté à la sortie de chacune des chambres. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem sur 6 expérimentations. * différent du contrôle sans DPTA-NONOate, p<0,05.

Le métabolisme de chacun de ces substrats est le reflet des modifications induites sur la voie de la glycolyse et néoglucogenèse, évaluée par la mesure respective de J_{glucose} et de J_{L+P} . Il apparaît que le NO induit une diminution significative de la néoglucogenèse uniquement en présence de DHA (Figure RI-17A). Aucune différence n'est mesurée au sein de la voie glycolytique (J_{L+P}), que ce soit en condition DHA ou glycérol (Figure RI-17B).

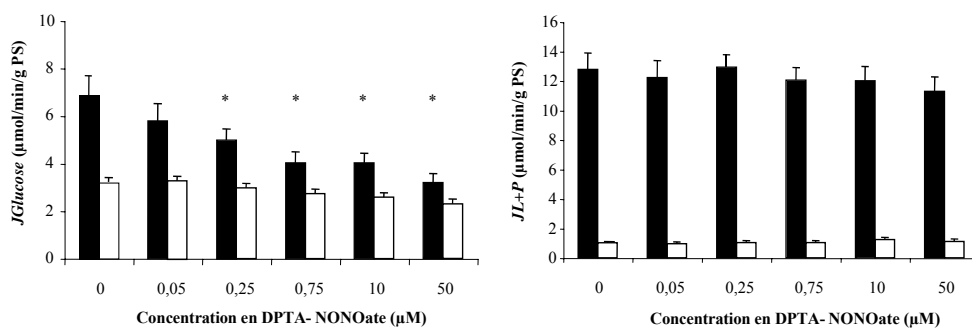
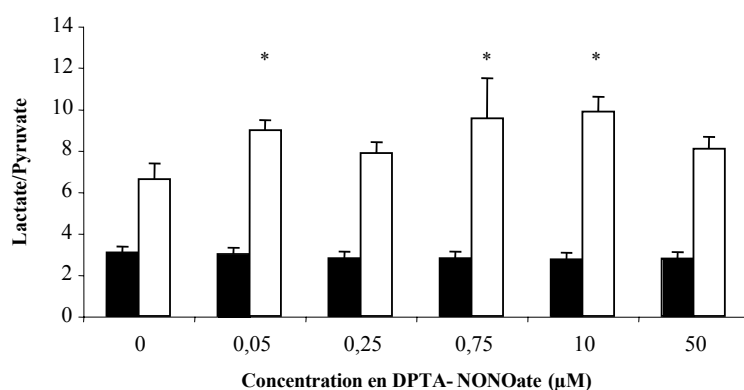


Figure RI-18 : Effets du DPTA-NONOate sur la glycolyse et la néoglucogénèse.

Les hépatocytes (200 mg de poids sec dans 15 ml) sont perfusés dans les conditions décrites dans la figure RII-2, en présence de DHA 5 mM (∇) ou de glycérol 5 mM (\square), le DPTA-NONOate est perfusé à concentrations croissantes (0,05 ; 0,25 ; 0,75 ; 10 et 50 μ M). A chaque état stationnaire les flux néoglucogénique ($J_{Glucose} - A$), et glycolitique ($J_{L+P} - B$) sont quantifiés à partir des concentrations de glucose, de lactate et de pyruvate mesurées dans le perfusât récolté à la sortie de chacune des chambres. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem sur 6 expérimentations. * différent du contrôle sans DPTA-NONOate, $p < 0,05$.

Nous avons également évalué l'effet du NO sur le potentiel redox cytosolique par la mesure du rapport lactate/pyruvate. Le potentiel redox ne varie qu'en présence de glycérol. Nous constatons une augmentation de ce potentiel qui est significative en présence de 0,05 μ M, 0,75 et 10 μ M de DPTA-NONOate.

Il serait intéressant de mesurer le rapport β -hydroxybutyrate/acétoacétate, reflet du potentiel redox mitochondrial.

**Figure RI-19 : Effets du DPTA-NONOate sur le potentiel rédox cytosolique.**

Les hépatocytes (200 mg de poids sec dans 15 ml) sont perfusés dans les conditions décrites dans la figure RII-2, en présence de DHA 5 mM (∇) ou de glycérol 5 mM (\square), le DPTA-NONOate est perfusé à concentrations croissantes (0,05 ; 0,25 ; 0,75 ; 10 et 50 μ M). A chaque état stationnaire, le potentiel rédox cytosolique (L/P) est quantifié à partir des concentrations de lactate et de pyruvate mesurées dans le perfusât récolté à la sortie de chacune des chambres. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem sur 6 expérimentations. * différent du contrôle sans DPTA-NONOate, $p < 0,05$.

Nous avons cependant des premiers résultats concernant le potentiel phosphate (ATP/ADP) cytosolique et mitochondrial. Aucune différence significative du potentiel phosphate cytosolique en présence de DHA ou de glycérol n'est relevée (Figure RI-19A). Cependant il y aurait une tendance, à confirmer en augmentant le nombre d'échantillons, d'une diminution du potentiel phosphate mitochondrial en DHA et en glycérol (Figure RI-19B).

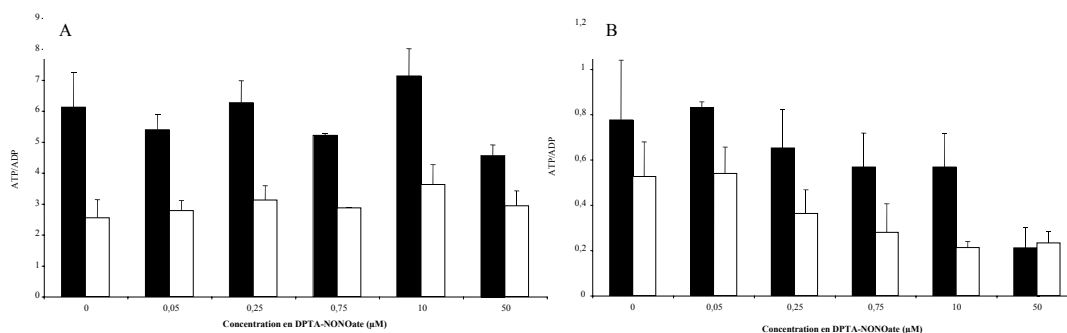
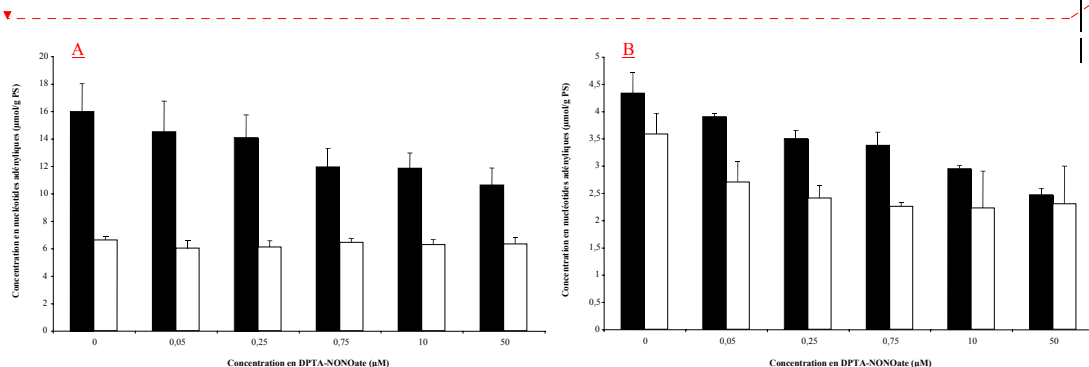


Figure RI- 20 : Effets du DPTA-NONOate sur le rapport ATP/ADP cytosolique (A) et mitochondrial (B).

Les hépatocytes (200 mg de poids sec dans 15 ml) sont périfusés dans les conditions décrites dans la figure RII-2, en présence de DHA 5 mM (v) ou de glycérol 5 mM (□), le DPTA-NONOate est perfusé à concentrations croissantes (0,05 ; 0,25 ; 0,75 ; 10 et 50 μM). A chaque état stationnaire, les concentrations en nucléotides adényliques sont mesurées dans le compartiment cytosolique et mitochondrial après fractionnement à travers une couche d’huile par la technique de la digitonine. Les résultats représentent la moyenne de 2 expérimentations.

La diminution du potentiel phosphate qui semble apparaître en présence de concentrations en DPTA-NONOate élevées, est sans doute due à la baisse de la concentrations en nucléotides adényliques qui se profile dans la figure RI-20.



Supprimé : ¶

Figure RI- 21 : Effets du DPTA-NONOate sur la somme des nucléotides adényliques cytosoliques (A) et mitochondriaux (B).

Les hépatocytes (200 mg de poids sec dans 15 ml) sont périfusés dans les conditions décrites dans la figure RII-2, en présence de DHA 5 mM (v) ou de glycérol 5 mM (□), le DPTA-NONOate est perfusé à concentrations croissantes (0,05 ; 0,25 ; 0,75 ; 10 et 50 μM). A chaque état stationnaire, les concentrations en nucléotides adényliques sont mesurées dans le compartiment cytosolique et mitochondrial après fractionnement à travers une couche d’huile par la technique de la digitonine. Les résultats représentent la moyenne de 2 expérimentations.

Ces résultats nous ont principalement servi à déterminer les effets d’une gamme de concentration de NO sur le métabolisme hépatique.

Comme nous venons de l’observer, la concentration en DPTA-NONOate utilisée dans notre étude sur mitochondries isolées induit également des changements dans le métabolisme hépatique, en présence de DHA et de glycérol à concentration saturante. Il serait donc

intéressant, à cette concentration de 10 μM , d'étudier la régulation des voies métaboliques et la consommation d'oxygène, en présence de concentrations sous-saturantes en substrats. Ainsi, les relations entre la concentration en substrat administré ou les concentrations intracellulaires des intermédiaires des voies métaboliques, et le flux résultant à travers ces mêmes voies, nous informeront sur l'étape ou les étapes modifiées dans les différentes conditions. Ils seraient également intéressant d'évaluer l'effet du NO sur le métabolisme cellulaire en présence de différents substrats, dont les acides gras.

En fonction des résultats obtenus, il serait envisageable d'utiliser ce système pour étudier le phénomène d'ischémie hépatique. Les études sur l'ischémie cardiaque sont très nombreuses, et mettent en évidence un effet protecteur du NO des dommages causés par l'ischémie (Wang *et coll.* 2005, Yeh *et coll.* 2004), mais une littérature très récente met en évidence les mêmes effets du NO, dans des situations d'ischémies hépatiques rencontrées notamment lors de transplantations (Hines *et coll.* 2005, Kim *et coll.* 2004, Kobayashi *et coll.* 1995).

Il se pourrait que le NO régule le métabolisme hépatique de telle façon à protéger le foie d'un déficit énergétique trop important pouvant conduire à la mort cellulaire.

Dans cette première étude, nous avons démontré une inhibition de la respiration et de la synthèse d'ATP suite au traitement par le NO, qui se traduit cependant par une augmentation du rendement de l'oxydation phosphorylante.

L'étude du rendement de l'oxydation phosphorylante, en présence de NO et de cyanure, a révélé des effets différents selon la nature des équivalents réduits fournis aux mitochondries isolées, puisqu'en présence de NADH le rendement n'est pas modifié.

L'étude du potentiel de membrane mitochondrial nous a permis de conclure que l'augmentation du rendement était due à une diminution du « slipping » et non pas du « leak ».

De plus, nous pouvons affirmer que l'effet du NO et du cyanure, sur le rendement de l'oxydation phosphorylante, n'est pas dépendant du flux d'électrons passant au travers de la chaîne respiratoire, puisque le glutamate/malate ou le palmitoyl-carnitine, qui génèrent un état 4 respiratoire quasiment identique, présentent des effets différents sur le rapport ATP/O.

Il apparaît également que l'oxydation des équivalents réduits, confère aux cytochromes aa₃ un état d'oxydo-réduction différent ; le NADH maintenant un état d'oxydation plus élevé.

Aux vues de ces résultats, nous proposons que le processus d'oxydation phosphorylante soit finement contrôlé par l'état d'oxydo-réduction des cytochromes aa₃.

Le NO, qui est une molécule physiologique, a la capacité, à concentration physiologique, d'augmenter le rendement de l'oxydation phosphorylante. Il pourrait donc, de façon aiguë, participer à la régulation de l'oxydation phosphorylante.

**REGULATION DU PTP PAR
L'INHIBITION DES COMPLEXES
I ET II DE LA CHAINE
RESPIRATOIRE**

I. Problématique

Le rôle du NO dans la régulation du processus apoptotique, lié ou non au pore de transition de perméabilité (PTP), n'est pas très bien défini. En effet, une littérature importante sur le sujet, révèle des effets anti-apoptotiques comme pro-apoptotiques, dépendants d'une part du type de donneur de NO utilisé (nitrosothiols ou donneur de NO « pur ») et d'autre part du type cellulaire d'intérêt (se référer au Tableau I-5 « Introduction »). Nous avons donc tenté de déterminer les effets du DPTA-NONOate sur une lignée de lymphomes humains, la lignée U937.

Par ailleurs, nous savons que le NO inhibe la chaîne respiratoire au niveau du complexe IV de façon réversible, mais aussi au niveau du complexe I de façon irréversible. Or, des travaux menés au sein de notre laboratoire ont montré que l'inhibition du flux à travers le complexe I de la chaîne respiratoire par des inhibiteurs comme la roténone ou encore la metformine, (Chauvin *et coll.* 2001, Detaille *et coll.* 2005, Guigas *et coll.* 2004) pouvait moduler la probabilité d'ouverture du PTP par le flux d'électrons passant à travers le complexe I.

Nous avons donc émis l'hypothèse, que le NO diminuerait la probabilité d'ouverture du PTP et donc pourrait prévenir du processus apoptotique.

II. Résultats – Discussion

II.1. Effet du NO sur la mort cellulaire

Afin de déterminer une concentration en DPTA-NONOate qui inhibe le complexe I, nous avons réalisé une titration de la respiration cellulaire en présence de glutamate/malate (Bergmeyer). Pour cela, des cellules issues d'une lignée de lymphome humain (U937) ont été incubées en présence de différentes concentrations en DPTA-NONOate (0 - 500 μ M) pendant 4h (à 37°C), les effets du NO sur le complexe I étant dépendants de la concentration et du temps d'incubation.

Nous avons ainsi sélectionné une concentration de 100 μ M de DPTA-NONOate inhibant d'environ 30 % la respiration à l'E3 en présence de GM ($0,73 \pm 0,13$ *versus* $0,49 \pm 0,05$ natome d'O/min/million de cellules) (Figure RII-4).

Parallèlement à la mesure d'oxygraphie, nous avons évalué l'effet de cette même titration sur la mort cellulaire. Les cellules U937 ont alors été pré-incubées 4 h en présence des différentes concentrations en DPTA-NONOate, puis la mortalité cellulaire a été estimée par un test d'exclusion du bleu trypan, 12 h et 24 h après le traitement avec le donneur de NO.

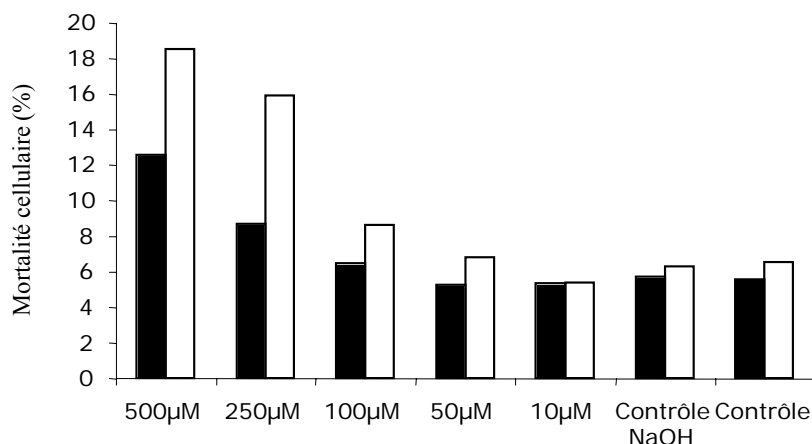


Figure RII-1 : Conséquence d'un traitement au DPTA-NONOate sur la mort cellulaire.

Les cellules U937 sont placées en culture dans le milieu de culture RPMI en présence ou non de DPTA-NONOate à différentes concentrations, ou en présence de NaOH qui est utilisé pour mettre en solution le DPTA-NONOate. Les cellules sont incubées 4 h à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et incubées à 37° pendant 12 h (barre noire) et 24 h (barre blanche), dans le milieu RPMI. Le pourcentage de mortalité cellulaire a été évalué par le test d'exclusion du bleu trypan. Les résultats sont la représentation d'une expérience représentative.

Dans la figure RII-1, nous constatons que la mortalité cellulaire augmente avec la concentration en DPTA-NONOate. La dose de 100 μM, retenue pour son effet inhibiteur sur le complexe I, présente un effet pro-apoptotique. Ce résultat, par ailleurs confirmé par un marquage à l'iodure de propidium (Figure RII-2) va à l'encontre de notre objectif initial qui était de déterminer si l'inhibition du complexe I par le NO contribuait à inhiber l'ouverture du pore et donc à protéger de la mort cellulaire.

Nous avons ensuite mesuré la capacité de rétention calcique (CRC) sur ces cellules perméabilisées, et incubées en présence de glutamate/malate. L'incubation de cellules pendant 4 h en présence de 100 μM de DPTA-NONOate active l'ouverture du PTP (Figure RII-3). De fait, la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore est inférieure à celle requise pour la condition contrôle (respectivement 35 nmol de Ca^{2+} /million cellules et 25 nmol Ca^{2+} /million de cellules).



Figure RII- 2 : Effets du DPTA-NONOate sur la mort cellulaire des cellules U937.

Les cellules U937 sont incubées pendant 4h à 37°C dans du milieu de culture RPMI en présence ou non de 100 µM de DPTA-NONOate. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS et incubées dans du milieu de culture RPMI complet pendant 12 heures à 37°C. Au terme de cette incubation, la mort cellulaire est évaluée grâce à un marquage fluorescent avec 20 µg.ml⁻¹ d'iodure de propidium. Les cellules sont observées en contraste de phase et en lumière fluorescente ($\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 550 \text{ nm}$). Les images sont obtenues avec une caméra couplée à un microscope inversé (grossissement 20 x).

Nous avons alors mesuré la CRC des cellules perméabilisées, énergisées par le succinate. Dans cette situation, nous avons également mesuré une activation de l'ouverture du PTP en présence de 100 µM de DPTA-NONOate (35 nmol Ca²⁺/million cellules *versus* 30 nmol Ca²⁺/million cellules) (Figure RII-3).

Comme attendu, l'utilisation de la ciclosporine (CsA) ou de la roténone, deux inhibiteurs puissants du pore, conduit à une augmentation de la CRC par rapport à la condition succinate seul (35 nmol Ca²⁺/million cellules *versus* 70 nmol Ca²⁺/million cellules en présence de CsA) (Figure RII-3). Cette inhibition est largement atténuée, voire totalement inversée par le DPTA-NONOate (70 nmol Ca²⁺/million cellules *versus* 40 nmol Ca²⁺/million cellules). Ainsi, la CRC mesurée en présence de CsA et de NO est presque équivalente à la CRC mesurée en présence de succinate seul.

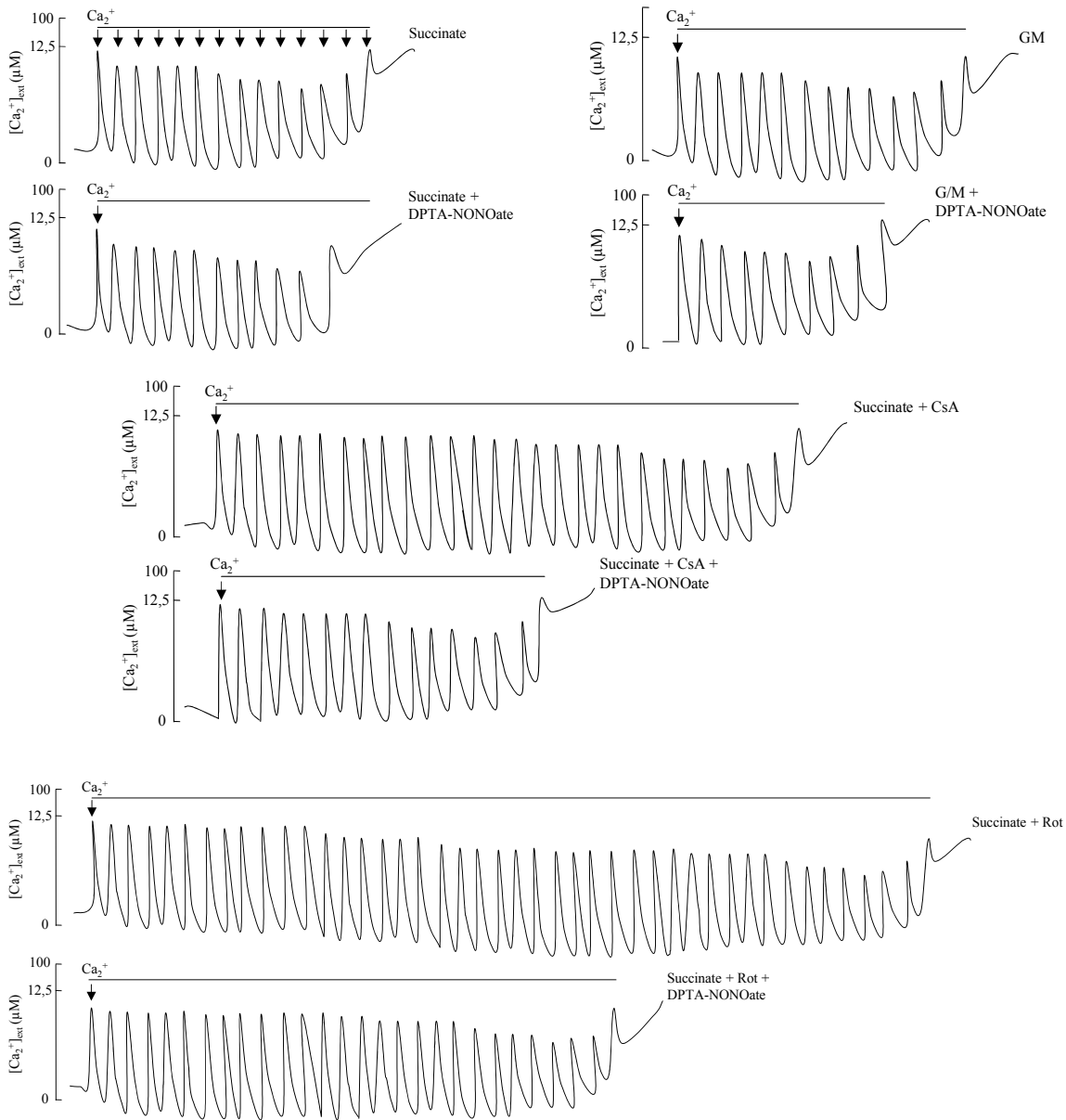


Figure RII- 3 : Effet d'un traitement au DPTA-NONOate sur le capacité de rétention calcique de cellules U937 perméabilisées.

Les mesures de capacité de rétention calcique sont réalisées sur la lignée U937. Les cellules U937 sont placées en culture dans le milieu de culture RPMI en présence ou non de DPTA-NONOate (100 µM), ou en présence de NaOH qui est utilisé pour mettre en solution le DPTA-NONOate. Les cellules sont incubées 4h à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées avec du PBS, centrifugées, puis le culot est repris dans un milieu contenant 250 mM de sucrose, 10 mM de Tris-MOPS, 1 mM de Pi, 50 µg.mL⁻¹ de digitonine, pH 7,4. Le milieu sucrose est supplémenté soit de 5 mM de succinate-Tris en présence ou non de 1 µM de CsA ou 1,25 µM de roténone, soit de 5 mM de glutamate-Tris plus 2,5 mM de malate-Tris. Le volume final est de 2 ml, les mesures sont réalisées à une concentration de 5 millions de cellules/ml, et la température est de 30°C. Le milieu est également supplémenté avec 1 µM de calcium-green permettant de suivre les variations de la concentration calcique extramitochondriale. Des injections de 12,5 µM de calcium sont réalisées toutes les 2 minutes. Les résultats présentés sont la représentation d'une expérience typique.

Afin de mieux cerner cette inhibition induite par le NO, nous avons mesuré la consommation d'oxygène sur les cellules U937 perméabilisées et énergisées par le GM et le succinate.

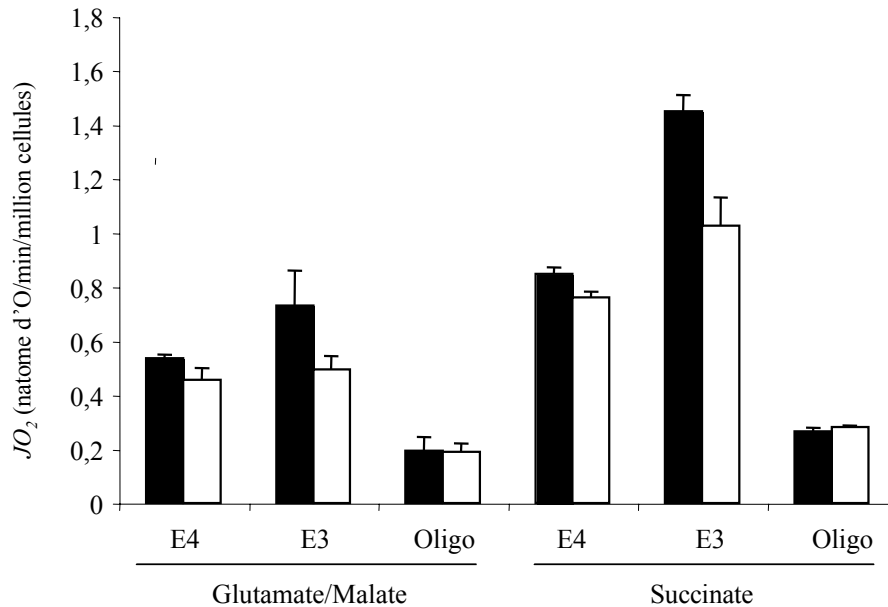


Figure RII- 4 : Effet du DPTA-NONOate sur la respiration de cellules U937 perméabilisées.

Les cellules sont incubées dans un milieu constitué de 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 1,2 mM KH_2PO_4 , 1,2 mM MgSO_4 , 1,3 mM CaCl_2 , 20 mM Glucose, pH 7,4. Les cellules sont incubées 4 h à 37°C en présence ou non de 100 μM de DPTA-NONOate. Les cellules sont ensuite rincées au PBS, centrifugées et le culot cellulaire et repris dans le milieu de respiration KCl décrit dans la figure RI-1 additionné de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de digitonine et supplémenté avec 5 mM de glutamate-Tris plus 2,5 mM malate-Tris ou 5 mM de succinate-Tris plus 1,25 μM de roténone. Les mesures ont été réalisées en présence de 1 mM ou de 2 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'oligomycine. Le volume final est de 2 ml, les mesures sont réalisées à une concentration de 10 millions de cellules $\cdot\text{ml}^{-1}$, et la température est de 30°C. Les résultats présentés sont la moyenne \pm sem de 2 expérimentations réalisées sur les cellules contrôles (barre noire) et sur les cellules traitées avec 100 μM de DPTA-NONOate (barre blanche)

Supprimé : /

Comme nous pouvons l'observer sur la figure RII-4, la respiration mitochondriale à l'état non-phosphorylant, mesurée en présence de 100 μM de DPTA-NONOate est très faiblement inhibée en présence de GM ($0,535 \pm 0,015$ versus $0,455 \pm 0,045$ natome d'O/min/million cellules) comme de succinate ($0,848 \pm 0,024$ versus $0,76 \pm 0,023$ natome d'O/min/million cellules).

Supprimé : ¶

L'effet du NO sur le complexe I et le complexe II est beaucoup plus important à l'état phosphorylant, la respiration étant inhibée d'environ 30 % en présence de chacun des deux substrats (le faible nombre d'expérimentations ne nous permet pas de réaliser d'étude statistique).

De plus, nous avons pu observer que ces deux effets (sur le PTP et la respiration) sont dépendants non seulement de la concentration en DPTA-NONOate ajoutée, mais aussi du temps d'exposition des cellules au NO.

Contrairement à notre postulat, le NO active l'ouverture du pore de transition de perméabilité et ce, malgré son effet inhibiteur au niveau du complexe I. Nous avons également mis en évidence un effet inhibiteur sur le complexe II (succinate déshydrogénase) et une augmentation de la probabilité d'ouverture du PTP en présence du substrat de ce complexe de la chaîne respiratoire.

De plus, l'inhibition du PTP par la roténone et la CsA est atténuée voire complètement inhibée en présence de NO.

II.2. Conséquences de l'inhibition du complexe II sur la mort cellulaire

II.2.1. Effet du TTFA sur la régulation du Pore de Transition de Perméabilité et la respiration mitochondriale

Les effets du NO sur la régulation de l'ouverture du PTP sont donc en contradiction avec les récentes découvertes obtenues avec la metformine et la roténone. Cependant, contrairement au NO, ni la metformine, ni la roténone n'ont d'effet sur le complexe II. C'est pourquoi, nous suggérons que l'inhibition induite par le NO au niveau du complexe II soit prédominante dans la régulation de l'ouverture du PTP.

Dans le but d'étayer cette idée, nous avons choisi d'étudier les effets du TTFA (Thényltrifluoroacétone), inhibiteur de référence du complexe II, sur la régulation de l'ouverture du PTP ainsi que sur la respiration mitochondriale.

Nous remarquons à la figure RII-5A, que sur mitochondries isolées incubées en présence de succinate, la respiration à l'état non-phosphorylant est diminuée de façon significative dès 10 μ M de TTFA ($23,3 \pm 0,871$ versus $15,686 \pm 1,15$ natome d'O/min/mg protéines, $n = 5$, $p < 0,05$). La respiration à l'état phosphorylant est quant à elle inhibée significativement dès 1 μ M de TTFA ($131,89 \pm 10,78$ versus $94,3 \pm 7,5$ natome d'O/min/mg protéines, $n = 5$, $p < 0,05$).

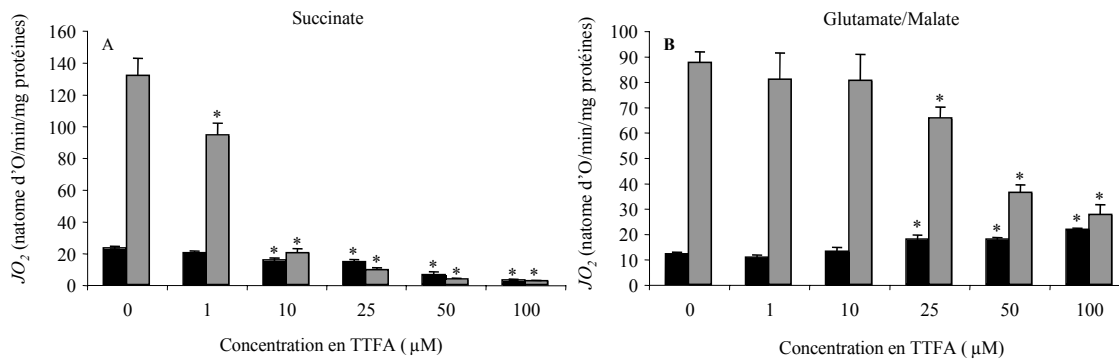


Figure RII- 5: Effets du TTFA sur la respiration mitochondriale.

Les mitochondries (2mg) sont incubées dans un milieu à pH 7,4, constitué de KCl 125 mM, EGTA 1mM, Tris-HCl 20 mM, 5 mM de Pi. Les mitochondries sont énergisées avec 5 mM de succinate-Tris (A) ou avec 5 mM de glutamate-Tris plus 2,5 mM de malate-Tris (B). La respiration est mesurée à l'état non-phosphorylant (barre noire) et à l'état phosphorylant induit par l'ajout de 5 mM d'ADP (barre grise). Le volume final est de 2 ml et la mesure est réalisée à 30°C. Les résultats sont exprimés par la moyenne de 4 expériences \pm sem en succinate, et de 5 expériences \pm sem en GM. * $p < 0,05$ versus contrôle.

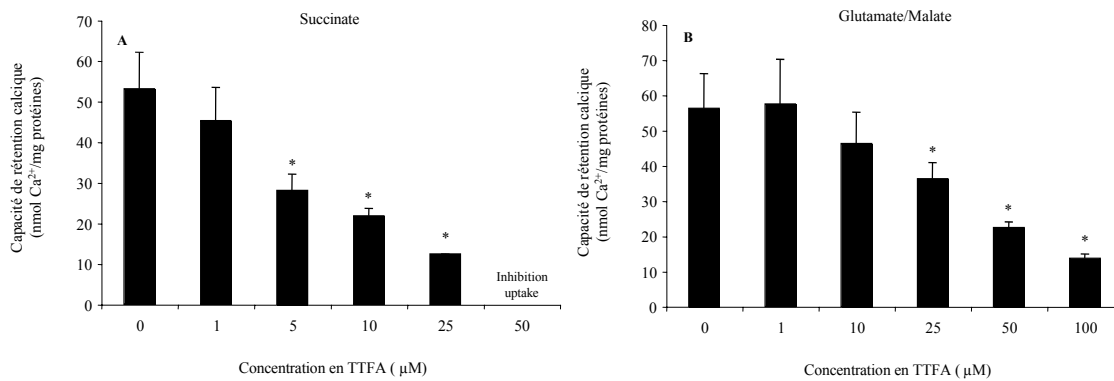


Figure RII- 6 : Effets du TTFA sur la capacité de rétention calcique.

Les mitochondries (2mg) sont incubées dans un milieu à pH 7,4, constitué de 250 mM de sucrose, 1 mM de Pi-Tris, 10 mM Tris-MOPS, supplémenté avec 1 μM de calcium-green pour mesurer les variations de la concentration calcique extra-mitochondriale. Les mitochondries sont énergisées avec 5 mM de succinate-Tris (A) ou avec 5 mM de glutamate-Tris plus 2,5 mM de malate-Tris (B). Après 2 min de stabilisation, 6,25 μM de calcium sont ajoutés toutes les 2 minutes jusqu'à l'ouverture du PTP. Le volume final est de 2 ml, et la mesure est réalisée à 30°C. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem (n = 4 en succinate, n = 5 en GM, * $p < 0,05$ versus contrôle).

Afin de vérifier la spécificité du TTFA pour le complexe II, nous avons réalisé la même titration sur des mitochondries isolées énergisées avec le glutamate/malate.

Nous avons observé un effet découplant sur la respiration à l'E4, qui est significatif à partir de 25 μM de TTFA ($12,19 \pm 0,471$ en GM versus $17,89 \pm 1,68$ natome d'O/min/mg protéines en présence de 25 μM de TTFA, n = 6, $p < 0,05$) (Figure RII-5B). En revanche, à l'E3, cette même

dose de TTFA inhibe la respiration mitochondriale ($87,61 \pm 4,15$ versus $65,64 \pm 4,38$ natome d'O/min/mg protéines, $n = 6$, $p < 0,05$).

Nous avons alors mesuré la capacité de rétention calcique de mitochondries énergisées par le succinate ou le GM et incubées en présence de TTFA (Figure RII-6).

La CRC, mesurée en présence de succinate, est diminuée significativement, par l'ajout de seulement $5 \mu\text{M}$ de TTFA ($53,1 \pm 9,02$ versus $28,12 \pm 4,03$ nmol de calcium/mg protéines, $n = 4$, $p < 0,05$) (Figure RII-6A). Comme pour la respiration, l'effet sur la CRC est dépendant de la concentration de TTFA. Ainsi, nous n'avons pu déterminer la CRC avec $50 \mu\text{M}$ de TTFA car à cette dose l'inhibition de la respiration est telle que le potentiel de membrane est insuffisant pour permettre l'entrée de calcium dans la mitochondrie, nous observons alors phénomène appelé inhibition de l'« uptake ».

En présence de GM, nous avons également observé une diminution significative de la CRC mais à partir de concentrations supérieures ou égales à $25 \mu\text{M}$ de TTFA ($56,25 \pm 9,88$ versus $46,25 \pm 8,97$ nmol de calcium/mg protéines, $n = 5$, $p < 0,05$) (Figure RII-6B).

Le TTFA est un inhibiteur spécifique du complexe II pour des concentrations inférieures ou égales à $10 \mu\text{M}$. Au delà, il induit une inhibition de la respiration à l'état phosphorylant et un découplage de la respiration à l'état non-phosphorylant lorsque les mitochondries sont énergisées avec les substrats du complexe I.

La diminution de la CRC induite par le TTFA en présence des substrats du complexe I et du complexe II est comparable à celle enregistrée avec le NO.

II.2.2. Effet du TTFA sur la respiration cellulaire et la mort cellulaire

Sur mitochondries de foie ainsi que sur hépatocytes isolés, la roténone n'a aucun effet sur la capacité de rétention calcique, ce qui n'est pas le cas sur mitochondries de muscles squelettiques, ou sur cellules issues de carcinomes épidermoïdes (Chauvin *et coll.* 2001, Fontaine *et coll.* 1998). Sachant que la roténone, et la CsA sont de puissants inhibiteurs de l'ouverture du pore, et que le NO inverse l'effet de la CsA, nous avons étudié l'effet du TTFA sur la capacité de rétention calcique en présence de ces inhibiteurs, afin de déterminer si en effet, l'inhibition du complexe II est prédominante sur les effets de la roténone et de la CsA.

Pour cela, nous avons choisi de travailler sur une lignée de carcinome buccal humain, la lignée KB.

II.2.3. Inhibition du complexe II par le TTFA : Effets sur la respiration et la capacité de rétention calcique

Dans un premier temps, nous avons reproduit sur les cellules KB perméabilisées, les résultats obtenus sur mitochondries isolées de foie de rats, sur la mesure de la CRC et de la consommation d'oxygène, en présence de TTFA.

En présence de succinate, la titration de la respiration mitochondriale à l'E4 par le TTFA, sur les cellules KB perméabilisées, révèle une inhibition significative pour des concentrations supérieures ou égales à 50 μM ($1,66 \pm 0,427$ *versus* $1,06 \pm 0,247$ natome d'O/min/million de cellules) (Figure RII-7A).

La mesure de la respiration à l'E3 révèle quant à elle une inhibition significative dès 10 μM ($2,677 \pm 0,829$ *versus* $1,977 \pm 0,487$ natome d'O/min/million de cellules) (Figure RII-7B).

Il est également important de noter que la concentration en TTFA, nécessaire pour inhiber la respiration dans les cellules KB perméabilisées, est plus importante que dans les mitochondries isolées. En effet, sur le modèle de mitochondries isolées énergisées avec le succinate, nous avons observé une inhibition de la respiration à l'E3 dès 1 μM et 10 μM à l'E4 (Figure RII-5A), tandis que sur le modèle des cellules perméabilisées 10 μM de TTFA sont nécessaires pour induire une inhibition de l'E3 en présence de succinate, et 50 μM pour inhiber l'E4.

Par l'étude de la capacité de rétention calcique en présence de succinate, nous avons constaté que l'ajout de concentrations croissantes en TTFA active l'ouverture du PTP et ce, dès 10 μM ($62,5 \pm 1,708$ pour la condition contrôle *versus* $35 \pm 2,236$ $\mu\text{mol Ca}^{2+}$ /million de cellules) (Figure RII-7C). Nous n'avons pu déterminer la capacité de rétention calcique pour la concentration de 100 μM de TTFA, car l'inhibition de la respiration est telle que le potentiel membranaire n'est pas suffisant pour permettre l'entrée de calcium.

Nous avons également mesuré la respiration à l'E4 et l'E3 ainsi que la capacité de rétention calcique, en présence de succinate et des deux inhibiteurs de référence de l'ouverture du PTP (la roténone et la CsA).

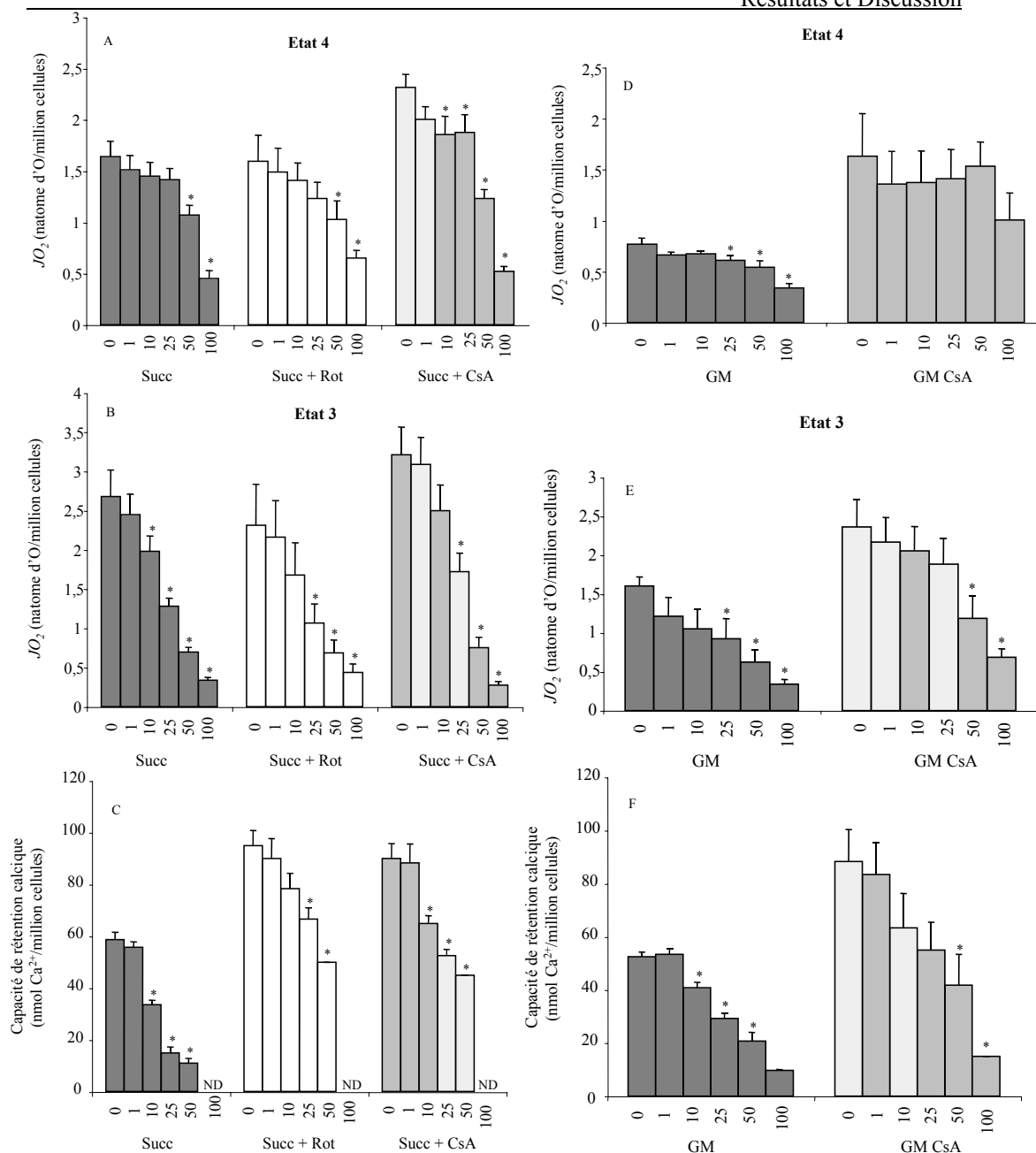


Figure RII- 7 : Effet du TFA sur la respiration et la capacité de rétention calcique de la lignée KB.

Les cellules KB (10.10^6) sont incubées soit dans un milieu à pH 7,4, constitué de KCl 125 mM, EGTA 1 mM, Tris-HCl 20 mM, Pi 5 mM (A, B, D, E) pour la mesure de la consommation d’oxygène à l’E4 (A et D) et à l’E3 en présence d’ADP 5 mM (B et E) soit dans un milieu à pH 7,4 composé de 250 mM de sucrose, 1 mM de Pi-Tris, 10 mM Tris-MOPS supplémenté avec 1 μ M de calcium-green pour mesurer les variations de la concentration calcique extra-mitochondriale (C et F). Les cellules sont perméabilisées par la digitonine et sont énergisées (A, B C) avec 5 mM de succinate-Tris (barre grise) supplémenté de 1,25 μ M de roténone (barre blanche) ou de 1 μ M de CsA (barre hachurée) ou (D, E, F) avec 5 mM de glutamate-Tris plus 2,5 mM de malate-Tris (barre grise) plus 1 μ M de CsA (barre hachurée). Après 2 min de stabilisation, 25 μ M de calcium sont ajoutés toutes les 2 minutes jusqu’à l’ouverture du PTP. Le volume final est de 2 ml, et la mesure est réalisée à 30°C. Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem (n = 4, *p<0,05 versus contrôle).

La titration de la respiration à l'E4 sur des cellules perméabilisées et incubées en présence de succinate et de roténone ou de CsA, révèle une inhibition à partir de 50 μ M dans la condition roténone et à partir de 10 μ M dans la condition CsA (Figure RII-7A).

Le TTFA inhibe également la respiration à l'E3 en présence de roténone et de CsA, dès 25 μ M ($2,668 \pm 0,497$ *versus* $1,065 \pm 0,245$ en présence de roténone, et $2,951 \pm 0,454$ *versus* $1,556 \pm 0,304$ en présence de CsA) (Figure RII-7B). De la même manière qu'en présence de GM, nous observons une activation de la respiration en présence de CsA par rapport à la condition contrôle (succinate seul).

La mesure de la capacité de rétention calcique, révèle bien une inhibition de l'ouverture du PTP en présence de roténone et de CsA (Figure RII-7C). De plus, le TTFA a la capacité d'augmenter la probabilité d'ouverture, et ce malgré la présence de roténone et de CsA. Donc, l'inhibition du complexe II semble avoir un effet dominant sur l'inhibition du complexe I.

Il est intéressant de noter que la capacité de rétention calcique mesurée en présence de roténone ou de CsA, et de 50 μ M de TTFA est inférieure à la capacité de rétention calcique mesurée en présence de succinate seul. Cela confirme donc que le TTFA est capable d'inhiber totalement l'effet de la roténone et de la CsA.

II.2.4. Inhibition du complexe I par le TTFA : Effets sur la respiration et la capacité de rétention calcique

Comme attendu, sur les cellules KB perméabilisées et énergisées par le GM, le TTFA induit une inhibition de la respiration à l'E3 ($1,446 \pm 0,182$ en GM *versus* $0,838 \pm 0,22$ en GM plus 25 μ M TTFA, $n = 5$, $p < 0,05$) (Figure RII-7E). En revanche il fut surprenant de mesurer une inhibition significative de la respiration à l'E4 dès 25 μ M ($0,769 \pm 0,06$ en GM *versus* $0,61 \pm 0,051$ en GM plus 25 μ M TTFA, $n = 5$, $p < 0,05$) (Figure RII-7D).

Rappelons, que sur les mitochondries isolées de foie incubées en présence de GM, le TTFA induit un découplage de la respiration à l'E4 (Figure RII-5B). Or, sur les cellules KB perméabilisées le TTFA inhibe la respiration à l'E4.

De même, la capacité de rétention calcique est diminuée significativement par l'ajout de TTFA à partir d'une concentration de 10 μ M (53 ± 2 *versus* $40 \pm 2,236$ μ mol calcium/million cellules) (Figure RII-7F).

Nous avons alors mesuré l'effet du TTFA en présence de CsA sur les cellules perméabilisées et énergisées par le GM. Comme nous pouvons le voir sur la figure RII-7D, en présence de CsA, le TTFA n'a pas d'effet significatif sur la respiration cellulaire à l'E4. Cependant, il inhibe la consommation d'oxygène à l'E3 à partir d'une concentration de 50 μ M ($1,308 \pm 0,222$ en

GM/CsA *versus* $0,496 \pm 0,021$ natome d'O/min/million cellules en GM/CsA plus TTFA 50 μ M) (Figure RII-7E). De même, l'effet inhibiteur de la CsA est contrecarré par l'ajout de TTFA (Figure RII-7F). Comme précédemment, le TTFA incubé en présence de substrats énergisants et de CsA, diminue la capacité de rétention calcique à des valeurs inférieures à celles obtenues en présence de glutamate/malate seuls (53 ± 2 en GM *versus* $41,667 \pm 11,667$ μ mol calcium/million cellules en GM plus CsA plus 50 μ M TTFA).

En revanche, en présence de 100 μ M de TTFA la respiration cellulaire est suffisante pour maintenir un potentiel membranaire mitochondrial nécessaire à l'entrée de calcium. Nous n'avons donc pas d'inhibition de l'« uptake » de Ca^{2+} comme dans le cas du complexe II (« Résultats » III.2.1.).

Dans les cellules KB perméabilisées, le TTFA n'est pas un inhibiteur spécifique du complexe II. En effet, la respiration cellulaire en présence de GM est inhibée significativement par le TTFA aux mêmes concentrations que celles qui inhibent la respiration en présence de succinate.

Le TTFA est un puissant inducteur du PTP puisque l'effet de la roténone et de la ciclosporine sur l'ouverture du PTP est inhibé par l'ajout de TTFA.

II.2.5. Effets des inhibiteurs spécifiques des complexes I et II sur la respiration et la capacité de rétention calcique

Afin de vérifier notre hypothèse suggérant que l'inhibition de complexe II ait un effet pro-apoptotique, nous avons comparé l'effet du malonate à celui du TTFA, sur la consommation d'oxygène ainsi que sur la probabilité d'ouverture du PTP.

Nous avons donc réalisé une titration en présence de malonate, substrat compétitif du succinate pour la succinate déshydrogénase, sur des cellules KB perméabilisées et énergisées en succinate. Comme attendu, à l'E4, nous avons observé une inhibition significative de la respiration cellulaire et ce, pour des concentrations en malonate supérieures ou égales à 250 μ M ($1,755 \pm 0,192$ *versus* $0,986 \pm 0,122$ natome d'O/min/million cellules, $n = 6$, $p < 0,05$) (Figure RII-8A). De plus, à l'E3, nous avons obtenu une inhibition de la respiration pour des concentrations

supérieures ou égales à 50 μM ($3,256 \pm 0,525$ versus $2,271 \pm 0,283$ natome d'O/min/millions cellules, $n = 6$, $p < 0,05$), (Figure RII-8A). Comme en présence de TTFA, la capacité de rétention calcique est diminuée lors de l'incubation des cellules KB en présence de malonate et ce, à partir d'une concentration de 50 μM ($62,5 \pm 3,8$ versus 50 nmol calcium/million cellules, $n = 3$, $p < 0,05$) (Figure RII-8B).

Il nous a alors semblé intéressant de mettre en relation les effets de la titration de faibles concentrations de roténone sur la respiration cellulaire à ceux observés sur la capacité de rétention calcique, sur la lignée KB perméabilisées et énergisées par le glutamate/malate.

La mesure de l'effet de la roténone sur la respiration de cellules incubées en présence de GM, révèle également une inhibition de la respiration significative à partir de 5 nM pour l'E3 et 10 nM pour l'E4 (Figure RII-9). En revanche, les concentrations de roténone de 0,1 nM à 20 nM, n'ont aucun effet sur la capacité de rétention calcique (Figure RII-8). Nous n'avons pas pu mesurer la CRC en présence de 50 nM de roténone puisque l'entrée de calcium dans les mitochondries est inhibée du fait d'un potentiel membranaire mitochondriale insuffisant dû à la forte inhibition de la respiration à cette concentration.

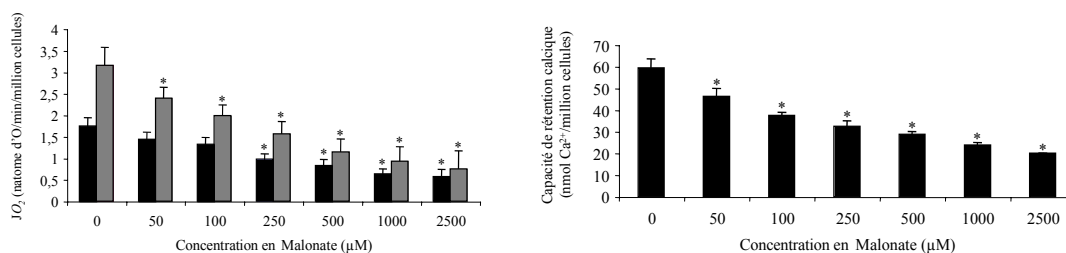


Figure RII- 8 : Effets du malonate sur la respiration cellulaire et la capacité de rétention calcique de cellules KB énergisées en succinate.

Les cellules issues de la lignée KB sont incubées à raison de 10.10^6 cellules en présence de succinate-Tris 5 mM, comme décrit dans la figure RII-6. La capacité de rétention calcique ainsi que la consommation d'oxygène à l'état non-phosphorylant (barre noire) et à l'état phosphorylant (barre grise) sont mesurées en présence de concentrations croissantes en malonate (50 à 2500 μM). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, $n = 6$, $*p < 0,05$ versus contrôle.

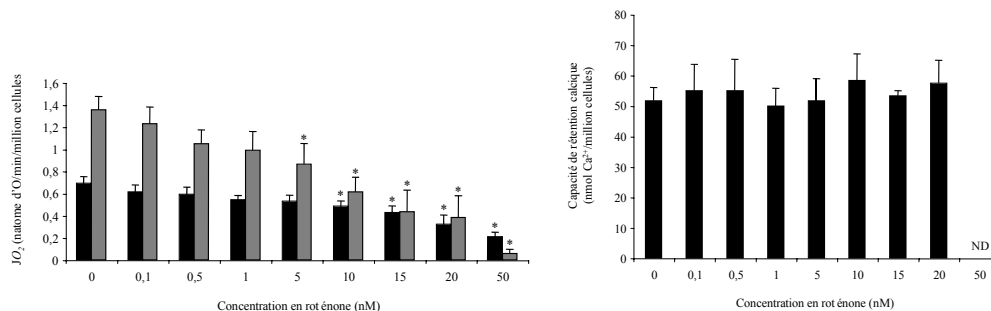


Figure RII- 9 : Effets de la roténone sur la respiration cellulaire et la capacité de rétention de cellules KB énergisées par le glutamate-malate.

Les cellules issues de la lignée KB sont incubées à raison de 10.10^6 cellules en présence de glutamate-Tris 5 mM plus malate-Tris 2,5 mM, comme décrit dans la figure RII-6. La capacité de rétention calcique ainsi que la consommation d'oxygène à l'état non-phosphorylant (barre noire) et à l'état phosphorylant (barre grise) sont mesurées en présence de concentrations croissantes en roténone (0,01 à 50 nM). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem, n = 6,* p< 0,05 versus contrôle.

D'après ces deux titrations, il apparaît que les effets du malonate et de la roténone, sont différents des effets observés en présence de TTFA.

En présence de concentrations croissantes de roténone, nous observons, sur la figure RII-10A, que la respiration en présence de GM est inhibée sans que la CRC ne soit modifiée. Nous remarquons en revanche, que l'effet du TTFA sur la relation entre la CRC et la respiration est sigmoïdale, révélant un effet spécifique du TTFA sur la régulation du PTP.

La contrainte énergétique imposée par l'ajout de concentration croissante en malonate induit une diminution de la CRC en relation avec l'inhibition de la respiration. En revanche, en présence de TTFA, la relation entre la CRC et la respiration est sigmoïdale, révélant un effet spécifique du TTFA sur le PTP. En effet, la CRC est fortement diminuée alors que la respiration n'est pas significativement inhibée (Figure RII-10B).

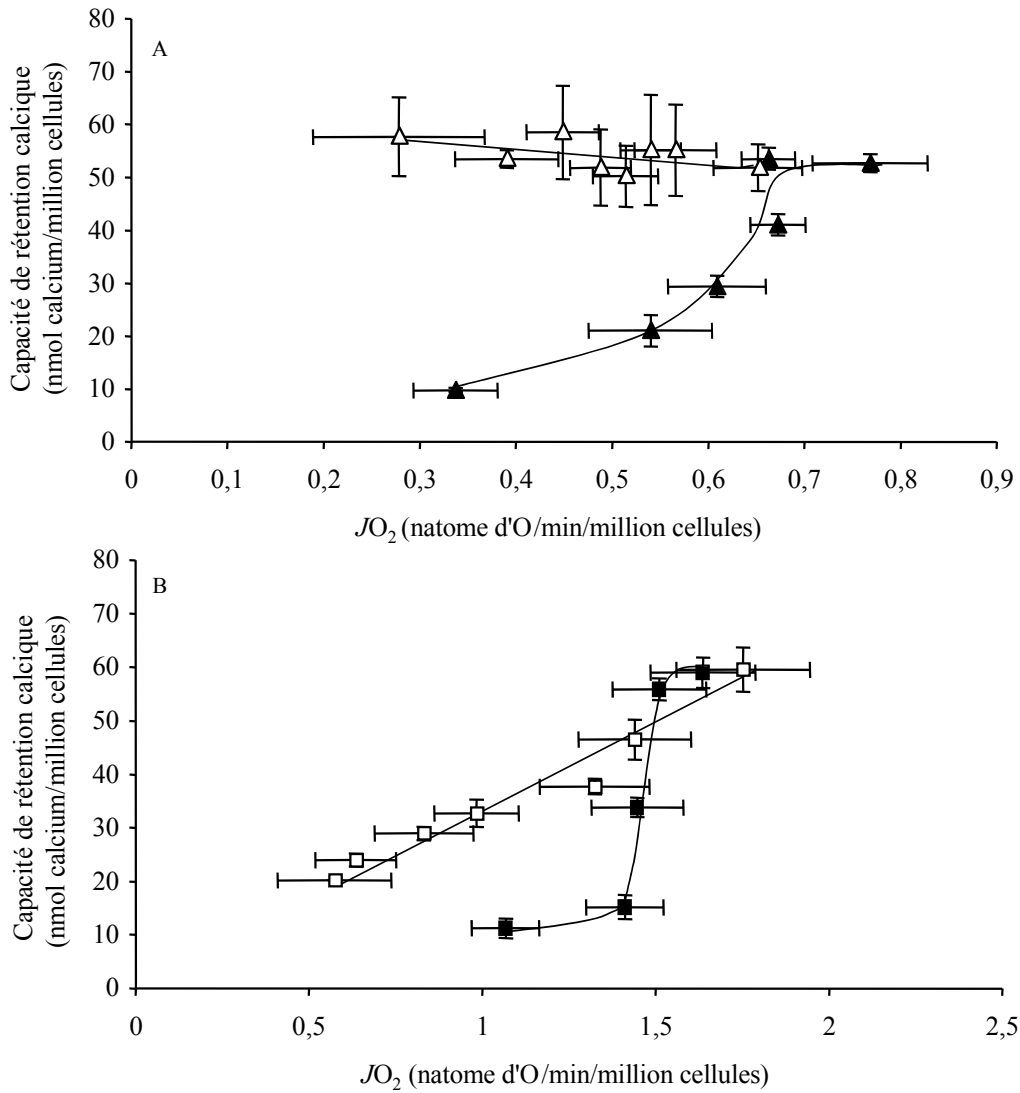


Figure RII- 10 : Effets des différents inhibiteurs des complexes I et II sur la relation entre la capacité de rétention calcique et la consommation d'oxygène.

Les cellules KB ($10 \cdot 10^6$) sont incubées comme décrit dans la figure RII-6 pour la mesure de la CRC et de la consommation d'oxygène. Les cellules sont perméabilisées par la digitonine ($20 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) et énergisées en glutamate-Tris 5 mM plus malate-Tris 2,5 mM (A) ou en succinate-Tris (B). La respiration et la CRC sont mesurées en présence de concentrations croissantes de TTFA (σ , ■), de roténone (Δ) ou de malonate (\square). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm sem à partir de 6 expériences.

Dans les cellules KB, le TTFA est un inhibiteur du complexe II mais également du complexe I.

Nous avons également démontré que le malonate, inhibiteur compétitif de la succinate deshydrogénase, induit également une activation de l'ouverture du PTP. En revanche l'inhibition du complexe I par la roténone n'a aucun effet sur la CRC aux faibles concentrations et ce, malgré son effet inhibiteur de la respiration.

II.2.6. Effets d'un traitement au TTFA sur la mort cellulaire

Suite à ces résultats, nous avons traité des cellules KB avec différentes concentrations de TTFA afin d'évaluer son effet sur la mort cellulaire.

Les cellules KB sont pré-incubées pendant 2 h dans le milieu de culture supplémenté en TTFA à différentes concentrations (0-100 μ M). Les cellules sont ensuite mises en culture pendant 12 h, 24 h ou 48 h à l'issue desquelles est réalisé un test d'exclusion au bleu trypan.

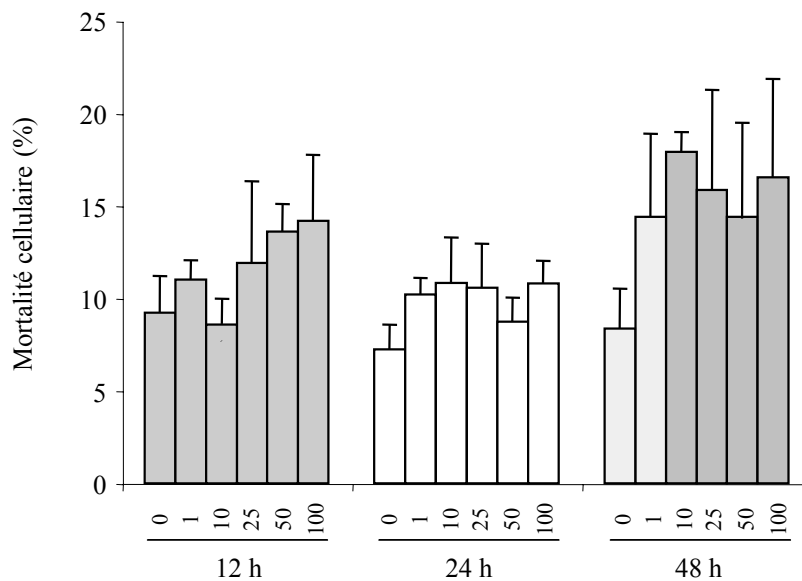


Figure RII- 11 : Effets du TTFA sur la mort cellulaire.

Les cellules sont incubées dans le milieu de culture complet et placées à 37°C pendant 24 h. Les cellules sont ensuite rincées et incubées dans le milieu complet en présence de concentrations croissantes de TTFA pendant 2 h à

37°C. Les cellules sont rincées au PBS et mises en culture pendant 12 h, 24 h, 48 h, à l'issue desquelles un test d'exclusion au bleu trypan est réalisé. Les résultats présentés sont les moyennes \pm sem de 2 expériences.

D'après les résultats obtenus par la mesure de la CRC, nous nous attendions à une augmentation significative de la mortalité en fonction de la dose de TTFA et du temps d'incubation. Or, nous n'avons pas mis en évidence de différence significative de la mort cellulaire (Figure RII-11). Nous pouvons tout de même noter une tendance à l'augmentation de la mort cellulaire aux plus fortes concentrations (Figure RII-11).

Ces résultats représentent la moyenne de seulement deux expériences, et mériteraient d'être reproduit un plus grand nombre de fois, afin de diminuer les erreurs de comptage et de confirmer ou d'infirmer la tendance observée.

Nous avons évalué en parallèle l'effet inducteur de la mort cellulaire du TTFA sur des cellules préalablement traitées à la CsA. Nous n'avons mis en évidence aucune différence, étant donné l'absence d'effet significatif du TTFA sur la mort cellulaire.

Nous avons également mesuré la respiration sur des cellules entières. Après une période de pré-incubation de 2 h (à 37°C) en présence de 50 μ M ou 100 μ M de TTFA, les cellules ont été rincées avec du PBS et mises en suspension dans le milieu de respiration. Dans ces conditions, nous n'avons pu observer qu'une très faible inhibition de la respiration endogène alors que ces mêmes concentrations induisaient, sur cellules perméabilisées, une inhibition de 38 % de la respiration à l'E4 et de 74 % à l'E3.

Etant donné que les mesures de respiration présentées précédemment ont été réalisées sur cellules perméabilisées, nous avons émis l'hypothèse que le TTFA traverse mal la membrane plasmique, ce qui expliquerait l'absence d'effet notable sur la mort cellulaire comme sur la respiration.

Nous avons alors incubé les cellules non perméabilisées, dans la chambre d'oxygraphie pendant 30 min en présence de 100 μ M, 500 μ M et 1 mM de TTFA. Comme nous pouvons l'observer dans la figure RII-12, la respiration cellulaire endogène est inhibée significativement de 43 %. En présence de cette même concentration, la respiration à l'E4 mesurée sur des cellules perméabilisées est inhibée d'environ 70 % en présence de succinate et 55 % en présence de GM. Le TTFA a donc la capacité de traverser la membrane plasmique, et n'est pas, contrairement à notre pensée, faiblement liposoluble.

Nous avons ensuite vérifié que le TTFA n'était pas piégé par les protéines du sérum contenu dans le milieu de culture, en incubant les cellules en présence de TTFA pendant 2 h à 37 °C dans un milieu dépourvu de sérum. Nous n'avons observé qu'une très faible inhibition de la

respiration semblable à celle observée lorsque les cellules sont incubées pendant 2 h à 37°C en présence de TTFA, puis rincées au PBS.

Ces résultats suggèrent que le TTFA diffuse assez difficilement à travers la membrane cellulaire et qu'il soit expulsé après le rinçage.

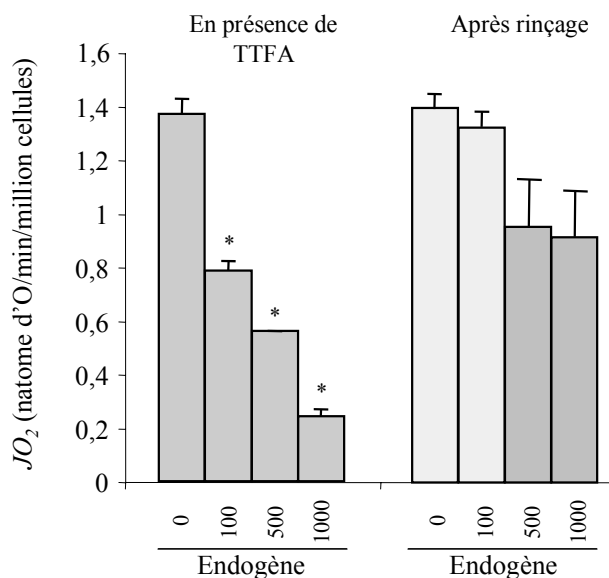


Figure RII- 12 : Effets du TTFA sur la respiration cellulaire.

Les cellules KB ($20 \cdot 10^6$) sont incubées dans le milieu de respiration composé d'HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, KCl 4,8 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, CaCl_2 1,3 mM, glucose 11 mM, pH 7,4. Le milieu de respiration est supplémenté en TTFA à concentrations croissantes (barre grise). Les cellules sont incubées dans le milieu de culture complet et placées à 37°C pendant 24 h. Les cellules sont ensuite rincées et incubées dans le milieu complet en présence de concentrations croissantes de TTFA pendant 2 h à 37°C. Les cellules sont rincées au PBS (barre hachurée). La respiration cellulaire à l'état basal est mesurée en présence des substrats endogènes. Le volume final est de 2 ml et la température de 30°C. Les valeurs sont exprimées en moyenne \pm sem, * $p < 0,05$ versus contrôle.

Nous avons finalement suggéré que les cellules KB sur-expriment une protéine leur conférant un phénotype de résistance multiple aux drogues (MDR pour MultiDrug Resistance). Une de ces protéines est la glycoprotéine P (P-gp) impliquée dans les processus de détoxification. La P-gp fonctionne comme une pompe capable d'expulser activement, à l'extérieur de la cellule, un grand nombre de drogues anti-cancéreuses. Il se pourrait alors que la P-gp expulse activement le TTFA. Nous avons alors évalué la capacité des cellules KB à expulser un marqueur fluorescent, la rhodamine 123, connue pour s'accumuler dans les cellules et pour être un substrat de la P-gp. Or, comme nous pouvons l'observer sur la figure RII-13, la P-gp n'est pas sur-exprimée dans les cellules KB (Wu *et coll.* 2005). Un niveau comparable de fluorescence de la rhodamine 123 est

en effet retrouvé dans les cellules incubées en présence de rhodamine seule ou en association avec la CsA, connue pour inhiber complètement la P-gp à la concentration de 10 μ M.

Nous ne pouvons donc pas expliquer la difficulté du TTFA à pénétrer dans les cellules par une sur-expression de la P-gp.

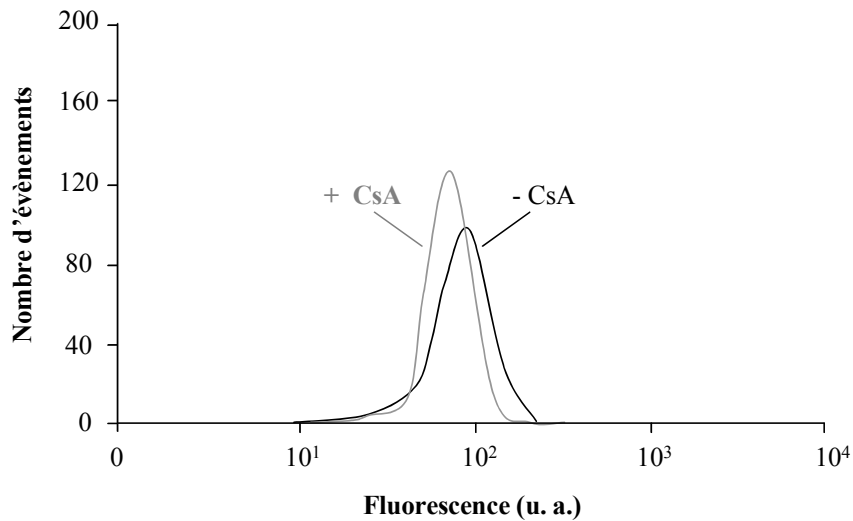


Figure RII- 13 : Activité de la P-gp dans les cellules KB.

Les cellules KB sont incubées pendant une heure à 37°C dans du milieu de culture RPMI en présence de Rhodamine 123 130 nM supplémenté ou non avec de la CsA 10 μ M. La détermination des niveaux de fluorescence des cellules a été réalisée en cytométrie de flux sur 8000 cellules dans chacune des conditions. Le graphique représente la répartition du nombre de cellules en fonction de leur fluorescence.

Le TTFA est un puissant inducteur de l'ouverture du PTP, mais aucun effet significatif n'a pu être mis en évidence sur la mort cellulaire.

De plus, la respiration cellulaire n'est inhibée que lorsque la consommation d'oxygène est mesurée en présence du TTFA.

III. Discussion et perspectives

III.1. Effets du NO sur le pore de transition de perméabilité

Il semble maintenant évident que la probabilité d'ouverture du PTP soit finement régulée par le complexe I de la chaîne respiratoire. En effet, la liste des inhibiteurs du complexe I bloquant l'ouverture du pore et donc exerçant un effet anti-apoptotique, ne cesse d'augmenter ; nous citerons la roténone (Chauvin *et coll.* 2001) et la metformine (Detaillé *et coll.* 2005, Guigas *et coll.* 2004).

Lors de ce travail nous avons pour ambition de déterminer l'effet du donneur DPTA-NONOate sur l'ouverture du PTP. Le NO étant un inhibiteur du complexe I, il nous semblait intéressant d'étayer ces précédentes études avec un molécule physiologique inhibitrice du complexe I.

Au vu de la littérature importante sur le NO et de ses effets pro- et anti-apoptotiques, il n'a pas été surprenant de constater un effet du NO, pro-apoptotique et activateur de l'ouverture du pore de transition de perméabilité, et ce malgré l'inhibition du complexe I (Figures RII-1, 2, 3, 4).

Toutefois, nous n'avons aucun moyen d'évaluer la production de peroxy-nitrites. En effet, dans notre étude, le NO est incubé à forte concentration pendant 4 h, ce qui favorise la formation d'espèces réactives dérivées de l'azote (RNS) dont les peroxy-nitrites. Or, une hypothèse permettant d'expliquer la sensibilité du PTP au potentiel membranaire suggère l'existence d'un site S, constitué d'une paire de thiols sensible au statut du glutathion, et un site P, sensible au statut redox des nucléotides pyridiniques. Ces sites feraient partie intégrante du « voltage-sensor » du PTP. Des composés comme l'arsénite ou le t-butyl-hydroxyperoxyde (tBH) sont connus pour leur propriété oxydante des groupements thiols, ce qui est également le cas des peroxy-nitrites. Il a également été démontré que ces oxydants, agissant par ce site S, induisent une oxydation du glutathion. En effet, le maintien du glutathion sous sa forme réduite prévient de leur effet oxydant. L'effet activateur du NO sur l'ouverture du pore pourrait éventuellement s'expliquer par un effet oxydant des résidus thiols du site S. Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du NO sur l'ouverture du pore, sur des mitochondries déplétées en glutathion ou incubées en présence d'agents anti-oxydants.

Ce « contre-résultat » mettant en évidence une ouverture du PTP malgré un effet inhibiteur du NO sur le complexe I, nous a ouvert de nouvelles perspectives concernant l'étude de la régulation du PTP.

En effet, par la mesure de la consommation d'oxygène, nous avons constaté que le NO inhibait également le complexe II (Figure RII-4), comme cela a été décrit dans la littérature ("Introduction" III.2.).

III.2. Effets du TTFA sur le PTP et la mort cellulaire

L'étude des paramètres mitochondriaux en présence de TTFA a permis de révéler sur des mitochondries isolées de foie, d'une part une inhibition de la respiration en présence de succinate ainsi qu'une activation de l'ouverture du PTP, et d'autre part une inhibition de la respiration à l'état phosphorylant et un découplage de la respiration à l'état non-phosphorylant en présence de glutamate/malate. Dans les études récentes, le TTFA est utilisé pour sa propriété d'inhibiteur spécifique du complexe II. Or, il a été également démontré qu'il pouvait avoir un effet découplant (Warshaw *et coll.* 1966).

Les mêmes études menées sur une lignée de carcinome buccal humain (Ghafourifar *et coll.*) révèlent un effet inhibiteur du TTFA sur la respiration (à l'E4 comme à l'E3) des cellules perméabilisées incubées en présence de succinate (Figure RII-7). Comme nous l'avons également montré sur mitochondries isolées de foie de rats, le TTFA active l'ouverture du PTP (Figure RII-6).

L'étude sur les cellules de carcinomes nous a permis de mettre en compétition le TTFA avec la roténone, inhibiteur du complexe I et de l'ouverture du PTP. Le TTFA a le pouvoir d'inverser l'effet de la roténone et de la CsA, et même de diminuer la quantité de calcium nécessaire à son ouverture en deça de celle requise pour ouvrir le pore en présence de succinate seul.

En présence de GM, nous avons démontré, contrairement à l'étude menée sur mitochondries isolées, que le TTFA était un inhibiteur de la respiration à l'état phosphorylant mais également à l'état non-phosphorylant. Comme attendu, le TTFA active l'ouverture du PTP en présence de GM, sur cellules comme sur mitochondries isolées (Figures RII-6, 7). Comme nous l'avons mis en évidence en présence de succinate, le TTFA inhibe l'effet protecteur de la CsA sur l'ouverture du PTP en présence de GM.

Le TTFA apparaît donc comme un puissant inducteur du PTP. Cependant nos études menées sur la mort cellulaire ne nous permettent pas de conclure à un effet pro-apoptotique, étant donné la difficulté que nous avons rencontrées à faire pénétrer le TTFA. En effet, le pourcentage de cellules mortes n'est pas significativement augmenté par le TTFA (Figure RII-11). En outre, les mesures de la consommation d'oxygène sur des cellules entières pré-incubées avec le TTFA,

puis rincées avant la mesure, ne correspondent pas aux effets obtenus quand le TTFA est directement ajouté dans la chambre d'oxygraphie (Figure RII-12). Ces résultats ont d'ailleurs permis d'exclure l'hypothèse selon laquelle le TTFA ne traverserait pas ou mal la membrane plasmique.

En revanche, le TTFA pourrait se répartir selon un gradient de concentration de part et d'autre de la membrane plasmique et donc, lors du rinçage des cellules avant la mesure oxygraphique, le TTFA se redistribuerait et la concentration intracellulaire, pouvant agir au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, serait diminuée. Nous envisageons de réaliser ces mesures après électroporation en présence de TTFA afin de faciliter son entrée dans la cellule. Si le TTFA se distribue effectivement selon un gradient de concentration, nous devrions obtenir les mêmes résultats que présentés dans cette étude. Afin de pallier à ce problème, il serait parfaitement envisageable d'effectuer des incubations en présence de TTFA à des concentrations plus élevées. Toutefois, le risque est de mettre en évidence un effet cytotoxique plutôt qu'un effet propre du TTFA sur le PTP et la respiration cellulaire.

III.3. Régulation de l'ouverture du PTP et inhibition des complexes I et II de la chaîne respiratoire

Les effets du TTFA sur le PTP sont différents de ceux observés avec le malonate. En effet, le malonate inhibe la respiration par compétition avec le succinate pour la succinate déshydrogénase, cette inhibition étant corrélée à une diminution de la capacité de rétention calcique. Le TTFA, quant à lui, active l'ouverture du PTP avant même que la respiration n'ait été inhibée.

A ce jour, quelques études ont mis en évidence un lien entre l'activation du PTP et l'inhibition du complexe II. Rosenstock et coll. se sont en effet intéressés à la maladie de Huntington, caractérisée par une inhibition du complexe II et une augmentation de la production de radicaux libres. Les auteurs ont montré l'acide nitropropionique, neurotoxique inhibiteur du complexe II, provoque une libération de calcium pouvant être inhibée par des inhibiteurs du PTP ou des anti-oxydants, suggérant ainsi une production de radicaux libres et l'ouverture du PTP.

En revanche, d'autres études mettent en évidence que l'inhibition du complexe II par le TTFA diminue drastiquement la production de ROS induite par l'hyperglycémie (Kiritoshi 2003, Ye 2004). Il a été montré que le TTFA inhibe la production mitochondriale de ROS en présence de succinate.

Nous avons observé un effet propre du TTFA sur le PTP, puisqu'en présence de succinate ou de glutamate/malate, il présente un effet activateur de l'ouverture du PTP.

Cet effet est beaucoup plus puissant que les effets protecteurs de la roténone ou de la CsA, et dépend de sa concentration. De plus, en présence de roténone ou de CsA et de TTFA à 50 μ M, la quantité de calcium nécessaire à induire l'ouverture du pore est inférieure à la quantité nécessaire en condition contrôle (succinate seul). Nous avons pu observer le même résultat en présence de GM et de CsA.

Nous savons que la roténone, la piéricidine et la metformine induisent une inhibition du complexe I en présence de succinate, qui est accompagnée d'une inhibition de l'ouverture du PTP. En revanche, la metformine n'a aucun effet sur la capacité de rétention calcique lorsque les mitochondries sont incubées en présence de G/M, ce que nous avons également observé dans la figure RII-8, en titrant la roténone sur la CRC en présence de G/M.

Ces résultats étayent l'hypothèse d'une régulation du PTP par le flux inverse d'électrons à travers le complexe I, qui n'existe qu'en présence de substrats du complexe II.

Cependant, même si le TTFA a un effet propre sur le PTP, cela n'exclut pas une régulation par le complexe II.

Une des perspectives intéressantes de travail serait d'étudier les effets des inhibiteurs du complexe I et II en présence d'acides gras comme substrat physiologique.

Le traitement au monoxyde d'azote s'est révélé pro-apoptotique dans nos conditions expérimentales, cependant des études supplémentaires seraient nécessaires, notamment sur des lignées de cellules endothéliales, où il présenterait un effet anti-apoptotique.

Cependant, cette étude nous a permis de nous intéresser aux effets d'inhibiteurs du complexe II de la chaîne respiratoire.

Nous avons ainsi mis en évidence un effet activateur du TTFA et du malonate, de l'ouverture du PTP. L'effet du malonate étant observé en présence de substrats du complexe II comme en présence de substrats du complexe I.

De plus, l'effet activateur du TTFA, n'est pas inhibé par les plus puissants inhibiteurs du pore que sont la CsA et la roténone. Bien au contraire, le TTFA peut même inhiber totalement l'effet de la CsA et de la roténone, jusqu'à diminuer la CRC en dessous des valeurs contrôles.

Nous pouvons émettre deux hypothèses :

- soit le PTP est directement régulé par le TTFA et le malonate, et peu être d'autres inhibiteurs du complexe II,**
- soit le PTP est régulé par un équilibre entre le complexe I et le complexe II.**

CONCLUSION

Ce travail de thèse a eu pour ambition d'approfondir notre connaissance de deux processus mitochondriaux primordiaux pour la survie cellulaire : l'oxydation phosphorylante et la transition de perméabilité. Ces quatre années de recherche se sont donc principalement articulées autour de la régulation par le monoxyde d'azote (NO) de ces deux mécanismes. Le NO est un radical gazeux physiologique, biosynthétisé à partir de L-arginine par les NO synthases et dont une des cibles sont les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La première partie de ce travail, qui consistait à étudier les effets du NO sur le rendement de l'oxydation phosphorylante (ATP/O), nous a amenée à mettre en évidence un lien fondamental entre l'état d'oxydo-réduction des cytochromes constituant le complexe IV et le rendement de l'oxydation phosphorylante. Nous avons démontré que l'inhibition de la cytochrome c oxydase (COX) par le NO et le cyanure est associée à une augmentation du rapport ATP/O dans des conditions particulières. En effet, cette première étude a révélée que l'effet du NO et du cyanure sur le rapport ATP/O était dépendant de la nature des équivalents réduits fournis aux mitochondries. L'augmentation de rendement est induite par le NO et le cyanure en présence de FADH₂ associé ou non au NADH. En revanche, en présence de NADH seul, ni le NO, ni le cyanure ne modifie le rapport ATP/O. La force de ce travail a été de mettre en évidence cet effet bénéfique du NO en présence d'acides gras comme substrats physiologiques, suggérant un rôle physiologique du NO sur le processus d'oxydation phosphorylante. Par l'étude du potentiel de membrane mitochondriale à l'état phosphorylante nous avons pu mettre en évidence, que le NO comme le cyanure induisait une diminution du « slipping » se traduisant par une augmentation de la stoechiométrie de la chaîne respiratoire. Enfin, nous avons cherché à comprendre quel était la cause de la différence d'effets des inhibiteurs de la COX en fonction des substrats énergétiques utilisés. Sachant, que le contenu en cytochromes aa₃ de la COX est inversement corrélé au rendement de l'oxydation phosphorylante nous avons étudié leur état d'oxydo-réduction. Nous avons ainsi découvert que les cytochromes aa₃ sont plus oxydés en présence de substrats générant uniquement du NADH qu'en présence de substrats générant du FADH₂ avec ou sans NADH. Les résultats présentés dans cette étude ne permettent pas de conclure quant à l'effet du NO et du cyanure sur cet état d'oxydo-réduction. Cependant, nous suggérons que le « slipping » de la COX soit en étroite relation avec l'état d'oxydo-réduction de ses cytochromes.

Dans la deuxième partie du travail présenté, nous avons pour intentions d'étayer notre connaissance des mécanismes de régulation du pore de transition de perméabilité (PTP). Des études réalisées au laboratoire ont montré un effet anti-apoptotique d'inhibiteurs du complexe I

de la chaîne respiratoire comme la roténone et le metformine. En effet, en situation de stress, l'inhibition modérée de ce complexe entraîne une diminution de la probabilité d'ouverture du PTP, prévenant ainsi de la libération de cytochrome c et de l'initiation des processus de mort cellulaire. L'étude de la régulation de l'ouverture du PTP par le NO a révélé un effet pro-apoptotique de cette molécule. Cependant, il est vrai que dans notre situation nous ne pouvons certifier que le NO n'agit que sur le complexe I de la chaîne respiratoire. Ces résultats nous ont donc orienté vers l'étude des effets des inhibiteurs du complexe II de la chaîne respiratoire.

Nous avons ainsi démontré que l'inhibition du complexe II par le TTFA (2-Thényltrifluoroacétone) activait l'ouverture du PTP et ce, même en présence d'inhibiteurs puissants de son ouverture comme la ciclosporine ou la roténone. Nous avons alors étudié l'effet de la roténone en présence du substrat du complexe I et du malonate en présence du substrat du complexe II. Cette étude a révélé que l'inhibition du complexe I en présence de son substrat ne modifie pas la probabilité d'ouverture du pore, tandis que l'inhibition du complexe II en présence de son substrat active l'ouverture du PTP. Nous avons suggéré deux hypothèses permettant d'expliquer ces résultats. Le PTP pourrait être régulé de manière directe par les inhibiteurs de la chaîne respiratoire, mais il se pourrait également que ce soit un équilibre entre l'inhibition du complexe I et du complexe II qui gouverne sa probabilité d'ouverture.

BIBLIOGRAPHIE

- D. C. Adamson, B. Wildemann, M. Sasaki, J. D. Glass, J. C. McArthur, V. I. Christov, T. M. Dawson and V. L. Dawson. Immunologic NO synthase: elevation in severe AIDS dementia and induction by HIV-1 gp41. *Science*.274:1917-21,1996.
- J. E. Albina and J. S. Reichner. Role of nitric oxide in mediation of macrophage cytotoxicity and apoptosis. *Cancer Metastasis Rev*.17:39-53,1998.
- A. Almeida, J. Almeida, J. P. Bolanos and S. Moncada. Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc Natl Acad Sci U S A*.98:15294-9,2001.
- E. Antonini, M. Brunori, C. Greenwood, B. G. Malmstrom and G. C. Rotilio. The interaction of cyanide with cytochrome oxidase. *Eur J Biochem*.23:396-400,1971.
- B. Antonsson. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res*.306:347-61,2001.
- B. Antonsson, S. Montessuit, S. Lauper, R. Eskes and J. C. Martinou. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J*.345 Pt 2:271-8,2000.
- O. Arancio, M. Kiebler, C. J. Lee, V. Lev-Ram, R. Y. Tsien, E. R. Kandel and R. D. Hawkins. Nitric oxide acts directly in the presynaptic neuron to produce long-term potentiation in cultured hippocampal neurons. *Cell*.87:1025-35,1996.
- M. Asahi, J. Fujii, K. Suzuki, H. G. Seo, T. Kuzuya, M. Hori, M. Tada, S. Fuji and N. Taniguchi. Inactivation of glutathione peroxidase by nitric oxide - Implication for cytotoxicity. *J Biol Chem*.270:21035-21039,1995.
- D. E. Atkinson. The energy charge of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry*.7:4030-4,1968.
- D. E. Atkinson and G. M. Walton. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat liver citrate cleavage enzyme. *J Biol Chem*.242:3239-41,1967.
- G. F. Azzone, M. Zoratti, V. Petronilli and D. Pietrobon. The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *J Inorg Biochem*.23:349-56,1985.
- C. P. Baines, R. A. Kaiser, N. H. Purcell, N. S. Blair, H. Osinska, M. A. Hambleton, E. W. Brunskill, M. R. Sayen, R. A. Gottlieb, G. W. Dorn, J. Robbins and J. D. Molkentin. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*.434:658-62,2005.
- J. L. Balligand, R. A. Kelly, P. A. Marsden, T. W. Smith and T. Michel. Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signaling system. *Proc Natl Acad Sci U S A*.90:347-51,1993a.
- J. L. Balligand, D. Ungureanu, R. A. Kelly, L. Kobzik, D. Pimental, T. Michel and T. W. Smith. Abnormal contractile function due to induction of nitric oxide synthesis in rat cardiac myocytes follows exposure to activated macrophage-conditioned medium. *J Clin Invest*.91:2314-9,1993b.
- J. E. Barker, J. P. Bolanos, J. M. Land, J. B. Clark and S. J. Heales. Glutathione protects astrocytes from peroxynitrite-mediated mitochondrial damage: implications for neuronal/astrocytic trafficking and neurodegeneration. *Dev Neurosci*.18:391-6,1996a.
- J. E. Barker, S. J. Heales, A. Cassidy, J. P. Bolanos, J. M. Land and J. B. Clark. Depletion of brain glutathione results in a decrease of glutathione reductase activity; an enzyme susceptible to oxidative damage. *Brain Res*.716:118-22,1996b.

- E. Basso, L. Fante, J. Fowlkes, V. Petronilli, M. A. Forte and P. Bernardi. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem.* 280:18558-61, 2005.
- J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall and B. A. Freeman. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:1620-4, 1990.
- J. S. Beckman and W. H. Koppenol. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol.* 271:C1424-37, 1996.
- E. Belcher, J. Mitchell and T. Evans. Myocardial dysfunction in sepsis: no role for NO? *Heart.* 87:507-9, 2002.
- B. Beltran, A. Mathur, M. R. Duchon, J. D. Erusalimsky and S. Moncada. The effect of nitric oxide on cell respiration: a key to understanding its role in cell survival or death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97:14602-14607, 2000.
- P. Bernardi, S. Vassanelli, P. Veronese, R. Colonna, I. Szabo and M. Zoratti. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations. *J Biol Chem.* 267:2934-9, 1992.
- P. Bernardi, P. Veronese and V. Petronilli. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. I. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J Biol Chem.* 268:1005-10, 1993.
- M. N. Berry and D. S. Friend. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells: a biochemical and fine structural study. *J Cell Biol.* 43:506-20, 1969.
- R. S. Blackmore, C. Greenwood and Q. H. Gibson. Studies of the primary oxygen intermediate in the reaction of fully reduced cytochrome oxidase. *J Biol Chem.* 266:19245-9, 1991.
- J. P. Bolanos, S. J. Heales, J. M. Land and J. B. Clark. Effect of peroxynitrite on the mitochondrial respiratory chain: differential susceptibility of neurones and astrocytes in primary culture. *J Neurochem.* 64:1965-72, 1995.
- J. P. Bolanos, S. J. Heales, S. Peuchen, J. E. Barker, J. M. Land and J. B. Clark. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage: a potential neuroprotective role for glutathione. *Free Radic Biol Med.* 21:995-1001, 1996.
- J. P. Bolanos, S. Peuchen, S. J. Heales, J. M. Land and J. B. Clark. Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J Neurochem.* 63:910-6, 1994.
- V. Borutaite and G. C. Brown. Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria and reversible inhibition of mitochondria respiration by nitric oxide. *Biochem J.* 315:295-299, 1996.
- V. Borutaite and G. C. Brown. Nitric oxide induces apoptosis via hydrogen peroxide, but necrosis via energy and thiol depletion. *Free Radic Biol Med.* 35:1457-68, 2003a.
- V. Borutaite and G. C. Brown. Nitric oxide induces apoptosis *via* hydrogen peroxide, but necrosis *via* energy and thiol depletion. *Free Rad Biol Med.* 35:1457-1468, 2003b.
- V. Borutaite, A. Budriunaite and G. C. Brown. Reversal of nitric oxide-, peroxynitrite- and S-nitrosothiol-induced inhibition of mitochondrial respiration or complex I activity by light and thiols. *Biochim Biophys Acta.* 1459:405-12, 2000a.
- V. Borutaite, A. Jekabsone, R. Morkuniene and G. C. Brown. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents mitochondrial dysfunction, cytochrome *c* release and apoptosis induced by heart ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 35:357-366, 2003c.

- W. Borutaite, R. Morkuniene and G. C. Brown. Nitric oxide donors, nitrosothiols and mitochondrial respiration inhibitors induce caspase activation by different mechanisms. *FEBS Lett.* 467:155-159, 2000b.
- L. Bosca and S. Hortelano. Mechanisms of nitric oxide-dependent apoptosis: involvement of mitochondrial mediators. *Cell Signal.* 11:239-244, 1999.
- C. A. Bradham, T. Qian, K. Streetz, C. Trautwein, D. A. Brenner and J. J. Lemasters. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol.* 18:6353-64, 1998.
- A. J. Brady, J. B. Warren, P. A. Poole-Wilson, T. J. Williams and S. E. Harding. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol.* 265:H176-82, 1993.
- M. D. Brand. The proton leak across the mitochondrial inner membrane. *Biochim Biophys Acta.* 1018:128-33, 1990.
- M. D. Brand, L. F. Chien and P. Diolez. Experimental discrimination between proton leak and redox slip during mitochondrial electron transport. *Biochem J.* 297 (Pt 1):27-9, 1994.
- M. D. Brand, R. P. Hafner and G. C. Brown. Control of respiration in non-phosphorylating mitochondria is shared between the proton leak and the respiratory chain. *Biochem J.* 255:535-9, 1988.
- D. S. Bredt. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. *Free Radic Res.* 31:577-96, 1999.
- D. S. Bredt, P. M. Hwang and S. H. Snyder. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature.* 347:768-70, 1990.
- P. S. Brookes. Mitochondrial proton leak and superoxide generation: an hypothesis. *Biochem Soc Trans.* 26:S331, 1998.
- P. S. Brookes, J. M. Land, J. B. Clark and S. J. Heales. Peroxynitrite causes proton leak in brain mitochondria. *Biochem Soc Trans.* 26:S332, 1998a.
- P. S. Brookes, J. M. Land, J. B. Clark and S. J. R. Heales. Peroxynitrite and brain mitochondria: evidence for increased proton leak. *J Neurochem.* 70:2195-2202, 1998b.
- G. C. Brown. The relative proton stoichiometries of the mitochondrial proton pumps are independent of the proton motive force. *J Biol Chem.* 264:14704-9, 1989.
- G. C. Brown. Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem J.* 284 (Pt 1):1-13, 1992.
- G. C. Brown. Nitric oxide and mitochondrial respiration. *Biochim Biophys Acta.* 1411:351-69, 1999.
- G. C. Brown, J. P. Bolanos, S. J. Heales and J. B. Clark. Nitric oxide produced by activated astrocytes rapidly and reversibly inhibits cellular respiration. *Neurosci Lett.* 193:201-4, 1995.
- G. C. Brown and M. D. Brand. Changes in permeability to protons and other cations at high proton motive force in rat liver mitochondria. *Biochem J.* 234:75-81, 1986.
- G. C. Brown and M. D. Brand. Proton/electron stoichiometry of mitochondrial complex I estimated from the equilibrium thermodynamic force ratio. *Biochem J.* 252:473-9, 1988.
- G. C. Brown and C. E. Cooper. Nanomolar concentrations of nitric oxide reversibly inhibit synaptosomal respiration by competing with oxygen at cytochrome oxidase. *FEBS Lett.* 356:295-298, 1994.
- G. C. Brown, N. Foxwell and S. Moncada. Transcellular regulation of cell respiration by nitric oxide generated by activated macrophages. *FEBS Lett.* 439:321-4, 1998.

- G. W. Brudvig, T. H. Stevens and S. I. Chan. Reactions of nitric oxide with cytochrome *c* oxidase. *Biochemistry*.19:5275-5285,1980.
- B. Brune, C. Gotz, U. K. Messmer, K. Sandau, M. R. Hirvonen and E. G. Lapetina. Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J Biol Chem*.272:7253-8,1997.
- B. Brune and E. G. Lapetina. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a target for nitric oxide signaling. *Adv Pharmacol*.34:351-60,1995a.
- B. Brune and E. G. Lapetina. Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for nitric oxide signaling. *Genet Eng (N Y)*.17:149-64,1995b.
- B. Brune, A. von Knethen and K. B. Sandau. Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ*.6:969-75,1999.
- A. Calignano, B. J. Whittle, M. Di Rosa and S. Moncada. Involvement of endogenous nitric oxide in the regulation of rat intestinal motility in vivo. *Eur J Pharmacol*.229:273-6,1992.
- J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon, J. Hirst and J. E. Walker. Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics*.2:117-26,2003.
- A. Cassina and R. Radi. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys*.328:309-316,1996.
- B. Chance. Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells. *Nature*.169:215-21,1952.
- B. Chance and G. R. Williams. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *J Biol Chem*.221:477-89,1956a.
- B. Chance and G. R. Williams. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol Relat Subj Biochem*.17:65-134,1956b.
- C. Chauvin, F. De Oliveira, X. Ronot, M. Mousseau, X. Lerverve and E. Fontaine. Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J Biol Chem*.276:41394-8,2001.
- B. V. Chernyak and P. Bernardi. The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur J Biochem*.238:623-30,1996.
- P. D. Cherry, R. F. Furchgott, J. V. Zawadzki and D. Jothianandan. Role of endothelial cells in relaxation of isolated arteries by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*.79:2106-10,1982.
- L. F. Chien and M. D. Brand. The effect of chloroform on mitochondrial energy transduction. *Biochem J*.320 (Pt 3):837-45,1996.
- H. T. Chung, H. O. Pae, B. M. Choi, T. R. Billiar and Y. M. Kim. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*.282:1075-9,2001.
- M. W. Cleeter, J. M. Cooper and A. H. Schapira. Irreversible inhibition of mitochondrial complex I by 1-methyl-4-phenylpyridinium: evidence for free radical involvement. *J Neurochem*.58:786-9,1992.
- M. W. J. Cleeter, J. M. Cooper, V. M. Darley-Usmar, S. Moncada and A. H. V. Schapira. Reversible inhibition of cytochrome *c* oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. *FEBS Lett*.345:50-54,1994.
- E. Clementi, G. C. Brown, M. Feelisch and S. Moncada. Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A*.95:7631-6,1998.

- E. Clementi, G. C. Brown, N. Foxwell and S. Moncada. On the mechanism by which vascular endothelial cells regulate their oxygen consumption. *Proc Natl Acad Sci U S A*.96:1559-62,1999.
- P. J. Cohen. Effect of anesthetics on mitochondrial function. *Anesthesiology*.39:153-64,1973.
- P. Costantini, V. Petronilli, R. Colonna and P. Bernardi. On the effects of paraquat on isolated mitochondria. Evidence that paraquat causes opening of the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore synergistically with nitric oxide. *Toxicology*.99:77-88,1995.
- P. Dabadie, P. Bendriss, P. Erny and J. P. Mazat. Uncoupling effects of local anesthetics on rat liver mitochondria. *FEBS Lett*.226:77-82,1987.
- T. M. Dawson, M. Sasaki, M. Gonzalez-Zulueta and V. L. Dawson. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. *Prog Brain Res*.118:3-11,1998.
- M. Degli Esposti. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta*.1364:222-35,1998.
- R. M. Denton and J. G. McCormack. On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS Lett*.119:1-8,1980.
- S. Desagher and J. C. Martinou. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol*.10:369-77,2000.
- D. Detaille, B. Guigas, C. Chauvin, C. Batandier, E. Fontaine, N. Wiernsperger and X. Leverve. Metformin prevents high-glucose-induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition-dependent process. *Diabetes*.54:2179-87,2005.
- R. Djafarzadeh, S. Kerscher, K. Zwicker, M. Radermacher, M. Lindahl, H. Schagger and U. Brandt. Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim Biophys Acta*.1459:230-8,2000.
- J. C. Drapier and J. B. Hibbs, Jr. Differentiation of murine macrophages to express nonspecific cytotoxicity for tumor cells results in L-arginine-dependent inhibition of mitochondrial iron-sulfur enzymes in the macrophage effector cells. *J Immunol*.140:2829-38,1988.
- A. J. Duncan and S. J. Heales. Nitric oxide and neurological disorders. *Mol Aspects Med*.26:67-96,2005.
- J. Duszynski and L. Wojtczak. The apparent non-linearity of the relationship between the rate of respiration and the protonmotive force of mitochondria can be explained by heterogeneity of mitochondrial preparations. *FEBS Lett*.182:243-8,1985.
- S. L. Elfering, T. M. Sarkela and C. Giulivi. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*.277:38079-86,2002.
- M. Erecinska and D. F. Wilson. Regulation of cellular energy metabolism. *J Membr Biol*.70:1-14,1982.
- A. G. Estevez, N. Spear, J. A. Thompson, T. L. Cornwell, R. Radi, L. Barbeito and J. S. Beckman. Nitric oxide-dependent production of cGMP supports the survival of rat embryonic motor neurons cultured with brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci*.18:3708-14,1998.
- T. Fehr, G. Schoedon, B. Odermatt, T. Holtzschke, M. Schneemann, M. F. Bachmann, T. W. Mak, I. Horak and R. M. Zinkernagel. Crucial role of interferon consensus sequence binding protein, but neither of interferon regulatory factor 1 nor of nitric oxide synthesis for protection against murine listeriosis. *J Exp Med*.185:921-31,1997.
- V. Fitton, M. Rigoulet, O. R. and B. Guérin. Mechanistic stoichiometry of yeast mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry*.33:9692-9698,1994.

- E. Fontaine and P. Bernardi. Progress on the mitochondrial permeability transition pore: regulation by complex I and ubiquinone analogs. *J Bioenerg Biomembr.* 31:335-45, 1999.
- E. Fontaine, O. Eriksson, F. Ichas and P. Bernardi. Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation By electron flow through the respiratory chain complex I. *J Biol Chem.* 273:12662-8, 1998.
- E. Fontaine, M. Moussa, A. Devin, J. Garcia, J. Ghisolfi, M. Rigoulet and X. M. Leverve. Effect of polyunsaturated fatty acid deficiency on oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1276:181-187, 1996.
- N. Fournier, G. Ducet and A. Crevat. Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr.* 19:297-303, 1987.
- J. E. Freedman, J. Loscalzo, M. R. Barnard, C. Alpert, J. F. Keane and A. D. Michelson. Nitric oxide released from activated platelets inhibits platelet recruitment. *J Clin Invest.* 100:350-6, 1997.
- H. Friberg, M. Ferrand-Drake, F. Bengtsson, A. P. Halestrap and T. Wieloch. Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J Neurosci.* 18:5151-9, 1998.
- T. Friedrich, K. Steinmuller and H. Weiss. The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett.* 367:107-11, 1995.
- R. F. Furchgott and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288:373-6, 1980.
- F. R. Gadelha, L. Thomson, M. M. Fagian, A. D. Costa, R. Radi and A. E. Vercesi. Ca²⁺-independent permeabilization of the inner mitochondrial membrane by peroxynitrite is mediated by membrane protein thiol cross-linking and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys.* 345:243-50, 1997.
- M. E. Gegg, S. Salas-Pino, J. P. Bolanos, J. B. Clark, S. Moncada and H. S. J. R. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurons: implications for neuroprotection/neurodegeneration? *J Neurochem.* 86:228-37, 2003.
- A. M. Genaro, S. Hortelano, A. Alvarez, C. Martinez and L. Bosca. Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J Clin Invest.* 95:1884-90, 1995.
- P. Ghafourifar, A. R. Dehpour and N. Akbarloo. Inhibition by L-NA, a nitric oxide synthase inhibitor, of naloxone-precipitated withdrawal signs in a mouse model of cholestasis. *Life Sci.* 60:PL 265-70, 1997a.
- P. Ghafourifar and C. Richter. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Lett.* 418:291-6, 1997b.
- P. Ghafourifar, U. Schenk, S. D. Klein and C. Richter. Mitochondrial nitric-oxide synthase stimulation causes cytochrome *c* release from isolated mitochondria. *J Biol Chem.* 274:31185-31188, 1999.
- S. Ghatan, S. Larner, Y. Kinoshita, M. Hetman, L. Patel, Z. Xia, R. J. Youle and R. S. Morrison. p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol.* 150:335-47, 2000.
- Q. H. Gibson and C. Greenwood. Kinetic Evidence For A Short Lived Intermediate In The Oxidation Of Cytochrome C Oxidase By Molecular Oxygen. *J Biol Chem.* 240:957-8, 1965.
- A. Giuffrè, P. Sarti, E. D'Iri, G. Bue, T. Soulimane and M. Brunori. On the mechanism of inhibition of cytochrome *c* oxidase by nitric oxide. *J Biol Chem.* 271:33404-33408, 1996.

- C. Giulivi, J. J. Poderoso and A. Boveris. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem.* 273:11038-43, 1998.
- D. L. Granger and A. L. Lehninger. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *J Cell Biol.* 95:527-35, 1982.
- G. J. Griffiths, L. Dubrez, C. P. Morgan, N. A. Jones, J. Whitehouse, B. M. Corfe, C. Dive and J. A. Hickman. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol.* 144:903-14, 1999.
- N. Grigorieff. Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr Opin Struct Biol.* 9:476-83, 1999.
- A. K. Groen, R. C. Vervoorn, R. Van der Meer and J. M. Tager. Control of gluconeogenesis in rat liver cells. I. Kinetics of the individual enzymes and the effect of glucagon. *J Biol Chem.* 258:14346-53, 1983.
- A. K. Groen, R. J. Wanders, H. V. Westerhoff, R. van der Meer and J. M. Tager. Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J Biol Chem.* 257:2754-7, 1982.
- A. Gross, J. Jockel, M. C. Wei and S. J. Korsmeyer. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *Embo J.* 17:3878-85, 1998.
- W. L. Gross, M. I. Bak, J. S. Ingwall, M. A. Arstall, T. W. Smith, J. L. Balligand and R. A. Kelly. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:5604-9, 1996.
- V. Guenebaut, A. Schlitt, H. Weiss, K. Leonard and T. Friedrich. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol.* 276:105-12, 1998.
- V. Guenebaut, R. Vincentelli, D. Mills, H. Weiss and K. R. Leonard. Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J Mol Biol.* 265:409-18, 1997.
- B. Guigas, D. Detaille, C. Chauvin, C. Batandier, F. De Oliveira, E. Fontaine and X. Lèverve. Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem J.* 382:877-84, 2004.
- A. P. Halestrap. The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 973:355-82, 1989.
- A. P. Halestrap, K. Y. Woodfield and C. P. Connern. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem.* 272:3346-54, 1997.
- R. G. Hansford, R. Moreno-Sanchez and B. Lewartowski. Activation of pyruvate dehydrogenase complex by Ca²⁺ in intact heart, cardiac myocytes, and cardiac mitochondria. *Ann N Y Acad Sci.* 573:240-53, 1989.
- J. M. Hare, J. F. Keaney, Jr., J. L. Balligand, J. Loscalzo, T. W. Smith and W. S. Colucci. Role of nitric oxide in parasympathetic modulation of beta-adrenergic myocardial contractility in normal dogs. *J Clin Invest.* 95:360-6, 1995.
- M. E. Harper and M. D. Brand. The quantitative contributions of mitochondrial proton leak and ATP turnover reactions to the changed respiration rates of hepatocytes from rats of different thyroid status. *J Biol Chem.* 268:14850-60, 1993.

- B. Hauser, H. Bracht, M. Matejovic, P. Radermacher and B. Venkatesh. Nitric oxide synthase inhibition in sepsis? Lessons learned from large-animal studies. *Anesth Analg*.101:488-98,2005.
- R. A. Haworth and D. R. Hunter. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch Biochem Biophys*.195:460-7,1979.
- L. Hederstedt. Complex II is complex too. *Science*.299:671-672,2003a.
- L. Hederstedt. Structural biology. Complex II is complex too. *Science*.299:671-2,2003b.
- R. Heinrich and T. A. Rapoport. A linear steady-state treatment of enzymatic chains. General properties, control and effector strength. *Eur J Biochem*.42:89-95,1974.
- J. B. Hibbs, Jr., R. R. Taintor and Z. Vavrin. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science*.235:473-6,1987.
- J. B. Hibbs, Jr., R. R. Taintor, Z. Vavrin and E. M. Rachlin. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun*.157:87-94,1988.
- B. C. Hill, T. Brittain, D. G. Eglinton, P. M. Gadsby, C. Greenwood, P. Nicholls, J. Peterson, A. J. Thomson and T. C. Woon. Low-spin ferric forms of cytochrome a₃ in mixed-ligand and partially reduced cyanide-bound derivatives of cytochrome c oxidase. *Biochem J*.215:57-66,1983.
- I. N. Hines, H. Harada, S. Flores, B. Gao, J. M. McCord and M. B. Grisham. Endothelial nitric oxide synthase protects the post-ischemic liver: potential interactions with superoxide. *Biomed Pharmacother*.59:183-9,2005.
- J. Hirst, J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon and J. E. Walker. The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim Biophys Acta*.1604:135-50,2003.
- G. Hofhaus, H. Weiss and K. Leonard. Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J Mol Biol*.221:1027-43,1991.
- V. S. Hollis, M. Palacios-Callender, R. J. Springett, D. T. Delpy and S. Moncada. Monitoring cytochrome redox changes in the mitochondria of intact cells using multi-wavelength visible light spectroscopy. *Biochim Biophys Acta*.1607:191-202,2003.
- C. Holscher. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: its role in synaptic plasticity. *Trends Neurosci*.20:298-303,1997.
- S. Horletano, B. Dallaporta, N. Zamzami, T. Hirsch, S. A. Susin, I. Marzo, L. Bosca and G. Kroemer. Nitric oxide induces apoptosis *via* triggering mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett*.410:373-377,1997.
- S. Hortelano, A. M. Alvarez and L. Bosca. Nitric oxide induces tyrosine nitration and release of cytochrome c preceding an increase of mitochondrial transmembrane potential in macrophages. *Faseb J*.13:2311-7,1999.
- Y. T. Hsu, K. G. Wolter and R. J. Youle. Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*.94:3668-72,1997.
- Y. T. Hsu and R. J. Youle. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem*.273:10777-83,1998.
- J. Hu, A. Ferreira and L. J. Van Eldik. S100beta induces neuronal cell death through nitric oxide release from astrocytes. *J Neurochem*.69:2294-301,1997.
- D. R. Hunter and R. A. Haworth. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*.195:453-9,1979a.

- D. R. Hunter and R. A. Haworth. The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch Biochem Biophys*. 195:468-77, 1979b.
- D. R. Hunter, R. A. Haworth and J. H. Southard. Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem*. 251:5069-77, 1976.
- C. Hägerhall. Succinate: quinone oxidoreductases variations on a conserved theme. *Biochim Biophys Acta*. 1320:107-141, 1997.
- C. Hägerhall and L. Hederstedt. A structural model for the membrane-integral domain of succinate: quinone oxidoreductases. *FEBS Lett*. 389:25-31, 1996.
- L. J. Ignarro. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. *Circ Res*. 65:1-21, 1989.
- L. J. Ignarro, G. M. Buga, K. S. Wood, R. E. Byrns and G. Chaudhuri. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 84:9265-9, 1987.
- T. Ino, T. Nishioka and H. Miyoshi. Characterization of inhibitor binding sites of mitochondrial complex I using fluorescent inhibitor. *Biochim Biophys Acta*. 1605:15-20, 2003.
- A. Jekabsone, Z. Dapkunas, G. C. Brown and V. Borutaite. S-nitrosothiol-induced rapid cytochrome c release, caspase activation and mitochondrial permeability transition in perfused heart. *Biochem Pharmacol*. 66:1513-9, 2003.
- A. Kaasik, A. Minajeva, E. De Sousa, R. Ventura-Clapier and V. Veksler. Nitric oxide inhibits cardiac energy production via inhibition of mitochondrial creatine kinase. *FEBS Lett*. 444:75-7, 1999.
- H. Kacser and J. A. Burns. The control of flux. *Symp Soc Exp Biol*. 27:65-104, 1973.
- B. Kadenbach. Regulation of respiration and ATP synthesis in higher organisms: hypothesis. *J Bioenerg Biomembr*. 18:39-54, 1986.
- B. Kadenbach and S. Arnold. A second mechanism of respiratory control. *FEBS Lett*. 447:131-4, 1999.
- B. Kadenbach, J. Napiwotzki, V. Frank, S. Arnold, S. Exner and M. Huttemann. Regulation of energy transduction and electron transfer in cytochrome c oxidase by adenine nucleotides. *J Bioenerg Biomembr*. 30:25-33, 1998.
- A. J. Kanai, L. L. Pearce, P. R. Clemens, L. A. Birder, M. M. VanBibber, S. Y. Choi, W. C. de Groat and J. Peterson. Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:14126-31, 2001.
- S. Katsuki, W. Arnold, C. Mittal and F. Murad. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J Cyclic Nucleotide Res*. 3:23-35, 1977.
- L. A. Katz, A. P. Koretsky and R. S. Balaban. Respiratory control in the glucose perfused heart. A 31P NMR and NADH fluorescence study. *FEBS Lett*. 221:270-6, 1987.
- J. S. Kim, S. Ohshima, P. Padiaditakis and J. J. Lemasters. Nitric oxide protects rat hepatocytes against reperfusion injury mediated by the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*. 39:1533-43, 2004.
- Y. M. Kim, M. E. de Vera, S. C. Watkins and T. R. Billiar. Nitric oxide protects cultured rat hepatocytes from tumor necrosis factor- α -induced apoptosis by inducing heat shock protein 70 expression. *J Biol Chem*. 272:1402-11, 1997a.

- Y. M. Kim, R. V. Talanian and T. R. Billiar. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem.* 272:31138-48, 1997b.
- S. J. Kish, C. Bergeron, A. Rajput, S. Dozic, F. Mastrogiacomo, L. J. Chang, J. M. Wilson, L. M. DiStefano and J. N. Nobrega. Brain cytochrome oxidase in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 59:776-9, 1992.
- M. Klingenberg. [On the reversibility of oxidative phosphorylation. IV. Relation between the redox state of cytochrome c and the phosphorylation potential of adenosine triphosphate.]. *Biochem Z.* 335:263-72, 1961.
- H. Kobayashi, T. Nonami, T. Kurokawa, Y. Takeuchi, A. Harada, A. Nakao and H. Takagi. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res.* 59:772-9, 1995.
- A. Koivisto, A. Matthias, G. Bronnikov and J. Nedergaard. Kinetics of the inhibition of mitochondrial respiration by NO. *FEBS Lett.* 417:75-80, 1997.
- A. Koivisto, J. Pittner, M. Froelich and A. E. Persson. Oxygen-dependent inhibition of respiration in isolated renal tubules by nitric oxide. *Kidney Int.* 55:2368-75, 1999.
- J. E. Kokoszka, K. G. Waymire, S. E. Levy, J. E. Sligh, J. Cai, D. P. Jones, G. R. MacGregor and D. C. Wallace. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature.* 427:461-5, 2004.
- E. A. Konorev, N. Hogg and B. Kalyanaraman. Rapid and irreversible inhibition of creatine kinase by peroxynitrite. *FEBS Lett.* 427:171-4, 1998.
- S. Krajewski, S. Tanaka, S. Takayama, M. J. Schibler, W. Fenton and J. C. Reed. Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 53:4701-14, 1993.
- G. Krishnamoorthy and P. C. Hinkle. Non-ohmic proton conductance of mitochondria and liposomes. *Biochemistry.* 23:1640-5, 1984.
- W. Kunz, R. Bohnsack, G. Bohme, U. Kuster, G. Letko and P. Schonfeld. Relations between extramitochondrial and intramitochondrial adenine nucleotide systems. *Arch Biochem Biophys.* 209:219-29, 1981.
- Y. G. Kwon, J. K. Min, K. M. Kim, D. J. Lee, T. R. Billiar and Y. M. Kim. Sphingosine 1-phosphate protects human umbilical vein endothelial cells from serum-deprived apoptosis by nitric oxide production. *J Biol Chem.* 276:10627-33, 2001.
- R. Laffranchi and G. A. Spinas. Interleukin 10 inhibits insulin release from and nitric oxide production in rat pancreatic islets. *Eur J Endocrinol.* 135:374-8, 1996.
- C. R. Lancaster. Succinate:quinone oxidoreductases: an overview. *Biochim Biophys Acta.* 1553:1-6, 2002.
- C. R. Lancaster and A. Kroger. Succinate: quinone oxidoreductases: new insights from X-ray crystal structures. *Biochim Biophys Acta.* 1459:422-31, 2000.
- X. M. Leverage and E. Fontaine. Role of substrates in the regulation of mitochondrial function *in situ*. *IUBMB Life.* 52:221-229, 2001.
- X. M. Leverage, E. Fontaine, F. Putod-Paramelle and M. Rigoulet. Decrease in cytosolic ATP/ADP ratio and activation of pyruvate kinase after in vitro addition of almitrine in hepatocytes isolated from fasted rats. *Eur J Biochem.* 224:967-74, 1994.
- J. Li, C. A. Bombeck, S. Yang, Y. M. Kim and T. R. Billiar. Nitric oxide suppresses apoptosis via interrupting caspase activation and mitochondrial dysfunction in cultured hepatocytes. *J Biol Chem.* 274:17325-33, 1999.

- P. Li, D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri and X. Wang. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*.91:479-89,1997.
- L. Liu and J. S. Stamler. NO: an inhibitor of cell death. *Cell Death Differ*.6:937-42,1999.
- X. Liu, C. N. Kim, J. Yang, R. Jemmerson and X. Wang. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*.86:147-57,1996.
- I. Lizasoain, M. A. Moro, R. G. Knowles, V. Darley-Usmar and S. Moncada. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J*.314 (Pt 3):877-80,1996.
- M. Loeffler and G. Kroemer. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*.256:19-26,2000.
- E. Lopez-Collazo, J. Mateo, M. T. Miras-Portugal and L. Bosca. Requirement of nitric oxide and calcium mobilization for the induction of apoptosis in adrenal vascular endothelial cells. *FEBS Lett*.413:124-8,1997.
- S. Luvisetto, E. Conti, M. Buso and G. F. Azzone. Flux ratios and pump stoichiometries at sites II and III in liver mitochondria. *J Biol Chem*.266:1034-1042,1991.
- S. Luvisetto, D. Pietrobon and G. F. Azzone. Uncoupling of oxidative phosphorylation. 1. Protonophoric effects account only partially for uncoupling. *Biochemistry*.26:7332-7338,1987.
- J. MacMicking, Q. W. Xie and C. Nathan. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol*.15:323-50,1997.
- J. B. Mannick, K. Asano, K. Izumi, E. Kieff and J. S. Stamler. Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell*.79:1137-46,1994.
- J. B. Mannick, X. Q. Miao and J. S. Stamler. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem*.272:24125-8,1997.
- P. Martin-Sanz, M. J. Diaz-Guerra, M. Casado and L. Bosca. Bacterial lipopolysaccharide antagonizes transforming growth factor beta 1-induced apoptosis in primary cultures of hepatocytes. *Hepatology*.23:1200-7,1996.
- I. Marzo, C. Brenner, N. Zamzami, S. A. Susin, G. Beutner, D. Brdiczka, R. Remy, Z. H. Xie, J. C. Reed and G. Kroemer. The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*.187:1261-71,1998.
- P. T. Massa and C. Wu. Increased inducible activation of NF-kappaB and responsive genes in astrocytes deficient in the protein tyrosine phosphatase SHP-1. *J Interferon Cytokine Res*.18:499-507,1998.
- G. Melino, F. Bernassola, R. A. Knight, M. T. Corasaniti, G. Nistico and A. Finazzi-Agro. S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature*.388:432-3,1997.
- U. K. Messmer and B. Brune. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signalling pathways. *Biochem J*.319 (Pt 1):299-305,1996a.
- U. K. Messmer, U. K. Reed and B. Brune. Bcl-2 protects macrophages from nitric oxide-induced apoptosis. *J Biol Chem*.271:20192-7,1996b.
- J. Meyer. Comparison of carbon monoxide, nitric oxide, and nitrite as inhibitors of the nitrogenase from *Clostridium pasteurianum*. *Arch Biochem Biophys*.210:246-56,1981.
- P. Mitchell. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*.191:144-8,1961.

- P. Mitchell and J. Moyle. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*. 213:137-9, 1967.
- R. Moreno-Sanchez, B. A. Hogue and R. G. Hansford. Influence of NAD-linked dehydrogenase activity on flux through oxidative phosphorylation. *Biochem J*. 268:421-8, 1990.
- R. Moriya, T. Uehara and Y. Nomura. Mechanism of nitric oxide-induced apoptosis in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *FEBS Lett*. 484:253-60, 2000.
- M. P. Murphy and M. D. Brand. Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain. *Nature*. 329:170-2, 1987.
- S. Murphy, M. L. Simmons, L. Agullo, A. Garcia, D. L. Feinstein, E. Galea, D. J. Reis, D. Minc-Golomb and J. P. Schwartz. Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells. *Trends Neurosci*. 16:323-8, 1993.
- T. Nakagawa, S. Shimizu, T. Watanabe, O. Yamaguchi, K. Otsu, H. Yamagata, H. Inohara, T. Kubo and Y. Tsujimoto. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 434:652-8, 2005.
- M. Narita, S. Shimizu, T. Ito, T. Chittenden, R. J. Lutz, H. Matsuda and Y. Tsujimoto. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:14681-6, 1998.
- K. M. Naseem. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Mol Aspects Med*. 26:33-65, 2005.
- D. G. Nicholls. The influence of respiration and ATP hydrolysis of the proton-electrochemical gradient across the inner membrane of rat-liver mitochondria as determined by ion distribution. *Eur J Biochem*. 50:305-315, 1974.
- P. Nicholls, K. J. van Buuren and B. F. van Gelder. Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa 3. 8. Effect of cyanide on the catalytic activity. *Biochim Biophys Acta*. 275:279-87, 1972.
- A. Nicolli, V. Petronilli and P. Bernardi. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*. 32:4461-5, 1993.
- P. Nicotera, F. Bernassola and G. Melino. Nitric oxide (NO), a signaling molecule with a killer soul. *Cell Death Differ*. 6:931-3, 1999.
- P. Nicotera, E. Bonfoco and B. Brune. Mechanisms for nitric oxide-induced cell death: involvement of apoptosis. *Adv Neuroimmunol*. 5:411-20, 1995.
- M. Nishikawa, E. F. Sato, T. Kuroki and M. Inoue. Role of glutathione and nitric oxide in the energy metabolism of rat liver mitochondria. *FEBS Lett*. 415:341-5, 1997.
- M. Nishikawa, E. F. Sato, K. Utsumi and M. Inoue. Oxygen-dependent regulation of energy metabolism in ascites tumor cells by nitric oxide. *Cancer Res*. 56:4535-40, 1996.
- C. D. Nobes, G. C. Brown, P. N. Olive and M. D. Brand. Non-ohmic proton conductance of the mitochondrial inner membrane in hepatocytes. *J Biol Chem*. 265:12903-9, 1990.
- V. Nogueira, M. A. Piquet, A. Devin, C. Fiore, E. Fontaine, G. Brandolin, M. Rigoulet and X. M. Leverve. Mitochondrial adaptation to in vivo polyunsaturated fatty acid deficiency: increase in phosphorylation efficiency. *J Bioenerg Biomembr*. 33:53-61, 2001.
- V. Nogueira, L. Walter, N. Averet, E. Fontaine, M. Rigoulet and X. M. Leverve. Thyroid status is a key regulator of both flux and efficiency of oxidative phosphorylation in rat hepatocytes. *J Bioenerg Biomembr*. 34:55-66, 2002.

- T. Ohnishi, C. C. Moser, C. C. Page, P. L. Dutton and T. Yano. Simple redox-linked proton-transfer design: new insights from structures of quinol-fumarate reductase. *Structure Fold Des.* 8:R23-32, 2000.
- J. G. Okun, P. Lummen and U. Brandt. Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J Biol Chem.* 274:2625-30, 1999.
- M. A. Packer and M. P. Murphy. Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett.* 345:237-40, 1994.
- E. Padan and H. Rottenberg. Respiratory control and the proton electrochemical gradient in mitochondria. *Eur J Biochem.* 40:431-7, 1973.
- R. M. Palmer, A. G. Ferrige and S. Moncada. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 327:524-6, 1987.
- R. M. Palmer, D. D. Rees, D. S. Ashton and S. Moncada. L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation. *Biochem Biophys Res Commun.* 153:1251-6, 1988.
- S. Papa, N. Capitanio, G. Capitanio, E. De Nitto and M. Minuto. The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H^+/e^- stoichiometry. *FEBS Lett.* 288:183-186, 1991.
- S. Papa, N. Capitanio and E. De Nitto. Characteristics of the redox-linked proton ejection in beef-heart cytochrome c oxidase reconstituted in liposomes. *Eur J Biochem.* 164:507-516, 1987.
- E. Paraskeva and M. W. Hentze. Iron-sulphur clusters as genetic regulatory switches: the bifunctional iron regulatory protein-1. *FEBS Lett.* 389:40-3, 1996.
- J. G. Pastorino, S. T. Chen, M. Tafani, J. W. Snyder and J. L. Farber. The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem.* 273:7770-5, 1998.
- J. G. Pastorino and J. B. Hoek. Ethanol potentiates tumor necrosis factor- α cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology.* 31:1141-52, 2000.
- S. D. Patterson, C. S. Spahr, E. Daugas, S. A. Susin, T. Irinopoulou, C. Koehler and G. Kroemer. Mass spectrometric identification of proteins released from mitochondria undergoing permeability transition. *Cell Death Differ.* 7:137-44, 2000.
- M. Perreault and A. Marette. Targeted disruption of inducible nitric oxide synthase protects against obesity-linked insulin resistance in muscle. *Nat Med.* 7:1138-43, 2001.
- S. Pervin, R. Singh and G. Chaudhuri. Nitric-oxide-induced Bax integration into the mitochondrial membrane commits MDA-MB-468 cells to apoptosis: essential role of Akt. *Cancer Res.* 63:5470-9, 2003.
- V. Petronilli, P. Costantini, L. Scorrano, R. Colonna, S. Passamonti and P. Bernardi. The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J Biol Chem.* 269:16638-42, 1994a.
- V. Petronilli, A. Nicolli, P. Costantini, R. Colonna and P. Bernardi. Regulation of the permeability transition pore, a voltage-dependent mitochondrial channel inhibited by cyclosporin A. *Biochim Biophys Acta.* 1187:255-9, 1994b.
- V. Petronilli, D. Penzo, L. Scorrano, P. Bernardi and F. Di Lisa. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem.* 276:12030-4, 2001.

- C. A. Piantadosi, L. G. Tatro and A. R. Whorton. Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition. *Nitric Oxide*.6:45-60,2002.
- D. Pietrobon, G. F. Azzone and D. Walz. Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-driven H^+ -pumps in mitochondria: on the nature of "leaks". *Eur J Biochem*.117:389-394,1981.
- D. Pietrobon and S. R. Caplan. Flow-force relationships for a six-state proton pump model: intrinsic uncoupling, kinetic equivalence of input and output forces, and domain of approximative linearity. *Biochemistry*.24:5764-5776,1985.
- D. Pietrobon, S. Luvisetto and G. F. Azzone. Uncoupling of oxidative phosphorylation. 2. Alternative mechanisms: intrinsic uncoupling or decoupling? *Biochemistry*.26:7339-7347,1987.
- D. Pietrobon, M. Zoratti and G. F. Azzone. Molecular slipping in redox and ATPase H^+ pumps. *Biochim Biophys Acta*.723:317-321,1983.
- D. Pietrobon, M. Zoratti, G. F. Azzone and S. R. Caplan. Intrinsic uncoupling of mitochondrial proton pumps. 2. Modeling studies. *Biochemistry*.25:767-75,1986.
- M. A. Piquet, E. Fontaine, B. Sibille, C. Filippi, C. Keriel and X. M. Lerverve. Uncoupling effect of polyunsaturated fatty acid deficiency in isolated rat hepatocytes: effect on glycerol metabolism. *Biochem J*.317:667-674,1996.
- M. A. Piquet, V. Nogueira, A. Devin, B. Sibille, C. Filippi, E. Fontaine, M. Roulet, M. Rigoulet and X. M. Lerverve. Chronic ethanol ingestion increases efficiency of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *FEBS*.468:239-242,2000.
- J. J. Poderoso, M. C. Carreras, C. Lisdero, N. Riobo, A. Schöpfer and A. Boveris. Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondrial and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys*.328:85-92,1996.
- E. Racker. Mechanisms of synthesis of adenosine triphosphate. *Adv Enzyme Regul*.23:323-99,1961.
- D. Reddy, J. R. Lancaster, Jr. and D. P. Cornforth. Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes. *Science*.221:769-70,1983.
- C. Richter, V. Gogvadze, R. Schlapbach, M. Schweizer and J. Schlegel. Nitric oxide kills hepatocytes by mobilizing mitochondrial calcium. *Biochem Biophys Res Commun*.205:1143-50,1994.
- N. A. Riobo, E. Clementi, M. Melani, A. Boveris, E. Cadenas, S. Moncada and J. J. Poderoso. Nitric oxide inhibits mitochondrial NADH:ubiquinone reductase activity through peroxynitrite formation. *Biochem J*.359:139-45,2001.
- N. Rodic, M. Oka, T. Hamazaki, M. R. Murawski, M. Jorgensen, D. M. Maatouk, J. L. Resnick, E. Li and N. Terada. DNA methylation is required for silencing of Ant4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells*.2005.
- R. Rognstad. Rate-limiting steps in metabolic pathways. *J Biol Chem*.254:1875-8,1979.
- H. Rottenberg. Uncoupling of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria by general anesthetics. *Proc Natl Acad Sci U S A*.80:3313-3317,1983.
- D. Roussel, J. F. Dumas, G. Simard, Y. Malthiéry and P. Ritz. Kinetics and control of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondrial after dexamethasone treatment. *Biochem J*.382:491-499,2004.
- M. J. Runswick, I. M. Fearnley, J. M. Skehel and J. E. Walker. Presence of an acyl carrier protein in NADH: ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett*.286:121-124,1991.

- A. Saavedra-Molina, J. Ramirez-Emiliano, M. Clemente-Guerrero, V. Perez-Vazquez, L. Aguilera-Aguirre and J. C. Gonzalez-Hernandez. Mitochondrial nitric oxide inhibits ATP synthesis. Effect of free calcium in rat heart. *Amino Acids*.24:95-102,2003.
- M. Saraste. Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science*.283:1488-93,1999.
- P. Sarti, A. Giuffrè, E. Forte, D. Mastronicola, M. C. Barone and M. Brunori. Nitric oxide and cytochrome *c* oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation. *Biochem Biophys Res Commun*.274:183-187,2000.
- P. Sarti, M. G. Jones, G. Antonini, F. Malatesta, A. Colosimo, M. T. Wilson and M. Brunori. Kinetics of redox-linked proton pumping activity of native and subunit III-depleted cytochrome *c* oxidase: a stopped-flow investigation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.82:4876-80,1985.
- P. Sarti, E. Lendaro, R. Ippoliti, A. Bellelli, P. A. Benedetti and M. Brunori. Modulation of mitochondrial respiration by nitric oxide: investigation by single cell fluorescence microscopy. *Faseb J*.13:191-7,1999.
- A. H. Schapira, V. M. Mann, J. M. Cooper, D. Dexter, S. E. Daniel, P. Jenner, J. B. Clark and C. D. Marsden. Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*.55:2142-5,1990.
- H. H. Schmidt, J. S. Pollock, M. Nakane, U. Forstermann and F. Murad. Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium*.13:427-34,1992.
- B. E. Schultz and S. I. Chan. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*.30:23-65,2001.
- M. Schweizer and C. Richter. Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Commun*.204:169-75,1994.
- C. Sciorati, P. Rovere, M. Ferrarini, S. Heltai, A. A. Manfredi and E. Clementi. Autocrine nitric oxide modulates CD95-induced apoptosis in gamma delta T lymphocytes. *J Biol Chem*.272:23211-5,1997.
- M. A. Sharpe and C. E. Cooper. Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. *J Biol Chem*.273:30961-30972,1998.
- W. Shen, T. H. Hintze and M. S. Wolin. Nitric oxide. An important signaling mechanism between vascular endothelium and parenchymal cells in the regulation of oxygen consumption. *Circulation*.92:3505-12,1995.
- W. Shen, R. Tian, K. W. Saupe, M. Spindler and J. S. Ingwall. Endogenous nitric oxide enhances coupling between O₂ consumption and ATP synthesis in guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.281:H838-46,2001.
- Y. Shidoji, K. Hayashi, S. Komura, N. Ohishi and K. Yagi. Loss of molecular interaction between cytochrome *c* and cardiolipin due to lipid peroxidation. *Biochem Biophys Res Commun*.264:343-7,1999.
- S. Shimizu, T. Ide, T. Yanagida and Y. Tsujimoto. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the voltage-dependent anion channel that is permeable to cytochrome *c*. *J Biol Chem*.275:12321-5,2000a.
- S. Shimizu, M. Narita and Y. Tsujimoto. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature*.399:483-7,1999.
- S. Shimizu, Y. Shinohara and Y. Tsujimoto. Bax and Bcl-xL independently regulate apoptotic changes of yeast mitochondria that require VDAC but not adenine nucleotide translocator. *Oncogene*.19:4309-18,2000b.

- E. C. Slater, J. A. Berden and M. A. Herweijer. A hypothesis for the mechanism of respiratory-chain phosphorylation not involving the electrochemical gradient of protons as obligatory intermediate. *Biochim Biophys Acta*. 811:217-31, 1985.
- J. M. Souza and R. Radi. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inactivation by peroxynitrite. *Arch Biochem Biophys*. 360:187-94, 1998.
- D. R. Springall. Nitric oxide--friend and foe. *J Pathol*. 175:165-6, 1995.
- H. Steen, J. G. Maring and D. K. Meijer. Differential effects of metabolic inhibitors on cellular and mitochondrial uptake of organic cations in rat liver. *Biochem Pharmacol*. 45:809-18, 1993.
- D. J. Stuehr. Mammalian nitric oxide synthases. *Biochim Biophys Acta*. 1411:217-30, 1999.
- D. J. Stuehr and C. F. Nathan. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J Exp Med*. 169:1543-55, 1989.
- T. Stumpe, U. K. Decking and J. Schrader. Nitric oxide reduces energy supply by direct action on the respiratory chain in isolated cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 280:H2350-6, 2001.
- M. Suzuki, R. J. Youle and N. Tjandra. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell*. 103:645-54, 2000.
- K. Takuma, P. Phuagphong, E. Lee, K. Mori, A. Baba and T. Matsuda. Anti-apoptotic effect of cGMP in cultured astrocytes: inhibition by cGMP-dependent protein kinase of mitochondrial permeable transition pore. *J Biol Chem*. 276:48093-9, 2001.
- A. Tatoyan and C. Giulivi. Purification and characterization of a nitric-oxide synthase from rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 273:11044-8, 1998.
- H. Terada. Uncouplers of oxidative phosphorylation. *Environ Health Perspect*. 87:213-8, 1990.
- J. Torres, C. E. Cooper and M. T. Wilson. A common mechanism for the interaction of nitric oxide with oxidized binuclear centre and oxygen intermediates of cytochrome *c* oxidase. *J Biol Chem*. 273:8756-8766, 1998.
- J. Torres, V. M. Darley-Usmar and M. T. Wilson. Inhibition of cytochrome *c* oxidase in turnover by nitric oxide: mechanism and implications for control of respiration. *Biochem J*. 312:169-173, 1995.
- A. Ushmorov, F. Ratter, V. Lehmann, W. Droge, V. Schirmmacher and V. Umansky. Nitric-oxide-induced apoptosis in human leukemic lines requires mitochondrial lipid degradation and cytochrome C release. *Blood*. 93:2342-52, 1999.
- K. J. van Buuren, P. Nicholis and B. F. van Gelder. Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa 3. VI. Reaction of cyanide with oxidized and reduced enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 256:258-76, 1972a.
- K. J. van Buuren, P. F. Zuurendonk, B. F. van Gelder and A. O. Muijsers. Biochemical and biophysical studies on cytochrome aa 3. V. Binding of cyanide to cytochrome aa 3. *Biochim Biophys Acta*. 256:243-57, 1972b.
- K. Van Dam, Y. Shinohara, A. Unami, K. Yoshida and H. Terada. Slipping pumps or proton leaks in oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*. 277:131-133, 1990.
- R. Van Der Meer and J. M. Tager. A simple method for the perfusion of isolated liver cells. *FEBS Lett*. 67:36-40, 1976.
- A. E. Vercesi, A. J. Kowaltowski, M. T. Grijalba, A. R. Meinicke and R. F. Castilho. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. *Biosci Rep*. 17:43-52, 1997.

- P. V. Vignais. Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. *Biochim Biophys Acta*.456:1-38,1976a.
- P. V. Vignais. The mitochondrial adenine nucleotide translocator. *J Bioenerg*.8:9-17,1976b.
- A. M. Vincent, Y. Mohammad, I. Ahmad, R. Greenberg and K. Maiese. Metabotropic glutamate receptors prevent nitric oxide-induced programmed cell death. *J Neurosci Res*.50:549-64,1997.
- A. D. Vinogradov. Respiratory complex I: structure, redox components, and possible mechanisms of energy transduction. *Biochemistry (Moscow)*.66:1346-1360,2001.
- L. Virag, D. J. Marmer and C. Szabo. Crucial role of apopain in the peroxynitrite-induced apoptotic DNA fragmentation. *Free Radic Biol Med*.25:1075-82,1998.
- W. W. Wainio. Reactions of cytochrome oxidase. *J Biol Chem*.212:723-733,1955.
- R. J. Wanders, A. K. Groen, A. J. Meijer and J. M. Tager. Determination of the free-energy difference of the adenine nucleotide translocator reaction in rat-liver mitochondria using intra- and extramitochondrial ATP-utilizing reactions. *FEBS Lett*.132:201-6,1981.
- G. Wang, D. A. Liem, T. M. Vondriska, H. M. Honda, P. Korge, D. M. Pantaleon, X. Qiao, Y. Wang, J. N. Weiss and P. Ping. Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*.288:H1290-5,2005.
- Y. Wang and P. A. Marsden. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol*.34:71-90,1995.
- J. B. Warshaw, K. W. Lam and D. R. Sanadi. Studies on oxidative phosphorylation. XII. Uncoupling of energy-linked reactions by 2-thenoyltrifluoroacetone. *Arch Biochem Biophys*.115:312-7,1966.
- H. Weiss and T. Friedrich. Redox-linked proton translocation by NADH-ubiquinone reductase (complex I). *J Bioenerg Biomembr*.23:743-54,1991.
- R. Welter, L. Yu and C. A. Yu. The effects of nitric oxide on electron transport complexes. *Arch Biochem Biophys*.331:9-14,1996.
- H. V. Westerhoff, S. L. Helgerson, S. M. Theg, O. van Kooten, M. Wikstrom, V. P. Skulachev and Z. Dancshazy. The present state of the chemiosmotic coupling theory. *Acta Biochim Biophys Acad Sci Hung*.18:129-49,1983.
- M. Wikstrom. Cytochrome c oxidase: 25 years of the elusive proton pump. *Biochim Biophys Acta*.1655:241-7,2004.
- M. Wikstrom, A. Bogachev, M. Finel, J. E. Morgan, A. Puustinen, M. Raitio, M. Verkhovskaya and M. I. Verkhovsky. Mechanism of proton translocation by the respiratory oxidases. The histidine cycle. *Biochim Biophys Acta*.1187:106-11,1994.
- M. K. Wikstrom. Proton pump coupled to cytochrome c oxidase in mitochondria. *Nature*.266:271-3,1977.
- R. J. Williams. The history and the hypotheses concerning ATP-formation by energised protons. *FEBS Lett*.85:9-19,1978.
- H. Wolosker, R. Panizzutti and S. Engelender. Inhibition of creatine kinase by S-nitrosoglutathione. *FEBS Lett*.392:274-6,1996.
- J. M. Wrigglesworth, C. E. Cooper, M. A. Sharpe and P. Nicholls. The proteoliposomal steady state. Effect of size, capacitance and membrane permeability on cytochrome-oxidase-induced ion gradients. *Biochem J*.270:109-18,1990.

- C. C. Wu, H. J. Hong, T. C. Chou, Y. A. Ding and M. H. Yen. Evidence for inducible nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 228:459-66, 1996.
- Q. L. Wu, X. P. Wu, Y. J. Liang, L. M. Chen, Y. Ding and L. W. Fu. P-glycoprotein is not involved in pathway of anti-Fas/Fas-induced apoptosis in KBv200 cells. *World J Gastroenterol.* 11:3544-8, 2005.
- D. Xia, C. A. Yu, H. Kim, J. Z. Xia, A. M. Kachurin, L. Zhang, L. Yu and J. Deisenhofer. Crystal structure of the cytochrome bc₁ complex from bovine heart mitochondria. *Science.* 277:60-6, 1997.
- Y. W. Xie, W. Shen, G. Zhao, X. Xu, M. S. Wolin and T. H. Hintze. Role of endothelium-derived nitric oxide in the modulation of canine myocardial mitochondrial respiration in vitro. Implications for the development of heart failure. *Circ Res.* 79:381-7, 1996a.
- Y. W. Xie and M. S. Wolin. Role of nitric oxide and its interaction with superoxide in the suppression of cardiac muscle mitochondrial respiration. Involvement in response to hypoxia/reoxygenation. *Circulation.* 94:2580-6, 1996b.
- M. Yabuki, K. Tsutsui, A. A. Horton, T. Yoshioka and K. Utsumi. Caspase activation and cytochrome c release during HL-60 cell apoptosis induced by a nitric oxide donor. *Free Radic Res.* 32:507-14, 2000.
- V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Törnroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Léger, B. Byrne, G. Cecchini and S. Ivata. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species regeneration. *Science.* 299:700-704, 2003.
- C. H. Yeh, Y. M. Lin, Y. C. Wu, Y. C. Wang and P. J. Lin. Nitric oxide attenuates cardiomyocytic apoptosis via diminished mitochondrial complex I up-regulation from cardiac ischemia-reperfusion injury under cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 128:180-8, 2004.
- S. Yoshikawa. Cytochrome c oxidase. *Adv Protein Chem.* 60:341-95, 2002.
- M. Yoshioka, W. G. Bradley, P. Shapshak, I. Nagano, R. V. Stewart, K. Q. Xin, A. K. Srivastava and S. Nakamura. Role of immune activation and cytokine expression in HIV-1-associated neurologic diseases. *Adv Neuroimmunol.* 5:335-58, 1995.
- S. W. Yu, H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson and V. L. Dawson. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science.* 297:259-63, 2002.
- N. Zamzami, P. Marchetti, M. Castedo, T. Hirsch, S. A. Susin, B. Masse and G. Kroemer. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.* 384:53-7, 1996.
- J. Zhang, G. Gong, Y. Ye, T. Guo, A. Mansoor, Q. Hu, K. Ochiai, J. Liu, X. Wang, Y. Cheng, N. Iverson, J. Lee, A. H. From, K. Ugurbil and R. J. Bache. Nitric oxide regulation of myocardial O₂ consumption and HEP metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H310-6, 2005.
- Z. Zhang, E. A. Berry, L. S. Huang and S. H. Kim. Mitochondrial cytochrome bc₁ complex. *Subcell Biochem.* 35:541-80, 2000.
- G. Zhao, R. D. Bernstein and T. H. Hintze. Nitric oxide and oxygen utilization: exercise, heart failure and diabetes. *Coron Artery Dis.* 10:315-20, 1999a.
- G. Zhao, X. Zhang, C. J. Smith, X. Xu, M. Ochoa, D. Greenhouse, T. Vogel, C. Curran and T. H. Hintze. Reduced coronary NO production in conscious dogs after the development of alloxan-induced diabetes. *Am J Physiol.* 277:H268-78, 1999b.

M. Zoratti, M. Favaron, D. Pietrobon and G. F. Azzone. Intrinsic uncoupling of mitochondrial proton pumps. I. Non-ohmic conductance cannot account for the nonlinear dependence of static head respiration on delta microH. *Biochemistry*. 25:760-7, 1986.

M. Zoratti and I. Szabo. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1241:139-76, 1995.

J. L. Zweier, A. Samouilov and P. Kuppusamy. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta*. 1411:250-62, 1999.

PUBLICATION

Le monoxyde d'azote (NO) est formé à partir de L-arginine par la famille des NO synthases. La dysrégulation de la synthèse de cette molécule de signalisation cellulaire est impliquée dans le développement d'un grand nombre de pathologies. Les effets cellulaires du NO sont en partie dus à une inhibition des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Nous nous sommes intéressés aux effets du NO sur la régulation de l'oxydation phosphorylante et de la transition de perméabilité, deux processus mitochondriaux gouvernant la survie cellulaire.

Nous avons ainsi démontré que l'inhibition de la cytochrome c oxydase (COX) par le NO était associée à une inhibition de la respiration et de la synthèse d'ATP. Cependant le NO augmente l'efficacité de l'oxydation phosphorylante (ATP/O) en diminuant le processus de « slipping ». Toutefois, notre travail a mis en exergue un effet du NO dépendant du substrat utilisé. En présence de NADH seul, le NO n'a pas l'effet bénéfique sur le rendement de l'oxydation phosphorylante, obtenu avec le FADH₂ seul ou associé au NADH. L'étude de l'état d'oxydoréduction des cytochromes de la COX a révélé que dans les mitochondries énergisées avec du FADH₂ seul ou en association avec le NADH, les cytochromes aa₃ sont plus réduits qu'en présence de NADH seul. Nous pouvons suggérer que le « slipping » au niveau de la COX soit dépendant de l'état d'oxydoréduction de ses cytochromes. Le NO pourrait donc être un régulateur physiologique du processus d'oxydation phosphorylante.

Nous avons également cherché à étayer l'hypothèse selon laquelle l'inhibition du complexe I aurait un effet anti-apoptotique en inhibant l'ouverture du PTP et la libération de cytochrome c. Le NO ayant un effet sur la chaîne respiratoire dans sa globalité, nous n'avons pu certifier que son effet activateur sur l'ouverture du pore soit dû à l'inhibition d'un complexe en particulier. Il semble que le phénomène de transition de perméabilité soit sensible à l'inhibition du complexe II. L'inhibition du complexe II par un inhibiteur comme le TTFA ou le malonate aurait un effet pro-apoptotique et ce malgré la présence d'inhibiteurs puissants du PTP comme la ciclosporine. Ces résultats suggèrent que le complexe II ferait partie des complexes protéiques régulateurs du PTP et que son inhibition soit dominante sur l'effet induit par l'inhibition du complexe I.

Mots clés : monoxyde d'azote, mitochondries, oxydation phosphorylante, cytochromes, pore de transition de perméabilité, apoptose.

Nitric oxide (NO) is produced from L-Arginine by the NO synthase family. Dysregulation of the synthesis of this signal molecule is involved in the development of numerous pathologies. The cellular effects of NO are partly due to the inhibition of the complexes of the mitochondrial respiratory chain.

We studied the NO regulation of the oxidative phosphorylation and the permeability transition, two mitochondrial processes controlling cellular survival.

We have demonstrated that the inhibition of cytochrome c oxidase (COX) by NO was associated with an inhibition of the respiration and the ATP synthesis. However, NO increased the yield of oxidative phosphorylation (ATP/O) due to a reduction in the « slipping ». Our work highlights an effect of NO which depends on the substrate used. Indeed, in the presence of NADH-linked substrates, NO does not have the beneficial effect on the yield of the oxidative phosphorylation, that obtained in the presence of FADH₂-linked substrates with or without NADH-linked substrates. The study of the redox status of the cytochromes of the COX revealed that in mitochondria energized with FADH₂-linked substrates with or without NADH-linked substrates, the cytochromes aa₃ are more reduced than in the presence of NADH-linked substrates alone. We can suggest that the « slipping » depends on the redox status of the cytochrome aa₃. NO could thus physiologically increase oxidative phosphorylation efficiency.

We also sought to support the hypothesis that the inhibition of complex I would have an anti-apoptotic effect by inhibiting the PTP opening and the cytochrome c release. Because NO acts on the whole respiratory chain, we could not certify that this activating effect of the pore opening is due to an inhibition of a complex in particular. It seems that the permeability transition is sensitive to the complex II inhibition. Inhibition of the complex II by inhibitors like TTFA or malonate would have a pro-apoptotic effect despite the presence of powerful inhibitor of PTP such as cyclosporine. This results suggests that complex II belongs to the regulating proteic complexes of the PTP and that its inhibition prevails over the effect induced by the inhibition of complex I.

Keywords : nitric oxide, mitochondria, oxidative phosphorylation, cytochromes, permeability transition pore, apoptosis.
