



HAL
open science

Implication des toxiques environnementaux dans la régulation mitochondriale et pathologies associées

Mohammed El Amine Benarbia

► **To cite this version:**

Mohammed El Amine Benarbia. Implication des toxiques environnementaux dans la régulation mitochondriale et pathologies associées. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2012. Français. NNT : . tel-00995354

HAL Id: tel-00995354

<https://theses.hal.science/tel-00995354>

Submitted on 23 May 2014

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.

**Implication des toxiques environnementaux
(lindane/chlordécone) dans la régulation mitochondriale
et pathologies associées**

Thèse de doctorat

Spécialité : Biologie cellulaire
Ecole doctorale : Biologie Santé

Présentée et soutenue publiquement le 13 Novembre 2012 par

Mohammed el Amine BENARBIA

Devant le jury ci-dessous :

Membres du jury :

Jean-Charles Deybach, PU-PH, rapporteur.

Dominique Giorgi, DR2 CNRS, rapporteur.

Norbert Ifrah, PU-PH, examinateur.

Yves Malthièry, PU-PH, directeur de thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude et ma reconnaissance envers Monsieur Yves Malthiery pour son accueil dans son laboratoire, ses conseils, son encadrement et sa disponibilité. Plus qu'un directeur de thèse, vous étiez un mentor. Merci !

Je remercie vivement :

Monsieur Jean Charles Deybach et Monsieur Dominique Giorgi d'avoir accepté d'être rapporteurs et de donner de leur temps pour juger ce travail. Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance.

Monsieur Norbert Ifrah d'avoir accepté de faire partie de ce jury et de donner de son temps pour juger ce travail.

Messieurs David Mascherel et Roger Rahmani d'avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse ainsi que pour leurs conseils et orientations durant les réunions annuelles.

Monsieur Jean-Philippe Antignac de l'intérêt qu'il a montré pour mon travail.

Les membres de l'équipe INSERM U.1063 SOPAM (INSERM U.694) pour les échanges scientifiques lors des réunions du lundi, Monsieur Ramaroson Andriantsitohaina, son directeur ainsi que Madame Carmen Martinez et Monsieur Sébastien Faure. Je vous souhaite une bonne continuation dans l'unité SOPAM nouvellement créée.

Caroline Jacques pour les standards des PCR et ses conseils technologiques ainsi que Emilie Lauret pour m'avoir formé aux différentes techniques de biologie moléculaire et d'imagerie confocale.

Un clin d'œil particulier à celles et ceux avec qui j'ai partagé mon bureau à L'IRIS : *Mireille, Alexis, Nicolas, Kim et Raffaella* (mes félicitations pour Marta). Merci pour votre bonne humeur.

Aussi aux autres membres de l'équipe SOPAM : Audrey, Jacques, Lucie, Sylvain et Wojteck.

Je remercie aussi, *Daniella, Gaceb et Luisa*, pour leur amitié et disponibilité aussi bien au laboratoire qu'en dehors du laboratoire, ainsi les fameuses pauses café qui furent des moments d'intenses débats scientifiques.

Un merci aussi à mes amis qui m'ont soutenu en dehors du laboratoire : *Dehman, Fahd, Lazhar, Omar, Younes* pour les sorties et les excursions, véritable défouloir essentiel pour l'équilibre durant ces années de thèse.

Je tiens à remercier particulièrement ma famille, mes parents Athmen et Mokhtaria ainsi que mes deux frères Khaled et Baghdadi pour m'avoir soutenu tout au long de mes études malgré l'éloignement géographique. Votre soutien et votre proximité à mon cœur m'ont beaucoup aidé à surmonter les difficultés rencontrées lors de mon parcours. Je remercie aussi Jazila, « Papito » Abdellah et « Mima » Kheira pour leurs conseils, je vous souhaite une longue vie pleine de bonheur et de santé.

Enfin, je te remercie Soundous pour ton aide et soutien lors de la rédaction de ma thèse, pour avoir participé activement à mon épanouissement professionnel mais surtout pour ta présence à mes côtés et toute l'énergie que tu me donnes pour aller de l'avant.

À Maman et Papa.

À ma fiancée Soundous.

À mes frères Khaled et Baghdadi.

À ma famille.

À la mémoire de ma grand-mère « Mima Saadia ».

Publications et communications scientifiques

Article Soumis :

Mohammed el Amine BENARBIA, David MACHEREL, Sébastien FAURE, Caroline JAQUES, Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA and Yves MALTHIERY. Plasmatic concentrations of organochlorine, lindane, chlordecone, act as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder.

Communications scientifiques :

Colloque de l'Association pour la Recherche en Toxicologie (ARET), PARIS 20/21 juin 2011

Mohammed el Amine BENARBIA, David MACHEREL, Sébastien FAURE, Caroline JAQUES, Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA and Yves MALTHIERY. Effects of low dose organochlorine on mitochondrial function and energy pathways of HepG2 cells.

(Communication orale)

Congrès du Groupe Français de bioénergétique, OLERON. 21-25 Septembre 2011

Mohammed el Amine BENARBIA, David MACHEREL, Sébastien FAURE, Caroline JAQUES, Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA and Yves MALTHIERY. Paradoxical effects of environmental concentrations of Organichlorine, Lindane and Chlordecone, on cellular energy pathways in HepG2 cells

(Communication orale)

CELLTOX 2011, Rome (Italie) 19-21 Octobre 2011

Mohammed el Amine BENARBIA, David MACHEREL, Sébastien FAURE, Caroline JAQUES, Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA and Yves MALTHIERY. Paradoxical effects of environmental concentrations of Organichlorine, Lindane and Chlordecone, on cellular energy pathways in HepG2 cells.

(Communication orale)

Abréviations :

ACC : acétyl-CoA carboxylase
AceCS : acétyl-CoA synthétase
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
ADP : adenosine 5'-diphosphate
AIF 5 : Apoptosis Inducing Factor
AMP : adenosine 5'-monophosphate
AMPc : adenosine 3',5'-monophosphate cyclique
AMPK : AMP-activated protein kinase
ANT : adénine nucléotide translocase
ApoB : apolipoprotéine B
ARN : acide ribonucléique
ARNi : ARN interférent
ARNm : ARN messenger
ARNr : ARN ribosomique
ARNt : ARN de transfert
ATP : adenosine 5'-triphosphate
ATP/O : rapport de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP
BAX : Bcl-2-associated X
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
BSA : bovine serum albumin
chlordécone: Chlordécone
ChREBP : carbohydrate response element binding protein
CoA : coenzyme A
CREB : cAMP response element-binding
CRM : chaîne respiratoire mitochondriale
CTE : chaîne transporteuse des électrons
CYP2E1 : cytochrome P450 2E1
DCPIP : dichlorophenolindophenol
DEPC : diéthylpyrocarbonate

DJA : dose journalière admise

DMEM : Dubelco's modified eagle medium

DMSO : dimethyl sulfoxide

dNTP : désoxyribonucléotide-tri-phosphate

DO : densité optique

DTNB : acide 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoïque)

EDTA : ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA : ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid

ERR α : estrogen-related receptor α

ESPA : N-ethyl-N-(3-sulfopropyl)m-anisidine

FAAH : fatty acid amide hydrolase

FAD : flavine adénine dinucléotide

FADH₂ : flavine adénine dinucléotide hydrogénée

FAS : fatty acid synthase

FCCP : carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone

FOXO : forkhead transcription factor O

G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase

GK : glucokinase

GLUT : glucose transporter

GMPc : guanosine-monophosphate cyclique

HEPES : 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid

HK : hexokinase

HSP : heavy strand promoter

IKK β : inhibitor of nuclear factor κ B kinase β

iNOS : inducible NO synthase.

IRS : insulin receptor substrate

JNK : c-Jun NH₂-terminal kinase

lindane : Lindane

lindaneH : lactate déshydrogénase

LPL : lipoprotéine lipase

LSP : light strand promoter

LXR : liver X receptor

MAPK : mitogen activated protein kinase
MCAD : medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase
mCICCP : carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone
MERRF : Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
NAD⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné
NADP⁺ : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate hydrogéné
NAFlindane : non alcoholic fatty liver disease
NARP : neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire
ND : NADH déshydrogénase
NF-κB : nuclear factor-κB
NO : nitric oxide
NOS : NO Synthase
NRF : nuclear respiratory factor
NRF : nuclear respiratory factor
OMS : organisation mondiale de la santé
ONOO⁻ : le peroxyinitrite
PBS : phosphate buffered saline
PCB : polychlorobiphényles.
PCR : polymerase chain reaction
PDH : pyruvate déshydrogénase
PDK : pyruvate déshydrogénase kinase
PEP : phosphoenolpyruvate
PEPCK : phosphoenolpyruvate carboxykinase
PERK : PKR-like ER kinase
PGC1 : PPAR γ coactivator 1
Pi : phosphate inorganique
PI-3 : phosphatidylinositol-3
PK : pyruvate kinase
PKA : protéine kinase A
PPAR : proliférateur-activated receptor

RCR : respiratory control ratio
RCRp : RCR phosphorylant
RE : réticulum endoplasmique
ROS : reactive oxygene species
RT : reverse transcription
S6Ks : S6 kinases
SIRT : sirtuine
SOD2 : superoxide dismutase 2
SVF : serum de veau foetal
TFAM : mitochondrial transcription factor A
TFBM : mitochondrial transcription factor B
TIM: translocase of Inner Membrane),
TNB : trinitrobenzène
TOM : Translocase of the Outer Membrane
TFA : Thenoyltrifluoroacetone
UCP : uncoupling protein
UCR : uncoupling control ratio
VDAC: voltage-dependent anion channel

Table des matières

I.	Introduction et problématique de thèse	14
1.	Les mitochondries : structure, fonction et régulation.	15
A.	Structure mitochondriale :	16
B.	Fonctionnement mitochondrial :	19
C.	Régulations énergétiques mitochondriales :	23
D.	Dialogue nucléo-mitochondrial :	26
2.	Dysfonctionnement mitochondrial et pathologies mitochondriales:	32
A.	Les pathologies mitochondriales :	32
B.	Facteurs participant à la pathologie mitochondriale:	34
3.	Xénobiotiques et molécules polluantes de l'environnement :	36
A.	Pesticides et assimilés :	37
B.	Les Cibles des organochlorés :	39
C.	Toxicologie des organochlorés :	40
D.	Effet des faibles doses :	40
E.	Effet des mélanges « effet cocktail » :	41
4.	Objectifs de l'étude.	42
II.	Matériel et méthodes :	44
1.	Modèle et culture cellulaire :	45
2.	Poudres chimiques et réactifs :	45
A.	Chlordécone (Sigma-Aldrich, Lyon, France):	45
B.	Lindane (sigma-Aldrich, Lyon, France) :	45
3.	Mesure de la viabilité cellulaire.	45
A.	Principe des techniques.	46
B.	Réactifs :	46
C.	Protocole :	46
4.	Mesure de la respiration cellulaire sur cellules intactes :	47
A.	Principe de l'électrode de Clark :	47
B.	Réactifs :	48
C.	Protocole :	49
5.	Dosage de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire :	51
A.	Complexe I (NADH ubiquinone réductase) :	51

B.	Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)	54
C.	Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase (complexe III)	57
D.	Cytochrome c oxydase (complexe IV)	60
5.	Cytrase synthase :	62
6.	Dosage des radicaux libres par résonance paramagnétique électronique (RPE) :	64
A.	Monoxyde d'Azote :	64
B.	Anion superoxyde (O_2^-) :	66
7.	Western blot iNOS, nitration protéines :	67
8.	Quantification des gènes de biogenèse mitochondriale et du métabolisme énergétique :	71
A.	Extraction des ARN totaux à partir de cellules avec le kit« RNAeasy » (QIAGEN):	71
B.	Reverse transcription.	73
C.	PCR quantitative en temps réel :	74
D.	PCR quantitative :	75
9.	Métabolisme énergétique :	76
A.	Mesure de la concentration intracellulaire d'ATP :	76
B.	Coloration des lipides intracellulaire au « Oil Red'O »:	77
III.	Résultats, discussion et perspectives	79
Article 1 :	80
Complex III (ubiquinol cytochrome c reductase) activity was measured as described by rustin et al.	88
IV.	Discussion et perspectives:	126
A.	Discussion :	127
B.	Conclusion et perspectives :	133
V.	Références bibliographiques.....	137

Liste des illustrations :

Figure 1 : Représentation schématique de la structure mitochondriale.....	16
Figure 2 : structure du réseau mitochondrial des cellules HepG2 par microscopie confocale X40.....	18
Figure 3 : représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons.	19
Figure 4: Structure chimique du Chlordécone.....	38
Figure 5: Structure chimique du Lindane	39

I. Introduction et problématique de thèse.

1. Les mitochondries : structure, fonction et régulation.

Au cours de l'évolution, les cellules des organismes eucaryotes se sont enrichi de nouvelles fonctions qui ont permis leur survie dans un environnement changeant. Un des challenges importants pour un organisme, est d'assurer son apport énergétique à partir d'une source extérieure, énergie solaire pour les plantes, énergie nutritionnelle pour les animaux. Le processus d'endosymbiose a permis aux cellules eucaryotes de se construire des structures biologiques adaptées à ce besoin. Dans les cellules végétales, l'endosymbiose d'une cellule bactérienne primitive est à l'origine des chloroplastes, lieu de la synthèse chlorophyllienne. Dans les cellules animales, mais également dans les cellules végétales, une cellule procaryote primitive, une alpha-protéobactérie, a donné naissance à la mitochondrie, lieu de conversion énergétique et de synthèse de l'ATP.

Ces mitochondries, tout en gardant leur fonction ubiquitaire de conversion énergétique, se sont spécialisées, selon les tissus, dans des fonctions métaboliques spécifiques, souvent de synthèse de molécules tissu-spécifiques. Ainsi, elles assurent différentes fonctions de régulation cellulaire nécessaires à la survie cellulaire, telles l'homéostasie calcique, la synthèse de l'hème ou de précurseurs des hormones stéroïdes, ainsi que la prolifération cellulaire.

Leur structure et leur organisation fonctionnelle sont un reflet des nécessités physiques de la conversion énergétique, ainsi d'ailleurs que des besoins énergétiques des cellules et de leur compartimentation. Leur nombre est variable selon les tissus, de quelques unités (spermatozoïde) à plusieurs centaines de milliers (environ 300 000 dans un ovule), avec une moyenne d'environ 5 000 dans une "cellule somatique standard". Ce nombre est variable selon le type cellulaire, l'organisme et l'état physiologique ou pathologique des cellules. Dans les faits, les mitochondries sont structurées en un réseau dynamique, subissant des processus de fusion et de fission, selon le statut métabolique, le stade du cycle cellulaire et les besoins énergétiques des compartiments cellulaires (tels les axones des cellules nerveuses).

A. *Structure mitochondriale :*

Les mitochondries mesurent entre 0,5 et 1 μm de diamètre et peuvent atteindre jusqu'à 7 μm de long. Leur forme et leur nombre varient selon le type cellulaire, elles peuvent être rondes ou filamenteuses, mais elles présentent toujours une structure générale identique, à savoir une double membrane composée chacune d'une bicouche phospholipidique. Les deux membranes sont tout à fait distinctes en apparence et en terme de propriétés physico-chimiques. Cette distinction donne à chacune des membranes un rôle biochimique particulier.

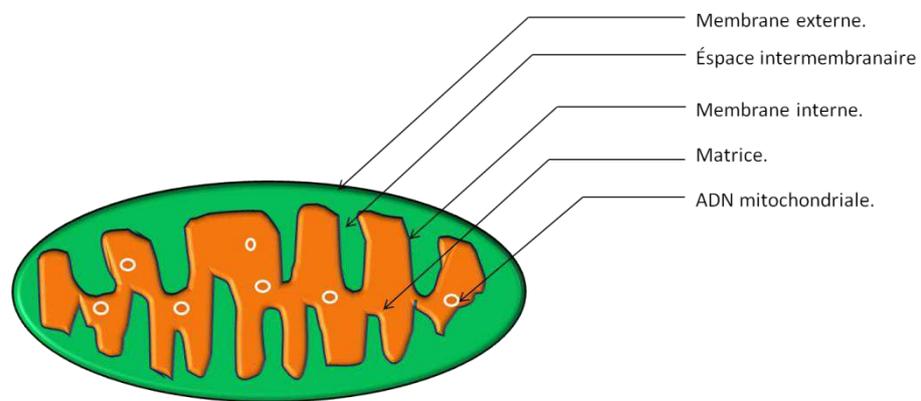


Figure 1 : Représentation schématique de la structure mitochondriale.

1. La membrane externe :

La membrane externe possède un ratio lipide/protéine de l'ordre de 50/50. Elle est largement perméable aux ions et aux molécules ayant un poids moléculaire élevé (jusqu'à 5000 kD) (Herrmann et Neupert 2000). Le passage transmembranaire des petites molécules, eau et ions hydrosolubles, est assuré par une porine constituant le VDAC (voltage-dependent anion channel). Le passage des grosses molécules a recours à un système spécifique d'importation, le complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane). Celui-ci permet le recrutement de protéines d'origine cellulaire dans les structures mitochondriales et la matrice mitochondriale. Cette perméabilité permet à la mitochondrie d'être en contact avec le cytosol et les autres organites intracellulaires et le réticulum endoplasmique notamment dans les processus de régulation de l'homéostasie calcique.

La membrane externe supporte la phase mitochondriale de la voie intrinsèque de l'apoptose. Les protéines anti-apoptotiques (de type Bcl2) et pro-apoptotiques (de type

Bax) interagissent sur cette membrane, enclenchant la phase irréversible de la voie intrinsèque de l'apoptose.

2. L'espace inter-membranaire :

C'est un espace étroit d'environ 100 angströms dont la composition est très proche de celle du cytosol. Il contient une forte concentration en protons, issus du fonctionnement de la chaîne respiratoire, qui lui confèrent une charge nettement positive. Ce compartiment mitochondrial renferme plusieurs protéines, soit impliquées dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire tel le cytochrome c, soit impliquées dans le processus de déclenchement de l'apoptose telle la protéine AIF 5 (Apoptosis Inducing Factor), des pro-caspases, l'endonucléase G, ainsi d'ailleurs que le cytochrome c. Après la phase d'initiation de la voie intrinsèque de l'apoptose, ces protéines sont expulsées dans le cytoplasme où elles vont provoquer une activation des caspases cellulaires.

3. La membrane interne :

La membrane interne a une composition assez différente des autres membranes biologiques. Elle est constituée de 20 % de lipides et 80% de protéines. Les lipides sont en grande proportion, des cardiolipines, phospholipides habituellement peu présents dans les membranes biologiques des cellules eucaryotes. Cette membrane se replie sur elle-même en formant les crêtes mitochondriales où sont localisés les complexes de la chaîne respiratoire. La membrane mitochondriale interne est beaucoup moins perméable aux ions et aux molécules que la membrane externe, permettant une forte séparation entre la matrice mitochondriale et l'environnement cytosolique.

Cette compartimentation joue un rôle central dans le processus de conversion énergétique. La membrane mitochondriale interne est, en fait, un isolant électrique et une barrière chimique. Des transporteurs spécialisés sont intégrés dans cette membrane permettant, à certaines molécules, de franchir cette barrière. L'adénine nucléotide translocase ou ANT, qui fonctionne selon un mode antiport en permettant l'échange de l'ADP cytosolique avec l'ATP mitochondrial, en est un exemple. Des navettes telle la navette malate/aspartate permettent, par un mode antiport, les échanges métaboliques. En outre, un transporteur spécifique, appelé complexe TIM (translocase of Inner

Membrane), permet l'importation de protéines synthétisées dans le cytoplasme dans la membrane interne ou dans la matrice mitochondriale.

D'autres protéines insérées dans la membrane interne jouent des rôles bien spécifiques. Les UCP (protéines découplantes) apportent une régulation du gradient établi par la fonction OXPHOS, autour de cette membrane en réduisant celui-ci sans synthèse d'ATP. D'autres protéines, telle OPA1, participent à la dynamique du réseau mitochondrial et à la stabilisation des crêtes.

4. La matrice mitochondriale :

La matrice mitochondriale est le siège d'une multitude de voies métaboliques aussi bien cataboliques, comme l'oxydation des glucides dans le cycle de Krebs, des lipides dans la β -oxydation et d'acides aminés, qu'anaboliques comme la biosynthèse de l'hème et de l'urée qui sont très tissu-spécifiques. Ceci est rendu possible grâce au grand nombre d'enzymes qu'elle contient. La matrice renferme donc de nombreuses molécules enzymatiques impliquées dans ces voies métaboliques. Toutes ces protéines sont synthétisées dans le cytoplasme cellulaire à partir d'une information nucléaire, puis transloquées dans la matrice mitochondriale.

D'autres protéines enzymatiques impliquées dans les métabolismes mitochondriaux suivent ce même chemin. Les NOS (Nitric Oxide Synthase) permettent la synthèse de monoxyde d'azote à partir des molécules d'oxygène et tout particulièrement des ROS (ou ERO, espèces réactives de l'oxygène). Trois isoformes de NOS sont décrites, la NOS1 ou nNOS décrite dans le cerveau, la NOS2 ou iNOS est une molécule inductible décrite dans les macrophages, le foie et les cellules endothéliales, la NOS3 ou eNOS décrite initialement dans les cellules endothéliales, puis dans les cellules musculaires et rénales.

La matrice mitochondriale héberge aussi l'ADN mitochondrial, des mitoribosomes ainsi que les ARN de transfert et ARN messagers issus de la transcription du génome mitochondrial. L'ADNmt est un ADN

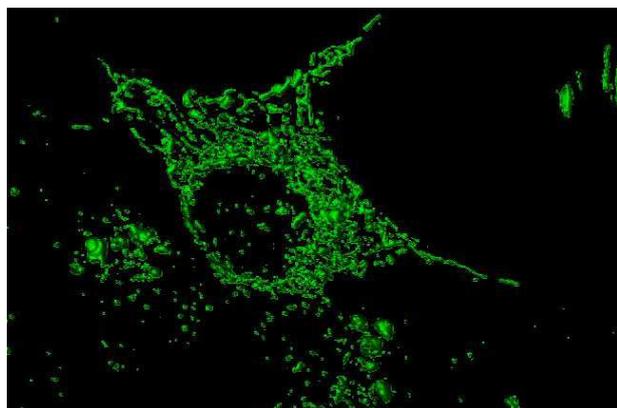


Figure 2 : structure du réseau mitochondrial des cellules HepG2 par microscopie confocale X40

circulaire de 16 569 nucléotides qui code notamment pour 13 protéines, toutes intégrées dans les complexes protéiques de la chaîne respiratoire mitochondriale (Anderson *et al.* 1981).

B. Fonctionnement mitochondrial :

1. Phosphorylation oxydative :

La conversion énergétique mitochondriale se fait grâce aux réactions de phosphorylation oxydative ou oxydation phosphorylante (OXPHOS). Ces réactions sont assurées par les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) ou chaîne transporteuse des électrons (CTE) insérée dans la membrane mitochondriale interne.

Les réactions de phosphorylation oxydative consistent en un transfert d'électrons issus de donneurs d'électrons ($\text{NADH} + \text{H}^+$, FADH_2) à des accepteurs d'électrons intermédiaires (les complexes de la chaîne respiratoire et les complexes mobiles) puis à un accepteur final, l'oxygène (O_2), à travers une succession de réactions d'oxydo-réduction. Ces réactions libèrent une énergie redox, utilisée pour la synthèse de l'ATP. L'énergie libérée par les électrons circulant à travers cette chaîne de transport d'électrons est utilisée pour transloquer des protons à travers la membrane mitochondriale interne, de la matrice vers l'espace intermembranaire, dans un processus appelé chimiosmose. Cela génère une énergie potentielle sous forme d'un gradient de pH et produit un potentiel électrique à travers cette membrane interne mitochondriale. Cette réserve d'énergie sera utilisée par l'ATP synthase qui, en permettant aux protons de refluer à travers la membrane vers la matrice, va permettre la phosphorylation d'une molécule d'ADP, ce qui va produire une molécule d'ATP.

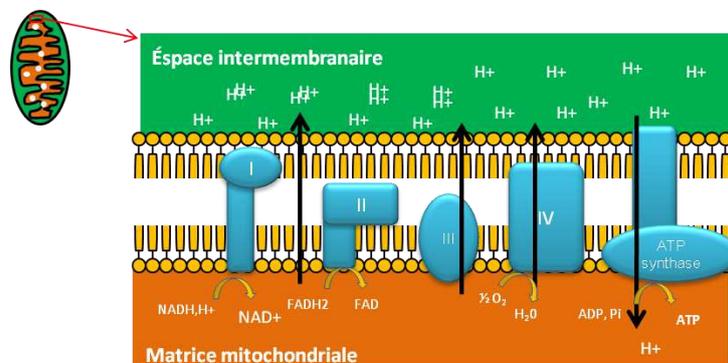


Figure 3 : représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons.

2. La chaîne respiratoire mitochondriale :

a. *Complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase ou NADH déshydrogénase):*

C'est la première enzyme dans la chaîne de transport d'électrons (Hirst 2005). Ce complexe capte deux électrons du NADH, H⁺ à l'ubiquinone, libérant une énergie permettant la translocation de quatre protons au travers de la membrane, ce qui participe à la force motrice transmembranaire (Sazanov 2007). Ce complexe est constitué d'environ 45 sous-unités (Carroll *et al.* 2006), dont le plus grand nombre (38) est codé par le génome nucléaire, tandis que 7 seulement sont codés par le génome mitochondrial.

Cette activité NADH déshydroxylase est sensible à plusieurs inhibiteurs, la roténone, la piéridine A, ainsi que certains médicaments (barbituriques, dérivés mercuriels, mépéridine ou péthidine).

Ce complexe, constitué de neuf noyaux Fer/Soufre, est une des principales sources d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) dans la mitochondrie.

b. *Complexe II (Succinate-Q oxydoréductase, ou succinate déshydrogénase) :*

C'est le second point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale (Cecchini 2003). Ce complexe est constitué de 4 sous-unités (SHHA, SDHB, SDHC, SDHD) toutes codées par le génome nucléaire. Il se caractérise par son appartenance à la fois à la chaîne respiratoire mitochondriale et au cycle de Krebs. La réaction catalysée par le complexe II consiste en l'oxydation du succinate en fumarate s'accompagnant d'une réduction de l'ubiquinone. Cette réaction oxydant le cofacteur enzymatique FADH libère moins d'énergie que l'oxydation du NADH et ne permet pas au complexe II de transporter des protons à travers la membrane. Il ne contribue donc pas à la génération du gradient électrochimique membranaire.

Les inhibiteurs les plus classiques du complexe II sont le malonate (analogue du succinate) et le TTFA (Thenoyltrifluoroacetone) qui se lie aux noyaux Fer/Soufre du complexe. Le complexe II peut générer des ROS, tout particulièrement en condition hypoxique.

c. Complexe III (Coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase, ou cytochrome c réductase ou cytochrome bc1 complexe) :

Chez les mammifères, cette enzyme est un dimère, chaque sous-unité du complexe contenant 11 sous-unités protéiques (10 codées par l'ADN nucléaire et 1 par l'ADN mitochondrial), un noyau fer-soufre et trois cytochromes (un cytochrome c1 et deux cytochromes b) (Iwata et al. 1998). La réaction catalysée par le complexe III est l'oxydation d'une molécule d'ubiquinol et la réduction de deux molécules de cytochrome c. Cette étape s'accompagne du transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire grâce au cycle Q décrit par Mitchell (1975). Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme ce qui permet le pompage des protons vers l'espace intermembranaire. Ce complexe est un des sites producteurs de ROS mitochondriaux.

Les inhibiteurs classiques du complexe III sont l'antimycine A, le myxothiazol, le dimercaprol (BAL ou British Anti Lewisite), la stigmatelline.

d. Complexe IV (cytochrome c oxydase) :

Ce complexe est la dernière enzyme de la chaîne de transport d'électrons. Composé de 13 sous-unités, dont 3 sont codées par le génome mitochondrial, il reçoit un électron de chacune des quatre molécules de cytochrome c et les transfère à une molécule d'oxygène. L'oxygène moléculaire est ainsi réduit en deux molécules d'eau. Cette réaction s'accompagne d'une translocation, vers l'espace intermembranaire, de quatre protons participant au potentiel électrochimique autour de la membrane interne de la mitochondrie.

Ce complexe est fortement impliqué dans la régulation de la chaîne respiratoire, notamment par l'occupation compétitive de molécules de NO sur le site de fixation de l'oxygène. Plusieurs isoformes tissu-spécifiques de ce complexe IV ont été décrites, participant au rôle régulateur

Plusieurs molécules sont inhibitrices de ce complexe IV, comme les petites molécules oxygénées (NO, CO) qui entrent en compétition sur le site de fixation de l'Oxygène, mais aussi le Cyanure qui bloque le transfert des électrons et l'Azide.

Certaines pathologies neurodégénératives (syndrome de Leigh, encéphalopathies) ont été attribuées à des déficits génétiques de ce complexe IV.

e. Complexe V (ATP Synthase) :

C'est le dernier complexe enzymatique dans la voie de la phosphorylation oxydative. L'enzyme utilise l'énergie emmagasinée dans le gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale pour faire la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate (Pi). L'énergie apportée par 3 à 4 protons est nécessaire pour permettre la synthèse d'une molécule d'ATP (Yoshida, Muneyuki, et Hisabori 2001). La réaction de phosphorylation est réversible, orientée en fonction du niveau du potentiel intermembranaire. Quand le potentiel intermembranaire est faible, l'ATP synthase hydrolyse un ATP et utilise l'énergie libérée pour la translocation de 4 protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (Boyer 1997).

L'ATP synthase est un complexe protéique massif en forme de champignon. Chez les mammifères, ce complexe est composé de 16 sous-unités pour un poids moléculaire (PM) d'environ 600 kDA (Rubinstein, Walker, et Henderson 2003). La partie du complexe incorporée dans la membrane est appelée FO (fraction sensible à l'oligomycine). Elle est composée de 5 sous-unités et est responsable du transfert des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice via le canal à proton du complexe. Le segment F1 est matriciel, au contact de la membrane interne et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP (et vice versa). Il est composé de 5 sous-unités (α , β , γ , δ , ϵ). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont également associées à ce complexe. Le fonctionnement de ce dernier repose sur les sous-unités c (au nombre de 10) de la partie FO qui, connectées à la sous-unité γ de F1, agissent comme un rotor utilisant le passage des protons à travers le stator (sous-unités A6, b, d et OSCP) pour fonctionner. La sous-unité γ cause, quant à elle, un changement conformationnel dans le trimère circulaire de sous-unités α et β de la partie F1 et permet ainsi successivement la liaison de l'ADP puis la réaction avec le phosphate inorganique pour générer l'ATP et enfin la libération de l'ATP (Kinosita 2012).

Les inhibiteurs classiques du complexe V sont l'Oligomycine et le Dicyclohexylcarbodiimide (DCchlorodécone), bloquant tous deux le domaine Fo.

Les pathologies associées aux déficits génétiques ou fonctionnels du complexe V sont des neuropathies, encéphalopathies ou encore des cardiomyopathies.

C. Régulations énergétiques mitochondriales :

Dans les cellules mammifères, l'homéostasie énergétique nécessite une coordination entre l'activité cellulaire, la disponibilité des nutriments et la régulation des processus de production énergétique. Ceci est réalisé par un système complexe de signalisation qui comprend différentes kinases et facteurs de transcription reliant d'une part la détection de besoins énergétiques cellulaires et d'autre part la disponibilité des éléments nutritifs (G Benard et al. 2010). Le statut énergétique intracellulaire est reflété par les concentrations respectives des nucléotides adényliques ATP, ADP et AMP (ainsi que phosphocréatine/créatine), alors que la disponibilité des nutriments se traduit plus par la concentration de glucose et des acides aminés. Les S6 kinases (S6Ks) 1 et 2 et les AMP-activated protein kinases (AMPKs) interviennent en aval de ces capteurs afin de moduler la prolifération cellulaire et le métabolisme énergétique (Aguilar et al. 2007, 6; G Benard et al. 2010). Les AMPK sont sensibles au ratio AMP/ATP qui lui-même est conditionné par la balance énergétique de la cellule (synthèse d'ATP et consommation d'ATP). Après activation par l'AMP, les AMPKs initient une cascade de phosphorylations afin d'activer les voies cataboliques conduisant à la production d'ATP (glycolyse et la phosphorylation oxydative via la stimulation de la biogenèse mitochondriale) et à l'inhibition des voies anaboliques consommatrices d'ATP (synthèse des protéines, acides gras et du cholestérol) (Hardie 2007). Plus récemment, il a été découvert, dans le muscle squelettique de la souris, que les AMPKs régulent le métabolisme énergétique à travers l'activation des sirtuines (SIRT1) [22] et [23]. La désacétylation de SIRT1 entraîne l'activation en aval de ses cibles, dont les facteurs de transcription PGC1 α , FOXO1 et FOXO3a (Cantó et Auwerx 2009; Greer et al. 2007)

1) Régulations de la phosphorylation oxydative :

L'adaptation cellulaire aux contraintes environnementales et physiologiques nécessite que le contrôle de la respiration mitochondriale soit adapté à l'évolution de la demande

énergétique et à la disponibilité du substrat. Ceci implique des mécanismes de régulation qui modulent la phosphorylation oxydative aussi bien au niveau structurel qu'au niveau fonctionnel. Selon les tissus, l'organisation et la composition de la chaîne respiratoire sont différentes et reflètent l'activité physiologique (ou bien patho-physiologique) de chaque type cellulaire (G Benard et al. 2006).

On peut distinguer cinq différents niveaux de régulation OXPHOS :

a) Régulation de la cinétique de la chaîne respiratoire :

Le premier niveau de régulation implique une modulation de la structure des composants de la chaîne respiratoire. La présence d'isoformes rapides ou lentes du complexe IV (Capaldi et al. 1988) induit une modulation biochimique de l'activité catalytique du complexe IV en fonction du potentiel de membrane électrique (Piccoli *et al.* 2006; Dalmonte *et al.* 2009). La régulation peut également se faire au travers de modifications post-traductionnelles des composants de la chaîne de transport des électrons, notamment la phosphorylation ou la nitrosylation des protéines impliquées dans les complexes de l'OXPHOS (Carroll et al. 2005; Das et al. 1998).

b) Régulation de l'efficacité de l'OXPHOS :

Le second niveau de régulation de l'OXPHOS repose sur la modulation de l'efficacité intrinsèque de la phosphorylation oxydative définie par le ratio ATP/O. Plus ce ration est élevé plus l'OXPHOS est efficace et inversement. L'efficacité de l'OXPHOS est régulée par les variations du potentiel inter-membranaire induite par "la fuite des protons". Celle-ci peut être basale ou induite par les protéines découplantes "UCP" (Parker et al. 2009). Les variations de la teneur en oxygène sont également à l'origine de la modification du rapport ATP/O, et par conséquent de l'efficacité de l'OXPHOS (Gnaiger, Méndez, et Hand 2000). Il a aussi été rapporté que l'approvisionnement en substrats respiratoires intermédiaires, ainsi que les variations dans l'organisation des complexes de la chaîne respiratoire (formation des super-complexes) sont à l'origine de la modification de l'efficacité de celle-ci (D'Aurelio et al. 2006; Bianchi *et al.* 2004).

2) Dynamique et morphologie mitochondriales :

Dans les cellules mammifères, la capacité de la phosphorylation oxydative peut aussi varier selon la morphologie des mitochondries. Ces dernières sont organisées en un réseau dynamique dans la cellule, constituant un compartiment subcellulaire. Selon l'état de réticulation ou de fragmentation de ce réseau mitochondrial, le rendement de l'OXPPOS n'est pas identique (Giovanni Benard et al. 2007). Cet état dépend donc de mécanismes finement régulés conditionnant la fission et la fusion mitochondriales. La motilité mitochondriale, ainsi que les variations dans la composition lipidique des membranes mitochondriales interviennent aussi sur la régulation de l'OXPPOS (Choi et al. 2006; Furt et Moreau 2009). Les phénomènes osmotiques conduisant aux modifications de l'ultrastructure mitochondriale ainsi que les changements de la taille des mitochondries (gonflement ou rétrécissement) joueraient également un rôle dans l'efficacité de l'OXPPOS (Furt et Moreau 2009; Hackenbrock *et al.* 1971). Cependant, aujourd'hui, le lien entre l'ultrastructure des mitochondries et leur capacité de la phosphorylation oxydative manque d'une véritable analyse expérimentale. Les différentes études portant sur ce sujet ont certes observé des modifications de la capacité de l'OXPPOS en parallèle à des modifications de l'ultrastructure sans pourtant démontrer un vrai lien de cause à effet.

3) Régulation transcriptionnelle :

La régulation énergétique mitochondriale se produit aussi à un niveau supérieur. Elle se fait à travers la modulation de la biogenèse mitochondriale ainsi qu'à travers sa dégradation. Cela se traduit par la détermination du contenu cellulaire en ADNmt (en général par le dosage et l'activité de PGC1 α et des sirtuines) (Arany *et al.* 2005; Ventura-Clapier, Garnier, et Veksler 2008), ainsi que par la régulation de la transcription en mesurant TFAM (Campbell, Kolesar, et Kaufman 2012). Selon le niveau énergétique cellulaire, la cellule peut aussi procéder à l'élimination de mitochondries par des phénomènes d'autophagie générale ou ciblée (Twig et al. 2008). Les résultats récents indiquent que PINK1 et Parkin jouent un rôle primordial dans la régulation des phénomènes d'autophagie mitochondriale suivant le niveau énergétique cellulaire (Narendra et al. 2010).

4) Régulations extrinsèques :

L'OXPHOS peut être influencée et régulée par des facteurs extrinsèques à la mitochondrie. Il a été rapporté que les interactions des mitochondries avec les autres organites intracellulaire (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, la membrane plasmique, peroxysomes) influencent l'OXPHOS (Kozieł et al. 2009; de Brito et Scorrano 2008). L'OXPHOS peut aussi être régulée par d'autres phénomènes cellulaires tels que l'apoptose et les flux de calcium. L'environnement cellulaire et l'exposition à divers xénobiotiques (médicaments, polluants environnementaux) ont également un impact certain sur la régulation de l'OXPHOS.

D. Dialogue nucléo-mitochondrial :

La plupart des protéines mitochondriales sont codées par le génome nucléaire. De ce fait, la régulation de la fonction mitochondriale, pour répondre aux stimuli intrinsèques ou extrinsèques de la cellule, nécessite un dialogue entre le génome mitochondrial et le génome nucléaire. Ce dialogue nucléo-mitochondrial est un facteur en perpétuelle régulation afin de répondre aux besoins de la cellule. Il implique divers facteurs de transcription et répond à des stimuli aussi divers que la restriction calorique, le froid, les besoins énergétiques cellulaires. En outre, il est sous l'influence de molécules régulatrices telles que les hormones et peut être perturbé par des molécules exogènes, xénobiotiques, perturbateurs endocriniens...

1. La voie antérograde : du noyau à la mitochondrie :

L'expression des gènes nucléaires codant pour les protéines mitochondriales, sous-unités de la chaîne respiratoire et autres localisations mitochondriales fait appel, pour l'initiation transcriptionnelle, à plusieurs facteurs de transcription spécifiques.

- NRF1 (Nuclear Respiratory Factor1) :

Identifié pour la première fois en 1989 par Evans et Scarpulla. Ce facteur de transcription est décrit comme étant le principal activateur transcriptionnel du gène du cytochrome c chez le rat (Evans et Scarpulla 1989). Par la suite, des éléments de liaison à NRF1 ont été découverts dans les promoteurs de plusieurs gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale, dans le promoteur du gène de l'enzyme delta-aminolevulinate synthase (voie de synthèse de l'hème), ainsi que dans le

promoteur des gènes impliqués dans la réplication de la transcription de l'ADN mitochondrial. Par son large rôle de régulateur transcriptionnel, NRF1 est un élément majeur des processus de biogénèse mitochondriale (Garesse et Vallejo 2001).

- NRF2 (Nuclear respiratory factor2) :

NRF2 se fixe sous forme de tétramère sur le promoteur de plusieurs sous-unités de la cytochrome c oxydase et régule ainsi leur transcription (Scarpulla, 2002).

Les facteurs NRF1 et NRF2 régulent en aval deux facteurs impliqués dans la réplication et la transcription mitochondriale : TFAM et MRP, permettant ainsi une expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux afin d'assurer un fonctionnement mitochondrial correct. Si NRF1 participe à la régulation transcriptionnelle de tous les gènes codant des protéines de la chaîne respiratoire, NRF2 semble plus sélectif à réguler l'expression des protéines du complexe IV.

- PPARs : *peroxisome proliferator-activated receptors* α , γ et δ / β :

Ce sont des protéines appartenant à la grande famille de récepteurs nucléaires qui fonctionnent comme facteurs de transcription régulant l'expression des divers gènes (Michalik et al. 2006). Diverses régulations cellulaires et systémiques sont attribuées à ces récepteurs, allant de la régulation du développement placentaire et celui du tractus gastro-intestinal durant la vie embryonnaire pour PPAR β/δ (Nadra et al. 2006) à la régulation du métabolisme énergétique via la régulation du métabolisme lipidique au niveau hépatique et du muscle squelettique assuré par PPAR α (Lefebvre et al. 2006). PPAR γ , quant à lui, joue un rôle primordial dans la différenciation des adipocytes et participe dans la régulation de l'homéostasie énergétique (Koutnikova et al. 2003). La stimulation de PPAR γ induit la biogénèse mitochondriale via l'activation de la voie PGC1 α (Miglio et al. 2009).

- ERR α : *Estrogen-related-receptor alpha* fait partie de la famille de récepteurs nucléaires qui comprend aussi ERR β et ERR γ . Ces derniers ressemblent aux récepteurs à l'œstrogène mais ne se lient pas à l'œstrogène. ERR α est lié à la régulation du métabolisme oxydatif cellulaire (Scarpulla 2006). En effet, le niveau d'expression d'ERR α est élevé dans les tissus oxydatifs tel que le muscle cardiaque, là où il est impliqué dans la régulation de la bêta-oxydation via le contrôle du promoteur de

l'enzyme *medium chain acyl-coenzyme A dehydrogenase* (MCAD) (Huss et Kelly 2004). $ERR\alpha$ est aussi impliqué dans la régulation mitochondriale. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication d' $ERR\alpha$ dans la biogénèse mitochondriale induite par $PGC1\alpha$ (Mootha et al. 2004; Schreiber et al. 2004).

- TFAM (mitochondrial Transcription factor A) : est un facteur de transcription spécifique à l'ADN mitochondrial. Via sa liaison à l'ADN mitochondrial, TFAM régule l'initiation et l'élongation transcriptionnelle des 13 gènes portés par le génome mitochondrial. Par ailleurs, TFAM assure l'initiation et la régulation de la réplication de l'ADN mitochondrial à partir des deux origines de réplication de ce génome. Les dysfonctionnements dans la réplication de l'ADNmt sont à l'origine de diverses pathologies telles que certaines cardiomyopathies et maladies neurodégénératives (Ikeuchi et al. 2005; Keeney et al. 2009; Zhang et al. 2011). Outre son rôle de régulateur dans la réplication et la transcription de l'ADNmt, TFAM participe à la stabilisation de cet ADN en se comportant comme les histones vis-à-vis de l'ADN nucléaire (Campbell, Kolesar, et Kaufman 2012).

Outre les facteurs de transcription jouant le rôle d'activateurs, les co-activateurs transcriptionnels remplissent aussi un rôle important dans la régulation du dialogue nucléo-mitochondrial antérograde. Les cofacteurs PGC1 (peroxisome proliferator-activated receptors gamma coactivator-1) constituent une famille de trois membres répertoriés à ce jour : $PGC-1\alpha$, $PGC-1\beta$ et PRC (PGC-1 Related Coactivator).

- $PGC-1\alpha$ contrôle le métabolisme oxydatif mitochondrial ainsi que la biogénèse mitochondriale. Ce facteur participe, directement ou indirectement, à la régulation de la respiration mitochondriale et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (1) en co-régulant l'expression induite par les activateurs $ERR\alpha$, NRF1 et NRF2 (Puigserver 2005) sur les gènes nucléaires impliqués dans la constitution du respirasome, (2) en régulant l'expression de TFAM et donc en régulant tant la réplication que la transcription de l'ADNmt, (3) en participant à la régulation de la synthèse et à l'assemblage des sous-unités de l'OXPHOS, (4) en participant à la dégradation des lipides dans la matrice mitochondriale à travers la β -oxydation elle-même sous la dépendance des PPARs, (5) en régulant l'expression des protéines découplantes, tout

particulièrement UCP1 et donc en participant à la modulation du gradient électrochimique permettant la synthèse de l'ATP par le complexe V de l'OXPPOS.

Par ailleurs, le co-activateur PGC-1 α est très impliqué dans d'autres régulations cellulaires non-mitochondriales, notamment, l'homéostasie énergétique via la régulation de la néoglucogenèse et la bêta-oxydation (Herzig et al. 2001) et la régulation du processus de l'inflammation (Buler et al. 2012). Dans un autre contexte, une étude récente montre l'implication de PGC1 α dans le développement tumoral et la prolifération des cellules tumorales. En effet, Klimcakova et al. ont démontré que la surexpression de PGC1 α dans un modèle murin de cancer du sein favorisait le développement tumoral et conduisait à la formation de tumeurs plus larges *in vivo* (Klimcakova et al. 2012).

- PGC-1 β : Contrairement à PGC1 α , il existe peu de données dans la littérature scientifique quant aux rôles et fonctions de PGC1 β . Du moins, PGC1 β est connu comme l'homologue de PGC1 α . Il est fortement exprimé dans les tissus avec un contenu mitochondrial élevé, tels que le muscle squelettique et le muscle cardiaque (Meirhaeghe et al. 2003; Lin et al. 2002). Contrairement à PGC1 α , l'expression de PGC1 β n'est pas altérée au niveau hépatique suite au jeûne ou à une exposition au froid (Meirhaeghe et al. 2003). Il a été démontré que PGC1 β est impliqué dans la régulation de la synthèse des lipides hépatiques et dans la production des lipoprotéines. L'expression ectopique de PGC1 β dans le muscle squelettique induit la biogenèse mitochondriale et augmente la consommation d'oxygène mitochondrial. PGC1 β est également impliqué dans la régulation de la transition et le métabolisme des fibres musculaires squelettiques.

- PRC (PGC-1-related coactivator) : PRC interagit avec plusieurs facteurs de transcription afin d'activer l'expression d'une série de gènes en réponse à des stimuli physiologiques. En réponse à l'induction du sérum, PRC est immédiatement exprimé et active le processus de prolifération cellulaire en se liant à des facteurs précoces, (Vercauteren et al. 2006). Durant la prolifération cellulaire, il se produit aussi le processus de biogénèse mitochondriale. PRC est impliqué dans la régulation de cette biogénèse mitochondriale à travers la formation d'un complexe avec les facteurs de transcription NRF-2 et HCF-1, en augmentant l'expression de la majorité des gènes nucléaires qui spécifient la fonction respiratoire mitochondriale et le cycle cellulaire

(Vercauteren, Gleyzer, et Scarpulla 2008). Un autre rapport à l'aide de *shRNA mediation PRC dosages knockdown* a indiqué que PRC joue un rôle dans l'intégration des voies régulant la fonction respiratoire mitochondriale et la croissance cellulaire (Vercauteren, Gleyzer, et Scarpulla 2009). Le *silencing* complet du gène RPC entraîne une inhibition sévère de la croissance respiratoire, une réduction de l'expression des sous-unités protéiques des complexes respiratoires I, II, III et IV ainsi qu'une diminution de production d'ATP mitochondrial (Vercauteren, Gleyzer, et Scarpulla 2009). Récemment, au sein de notre laboratoire, il a été mis en évidence l'implication de PRC dans la modulation des fonctions métaboliques en réponse au cycle cellulaire dans la lignée d'oncocytome thyroïdien XTC (Raharijaona et al. 2009). Une étude *in vivo* récente a démontré, en utilisant des souris déficientes en PRC, que ce dernier joue un rôle dans les étapes précoces du développement embryonnaire. En effet, les souris homozygotes déficientes en PRC mouraient juste après l'implantation (He et al. 2012).

2. La voie rétrograde : de la mitochondrie vers le noyau :

L'expression des gènes nucléaires peut être modifiée à la suite de signaux provenant de la mitochondrie, dans des conditions physiologiques ou encore dans un contexte pathologique. Ce processus est appelé "voie rétrograde du dialogue nucléo-mitochondrial" (Liu et Butow 2006; Garesse et Vallejo 2001).

Cette voie fait intervenir plusieurs "indicateurs" du dysfonctionnement de la mitochondrie, ainsi que plusieurs protéines régulant, *in fine*, l'expression des gènes nucléaires répondant à la sollicitation mitochondriale. Ces indicateurs sont en relation directe avec les produits de la mitochondrie tels que des altérations de la production d'ATP, la diminution du potentiel intermembranaire mitochondrial ou d'ADNmt (Garesse et Vallejo 2001). La molécule de signalisation impliquée dans la présente communication rétrograde est Ca^{2+} . En effet, la perturbation du potentiel de membrane ainsi que la capacité de synthèse d'ATP des mitochondries altérées ou "souffrantes" sont des indicateurs de stress mitochondrial qui génèrent une augmentation de la concentration de Ca^{2+} cytosolique (Biswas et al. 1999). Cette augmentation, à la suite d'un stress mitochondrial, active la voie de signalisation des calcineurines, PKC, JNK, MAPK et CamKIV qui à leur tour activent divers facteurs de transcription responsables

de la réponse cellulaire au stress mitochondrial (Luo, Bond, et Ingram 1997; Liu et Butow 2006).

Ce mécanisme est lui-même régulé par le contexte cellulaire. Des éléments de l'environnement cellulaire tels que la température, la disponibilité des nutriments ou bien des xénobiotiques sont des facteurs qui activent ou inhibent les voies de signalisation de la voie rétrograde du dialogue nucléo-mitochondrial (Jones et al. 2012).

Le premier exemple connu de l'expression de ce dialogue rétrograde se retrouve dans le syndrome de MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers) caractérisé par la description de Ragged Red Fibers.

La voie rétrograde du dialogue nucléo-mitochondrial fait intervenir des protéines de type RTG (*chez la levure*). La voie rétrograde la plus étudiée fait intervenir le gène CIT2 codant pour une citrate synthase peroxysomale dont l'expression est augmentée 50 à 60 fois suite à un dysfonctionnement mitochondrial (Liao, X. S. *et al.*, 1991). Trois régulateurs positifs (Rtg1p, Rtg2p et Rtg3p) et quatre régulateurs négatifs de cette voie (Mks1, Lst8p, Bmh1p et Bmh2p) sont décrits. (pour revue, Liu et Butow 2006).

2. Dysfonctionnement mitochondrial et pathologies mitochondriales:

A. *Les pathologies mitochondriales :*

Les anomalies du fonctionnement mitochondrial peuvent être causées par des mutations, acquises ou héritées, dans la molécule d'ADN mitochondrial (ADNmt) ou dans les gènes nucléaires codant pour le protéome mitochondrial.

Les pathologies induites par une mutation ou un réarrangement du génome mitochondrial sont regroupées dans la classe des cytopathies mitochondriales. Celles-ci, se manifestant le plus souvent dans la première enfance, sont des pathologies graves, multiviscérales et n'espérant, à l'heure actuelle, aucun traitement. Elles portent des noms acronymiques qui reflètent la symptomatologie, MELAS (Mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke), MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers), syndrome NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire) ou bien encore syndrome de Kearns-Sayre. Génétiques, elles seront à transmission maternelle.

On a longtemps considéré, à tort, que les mitochondriopathies proviennent uniquement des mutations de l'ADN mitochondrial. Cela est dû au fait que pendant de longues périodes, seules les mutations ou les délétions de l'ADN mitochondrial ont été identifiées. Toutefois, le nombre de maladies identifiées dues à des mutations dans des gènes nucléaires codant pour des composantes mitochondriales est en constante augmentation (Rötig et Munnich 2003). La première maladie reconnue, due à une mutation d'un gène mitochondrial nucléaire est le syndrome de Leigh. Ce dernier est caractérisé par une encéphalomyopathie nécrosante caractérisée par des crises récurrentes de régression psychomotrice. Ce syndrome est dû à la mutation du gène codant pour la sous-unité flavoprotéine du complexe II causant des dysfonctionnements au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Bourgeron et al. 1995). D'autres pathologies sont liées à la mutation, soit d'un gène codant pour une protéine de structure de la chaîne respiratoire, soit d'une protéine régulant l'assemblage ou le fonctionnement des complexes (pour revue, Rötig et Munnich 2003).

Outre ces pathologies génétiques, un dysfonctionnement mitochondrial est souvent évoqué dans de nombreuses pathologies métaboliques ou dégénératives, notamment liées à l'âge (Schapira 2012).

Les maladies neuro-dégénératives font partie des maladies liées à l'âge et dont l'implication des dysfonctions mitochondriales est bien décrite. La maladie d'Alzheimer est un bon exemple. En effet, plusieurs études ont rapporté des anomalies de la structure ou de la fonction mitochondriale, ou des défauts d'ADNmt dans le cerveau ou d'autres tissus et de cellules de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Schapira 2012). En outre, le polymorphisme dans le gène TOMM40 (translocase of outer mitochondrial membrane 40) constitue un facteur de risque pour le développement de la maladie d'Alzheimer. TOMM40, protéine de la membrane externe mitochondriale, fait partie du pore servant de site d'importation pour les protéines cytoplasmiques pour entrer dans la mitochondrie (Roses et al. 2010).

Les dysfonctionnements mitochondriaux liés à l'âge ainsi que le stress oxydant peuvent être des facteurs de risque pour le développement de glaucome (Kong et al. 2009). Le processus de fission-fusion mitochondrial est l'objet d'études multiples en pathologie humaine. Plusieurs types d'atrophies optiques héréditaires, souvent dominantes, sont liés à des mutations et des déficits fonctionnels des protéines impliquées dans la dynamique du réseau mitochondrial. (Delettre et al. 2000).

La mitochondrie peut désormais être considérée comme une cible thérapeutique. Si plusieurs protocoles thérapeutiques sont en cours d'expérimentation, il faut bien reconnaître que les modalités thérapeutiques restent à mettre au point.

B. Facteurs participant à la pathologie mitochondriale:

a. ROS et Stress oxydant :

Le stress oxydatif se réfère aux divers processus délétères résultant d'un déséquilibre entre la génération excessive de ROS et la limite des systèmes de défense antioxydant cellulaire (Rolo, Teodoro, et Palmeira 2012). La chaîne respiratoire mitochondriale, et plus particulièrement au niveau des complexes I et III, est considérée comme la principale source des ROS au niveau cellulaire. Cela est exacerbé lorsque le potentiel de membrane est élevé (Lenaz 2012). La mitochondrie est elle-même la cible de ces molécules oxydantes qui interagissent avec les protéines des complexes protéiques engendrant ainsi des dysfonctionnements mitochondriaux. Ces dysfonctions seraient impliquées dans le processus de vieillissement (H.-C. Lee et Wei 2012) mais aussi dans divers processus pathologiques tels que l'insulino-résistance (Newsholme, Gaudel, et Krause 2012), le diabète type II (Rolo, Teodoro, et Palmeira 2012) ainsi que diverses pathologies prolifératives et neuro-dégénératives (Lenaz 2012).

b. NO et stress nitrosant :

Le monoxyde d'azote est produit par différentes isoformes de NO Synthase (NOS) à partir de L-Arginine (Knowles et Moncada 1994). Il joue un rôle important dans la régulation de diverses voies de signalisation cellulaire et processus physiologiques. Le NO a été décrit comme ayant la capacité de stimuler la biogénèse mitochondriale via la voie de signalisation impliquant PGC1 α (Clementi et Nisoli 2005; Nisoli et al. 2003; Nisoli et Carruba 2006). Une production excessive et/ou permanente de NO conduit aussi à le convertir en radicaux libres générant ainsi un stress nitrosant qui a des effets délétères au niveau cellulaire et mitochondrial (A. B. Knott et Bossy-Wetzel 2010). La réaction entre le NO et l'anion superoxyde conduit à la production d'une espèce hautement réactive : le peroxy-nitrite (ONOO $^-$) (A. B. Knott et Bossy-Wetzel 2010) qui induit un stress mitochondrial et inhibe, d'une manière irréversible, la chaîne respiratoire au niveau du complexe I et IV (Andrew B Knott et Bossy-Wetzel 2009). Le NO peut interagir, d'une manière physiologique ou physiopathologique, avec les résidus cystéine des protéines dans un processus connu sous le nom de S-Nitrosylation (Stamler, Lamas, et Fang 2001). Cette S-Nitrosylation est impliquée dans diverses

régulations physiologiques mais a aussi été associé à des processus physiopathologiques tels que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Andrew B Knott et Bossy-Wetzel 2009).

c. Flux cellulaires du Calcium:

La mitochondrie, avec le réticulum endoplasmique, joue un rôle majeur dans l'homéostasie calcique au niveau cellulaire. D'autre part, les flux de calcium sont aussi d'importants régulateurs de la fonction mitochondriale (Glancy et Balaban 2012). Le calcium régule l'efficacité de la conversion énergétique à travers son action sur les complexes de la chaîne respiratoire et les enzymes de la matrice mitochondriale (Glancy et Balaban 2012). Une étude récente suggère que les dysfonctionnements mitochondriaux observés à la suite d'une mutation du gène Pink1 dans de la maladie de Parkinson sont dus aux dérégulations des flux de calcium. Ces perturbations mitochondriales sont associées à une augmentation de la concentration intracellulaire de calcium, accompagnée d'un changement de la morphologie mitochondriale (Marongiu et al. 2009).

d. Traitements médicamenteux

La fonction et la régulation mitochondriales sont sujettes à des altérations dues à la prise de certains médicaments. En effet, les molécules médicamenteuses peuvent interagir à différents niveaux de la régulation mitochondriale et avoir des conséquences délétères sur cette fonction, pouvant conduire jusqu'à la létalité. Le Zidovudine (Retrovir®, Combivir®) fut le traitement de référence pour les patients atteints de VIH pendant plusieurs années. Cette molécule inhibe le processus de réplication de l'ADN mitochondrial à travers son action sur l'ADN polymérase mitochondriale (Martin et al. 1994). De sévères myopathies mitochondriales ont été observées chez les patients atteints du VIH traités avec la Zidovudine (Benbrik et al. 1997; Tomelleri et al. 1992). Les anthracycline, molécules largement utilisées pour la chimiothérapie des tumeurs malignes, sont un autre exemple des molécules médicamenteuses ayant des effets délétères sur la mitochondrie (Mordente et al. 2012). Le mode d'action exact de ces anticancéreux sur la mitochondrie n'est pas très bien élucidé et demeure l'objet de plusieurs études. Selon une étude récente, l'ADNmt serait la cible de la toxicité mitochondriale de ces agents. En effet, ces agents s'intercalent au niveau de l'ADNmt,

ce qui expliquerait la toxicité mitochondriale de ces composés (Ashley et Poulton 2009). D'autres molécules ou familles de molécules médicamenteuses sont connues pour avoir des effets délétères sur la fonction mitochondriale telles que les statines hypocholestérolémiantes (Rosenson 2004) et certains antibiotiques (Li et al. 2005).

e. Métaux lourds et xénobiotiques :

Parmi les polluants environnementaux, les métaux lourds constituent une famille avec un fort potentiel perturbateur sur la régulation de la fonction mitochondriale. Le Cadmium, un des métaux lourds les plus étudiés, altère la fonction mitochondriale en inhibant la phosphorylation oxydative ainsi que l'expression des gènes régulant cette fonction (Cannino et al. 2009). Cet effet serait dû principalement à l'inhibition du transport d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Miccadei et Floridi 1993). D'autres métaux lourds ont cet effet inhibiteur sur la chaîne respiratoire mitochondriale tels que le mercure et le cuivre (Belyaeva et al. 2012). D'autres molécules, notamment certaines utilisées comme pesticides et/ou insecticides ont été décrites comme inhibant la fonction respiratoire mitochondriale. L'effet de ces molécules telles que la roténone ou le DDT a souvent pour conséquence une augmentation des ROS intracellulaires suite à une inhibition d'un ou de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire (Slaninova et al. 2009).

3. Xénobiotiques et molécules polluantes de l'environnement :

L'avènement de la chimie dans l'industrie et l'agriculture après la deuxième guerre mondiale fut bénéfique pour le développement de ces deux secteurs. En effet, des gains de temps et de productivité ont été réalisés. Cependant, cet avènement s'est accompagné par la production d'un grand nombre de substances chimiques, soit d'une manière volontaire et contrôlée comme ce fut le cas pour la production de pesticides et engrais agricoles, ou bien d'une manière moins contrôlée et involontaire comme les sous-produits de l'industrie. Qu'elles soient produites d'une manière volontaire ou pas, la majorité de ces substances n'est pas biodégradable et persiste dans l'environnement au niveau des sédiments ou bien dans les eaux durant plusieurs années, ce qui en fait un problème de santé publique majeur.

La production d'un volume croissant de ces substances chimiques augmente les risques d'exposition humaine. Ce risque, réservé dans les années 70 aux ouvriers ou agriculteurs qui furent en contact direct avec ces produits, se trouve, de nos jours, généralisé à toute la population sans exception à cause de la persistance de ces substances et leur transmission via la chaîne alimentaire. Il existe plusieurs types de contaminants alimentaires dont certains sont issus de procédés industriels tels que les PCB, les métaux lourds (cadmium, plomb) ainsi que les pesticides. D'autres, sont produits par des organismes tels que les toxines bactériennes ou les mycotoxines produites par les champignons.

Face à ce risque croissant, les autorités nationales et internationales ont pris des mesures visant à évaluer les risques potentiels de ces substances sur la santé publique. Cela a conduit à l'interdiction de certains produits et la définition des concepts de "concentration maximale tolérée" dans les eaux et les aliments ainsi que de "doses journalières admissibles" (DJA).

En parallèle à l'augmentation de l'exposition de la population aux polluants environnementaux, une augmentation importante des maladies dites non transmissibles a été observée telles que les pathologies neurodégénératives, l'insulino-résistance ou encore les pathologies prolifératives (L. Multigner et al. 2008; Priyadarshi et al. 2001; Lim et al. 2010; D.-H. Lee et al. 2010). La progression de ces pathologies multifactorielles ne peut être expliquée simplement par la génétique et/ou l'augmentation de la durée de vie mais l'exposition aux polluants environnementaux a une part non négligeable dans cette pathogénèse.

A. Pesticides et assimilés :

Les produits organochlorés ont été largement utilisés dans le monde entier en tant que pesticides, fongicides ou insecticides. Leur utilisation est courante, aussi bien dans le domaine de l'agriculture que celui de la santé humaine et animale. Plusieurs procédures judiciaires, en France et dans le monde, sont actuellement en cours concernant, par exemple, le domaine de l'apiculture.

a. Le chlordécone :

Le Chlordécone est un produit phytosanitaire organochloré largement utilisé pendant plus de 20 ans (1973-1993) dans les Antilles françaises, pour contrôler le charançon du bananier (Luc Multigner et al. 2010; Guldner et al. 2010) et cela, en dépit de l'interdiction de son utilisation aux Etats-Unis en 1976. Cette utilisation intensive a conduit à une importante pollution des territoires d'outre-mer (Guadeloupe, Martinique). Certaines nappes phréatiques contiennent des niveaux 100 fois supérieurs aux normes fixées par l'organisation mondiale de la santé (OMS).

Le chlordécone est rapidement absorbé par la muqueuse intestinale après ingestion. Il est largement distribué au sein de l'organisme, l'accumulation survient principalement dans le foie. La demi-vie du chlordécone dans l'organisme est de plusieurs mois. L'excrétion du chlordécone est lente et se fait principalement par les excréments.

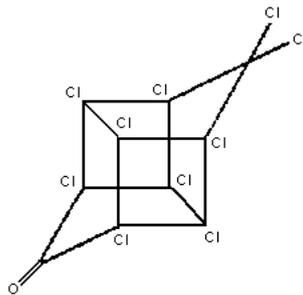


Figure 4: Structure chimique du Chlordécone

b. Le lindane :

Le lindane est un insecticide à large spectre utilisé depuis 1938. Environ 80% du lindane est utilisé à des fins agricoles (Demozay & Maréchal, 1972), principalement pour le traitement des semences et des sols. La protection du bois est la principale utilisation non agricole du lindane. Son utilisation est interdite dans plusieurs pays (Weinhold 2001), notamment dans les pays de l'Union Européenne pour la protection des végétaux, où elle a été réduite de deux tiers entre 1970 et 1996 (Breivik, Pacyna, et Münch 1999). Le lindane est également utilisé contre les ectoparasites dans les produits vétérinaires et pharmaceutiques. Il est utilisé par voie topique dans des concentrations de 1% pour le traitement de la gale en médecine.

Après ingestion, le lindane est rapidement absorbé et distribué dans tout l'organisme. Sa bioaccumulation dans les tissus est fonction de leur teneur en molécules grasses. Plus le tissu est riche en graisse plus le lindane s'y accumule. Le lindane et ses métabolites sont éliminés majoritairement dans les urines et les fèces.

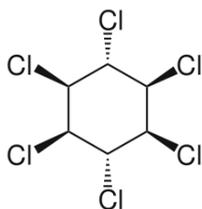


Figure 5: Structure chimique du Lindane

L'utilisation intensive du chlordécone et du lindane, combinée à leur résistance à la dégradation, fait de ces molécules des polluants importants de l'écosystème. Ces deux organochlorés sont classés comme polluants organiques persistants par la convention de Stockholm.

Comme d'autres polluants environnementaux, l'exposition aux composés organochlorés se fait principalement via la voie orale à travers l'ingestion d'aliments contaminés (Guldner *et al.* 2010; Mariscal-Arcas *et al.* 2010). En effet, les résidus de ces composés sont encore détectés dans les rivières, les aliments et les tissus animaux, même si leur utilisation est actuellement interdite dans la plupart des pays (Dagorn *et al.*, 1988; Coat *et al.*, 2011). Des quantités variables de ces organochlorés et leurs métabolites ont été retrouvées dans le sérum du sang ombilical de femmes enceintes (Guldner *et al.*, 2010; Mariscal-Arcas *et al.*, 2010) et dans le lait maternel (Mishra et Sharma, 2011), ce qui élargit le spectre de la population exposée, aux fœtus et aux nouveau-nés.

B. Les Cibles des organochlorés :

Du fait de leur caractère lipophile, les organochlorés se bioaccumulent principalement au niveau du système nerveux central, du foie et du tissu adipeux. Des niveaux élevés sont détectés dans ces tissus à la suite d'une exposition aux organochlorés (Srinivasan et Radhakrishnamurty, 1983; Belfiore *et al.*, 2007). Cette bioaccumulation dans les tissus biologiques est être responsable de dysfonctionnements physiologiques et probablement la source de plusieurs maladies comme le cancer et l'insulino-résistance.

En effet, des études récentes menées dans les Antilles françaises ont permis de constater que plus la concentration plasmatique de chlordécone est élevée, plus le risque de cancer de la prostate augmente. (Multigner *et al.*, 2010). D'autres études décrivent une corrélation positive entre le cancer, l'obésité ou le diabète et la concentration sanguine des organochlorés (Lim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). Une des cibles communes de la toxicité des organochlorés est le foie car il joue un rôle clé dans la détoxification et le métabolisme. Il est le siège de la synthèse d'une gamme de molécules indispensables pour le maintien de l'homéostasie corporelle.

C. Toxicologie des organochlorés :

L'évaluation toxicologique des deux organochlorés s'est faite par la mesure de leur toxicité sur des modèles *in vitro* et *in vivo*. Cela se fait sur plusieurs modes (dose unique ou doses répétées) et temps d'exposition (court terme, exposition chronique...) ainsi qu'avec des doses ou concentrations différentes d'organochlorés. L'effet de l'exposition aux organochlorés est évalué sur de multiples aspects biologiques tels que le pouvoir mutagène, le pouvoir tératogène ou les effets sur la reproduction, mais le point final de la mesure de la toxicité reste le pouvoir létal de ces produits. Ces études aboutissent souvent à la détermination de la dose létale 50 (lindane50) et aide à la définition de dose seuil d'exposition : la dose journalière admissible (DJA).

D. Effet des faibles doses :

Ces dernières années, l'hypothèse de l'effet des faibles doses a bousculée le modèle "dose-réponse" qui repose sur l'idée que la nature de la réponse à une substance augmente en proportion de la dose. L'effet des faibles doses a remis en question cette hypothèse scientifique bien ancrée chez les toxicologues et a démontré que l'effet de certaines substances actives hormono-mimétiques ne dépendait pas de la dose. C'est le cas de plusieurs substances telles que le Bisphénol A sur lequel l'Anses (Agence nationale de sécurité sanitaire) reconnaît des effets à des doses notablement inférieures aux doses de référence. De la même manière, les faibles doses peuvent induire des effets que les fortes doses n'engendrent pas. C'est le cas des polluants organiques persistants. En effet, dans une étude récente, Lee *et al.* concluent que les faibles doses des polluants organiques persistants, similaires aux niveaux actuels d'exposition de la population,

augmentent le risque du diabète type 2 tandis que les fortes doses ne l'augmentent pas (D.-H. Lee et al. 2010).

E. Effet des mélanges « effet cocktail » :

Les analyses de sérum, de plasma et du tissu adipeux faites lors d'études épidémiologiques concernant l'exposition aux polluants environnementaux montrent clairement que les individus sont exposés à plusieurs substances en même temps (Dirinck et al. 2011; D.-H. Lee et al. 2011). Les effets combinés sur l'organisme à la suite d'une exposition à un mélange de xénobiotiques font l'objet de plusieurs études toxicologiques et pharmacologiques. A ce "cocktail" de substances s'ajoutent d'autres polluants non quantifiables dans le sang ou d'autres milieux biologiques et dont les effets sont encore mal connus. Ces polluants sont les ondes électromagnétiques et les radiofréquences utilisées par les téléphone portables entre autres (Feychting, 2011).

L'évaluation des risques potentiels pour la santé humaine de l'exposition à des faibles doses de polluants environnementaux et/ou à des mélanges de substances chimiques présentes dans l'environnement, constitue un des défis les plus difficiles à relever aussi bien pour l'évaluation des risques que pour la recherche en toxicologie (Teuschler *et al.* 2002).

Les approches classiques de la toxicologie qui reposent, pour la plupart, sur l'étude de l'effet mutagène, tératogène et qui ont la mortalité comme évaluation finale ne sont pas adaptés pour l'évaluation des effets des faibles doses et/ou des mélanges. En effet, ces doses entraînent des perturbations à plusieurs niveaux de l'organisme sans pour autant que ces perturbations soient létales. Le défi de la toxicologie moderne pour les années à venir est d'élaborer des moyens et techniques fiables pour l'évaluation des effets des faibles doses des xénobiotiques. Cela afin de pouvoir prédire les effets néfastes de polluants ou secondaires dans le cas du processus de développement des médicaments.

4. Objectifs de l'étude.

La mitochondrie joue un rôle important dans l'hépatocyte, comme dans d'autres types cellulaires. En effet, de nombreuses voies et processus cellulaires sont régis par les mitochondries, comme la mort cellulaire, la prolifération des cellules et le métabolisme (Green, 1998; Hajnóczky *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2006).

Plusieurs études *in vivo* et *in vitro* ont évalué la toxicité et les effets du chlordécone et du lindane. Les effets observés étaient différents selon les doses utilisées et la durée d'exposition. La toxicité aiguë indique des effets sur le système nerveux central (hypoactivité, ataxie et convulsion) (Ullman *et al.*, 1986). Les études de toxicité à court terme et à long terme ont montré une altération de l'homéostasie sanguine, l'apparition d'hépatocarcinome et l'augmentation du taux de cholestérol (Steinberg *et al.*, 1977). Des études *in vitro* ont montré que ces deux organochlorés ont un impact sur le niveau de calcium intracellulaire (Younglai *et al.*, 2006; Heusinkveld et Westerink, 2012) et les espèces réactives de l'oxygène (Ledirac *et al.*, 2005; Piskac-Collier et Smith, 2009). Cependant, les concentrations utilisées dans la plupart de ces études étaient relativement élevées comparées à celles que l'on retrouve dans l'environnement et dans le sang des personnes exposées. Néanmoins, les concentrations de chlordécone et de lindane détectées dans le sang des personnes vivant et/ou travaillant dans la zone contaminée sont hétérogènes. Selon le niveau de contamination de l'environnement et la fréquence de l'exposition, ces concentrations sont de l'ordre du picomolaire et/ou du nanomolaire (Cannon *et al.*, 1978; Krauthacker *et al.*, 1980; Drummond *et al.*, 1988; Boffa *et al.*, 1995; Guldner *et al.*, 2010; Mariscal-Arcas *et al.*, 2010). En outre, la limite fixée par l'OMS dans l'eau potable est autour du picomolaire mais les effets de ces faibles concentrations restent mal explorés. D'autre part, il y a un besoin urgent de trouver d'autres moyens et paramètres mesurables pour évaluer la toxicité des faibles concentrations de ces composés qui ne peuvent être évalués par des méthodes classiques de toxicologie.

Dans la présente étude, nous avons exploré les effets des faibles concentrations de lindane et de chlordécone retrouvées dans l'environnement sur la lignée cellulaire HepG2. Le but de notre étude est d'évaluer le potentiel perturbateur des organochlorés sur la fonction mitochondriale et les voies métaboliques à des faibles concentrations (environnementales et plasmatiques).

Notre but est d'avoir des éléments de réponse pour un lien éventuel entre l'exposition aux composés organochlorés, le dysfonctionnement mitochondrial et les maladies métaboliques d'un côté et l'évaluation de la sensibilité de la fonction mitochondriale à des faibles expositions d'une durée relativement courte d'un autre côté. Cette approche devra estimer la possibilité d'utiliser ce type d'analyse pour évaluer la toxicité des faibles concentrations de xénobiotiques, et permettra d'envisager l'élaboration d'une nouvelle méthode d'évaluation d'un effet cellulaire lié aux xénobiotiques.

On a exposé les cellules HepG2 aux faibles concentrations observées au niveau plasmatique et environnemental de chlordécone et de lindane durant 24, 48 et 72h. A la suite de cette exposition, la viabilité cellulaire a été évaluée par test MTT et test de l'exclusion du bleu Trypan, la respiration ainsi que la régulation mitochondriale ont été mesurées par la polarographie et l'expression d'un nombre de gènes régulant la fonction mitochondriale. Les stress oxydants et nitrosants ont été évalués du fait de leur implication dans la régulation mitochondriale. L'anion superoxyde et le monoxyde d'azote ont été quantifiés par la technique de résonance paramagnétique électronique. L'observation d'une augmentation de production de NO nous a conduit à réaliser des "Western Blot" pour quantifier la nitration des protéines et l'expression de l'isoforme inductible de la NOS.

Afin de qualifier et quantifier les conséquences observées sur la régulation et la fonction mitochondriale, des paramètres du métabolisme énergétique ont été évalués. La production d'ATP ainsi que l'évaluation de la voie glycolytique ont été réalisées par la mesure des adénylates par HPLC et du taux de L-lactate par spectrophotométrie. Enfin, comme "end-point" physiopathologique, une mesure de l'accumulation des lipides au niveau des cellules HepG2 a été réalisée par la technique du "Oil-Red".

II. Matériel et méthodes.

1. Modèle et culture cellulaire :

HepG2 (ATCC HB 8065) est une lignée cellulaire obtenue à partir d'un hépatocarcinome humain. Les cellules sont cultivées en milieu HAM'S/DMEM (LONZA, Verviers, Belgique) supplémenté avec 10% de SVF (PAA, Les Mureaux, France), 1% de glutamine, 1% pénicilline (100U/mL)/streptomycine (2mM) (LONZA, Verviers, Belgique). Les cellules sont maintenues dans un incubateur thermostaté à 37°C dans une atmosphère saturée en humidité avec 5% de CO₂. A confluence, les cellules subissent une trypsination. Le tapis cellulaire est préalablement rincé avec 8 mL de PBS 1X (LONZA, Verviers, Belgique) et 2 mL de trypsine 1X (Lonza®, Verviers, Belgique) sont ajoutés dans la flasque. Les cellules sont ainsi incubées à 37°C pendant 5 minutes. La réaction est arrêtée par l'ajout de 8 mL de milieu contenant du SVF. Les cellules sont homogénéisées et repiquées au minimum au 1/10^e dans une nouvelle flasque.

2. Poudres chimiques et réactifs :

A. Chlordécone (Sigma-Aldrich, Lyon, France):

Une solution stock de 50 mM est obtenue en dissolvant 24,5 mg de chlordécone dans 1 mL de DMSO et stockée à -20°C. Des solutions intermédiaires sont préparées à partir de la solution stock pour être diluées au 1/1000 dans les milieux lors du traitement des cellules afin de garder la concentration de DMSO égale dans tous les traitements.

B. Lindane (sigma-Aldrich, Lyon, France) :

Une solution stock de 50 mM est obtenue en dissolvant 14,5 mg de lindane dans 1 mL de DMSO et stockée à -20°C. Des solutions intermédiaires sont préparées à partir de la solution stock pour être diluées au 1/1000 dans les milieux lors du traitement des cellules afin de garder la concentration de DMSO égale dans tous les traitements.

3. Mesure de la viabilité cellulaire.

La viabilité cellulaire a été évaluée par deux techniques : le test MTT et le test d'exclusion du Bleu Trypan

A. Principe des techniques.

a. MTT :

Le test MTT se base sur la réaction de réduction du MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide), composé jaune, en sel de formazén de couleur violette par les succinate-déhydrogénases mitochondriales. Les sels de formazén formés sont dissouts et l'absorbance est proportionnelle aux cellules vivantes.

b. Test d'exclusion Bleu Trypan :

Le Bleu Trypan est un colorant permettant de colorer les cellules mortes. Cet élément toxique diffuse dans les cellules, ce qui déclenche un mécanisme pour son exclusion dans les cellules vivantes. Ce mécanisme nécessitant de l'énergie, seules les cellules vivantes peuvent le mettre en place et donc apparaissent claires au microscope. Les cellules mortes, ne pouvant pas mettre en place ce mécanisme d'exclusion, se colorent et apparaissent en bleu au microscope.

B. Réactifs :

a) Poudre MTT (Sigma-Aldrich, Lyon, France) :

Une solution de 0,5 mg/mL est obtenue en dissolvant 5 mg dans 10 mL de milieu de culture sans SVF. La solution est aliquotée et stockée à -20°C pendant un mois.

b) Bleu Trypan (Sigma-Aldrich, Lyon, France) :

Une solution de travail de 0,04% est obtenue en diluant la solution mère au 1/5 juste avant utilisation.

C. Protocole :

1. MTT :

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de culture cellulaire de 96 puits (Costar, NY, USA). 24h après leur mise en culture, les milieux sont remplacés, soit par du milieu contenant le chlordécone aux concentrations plasmatiques ou environnementales, soit du lindane aux concentrations plasmatiques ou environnementales. Le milieu des cellules contrôles est remplacé par du milieu contenant le solvant (DMSO) à 1/1000. Les cellules sont traitées pendant 24 ou 48h

avec un changement de milieux respectifs chaque 24h. À la fin des traitements, les cellules sont incubées avec du milieu sans SVF contenant 10% de MTT pendant 3,5h. À la fin du temps d'incubation, le milieu est éliminé et 100µL de DMSO sont ajoutés à chaque puits et la plaque est mise sous agitation durant 15 minutes pour la dissolution des sels de formazén formés. Ensuite l'absorbance est mesurée à 550 nm à l'aide du lecteur de plaques Mithras® LB940 (Berthold Technologies, Thoiry, France). Les résultats sont présentés en pourcentage de DO des différentes conditions par rapport à celles de leur contrôle.

2. Bleu Trypan :

Les cellules sont mises en culture dans des plaques de culture cellulaire de 6 puits (Costar, NY, USA) et traitées comme décrit précédemment. Les cellules sont ensuite détachées par l'ajout de 500µL de trypsine dans chaque puits et incubées pendant 5 minutes à 37°. Après l'incubation, l'action de la trypsine est arrêtée par ajout de 1mL de milieu complet. Les cellules sont récupérées et homogénéisées. Un comptage cellulaire en triplicat est réalisé sur une lame de Neubauer pour chaque condition en prélevant 25µL de suspension cellulaire à laquelle on ajoute 25µL de solution de travail de Bleu Trypan pour obtenir une concentration finale de 0,02 % de Bleu Trypan. Les cellules vivantes sont comptées et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules vivantes pour chaque condition par rapport à leur contrôle.

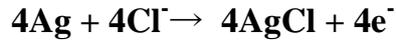
4. **Mesure de la respiration cellulaire sur cellules intactes :**

La respiration mitochondriale des cellules est mesurée par polarographie avec une électrode à oxygène type « Clark » (Oroboros, Innsbruck, Autriche) sur des cellules non perméabilisées utilisant leurs substrats endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour respirer.

A. *Principe de l'électrode de Clark :*

Elle est constituée d'une cathode en platine et d'une anode en argent. Lorsqu'une différence de potentiel de -0,6 V est appliquée, l'électrode de platine se charge négativement par rapport à celle en argent et chaque molécule d'oxygène dissoute dans le milieu diffuse à travers la membrane de Téflon perméable aux gaz, et est réduite à la cathode selon la réaction suivante : $O_2 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow 2H_2O$.

Une oxydation se produit de manière concomitante à l'anode :



L'équation bilan de la réaction peut donc se résumer sous la forme :



Le courant ainsi généré est proportionnel à la concentration en oxygène dissout.

L'oxygraphe est relié à un ordinateur et permet de visualiser en temps réel la consommation d'oxygène des cellules en (pico mole) par unité de temps (minute).

La respiration cellulaire est mesurée dans différents états :

- a) La respiration de Routine (respiration basale) : correspond à la consommation d'oxygène par les cellules sans inhibiteur.
- b) La respiration non couplée à la synthèse d'ATP (Oligomycine) : correspond à la consommation d'oxygène après inhibition de l'ATP synthase. Il s'agit de la respiration pour la compensation de la fuite des protons.
- c) FCCP (capacité respiratoire maximale) : la consommation d'oxygène après dissipation du gradient de proton mitochondrial suite à l'ajout pas à pas, d'un protonophore (FCCP). Dans le souci de rétablir le gradient de proton mitochondrial, la mitochondrie fait appel à sa réserve respiratoire et de ce fait, la consommation d'oxygène va refléter la capacité respiratoire maximale.

B. Réactifs :

1. **Oligomycine A** (Sigma Aldrich, Lyon, France).

Une solution à 6 mg/mL est préparée en dissolvant 3 mg d'oligomycine dans 500 μL d'éthanol absolu. Cette solution est stable pendant un mois à -20°C .

2. **FCCP** (Sigma Aldrich, Lyon, France).

4 mg de mClCCP sont dissouts dans 978 μL d'éthanol absolu. La solution à 20 mM ainsi préparée, est diluée au 1/10^e dans l'éthanol absolu et peut être conservée pendant un mois à -20°C .

3. **Antimycine A** (Sigma Aldrich, Lyon, France).

2 mg d'antimycine A sont repris par 1 mL d'eau distillée. Cette solution à 2mg/mL est stable pendant un mois à -20°C.

C. Protocole :

1. Traitement des cellules :

Les cellules HepG2 sont mises en culture dans des flasks T 75cm². 24h après leur mise en culture, les milieux sont remplacés par du milieu contenant le lindane ou bien le chlordécone aux concentrations plasmatiques et environnementales durant 48h, avec un changement de milieu à 24h. Le milieu des cellules contrôles est remplacé par du milieu contenant du DMSO (1/1000)

2. Préparation des cellules.

Après les traitements, le flask de 75 cm² arrive à 75% de confluence. Le tapis cellulaire est détaché par l'ajout de 2 mL de trypsine EDTA (Lonza®, Verviers, Belgique) et une incubation de 5 minutes à 37°C. L'action de la trypsine est inhibée suite à l'ajout de 8 mL de milieu complet. Un échantillon est prélevé pour effectuer un comptage cellulaire en utilisant une lame Neubauer. Les cellules sont centrifugées à 350 g pendant 5 minutes et reprises dans le milieu. Le volume de milieu ajouté est calculé de façon à obtenir une concentration de cellules égale à 10⁶/mL. 2 mL de cette suspension cellulaire sont transférés immédiatement dans la chambre de l'oxygraphe pour la mesure de la respiration cellulaire.

Un comptage cellulaire est effectué en utilisant une lame Neubauer. Un volume correspondant à 5 millions de cellules est prélevé et mis dans un tube à centrifuger. Le reste servira à faire des culots secs pour les manipulations pouvant être effectuées sur des cellules congelées. L'aliquot de 5 millions de cellules est centrifugé pendant 5 minutes à 900 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 500 µl de milieu + glutamine 2 mM.

3. Mesure de la respiration par polarographie.

Avant la première mesure, l'électrode est calibrée afin d'obtenir des valeurs de 100% et 0% d'oxygène. Pour le 100%, la consommation d'oxygène est mesurée sous agitation,

cuve ouverte avec du milieu. Lorsque le tracé est bien stable, le 100 % d'oxygène est réglé sur l'appareil. Le 0% oxygène est réalisé par l'ajout de 2mg de dithionite de sodium, un agent réducteur qui va peu à peu consommer l'oxygène contenu dans le milieu et donner la valeur du 0% d'oxygène. Après cet étalonnage, la cuve de mesure est rincée trois fois à l'eau distillée et les 2 mL de suspension cellulaire préparée précédemment y sont introduits. Le bouchon est fixé sur la cuve et la consommation d'oxygène est mesurée. Lorsque le tracé est régulier (environ 3 à 5 minutes), 1µL de la solution d'oligomycine est ajouté. Afin de s'assurer que ce réactif est bien en concentration saturante. Un autre ajout d'1 µL d'oligomycine est réalisé. Ensuite, des ajouts successifs de 0,5 µL de FCCP permettent d'effectuer une titration. En effet, il convient de déterminer la concentration optimale en FCCP nécessaire pour stimuler de manière maximale la chaîne respiratoire. Au-delà d'une certaine concentration, le FCCP a un effet toxique sur les cellules et inhibe la respiration. Une fois cette concentration optimale dépassée (souvent après ajout de 600 à 800 nM), 2µL d'antimycine A à 2 mg/mL sont ajoutés. Ce réactif est inhibiteur du complexe III permettant de mesurer la consommation d'oxygène qui n'est pas due à la chaîne respiratoire mitochondriale. La valeur de cette respiration, en présence d'antimycine A, sera soustraite à toutes les autres mesures afin d'exprimer spécifiquement la respiration mitochondriale.

4. Dosage de la concentration en protéines.

Après la mesure de la respiration en présence d'antimycine A, 1 mL de la suspension cellulaire est prélevé dans la cuve et centrifugé pendant 5 minutes à 350 g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 1 mL de NaCl. Deux fois 5 µL de cette solution sont prélevés et placés dans une microplaque 96 puits. Le kit DC protein Assay® 5 (Bio-Rad, Lyon, France) est utilisé pour doser les protéines dans ces échantillons.

Le principe de ce dosage est similaire à la méthode de Lowry et repose sur la formation d'ions Cu^+ à partir d'ions Cu^{2+} par les liaisons peptidiques des protéines. Les ions Cu^+ forment un complexe violet avec l'acide bicinchonique en conditions alcalines, ce qui permet de suivre directement la réduction des ions Cu^{2+} en Cu^+ par les protéines par lecture de l'absorbance à 562 nm en spectrophotométrie. La concentration protéique de

l'échantillon est calculée à l'aide d'une courbe étalon obtenue avec des concentrations connues d'albumine bovine (0,2 à 2 mg/mL).

On commence par la préparation de la solution de travail A'. 20µL du réactif S du kit sont ajoutés à chaque mL du Réactif A. Après avoir déposé 5µL en duplicat de notre gamme étalon et des échantillons à doser dans une microplaque 96 puits, 25 µL de la solution de travail sont ajoutés à chaque puits. Ensuite, 200 µL de la solution B sont ajoutés dans chaque puits. La microplaque est placée dans un lecteur microplaque Mithras (Berthold) et l'absorbance est lue à 570 nM.

Les résultats de la polarographie sont exprimés en nmole d'O₂/milligramme de protéines/minute.

5. Dosage de l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire :

Les dosages des activités enzymatiques des complexes I, II, III et IV et de la citrate synthase sont réalisés sur des mitochondries isolées selon les adaptations de la méthode de Malgat *et al.* (1999). Le principe des dosages des complexes de la chaîne respiratoire repose sur le transfert d'électrons d'un donneur (substrat) à un accepteur. La mesure par spectrophotométrie de la vitesse d'apparition de l'accepteur réduit ou de disparition du donneur oxydé permet de quantifier l'activité enzymatique associée.

Les réactifs utilisés proviennent de chez Sigma Aldrich (Lyon, France) excepté pour l'ATP, le NADH, la lindaneH et la PK (Roche, Meylan, France), pour le décylubiquinone (Tebu-bio, La Perray-en-Yvelines, France) et pour le cytochrome c oxydé (Acros Organics, Halluin, France). Une fois préparés, les réactifs sont aliquotés de manière à n'utiliser qu'un seul aliquot par jour d'expérimentation.

A. Complexe I (NADH ubiquinone réductase) :

1. Principe de la technique :

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



Le principe de la technique repose sur la mesure de la cinétique d'oxydation du NADH, dont l'absorbance est mesurée à 340 nm, en présence de l'ubiquinone. Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution de l'absorbance à 340 nm est alors proportionnelle à l'activité du complexe I. la cinétique de l'oxydation du NADH est mesurée aussi après l'inhibition du complexe I. Cela permet d'obtenir l'activité d'oxydation du NADH spécifique du complexe I.

2. Réactifs :

- **Tampon A, pH 7,2** : Ce tampon est utilisé pour reprendre les cellules et est commun au dosage de tous les complexes de la chaîne respiratoire. Ce tampon est obtenu en dissolvant dans 100 mL d'eau distillée 8,6 g de Saccharose (250 mM), 242,28 mg de Tris base (20 mM), 58,45 mg d'EDTA (2 mM) et 100 mg de BSA (1 mg/mL). Le pH est ajusté à 7,2 en utilisant une solution d'HCl 5N.
- **Tampon KH_2PO_4 100 mM, pH 7,4** : 2,72 g de KH_2PO_4 sont dissouts dans 200 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois à -20°C .
- **Azide de sodium** : Cet inhibiteur inhibe spécifiquement le complexe IV de la chaîne respiratoire. 65 mg d'azide de sodium (NaN_3) sont dissouts dans 1 mL d'eau distillée. La solution à 1M ainsi préparée est aliquotée et se conserve pendant 6 mois à -20°C .
- **Cyanure de potassium (KCN)** : Cet inhibiteur est spécifique du complexe IV de la chaîne respiratoire. 26 mg de cyanure de potassium sont dissouts dans 800 μL d'eau distillée pour obtenir une concentration de 0,5 M. La solution se conserve pendant un mois à -20°C .
- **NADH** (Roche, Rosny-sous-bois, France) : Une solution à 15 mM de NADH doit être préparée en préalable en dissolvant 11,5 mg de NADH dans 1mL d'eau distillée. La solution doit être conservée sur glace et protégée de la lumière.
- **Roténone** : Cet inhibiteur est spécifique du complexe I. Une solution de roténone à 0,5 mM est préparée en reprenant 1,97 mg de roténone par 10 mL d'un mélange éthanol/DMSO (V/V). Une fois aliquotée, cette solution peut être conservée pendant 1 mois à -20°C

- **Ubiquinone-1** : 10 mg d'ubiquinone-1 sont repris par 1 mL d'éthanol absolu et constituent une solution stock à 39,9 mM. Avant chaque expérience, 100 μ L de cette solution sont ajoutés à 1,398 mL d'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 2,5 mM. La solution stock est stable pendant un mois à -20°C mais doit être protégée de la lumière.

3. Protocole :

Le protocole se fait sur des culots secs de cellules contenant au minimum 5 millions de cellules conservés à -80°C. Après décongélation, le culot est repris par 50 μ L par million de cellules de tampon A et placé pendant 3 minutes dans l'azote liquide. S'en suit une rapide décongélation au bain marie à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes et le culot est repris par du tampon A (250 μ L par million de cellules). Les cellules sont transvasées dans un tube Kimble en verre lui-même placé dans un bécher contenant de la glace. La suspension cellulaire subit une sonication suivant un cycle de 6 x 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque cycle afin de rendre. Cette opération a pour but de rendre le complexe I plus accessible.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 815 μ L de KH_2PO_4 : 80 mM
- 40 μ L d'Ubiquinone-1 : 0,1 mM
- 2 μ L d'Azid de Sodium : 2 mM
- 2 μ L de KCN : 1 mM

Ce mélange réactionnel est incubé pendant 3 minutes à 37°C. 10^5 de cellules sont ajoutés (soit 125 μ L de la suspension cellulaire). Le déclenchement de la réaction se fait par l'ajout de 20 μ L de NADH à 15 mM. Le mélange est rapidement transféré dans des micro-cuves à usage unique. La lecture se fait sur un spectrophotomètre (SAFAS, Monaco, France) thermostaté à 37°C, la cinétique de diminution de l'absorbance à 340 nm est suivie pendant 40 secondes. Sans stopper la lecture, 4 μ L de roténone sont ajoutés dans les micro-cuves et bien homogénéisés.

4. Expression des résultats :

L'activité spécifique (AS) du complexe I est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS \text{ (Cellules)} = \frac{\Delta DO_a - \Delta DO_b}{1 \times \varepsilon_{NADH} \times S_{nNADH}} \times \frac{10}{q \text{ cellules}}$$

ΔDO_a : delta DO par minute mesurée avant addition de Roténone

ΔDO_b : delta DO par minute mesurée après une des additions de roténone en prenant l'inhibition la plus forte (delta DO la plus faible)

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε_{NADH} : coefficient d'extinction du NADH à 340 nm et pH 7,4, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 6,22

S_{nNADH} : nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel soit : 10^5

Les résultats ainsi obtenus sont exprimés en UI micro moles/min/million de cellules.

B. Succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)

1. Principe

La technique de mesure de l'activité enzymatique du complexe II de la chaîne respiratoire sur cellules est adaptée de celle décrite par James *et al.* (1996). Les réactions enzymatiques catalysées par le complexe II sont :



Lors de cette réaction, le succinate réduit l'ubiquinone en ubiquinol. Le dosage fait intervenir une seconde réaction impliquant un composé chimique de couleur bleue, le DCPIP (dichlorophenolindophenol) qui absorbe la lumière à 600 nm. Ce dernier va être réduit par l'ubiquinol-2 formé lors de la réaction précédente. Le DCPIP perd alors sa couleur bleue et n'absorbe plus de lumière. La réaction pour mesurer l'activité du complexe II consiste donc à suivre la diminution de l'absorbance du DCPIP à 600 nm, celle-ci étant proportionnelle à l'ubiquinol formé.

2. Réactifs

- **Antimycine A (1 mg/mL éthanol)** : Le contenu du flacon (10 mg) est dissous dans 1 mL d'éthanol absolu et peut être conservé pendant 1 mois à -20°C . Une solution diluée à 1mg/mL est préparée en prélevant 100 μL de cette solution mère et en les ajoutant à 900 μL d'éthanol absolu.
- **BSA (50 mg/mL eau distillée)** : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.

- **DCPIP (5 mM)** : 14,51 mg/10 mL eau distillée. La solution est préparée extemporanément et incubée à 37°C.
- **EDTA (20 mM)** : 584 mg/10 mL eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du NaOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.
- **KCN (10 mM)** : 6,5 mg/10 mL eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.
- **Roténone (2,5 mM)** : 9,86 mg sont dissous dans 10 mL éthanol/DMSO (volume/volume). La solution est stable à -20°C pendant 3 mois.
- **Succinate (500 mM)** : 590,45 mg/10 mL eau distillée. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.
- **Tampon KH₂PO₄ (100 mM), pH 7,5** : 1,36 g/100 mL eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du KOH 5 M. La solution est aliquotée et conservée à -20°C pendant 6 mois.
- **Thénoltrifluoroacétone (40 mM)** : 8,89 mg sont dissous dans 1 mL éthanol absolu. La solution est conservée à -20°C pendant 3 mois.
- **Triton X 100 (10 %)** : Le triton X 100 est dilué au 1/10^e dans de l'eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.
- **Ubiquinone-1 (2,5 mM)** : Une solution de 39,9 mM est préparée en dissolvant 10 mg d'ubiquinone dans 1 mL d'éthanol. Cette solution mère est conservée à -20°C pendant 1 mois à l'abri de la lumière. La solution à 2,5 mM est préparée extemporanément en diluant 100 µL de la solution mère dans 1,498 µL d'éthanol.

3. Protocole

La mesure de l'activité enzymatique du complexe II se fait sur culots secs de cellules (au moins 5 millions de cellules) conservés à -80°C. Le culot, une fois décongelé, est repris par 50 µL par million de cellules de tampon A (composition : cf. dosage de l'activité du complexe I) et immergé pendant 3 minutes dans l'azote liquide. Le culot est ensuite rapidement décongelé au bain marie à 37°C. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes et le culot est repris par 50 µL de tampon A par million de cellules.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- 160 µL d'eau distillée

- 500 μL de tampon KH_2PO_4 (soit 50 mM)
- 5 μL d'EDTA (soit 100 μM)
- 20 μL de BSA (soit 1 mg/mL)
- 40 μL de succinate (soit 20 mM)
- 200 μL de KCN (soit 2 mM)
- 4 μL de roténone (soit 10 μM)
- 4 μL d'antimycine A (soit 4 $\mu\text{g/mL}$)
- 16 μL de DCPIP (soit 80 μM)
- 2 μL de triton X 100 (soit 0,02 %)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis 25 μL de la suspension cellulaire (soit 0,5 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 20 μL d'ubiquinone-1 (soit 50 μM). L'évolution de l'absorbance à 600 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 40 secondes. Sans arrêter la lecture, 5 μL de thénoltrifluoroacétone (soit 200 μM) sont ajoutés en agitant dans les cuves. L'évolution de l'absorbance est à nouveau suivie pendant 40 secondes. La lecture est ensuite arrêtée et les pentes de décroissance sont notées :

- la pente initiale avant l'ajout de thénoltrifluoroacétone
- la pente après ajout de thénoltrifluoroacétone

4. Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) du complexe II est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS (\text{Cellules}) = \frac{\Delta DO_a - \Delta DO_b}{1 \times \varepsilon_{DCPIP} \times S n_{DCPIP}} \times \frac{10}{q \text{ cellules}}$$

ΔDO_a : variation de DO par minute sans thénoltrifluoroacétone.

ΔDO_b : variation de DO par minute avec thénoltrifluoroacétone.

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1.

ϵ_{DCPIP} : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm, en $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, soit 19,1.

S_{DCPIP} : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1.

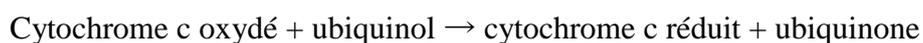
q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,5.

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/million de cellules.

C. Ubiquinol cytochrome c oxydoréductase (complexe III)

1. Principe :

La technique de mesure de l'activité du complexe III est adaptée à partir de celle décrite par Rustin *et al.* (1993). La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :



La mesure de l'activité du complexe III consiste à suivre la réduction du cytochrome c oxydé à 550 nm. En effet, le cytochrome c réduit absorbe la lumière à 550 nm, donc l'apparition de la forme réduite du cytochrome c entraînera une augmentation de l'absorbance à 550 nm qui sera proportionnelle à l'activité du complexe III.

2. Réactifs

- **Tampon KH_2PO_4 (20 mM), pH 7,8** : 272 mg/100 mL eau distillée. Le pH est ajusté à 7,8 avec du KOH 5 M. La solution est stable à -20°C pendant 6 mois.
- **BSA (50 mg/mL eau distillée)** : La solution est stable à -20°C pendant 6 mois.
- **EDTA (20 mM)** : 584 mg/10 mL eau distillée. Le pH est ajusté à 7,5 avec du NaOH 5 M. La solution est stable à -20°C pendant 6 mois.
- **KCN (10 mM)** : 6,5 mg/10 mL eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.
- **Cytochrome c oxydé (1 mM)** : 12,38 mg/1 mL eau distillée. La solution est préparée extemporanément.
- **Antimycine A (1 mg/mL éthanol)** : La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.
- **Décylubiquinol (25 mM)** : Le décylubiquinol est préparé à partir de décylubiquinone, un analogue de l'ubiquinone. Pour cela, 20 mg de décylubiquinone (*Tébu-bio, La*

Perray-en-Yvelines, France) sont dissous dans 4,77 mL d'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 23 mM. Le spectre de l'ubiquinone oxydée est réalisé en diluant 10 µL d'ubiquinone dans 1 mL d'éthanol et en lisant l'absorbance entre 250 et 350 nm. Un pic à 275 nm doit apparaître avec une absorbance d'environ 2,6.

A partir de ce moment, toutes les étapes doivent être réalisées en plaçant la solution de décylubiquinone à l'obscurité dans un tube entouré de papier d'aluminium. La solution de décylubiquinone est réduite par quelques cristaux de borohydrure de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) puis 30 µL d'acide chlorhydrique fumant à 37% sont ajoutés. Le tube est bouché avec un parafilm percé d'un trou pour permettre aux gaz produits par la réaction de s'échapper. Lorsque la solution est totalement décolorée, elle est centrifugée pendant 15 minutes à 4000 g. Le surnageant est réparti dans deux tubes en verre et dans chacun sont ajoutés 2,5 mL de tampon KH₂PO₄ 100 mM / Sorbitol 250 mM pH 7,4 et 1 mL de cyclohexane. Le tube est bouché avec un parafilm percé d'un trou et agité fortement. Les deux solutions sont regroupées dans un même tube et centrifugées pendant 10 minutes à 1000g. La phase supérieure (organique) est recueillie dans un tube et mise à l'obscurité. L'extraction de la phase inférieure est répétée deux fois par reprise par 1 mL de cyclohexane et centrifugation à 1000g pendant 10 minutes. Les phases organiques sont regroupées et évaporées sous azote.

Le tube contenant l'extrait sec est pesé sur une balance de précision puis repris par 2 mL de cyclohexane et aliquoté par 50 µL dans des tubes « microvials » (*Agilent Technologies, Massy,*

France). Les tubes sont alors mis à évaporer sous azote puis bouchés rapidement et mis à l'obscurité à -80°C. Le tube ayant contenu l'extrait sec est pesé à nouveau et son poids est retranché à celui en présence de l'extrait sec, ce calcul permet de déduire la masse de décylubiquinol contenu dans chaque microvial. Le décylubiquinol ainsi préparé peut être conservé pendant 3 mois.

Le jour de la manipulation, reprendre un microvial par de l'éthanol absolu. Le volume d'éthanol sera calculé en fonction de la masse de décylubiquinol contenu dans les vials de manière à obtenir une concentration de 25 mM.

3. Protocole

La mesure de l'activité enzymatique du complexe III se fait sur culots sec de cellules (5×10^6 cellules au minimum). Une fois décongelé, le culot cellulaire est repris par le tampon A à raison de $50 \mu\text{L}/10^6$ de cellule. Le tube contenant les cellules reprises dans le tampon A (composition : cf. dosage de l'activité du complexe I). En suite, la suspension est immergée dans de l'azote liquide pendant 3 minutes. La suspension cellulaire est ensuite rapidement décongelée à 37°C puis centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes. Une fois le surnageant éliminé, le culot est repris avec $50 \mu\text{L}$ de tampon A par million de cellules.

Dans un tube en verre, sont ajoutés :

- $309 \mu\text{L}$ d'eau distillée
- $500 \mu\text{L}$ de tampon KH_2PO_4 (soit 10 mM)
- $20 \mu\text{L}$ de BSA (soit 1 mg/mL)
- $100 \mu\text{L}$ d'EDTA (soit 2 mM)
- $24 \mu\text{L}$ de KCN (soit $240 \mu\text{M}$)
- $40 \mu\text{L}$ de cytochrome *c* oxydé (soit $40 \mu\text{M}$)
- $\pm 4 \mu\text{L}$ d'antimycine A (soit $4 \mu\text{g/mL}$)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes, puis $5 \mu\text{L}$ de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de $2 \mu\text{L}$ de décyubiquinol (soit $50 \mu\text{M}$). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C , pendant 1 minute.

4. Expression des résultats

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) du complexe III est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS (\text{Cellules}) = \frac{\Delta DO_a - \Delta DO_b}{1 \times \varepsilon_{\text{Cyt } c} \times S_{\text{ncyt } c}} \times \frac{10}{q \text{ cellules}}$$

DO_a : variation de DO par minute sans antimycine A.

DO_b : variation de DO par minute avec antimycine A.

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1.

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

Sn_{cyt c} : nombre stœchiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit 1.

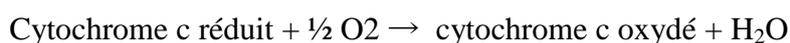
q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,1.

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/10⁶ cellules.

D. Cytochrome c oxydase (complexe IV)

1. Principe :

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



La mesure de l'activité enzymatique du complexe IV consiste à suivre l'oxydation du cytochrome *c* réduit à 550 nm. En effet, le cytochrome *c* réduit absorbe la lumière à 550 nm, donc la disparition de la forme réduite du cytochrome *c* entrainera une diminution de l'absorbance à 550 nm qui sera proportionnelle à l'activité du complexe IV.

2. Réactifs

- **Tampon KH₂PO₄ (100 mM), pH 6,5** : 1,36 g/100 mL eau distillée. Le pH est ajusté à 6,5 avec du KOH 5 M. La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.
- **BSA (50 mg/mL eau distillée)** : La solution est conservée à -20°C pendant 6 mois.
- **Laurylmaltoside (125 mM)** : 63,83 mg/1 mL eau distillée. La solution est conservée à -20°C pendant 1 mois.
- **Cytochrome c (1 mM)** : 12,38 mg/1 mL tampon KH₂PO₄ (100 mM, pH 6,5). La solution est préparée extemporanément.
- **Cytochrome c réduit (50 μM)** : Ce dernier est préparé à partir de la solution de cytochrome *c* oxydé décrite ci-dessus. Pour ce faire, 250 μl de cytochrome *c* oxydé 1 mM sont dilués dans 4,75 mL de tampon KH₂PO₄ 100 mM pH 6,5.

Deux cuvettes contenant 1 mL de cette solution sont préparées. Dans une des deux cuvettes, 5 mg de cristaux de ferricyanure de potassium sont ajoutés pour obtenir une solution 0% réduite.

Dans l'autre cuvette, 5 mg de sulfite de sodium sont ajoutés, une solution de cytochrome c 100 % réduit est ainsi obtenue.

Les densités optiques de ces deux solutions sont lues à 550 et 560 nm. Le rapport 550/560 nm doit être proche de 1,16 pour la solution 0% de réduction et compris entre 7,1 et 10 pour la solution 100% de réduction. Si tel est le cas, une fourchette de $DO_{550\text{ nm}}$ pour obtenir 92 à 97% de réduction est calculée selon la formule suivante :

- 92% de reduction : $((DO_{550\text{nm red}} - DO_{550\text{nm ox}}) \times 0,92) + DO_{550\text{nm ox}}$
- 97% de reduction : $((DO_{550\text{nm red}} - DO_{550\text{nm ox}}) \times 0,97) + DO_{550\text{nm ox}}$
- 20 μ L de solution 100% réduite sont ajoutés à la solution de cytochrome c oxydée diluée et la DO est lue à 550 nm. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une DO comprise dans la fourchette déterminée ci-dessus. Si la valeur de DO est supérieure à celle de 97% de réduction, il faut recommencer la préparation du cytochrome c réduit.

3. Protocole :

La mesure de l'activité enzymatique du complexe IV se fait sur culots sec de cellules (5×10^6 cellules au minimum). Une fois décongelé, le culot cellulaire est repris par le tampon A à raison de $50 \mu\text{L}/10^6$ de cellule. Le tube contenant les cellules reprises dans le tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I).

Dans un tube à hémolyse, sont ajoutés :

- 455 μL d'eau distillée.
- 200 μL de tampon KH_2PO_4 (soit 20 mM).
- 20 μL de BSA (soit 1 mg/mL).
- 300 μL de cytochrome c réduit (soit 15 μM).

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 3 minutes, puis 5 μL de la suspension cellulaire (10^5 de cellules) sont ajoutés. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 20 μL

de laurylmaltoside (soit 2,5 mM). L'évolution de l'absorbance à 550 nm est suivie au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 90 secondes.

4. Expression des résultats :

Les variations d'absorbance sont mesurées, en fonction du temps, sur la partie linéaire de la cinétique. L'activité spécifique (nmol/min/million de cellules) du complexe IV est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS \text{ (Cellules)} = \frac{\Delta DO}{1 \times \varepsilon_{Cyt\ c} \times Sn_{Cyt\ c}} \times \frac{10}{q \text{ cellules}}$$

ΔDO : variation de DO durant le temps de mesure

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1

$\varepsilon_{Cyt\ c}$: coefficient d'extinction molaire du cytochrome c réduit à 550 nm, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 18,5

$Sn_{Cyt\ c}$: nombre stoechiométrique du cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit 1

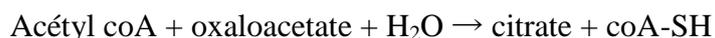
q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 0,1

Les résultats en nmol/min/million de cellules sont ensuite convertis en nmol/min/ 10^6 de cellules.

5. *Citrase synthase* :

1. Principe :

La citrate synthase est la première enzyme du cycle de Krebs, elle catalyse la réaction suivante :



La mesure de l'activité enzymatique de la CS fait intervenir l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le DTNB réagit avec les groupements thiols (SH) du coA-SH formé dans la réaction ci-dessus et forme du coATNB et du TNB. Ce dernier est un composé jaune qui absorbe la lumière à 412 nm. Le dosage consiste à suivre la formation de TNB à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance à 412 nm sera donc proportionnelle à l'activité de la citrate synthase.

2. Réactifs :

- **Tampon Tris 1M pH 8,1** : 12,1 g de Tris-base sont dissous dans 100 mL d'eau distillée et le pH est ajusté à 8,1 avec de l'HCl 5N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois -20°C.
- **Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB)** : 2 mg de DTNB sont dilués dans 5 mL de tampon Tris 1M. La solution à 1mM ainsi préparée n'est utilisable que pendant une demi-journée et se conserve à l'abri de la lumière.
- **Acétyl CoA** : Pour préparer une solution à 30 mM, les 25 mg du flacon d'acétyl coA sont dissous dans 1,03 mL d'eau distillée. Cette solution est stable pendant 1 mois à -20°C. Le jour de la manipulation, cette solution est diluée au 1/3 en ajoutant 1 mL de la solution mère à 2mL d'eau distillée.
- **Oxaloacétate** : préalablement à chaque mesure, 6,6 mg d'oxaloacetate sont dilués dans 5 mL d'eau distillée afin d'obtenir une solution à 10 mM.
- **Triton X100** : Le triton est conservé à 4°C. La veille des mesures, il est placé à température ambiante. Puis, une solution à 10% est préparée en diluant 1 mL de triton X100 dans 9 mL d'eau distillée.

3. Protocole :

La mesure de l'activité enzymatique du complexe IV se fait sur culots sec de cellules (5×10^6 cellules au minimum). Une fois décongelé, le culot cellulaire est repris par le tampon A à raison de 50 μ L/10⁶ de cellule. Le tube contenant les cellules reprises dans le tampon A (composition : cf. dosage de l'activité du complexe I).

Dans un tube en plastique sont ajoutés :

- 755 μ l d'eau distillée
- 150 μ l de DTNB (soit 150 μ M)
- 50 μ l d'oxaloacétate (soit 500 μ M)
- 30 μ l d'acétyl-CoA (soit 300 μ M)
- 10 μ l de triton X 100 (soit 0,1 %)

Ce mélange réactionnel est incubé à 37°C pendant 2 minutes. La réaction est ensuite initiée par l'ajout de 5 µL de la suspension cellulaire (soit 10⁵ de cellules). L'évolution de l'absorbance à 412 nm est suivie pendant 90 secondes au spectrophotomètre, thermostaté à 37°C, pendant 1 minute.

4. Expression des résultats :

$$AS \text{ (Cellules)} = \frac{\Delta DO}{1 \times \epsilon_{TNB} \times S_{nTNB} c} \times \frac{10}{q \text{ cellules}}$$

ΔDO : variation de DO par minute.

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit 1.

ε_{TNB} : coefficient d'extinction molaire du TNB à 412 nm, en mM⁻¹.cm⁻¹, soit 13,6.

S_{nTNB} : nombre stoechiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit 1.

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le milieu réactionnel en million, soit 10⁵.

Les résultats de la mesure sont exprimés en nmol/min/ 10⁶de cellules.

6. Dosage des radicaux libres par résonance paramagnétique électronique (RPE) :

La résonance paramagnétique électronique (RPE) est une technique spectroscopique permettant l'étude des molécules ou des ions ayant un ou plusieurs électrons non appariés. Le paramagnétisme qui résulte de la résonance du spin électronique de l'électron est à la base de la détection par la RPE.

A. *Monoxyde d'Azote :*

Le dosage du monoxyde d'azote a été réalisé par la technique du « spin-trap » suivie de l'analyse des spectres obtenue par résonance paramagnétique électronique.

1. Principe de la technique :

Le principe de la technique consiste à piéger le monoxyde d'azote en favorisant sa réaction avec un capteur de spin (spin-trap) FeSO₄/DETC. Une fois la réaction faite, le monoxyde d'azote et le capteur de spin forment un complexe stable. Le complexe formé émet un signal spécifique détectable par RPE et dont l'amplitude est proportionnelle à la quantité de monoxyde d'azote libérée.

2. Réactifs :

- **Tampon KREBS-HEPES** : La solution sert à dissoudre les éléments du capteur de spin, à savoir, le FeSO_4 et le diéthylthiocarbamate (DETC). Pour la dissolution du DETC, la solution est préparée sans CaCl_2 . Dans 500 mL d'eau millipore on ajoute : 5782 mg de NaCl (0,1 M), 350 mg de KCl (0,005 M), 366 mg de CaCl_2 (0,003 M), 296 mg de MgSO_4 (0,0025 M), 2100 mg de NaHCO_3 (0,025 M), 140 mg de K_2HPO_4 (0,001 M), 5206 mg de N-HEPES (0,02 M), 2000 mg de Glucose (0,01 M). Le pH est ajusté à 7,35 en utilisant du NaOH. Le volume est complété à 1L. Cette solution se conserve un mois à 4°C.
- **Solution FeSO_4** : une solution de 1,5 mM de FeSO_4 est obtenue en dissolvant 2,3 mg de FeSO_4 dans 10 mL de Tampon KREBS-HEPES qui a été préalablement dégazé pendant 45 minutes sous bullage à l'azote gazeux (N_2).
- **Solution DETC** (diéthylthiocarbamate) : une solution de 2 mM de DETC est obtenue en dissolvant 3,6 mg de DETC dans 10 mL de solution KREBS-HEPES sans CaCl_2 qui a été préalablement dégazé pendant 45 minutes sous bullage à l'azote gazeux (N_2).

3. Protocole :

Le capteur de spin, le diéthylthiocarbamate de fer $\text{Fe}(\text{DETC})_2$, qui forme le complexe $\text{NO-Fe}(\text{DETC})_2$ dont les propriétés paramagnétiques sont détectables par RPE a été utilisé pour la quantification du NO. Les cellules sont mises en culture dans une plaque 6 puits et exposées au chlordécone, lindane ou milieu contrôle pendant 48 heures, puis incubées pendant 45 minutes à 37°C en présence d'un tampon d'incubation (5 mM HEPES, 1 mM L-Arginine, 3 mM CaCl_2 , 0,3 M BSA, pH 7,4). Les cellules sont ensuite incubées dans les mêmes conditions (37°C, 45 minutes) avec le capteur de spin, diéthylthiocarbamate (DETC, 1,5 mM) en présence de FeSO_4 . Les échantillons sont ensuite mis dans des seringues et congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C. Les « carottes » ainsi obtenues ont été passées au spectromètre Magnetech 100X et l'amplitude spécifique au pique de monoxyde d'azote a été quantifiée.

4. Expression des résultats :

Les résultats sont calculés en fonction de l'amplitude du pique de la courbe correspondant au monoxyde d'azote normalisé par rapport à la concentration de protéine de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition contrôle.

B. Anion superoxyde (O_2^-) :

Le dosage de l'anion superoxyde a été réalisé par technique du « spin-trap » suivie de l'analyse des spectres obtenue par résonance paramagnétique électronique.

1. Principe de la technique :

Le principe de la technique consiste à piéger l'anion superoxyde en favorisant sa réaction avec un capteur de spin (spin-trap) CMH/deferroxamine/DETC. Une fois la réaction faite, l'anion superoxyde et le capteur de spin forme un complexe stable. Le complexe formé émet un signal spécifique détectable par RPE et dont l'amplitude est proportionnelle à la quantité de monoxyde d'azote libérée.

2. Réactifs :

Tampon KREBS-HEPES : La solution sert à dissoudre les éléments du capteur de spin, à savoir, le $FeSO_4$ et le diethyldithiocarbamate (DETC). Pour la dissolution du DETC, la solution est préparée sans $CaCl_2$.

Dans 500 mL d'eau millipore on ajoute : 5782 mg de $NaCl$ (0,1 M), 350 mg de KCl (0,005 M), 366 mg de $CaCl_2$ (0,003 M), 296 mg de $MgSO_4$ (0,0025 M), 2100 mg de $NaHCO_3$ (0,025 M), 140 mg de K_2HPO_4 (0,001 M), 5206 mg de N-HEPES (0,02 M), 2000 mg de Glucose (0,01 M). Le pH est ajusté à 7,35 en utilisant du $NaOH$. Le volume est complété à 1L. Cette solution se conserve un mois à 4°C.

Solution DETC (diethyldithiocarbamate) : une solution de 2 mM de DETC est obtenue en dissolvant 3,6 mg de DETC dans 10 mL de solution KREBS-HEPES sans $CaCl_2$ qui a été préalablement dégazé pendant 45 minutes sous bullage à l'azote gazeux (N_2).

3. Protocole :

Après traitement, les cellules sont incubées pendant 45 minutes à 37°C en présence d'un tampon d'incubation Krebs-Hepes contenant du 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl-2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine (CMH, Noxygen, Mainz, Allemagne) (10 mM), de la deferoxamine (25 µM) et du DETC (5 µM). La réaction est stoppée en déposant les échantillons pendant 5 minutes à 4°C. Les échantillons sont ensuite mis dans des seringues et congelés dans l'azote liquide puis conservés à -80°C.

L'analyse est réalisée à l'aide d'un spectromètre Miniscope MS 200 (Magnettech, Berlin, Allemagne). Les enregistrements sont faits à 77°K, en utilisant un vase Dewar. L'instrumentation a été calibrée à 10 mW du pouvoir des micro-ondes, à 1mT de modulation d'amplitude, à 100 kHz de la fréquence de modulation avec un temps d'enregistrement d'un spectre de 100 secondes répété 5 fois de suite. La quantité de NO et d'O₂⁻ mesurée est exprimée en unités arbitraires d'absorbance par microgramme de protéine par microlitre. La quantité de protéines dans chaque échantillon était mesurée par dosage colorimétrique de Lowry et déterminée au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 575 nm.

4. Expression des résultats :

Les résultats sont calculés en fonction de l'amplitude du pique de la courbe correspondant au monoxyde d'azote normalisé par rapport à la concentration de protéine de chaque échantillon. Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition contrôle.

7. Western blot iNOS, nitration protéines :

1. Principe :

Les protéines sont tout d'abord séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide selon leur poids moléculaire. Un électro-transfert permet de faire passer les protéines sur une membrane (nitrocellulose 0,2). La membrane est alors incubée avec le premier anticorps, spécifique de la protéine recherchée. Après rinçage, la membrane est incubée avec un second anticorps marqué à l'HRP et dirigé contre l'anticorps primaire. La

révélation se fera alors par chimiluminescence grâce au kit et sera observée après révélation radiographique.

2. Réactifs :

- **Tampon de migration 1X:**
 - MOPS SDS Running Buffer 20X (Invitrogen®): 50 mL.
 - Eau MilliQ: 950 mL.
- **Tampon de transfert 10X:**
 - Tris-base: 30 g (250 mM).
 - Glycine: 144 g (1,9 M)
 - Eau MilliQ: QSP 1L.

La solution se conserve à 4°C.

- **Tampon de transfert 1X :**
 - Méthanol : 200 mL (20%).
 - Tampon de transfert 10X : 100 mL.
 - Eau MilliQ : QSP 1L.
- **Tampon TBST 10X (Tris Buffered Saline Tween) :** pour un litre
 - Tris-base: 24,2g (200mM).
 - NaCl: 80g (615 mM).
 - Tween 20: 10 mL (1%)
 - Eau MilliQ: QSP 1L
- **Tampon TBST 1X :**
 - TBST 10X : 100 mL.
 - Eau MilliQ : 900 mL.
- **Solution de saturation (5%) :**
 - BSA : 2,5 g (5%).
 - TBS-Tween 1X : 50 mL.
- **Solution rouge Ponceau :**
 - Poudre rouge P : 2,28 g (0,1%).
 - Acide acétique : 5 mL (5%)
 - Eau MilliQ : QSP 100 mL.

3. Protocole :

a) **Préparation des échantillons :**

Les cellules sont trypsinées et reprises dans 10 mL de PBS-10% SVF puis sont centrifugées à 300g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris par 300 μ L de tampon de lyse RIPA, bien homogénéisé et laissé pendant 30 minutes sur glace. S'en suit une centrifugation à 14000g/ 20 minutes dans une centrifugeuse préalablement thermostatée à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est récupéré.

La concentration en protéines est alors déterminé sur l'échantillon selon la méthode de Lowry Bio-Rad Assay kit[®] (Bio-Rad, Lyon, France) ainsi qu'une gamme étalon de concentration croissante de BSA. Un volume équivalent à 30 μ g de protéines est alors prélevé de chaque l'échantillon et de l'eau distillée est ajoutée afin de compléter le volume à 12 μ L. A ce mélange sont ajoutés 2 μ L de NuPAGE[®] Reducing Agent (10X) (Invitrogen[®], Carlsbad, Etats-Unis) afin de maintenir les protéines réduites durant l'électrophorèse, ainsi que 6 μ L de tampon de charge (Invitrogen[®], Carlsbad, Etats-Unis) pour un volume final de 20 μ L. Afin de dénaturer les interactions protéiques, le mélange est ensuite chauffé à 70°C pendant 10 minutes puis conservé sur glace à 4°C jusqu'au dépôt sur gel.

b) **Dépôt des échantillons et migration :**

Les protéines dénaturées sont séparées selon leur poids moléculaire grâce à une électrophorèse effectuée en utilisant la cuve d'électrophorèse X cell[®], (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). Le gel pré-coulé « NuPAGE[®] Novex » (Invitrogen[®], Carlsbad, Etats-Unis) est placé dans la cuve de migration qui a été préalablement remplie de tampon de migration 1X. Ensuite, un dépôt de 20 μ L de chaque préparation d'échantillon dans chaque puits du gel. 5 μ L de marqueur du poids moléculaire sont déposés dans le premier puits pour servir de référence. Une fois le dépôt terminé, 500 μ L d'anti oxydant « NuPAGE[®] Antioxydant » (Invitrogen[®], Carlsbad, Etats-Unis) sont ajoutés dans la cuve puis la cuve est fermée et reliée au générateur. Une migration de 1h30' à 110V est alors réalisée

afin de permettre une bonne séparation des protéines. Lorsque le front de migration atteint le bas du gel, la migration est stoppée.

c) Transfert sur membrane nitrocellulose :

Cette étape permet le transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane de Nitrocellulose (GE Healthcare, France). Une fois le gel démoulé, il est placé dans la cuve de transfert (Bio-Rad, Lyon France) sur une épaisseur de mousse et 2 épaisseurs de papier buvard (Whatman, Maidstone, Angleterre) imbibé de tampon de transfert. La membrane est déposée délicatement sur le gel et à son tour recouverte de deux épaisseurs de papier buvard et une épaisseur de mousse. Le transfert des protéines sur les membranes est alors réalisé par application d'un courant de 260 mA pendant 50 minutes. Après ce temps, l'efficacité de transfert est vérifiée par la coloration de la membrane au rouge ponceau.

d) Saturation des membranes :

Afin de saturer les sites de fixation non spécifiques, la membrane est placée dans une solution de saturation (TBS-Tween-5% BSA) sous agitation pendant une 1h30.

e) Incubation avec l'anticorps primaire :

La membrane est rincée 3 fois 10 minutes dans un bain de TBS-Tween 1X puis placée dans une boîte à hybridation. 10 mL de TBS-Tween 0,1%-BSA 5% contenant l'anticorps primaire dilué à la concentration voulue sont ajoutés dans la boîte. L'hybridation se fait à 4°C durant une nuit.

f) Incubation avec l'anticorps secondaire :

Après trois rinçages de 10 minutes en TBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase. Cet anticorps est dilué au 1/10000e dans une solution de TBS-Tween 0,1%-BSA 5%. La membrane est placée sous agitation à température ambiante pendant 1h30'.

g) **Révélation :**

L'hybridation des anticorps sur la membrane a été révélée par chimioluminescence avec le kit Western Blotting Luminol Reagent plus® (Santa-Cruz biotechnologies, CA, USA). Après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est rincée 3 fois dans le tampon TBS-Tween 1X. Un mélange contenant 500 µL de la solution A du kit plus 500 µL de la solution B est réalisé puis 1 mL de la solution A+B est déposé uniformément sur la membrane. Après 1 minute d'incubation, l'excès de réactif est retiré de la membrane et la membrane est placée dans l'imageur. Différents temps d'exposition sont réalisés jusqu'à obtention de bandes d'intensité satisfaisante mais pas saturante.

h) **Quantification :**

L'intensité des différentes bandes est quantifiée grâce au logiciel chemi-capt 5000® Molecular Imaging Software version 12.9 pour windows® (Vibert Lourmat, Marne-la-Vallée, France). Les résultats concernant la protéine d'intérêt sont normalisés par rapport à la quantité de la β -actine.

8. Quantification des gènes de biogenèse mitochondriale et du métabolisme énergétique :

A. Extraction des ARN totaux à partir de cellules avec le kit « RNAeasy » (QIAGEN):

1. Principe de la technique :

Cette méthode est basée sur la propriété qu'ont les colonnes de silice à adsorber les acides nucléiques en présence de sels chaotropiques. Ces derniers attirent les molécules d'eau en milieu acide et alcoolique, ce qui favorise l'adsorption des acides nucléiques. Le dépôt des lysats cellulaires sur les colonnes de silice du kit permet la rétention des ARN totaux et l'éluion des contaminants (protéines, débris cellulaires). Un traitement DNAase est effectué afin d'éliminer les probables contaminations d'ADN. Ensuite, les

ARN totaux sont décrochés des colonnes et élués. Cette technique est réalisée avec le kit « RNeasy » de QIAGEN.

2. Protocole :

a) Extraction des ARNs totaux : Après traitement dans des plaques 6 puits, les cellules de chaque puits sont reprises par 600µL de Tampon contenant du thiocynate de guanidium (Tampon RLT). Une fois homogénéisé, le mélange est transféré dans les colonnes « QIAshredder ». Les colonnes sont ensuite placées dans des tubes collecteurs et centrifugées 2 minutes/10000 g. Cette étape permet l'élimination des débris cellulaires. 600µL d'éthanol à 70% sont ajoutés au lysat. Ce mélange est transféré dans les colonnes RNeasy qui à leur tour sont placées dans des tubes collecteurs et centrifugées à 10000g/15 secondes. 700µL du tampon RW sont ajoutés au dessus de la colonne suivie d'une centrifugation à 10000g/15 secondes. Un traitement avec la DNAase est effectué afin d'éliminer d'éventuelles contaminations ADN. Deux lavages avec centrifugation sont ensuite réalisés avec le tampon RPE. Une dernière centrifugation à vide pour éliminer totalement les restes du tampon RPE est effectuée à 10000g/1 minute. Enfin, 50 µL d'eau « RNAse free » sont ajoutés à chaque colonne suivis d'une centrifugation à 10000g/1 minute pour éluer les ARN.

b) Dosage et contrôle qualité des ARN :

La mesure de la concentration en ARN des échantillons a été réalisée en utilisant le « NanoDrop® » (Thermo Scientific). La densité optique des échantillons est lue à 260 nm (longueur d'ondes d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) afin de s'assurer de la pureté des échantillons, seuls les échantillons ayant un ratio 260/280 compris en 1,8 et 2 ont été utilisés. L'intégrité des échantillons d'ARN a été évalué en utilisant la technique de miniaturisation d'électrophorèse sur puce (Lab on Chip) et le Bioanalyser 2100 (Agilent®). 3µL de chaque échantillon des préparations d'ARN sont déposés dans chacun des 12 puits de la puce Agilent RNA 6000® en présence d'un marqueur fluorescent. L'appareil mesure en temps réel, l'intensité de fluorescence émise en fonction du temps de rétention des ARN au sein du microréseau. Les données de temps de rétention et d'intensité de fluorescence sont validées par rapport au marqueur de poids moléculaire. Les résultats sont visualisés sous forme d'électrophorégrammes et le

logiciel évalue l'intégrité de chaque préparation d'ARN et attribue un indice de qualité, le RIN (Rna Integrity Number), à chaque échantillon. Seuls les échantillons ayant un RIN supérieur ou égale à 7 ont été retenus.

B. Reverse transcription.

1. Principe de la technique :

La reverse transcription consiste à synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Cette étape est réalisée grâce à l'enzyme rétrovirale reverse transcriptase (MMLV : Moloney- Murine Leukemia Virus). Cette technique est réalisée grâce au kit Advantage[®] RT-for-PCR Kit (Clontech, Saint-Germain-en-Lay, France).

2. Protocole :

Un volume correspondant à 1 µg d'ARN est utilisé. De l'eau DEPC est ajoutée pour obtenir un volume de 12,5 µL. Un microlitre d'amorces hexamères est ajouté et le mélange est chauffé à 70°C pendant 2 minutes. Les tubes sont immédiatement placés sur glace pour stopper la réaction. Un mélange réactionnel est ensuite préparé comme suit :

Pour un tube :

- Tampon de réaction 5X : 4 µL.
- - Mélange de dNTP (10 mM de chaque) : 1 µL.
- - Inhibiteur de RNases recombinantes : 0,5 µL.
- - Reverse transcriptase MMLV : 1 µL.

Le volume réactionnel est donc de 6,5 µl, le volume nécessaire doit être calculé pour n+1 tubes. Ce mélange est ajouté dans chacun des tubes et la réaction de reverse transcription est réalisée en incubant les tubes pendant 1 heure à 42°C. La réaction est ensuite stoppée par 5 minutes de chauffage à 94°C. Cette étape permet également d'inhiber les éventuelles DNases. Les échantillons sont ensuite dilués au 1/50e en ajoutant 80 µL d'eau DEPC. Après homogénéisation, les ADNc ainsi synthétisés sont en aliquotés et conservés à -80°C.

C. PCR quantitative en temps réel :

1. Principe :

La PCR quantitative en temps réel est une application de la PCR. Elle permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés. Cela est possible grâce à l'utilisation d'un fluorochrome, le SYBR Green, ayant la propriété de se lier à l'ADN double brin et de n'être fluorescent que sous sa forme liée. Au début de l'amplification, le mélange réactionnel contient l'ADNc dénaturé, les amorces et le fluorochrome non lié. Pendant l'étape d'élongation, le nombre de SYBR Green liés à l'ADN synthétisé augmente entraînant ainsi une augmentation de la fluorescence, qui est mesurée à la fin de chaque cycle en utilisant un spectrofluorimètre à la longueur d'onde de 521 nm. Une courbe représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles est ainsi obtenue.

2. Protocole :

a) Préparation des standards :

L'analyse quantitative de l'amplification du gène d'intérêt nécessite l'établissement au préalable une gamme de nombre de copies connues d'amplicons du gène cible. Dans cet optique, une PCR est réalisée : 5 µl d'ADNc sont ajoutés à 15 µl d'un mélange d'amorces (2µl d'amorces sens et antisens à 20 mM chacune et 11 µl d'eau) et à 23 µl du mélange de PCR (4 µL de tampon 10X, 2,5 µl de MgCl₂ à 25 mM, 4µl de dNTP à 2 mM, 12 µl d'eau DEPC et 0,5 µl de l'enzyme Taq polymerase). Les ADNc sont d'abord dénaturés à 94°C pendant 3 minutes puis 40 cycles de dénaturation 94°C 30 secondes, hybridation au T_m du couple d'amorces 30 secondes, élongation à 72°C pendant 30 secondes et enfin 72°C pendant 10 minutes. Les ADN amplifiés sont purifiés sur colonne (High Pure Product Purification kit, Boeringher) et sont quantifiés à l'aide du NanoDrop ® (Thermo Fisher scientific) par lecture de la densité optique des ADN double brins à 260 nm. Le nombre de copies dans les échantillons est calculé grâce à la formule suivante :

1 µg d'ADN de 1000 paires de bases correspond à $9,4 \times 10^{11}$ copies.

Les échantillons sont dilués pour obtenir 1010 copies/µl. La gamme est ensuite réalisée par dilutions successives de cet échantillon.

b) PCR quantitative :

Le mélange réactionnel est préparé pour n+1 tubes. Il comprend 9 µl d'eau DEPC, 4 µl de master mix 5X® (composé d'ADN polymérase et de la sonde SYBR Green 1) et 2 µl d'amorces sens et antisens à 10 mM chacune. Ce mélange est transféré dans les puits d'une plaque PCR 96 puits (Axygene) dans la quelle il à été préalablement déposer à l'aide du robot de dépôt epmotion (Eppendorf®) 2µL d'ADNc et de 2µL de la gamme du gène d'intérêt ont été déposés en duplicat. La plaque est transférée en suite dans le CFX96 (Bio-Rad). Le programme est le suivant : préincubation de 95°C pendant 5 minutes puis 40 cycles d'amplification (composés chacun d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 1 seconde puis d'une phase d'hybridation aux Tm des amorces 10 secondes puis d'une phase d'élongation à 72°C pendant 10 secondes). La fluorescence est mesurée de manière ponctuelle à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle d'amplification. Elle permet ainsi d'établir une courbe de quantification représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Afin de s'assurer de la spécificité des produits de PCR amplifiés, une courbe de fusion est réalisée après la phase d'amplification. Elle consiste en une étape de dénaturation ponctuelle à 95°C puis une hybridation à 65°C pendant 60 secondes et enfin une étape de fusion avec élévation progressive de la température jusqu'à 95°C par incrément de 0,1°C par seconde. La fluorescence est lue en continu pendant cette dernière phase de fusion. L'établissement de la courbe de fusion (fluorescence en fonction de la température) permet de discriminer les dimères d'amorces et les produits de PCR spécifiques. Pour chaque manipulation, un témoin négatif (ne contenant pas d'ADNc mais de l'eau) est effectué pour s'assurer de l'amplification sélective du gène d'intérêt. La quantification est faite grâce au rapport du nombre de copies du gène cible sur le nombre de copies d'un gène de référence dont le nombre de copie est connu pour varier peu en fonction des conditions expérimentales. Dans le cas de nos expériences, l'expression de la β-Actine a été évaluée et n'a pas montrée de variations significatives dans nos différentes conditions expérimentales.

9. Métabolisme énergétique :

A. *Mesure de la concentration intracellulaire d'ATP :*

1. Principe :

La méthode utilisée repose sur l'extraction des adénylates (ATP, ADP et AMP) à l'aide d'un mélange de solvants (chloroforme-méthanol) suivie d'une séparation par HPLC sur colonnes. La quantification est faite en suite à l'aide d'une gamme préétablie de concentrations connues d'ATP, d'ADP et d'AMP. La mesure de L-lactate, quant à elle, se fait par une méthode enzymatique sur les automates (COBAS 4000, Roche[®]) de la plateforme biochimie du CHU d'Angers.

2. Réactifs :

Tampon d'extraction : un mélange chloroforme-méthanol (50/50) est préparé dans un flacon en verre. La solution se conserve à température ambiante et est stable pendant 1 mois.

3. Protocole :

Les cellules HepG2 sont mises en culture dans des flasks T 25cm². 24h après, les milieux sont remplacés par du milieu contenant le lindane ou bien le chlordécone aux concentrations plasmatiques (16 pM, 50 nM) et environnementales (50 nM, 7 pM) durant 48h avec un changement de milieu à 24h. Le milieu des cellules contrôles est remplacé par du milieu contenant du DMSO (la concentration de DMSO est égale à 1 :1000). Après le traitement, les cellules sont récoltées et comptées. 1mL d'échantillon du milieu est prélevé à 24h et à 48h pour la mesure du L-lactate sur automate COBAS-integra 4000 (Roche[®]). Un volume équivalent à 10⁶ cellules est prélevé et centrifugé. Afin de laver les cellules d'éventuels contaminants présents dans le milieu, le culot cellulaire est repris par 1mL PBS transféré dans un tube Eppendorf[®] 1,5 et centrifugé une seconde fois. Le culot est repris par 300µL du tampon d'extraction et homogénéisé par aspiration-expiration. En suite, 300 µL d'eau distillé sont ajoutés et mélangés. Les tubes sont transférés dans une centrifugeuse préalablement thermostatée à 4°C et centrifugés à 14000g/15 minutes. Une fois la centrifugation terminée, le surnageant contenant les adénylates est prélevé et stocké à -80°C.

Les adénylates sont en suite séparés par HPLC sur colonnes IonPac AS11 (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). La quantification s'est faite en utilisant une gamme préétablie de concentrations connues d'ATP et d'ADP.

B. Coloration des lipides intracellulaire au « Oil Red'O »:

I. Principe:

Cette technique permet d'identifier des lipides hydrophobes en phase liquide. Le corps coloré appelé lysochrome, se déplace du solvant dans lequel il se trouve vers le lipide tissulaire.

II. Réactifs :

- **Isopropanol 60%** : cette solution est obtenue diluant 60mL d'isopropanol dans 40 ml d'eau distillée.
- **Oil Red'O solution mère** : une solution mère à 5% est préparée par la dissolution de 1g dans 200 mL d'isopropanol pure. Pour une bonne dissolution de la poudre Oil Red'O, la solution est laissée sous agitation durant une nuit. La solution est ensuite filtrée et stockée à température ambiante.
- **Solution de travail** : La solution de travail se prépare le jour même de l'expérimentation et ne se conserve pas. Sa concentration à 60% est obtenue en diluant 6 mL la solution mère dans 4mL d'eau distillée. Après l'avoir laissée reposer pendant une heure, la solution est filtrée au moment de l'emploi.
- **Para formaldéhyde 10 %** : Une solution de 4% de paraformaldéhyde est préparée par la dissolution de 1g dans 100mL d'eau distillée. Pour une dissolution optimale, la solution est chauffée et mise sous agitation.

III. Protocole :

Par mesure de sécurité envers les produits utilisés, toutes les manipulations sont effectuées sous sorbone.

- a) **Fixation de cellules** : Après exposition des cellules au chlordécone/lindane durant 24, 48 et 72h dans des plaques de culture 6 puits, les milieux sont enlevés, remplacés par la

solution de para-formaldéhyde 10% (1mL/puits) et laissés 5 minutes. L'opération est renouvelée avec une incubation d'une heure.

- b) **Lavage à l'Iso-propanol 60%** : Après la fixation des cellules et en vue de leur coloration, le para-formaldéhyde est enlevé des puits et un lavage à l'iso-propanol est réalisé en vue de la préparation à la coloration des lipides (1mL/puits).
- c) **Coloration des lipides** : 750µL de la solution de travail OilRed'O préparée au préalable est ajoutée à chaque puits et incubée 15 minutes à température ambiante.
- d) **Lavage à l'eau distillée** : Après incubation avec la solution de travail, cette dernière est éliminée et 3 lavages rapides et successifs sont réalisés à l'aide de l'eau distillée. Une fois les lavages terminés, des photos sont réalisées à l'aide du microscope avec différents grossissements.
- e) **Dissolution du Oil-Red'O et quantification** : 1 mL d'isopropanol pure est ajouté à chaque puits pour la dissolution de Oil Red'O et la plaque est laissée sous agitation pendant 5 minutes. 100µL de chaque puits sont transférés ensuite dans une plaque 96 puits pour la lecture de la densité optique à 500 nm sur le lecteur de plaque Mithras (Bertholds).

IV. Expression des résultats :

Les résultats sont exprimés en pourcentage par rapport à la condition contrôle.

III. Résultats, discussion et perspectives

A. Article 1 :

Plasmatic concentrations of organochlorine, lindane, chlordecone, act as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder.

Mohammed el Amine BENARBIA*†, David MACHEREL*‡, Sébastien FAURE*†, Caroline JAQUES*†, Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA*† and Yves MALTHIERY*†¹.

Article soumis à TAAP (Toxicology and applied pharmacology)

Plasmatic concentrations of organochlorine, lindane, chlordecone, act as metabolic disruptors in HepG2 liver cell line by inducing mitochondrial disorder.

Mohammed el Amine BENARBIA*†, David MACHEREL*‡, Sébastien FAURE*†, Caroline JAKUES*†, Ramaroson ANDRIANTSITOHAINA*† and Yves MALTHIERY*†¹.

*LUNAM Université, Angers, France

†Inserm 1063, Angers, France.

‡ UMR 1345 IRHS, Angers, France

Corresponding author:

Yves MALTHIERY: IBS/ IRIS, 4, Rue Larray, 49045 Angers, France

Email: yves.malthiery@univ-angers.fr

Tel: +33 2 44 66 85 86 /Fax: +33 2 44 66 85 85.

Abstract

Chlordecone (chlordécone) and lindane (lindane) are persistent environmental pollutants. Several studies investigated both organochlorines toxicity. In most of those studies, concentrations used were relatively higher than those found in blood contaminated area residents. Effects of low concentration remain poorly investigated. Moreover, effects on cell metabolism and mitochondrial function of organochlorines exposure have received little attention. This study was designed in order to explore the effects of low concentrations of chlordécone and lindane on cellular metabolism and mitochondrial function in hepatocarcinoma cell line HepG2.

Cells were exposed to chlordécone, lindane for 24, 48 and 72h. Exposure effects on cell viability were assessed by MTT test. Mitochondrial function was analyzed by measuring mitochondrial respiration and electron transport chain complexes activity. Mitochondrial regulation was assessed by analyzing free radicals (NO, O₂⁻) and genes involved for mitochondrial biogenesis. Finally, energy metabolism was analyzed by measuring intracellular ATP, lactate level in medium and intracellular lipid accumulation.

Despite the absence of effects on cells viability, exposure to chlordécone resulted in a decrease of maximal respiratory capacity, complex II activity and medium lactate level. This was associated with an increase of intracellular ATP and NO release. lindane exposure led to an increase of maximal respiratory capacity, complex I activity, intracellular ATP and NO release but decreased uncoupled respiration and medium lactate level. Both chlordécone and lindane exposure resulted in upregulation of mitochondrial biogenesis genes.

At plasmatic concentrations, chlordécone and lindane acted as metabolic disruptors. They impaired mitochondrial function and regulation with an impact on cellular energetic metabolism.

Keywords: organochlorine, mitochondria, nitric oxide, energetic metabolism, OXPHOS

Introduction

Organochlorine products have been largely used worldwide as pesticide, fungicide and insecticides, essentially in agriculture but also for animal and human pest control. Chlordecone (chlordécone), an organochlorine phytosanitary product, has been intensively used for more than 20 years (1973-1993) in French West Indies to control the banana root borer (Multigner *et al.*, 2010), even though its use was banned in the USA since 1976. Lindane (lindane), an organochlorine insecticide, has been used since 1938 in agriculture for seeds and livestock treatment. It is still used in human health as treatment for lice and scabies in several countries. The intensive use of chlordécone and lindane combined to their resistance to environmental degradation makes them important ecosystem pollutants. Moreover, both lindane and chlordécone are classified as persistent organic pollutants by the Stockholm convention. As other environmental pollutants, the ingestion of contaminated food is the main way of exposure to organochlorines (Guldner *et al.*, 2010; Mariscal-Arcas *et al.*, 2010). Indeed, residues of these compounds are still detected in rivers, food and animal tissues even if their use is currently banned in most countries (Dagorn *et al.*, 1988; Coat *et al.*, 2011). chlordécone, lindane and their metabolites were also found in the umbilical blood serum of pregnant women (Guldner *et al.*, 2010; Mariscal-Arcas *et al.*, 2010) and maternal milk (Mishra and Sharma, 2011), which enlarges the spectra of the exposed population to fetus and neonates. After ingestion, chlordécone and lindane have a strong tendency for bioaccumulation in tissues (Xue *et al.*, 2010). Bioaccumulation occurs mainly in fat tissue, brain and liver which shows high levels of these compound after exposure (Srinivasan and Radhakrishnamurty, 1983; Belfiore *et al.*, 2007). The accumulation in biological tissue is incriminated to be behind physiological dysfunctions and probably the source of several diseases as cancer and insulin resistance. In fact, a recent study conducted in French West Indies revealed a significant increase in the risk of prostate cancer development with the increased plasma concentrations of chlordécone (Multigner *et al.*, 2010). Others studies described a positive correlation between cancer, obesity or diabetes and blood concentration of organochlorines (Lim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011).

Liver plays a key role in organism metabolism. Hepatocytes synthesize a range of molecules that are further used to support homeostasis and regulate energy balance. As

in other cell types, the mitochondrion plays an important role in the hepatocyte. Indeed, many pathways and cellular process are regulated through mitochondria (cell death, cell proliferation, metabolism) (Green, 1998; Hajnóczky *et al.*, 2006; McBride *et al.*, 2006). One of the most documented functions of mitochondria is the energy conversion. A part of this process occurs within the internal membrane of mitochondria through the electron transport chain (ETC) and the oxidative phosphorylation reactions (OXPHOS). The OXPHOS system is under a dual genetic control with complex communication and regulation between the nuclear and mitochondrial genomes, the so named “nucleo-mitochondrial cross-talk” (Scarpulla, 2008). This signaling cross-talk is in a constant regulation governed by the cell environment: caloric restriction, cold and stimulation (Nicholls, 2002). The impairment of OXPHOS and/or mitochondrial function has been described in several diseases that are linked to insulin resistance as obesity (J. Kim, Wei, et Sowers 2008; H. K. Lee 2011) and Diabetes (Garcia-Roves, 2011; Joseph *et al.*, 2012).

Several *in vivo* and *in vitro* studies assessed chlordécone and lindane toxicity. Effects are different depending on doses and duration of exposure. Acute toxicity indicates effects on central nervous system (hypoactivity, ataxia and convulsion) (Ullman *et al.*, 1986). Short term and long term toxicity study showed alteration of blood cholesterol homeostasis and hepatocellular carcinoma susceptibility (Steinberg *et al.*, 1977). *In vitro* studies showed that both chlordécone and lindane have an impact on intracellular calcium level (Younglai *et al.*, 2006; Heusinkveld and Westerink, 2012) and reactive oxygen species (Ledirac *et al.*, 2005; Piskac-Collier and Smith, 2009). However, concentrations used in most of those studies were relatively high if compared to those that can be found in the environment and in the blood of exposed people. In fact, concentrations of chlordécone and lindane detected in blood of individuals living and/or working in the contaminated area are heterogeneous. Depending on contamination level of the environment and the frequency of exposure, these concentrations range from picomolar to nanomolar levels (Cannon *et al.*, 1978; Krauthacker *et al.*, 1980; Drummond *et al.*, 1988; Boffa *et al.*, 1995; Guldner *et al.*, 2010; Mariscal-Arcas *et al.*, 2010). Moreover, the limit fixed by the World Health Organization in drinking water is at the picomolar level. The effects of these low concentrations remain poorly explored. On the other hand, there is a pressing need to find other ways and measurable

parameters to evaluate the toxicity of low concentrations of these compounds that cannot be evaluated by classical methods of toxicology.

In the present study, we have investigated the effects of environmentally relevant low concentrations of lindane and chlordécone on HepG2 cell line, aiming to assess whereas such exposure could disrupt mitochondrial respiration and energetic pathways of cells. We intend to obtain some response elements for an eventual link between organochlorine exposure, mitochondrial dysfunction and metabolic diseases from one side, and from another side to investigate the possible use of mitochondria as a toxicological tool for low concentration toxicity testing.

Materials and methods:

Chemicals:

Chlordecone (Kepone, chlordécone), Lindane (γ -hexachlorocyclohexane, lindane), oligomycine A, Carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), Antimycine A, Thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) powders were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Louis, USA). Stock solutions of organochlorine were prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). Intermediate concentrations were obtained from stock solutions in order to keep solvent concentration equal in all conditions for each compound (1/1000). Oligomycine A, Antimycine A, FCCP were dissolved in absolute ethanol.

Cell culture

The human hepatoma cell line HepG2 was maintained at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ in HAMS F12/ Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) (v/v) supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine and 1% penicillin G (100U/ml) and streptomycin (2 mM). All culture media and media supplements were purchased from LONZA (Verviers, Belgium).

For treatments, cells were incubated either with chlordécone (16 pM) or lindane (50 nM) or with DMSO for 24 hours, 48 hours and 72 hours.

Cell viability assay:

Cells were plated and allowed to attach overnight; the medium was removed and replaced by either control medium or medium with organochlorines. After exposure (24h, 48h), cells were incubated for 3.5 hours in serum-free medium supplemented with 10 % MTT solution (0.5mg/mL). 100 μ L DMSO were then added to dissolve the formazan crystals and the absorbance was read at 570 nm using the Mithras LB940 (Berthold Technologies, Thoiry, France). The proportion of metabolically competent cells was determined as the ratio (expressed as a percentage) of absorbance of toxic treated cells versus control cells.

Measurement of mitochondrial respiration:

Cells were exposed for 24h and 48h to chlordécone and lindane. At 70% confluence, cells were collected by trypsinization, washed once in complete medium and centrifuged. The pellet was resuspended at a final concentration of 10^6 cells per ml in 2 ml of medium. After air-equilibration at 37 °C, the suspension was immediately transferred to the 2 ml chamber of a Clarke-type oxygen electrode (Oxygraph-2K, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) maintained at 37 °C. Respiration rates were measured in intact HepG2 cells as previously described (Desquiret *et al.*, 2006). The routine respiration rate of cells was determined by measuring the linear rate of oxygen consumption, which reflects the aerobic metabolic activity of cells with physiological substrates present in culture media. In order to determine the uncoupling respiration rate, 2 μ l of oligomycin A (12 mg/ml) was then added to determine the non-phosphorylating respiration rate. To determine the maximal respiratory capacity, FCCP (200nM) was added stepwise up to the optimal concentration representing the maximal capacity of the respiratory chain. Finally, the non-mitochondrial oxygen consumption rate, which was subtracted from other values, was determined by adding Antimycine A (4 μ g/ml). The total protein content was determined using the Bio-Rad Assay kit[®] (Bio-Rad, Lyon, France).

ETC activity measurement :

The activity of the different mitochondrial respiratory chain complexes was measured on cell homogenates, at 37 °C, using a SAFAS spectrophotometer (SAFAS, Monaco, France).

Complex I (NADH ubiquinone reductase): Cells were first disrupted by freezing in liquid nitrogen followed by rapid thawing at 37°C. Cells were then washed and centrifuged (2 min, 110g), resuspended in cell buffer (250 μ L/ 10^6 cells), and sonicated on ice (6-5 seconds) (Branson Sonic Power, SmithKline Company, Danbury, CT). Complex I activity was immediately assayed on this cell lysate (0,5 μ L / 10^6 cells) in KH_2PO_4 buffer (80mM, pH 7.4), containing 1mM KCN, 2mM NaN_3 , and 0.1mM of the ubiquinone analogue ubiquinone-1. After 5 min of incubation, 0.3mM NADH was added and its rate of disappearance was monitored at 340nm. Rotenone (5 μ M) was also added to determine the background rate. Specific complex I activity was expressed in mIU (nmoles NADH/min/ 10^6 cell).

Complex II (succinate ubiquinone reductase): Cells were disrupted by a freeze-thaw cycle and extract prepared as described above. The reaction was initiated by the addition of 5 μM of ubiquinone and the rate of disappearance of DCPIP was monitored at 600 nm. Specific enzymatic activity was expressed in mIU (nmoles DCPIP/min/ 10^6 cells).

Complex III (ubiquinol cytochrome c reductase) activity was measured as described by rustin et al. (*Rustin et al., 1994*) with an additional step of cells disruption by three cycles of freezing in liquid nitrogen. Specific enzymatic activity was expressed in mIU (nmoles cytochrome c/min/ 10^6 cells).

Complex IV (cytochrome c oxidase): a volume of extract equivalent to 10^5 cells was added to the reaction medium (reduced cytochrome c 0.05 mM, BSA 1 mg/ml, laurylmaltoside 0.25 mM) and the oxidation rate of reduced cytochrome c was monitored at 550 nm.

The enzymatic activities of the electron transport chain complexes were normalized to citrate synthase (CS) activity (a marker of mitochondrial mass). CS activity was measured by adding 10^5 cells to a prewarmed reaction mix (DTNB 0.15 mM, oxaloacetic acid 0.5 mM, acetyl- CoA 0.3 mM, Triton X100 0.1%) and the appearance of CoA-SH was measured at 412 nm.

Nitric oxide (NO) and superoxide anion (O_2^-) determination by electron paramagnetic resonance (EPR):

NO and O_2^- were quantified by electron paramagnetic resonance (EPR) technique. Detection of NO production was performed using $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ (diethyldithiocarbamate) (Sigma–Aldrich) as spin trap. Briefly, cells were treated with chlordécone, lindane or Control medium for 24 and 48h; cell were incubated 30 min in Krebs-Hepes buffer containing : BSA ($20.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), CaCl_2 (3 mM) and L-Arginine (0.8 mM). NaDETC (1.5 mM) and $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5 mM) were separately dissolved under nitrogen gas bubbling in 10 ml volumes of ice-cold Krebs-Hepes buffer. These were rapidly mixed to obtain $\text{Fe}(\text{DETC})_2$ solution (0.4 mM), which was added to the cells and incubated for

45 min at 37°C. Cells were immediately frozen in plastic tubes using liquid nitrogen. NO measurement was performed on a table-top x-band spectrometer Miniscope® (Magnettech, MS200, Berlin, Germany). Signals were quantified by measuring the total amplitude, after correction of baseline. Values are expressed as amplitude of signal per protein concentration (A/μg/μL of HepG2 cell proteins).

For O₂⁻ spin-trapping, cells were treated as described above and allowed to equilibrate in deferoxamine-chelated Krebs–Hepes solution containing 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen; Denzlingen, Germany) (500 mM), deferoxamin (25 mM, Sigma-Aldrich) and DETC (5 mM, Sigma-Aldrich) under constant temperature (37 °C) for 1 h. Then, they were frozen in liquid N₂ and analyzed in a Dewar flask by EPR. Values were normalized to protein concentration (A/μg/μL of HepG2 cell proteins).

Western blotting:

After treatment, nuclear, membrane and cytosolic extracts were prepared using the RIPA buffer. Protein concentrations were determined by the Bio-Rad Assay kit® (Bio-Rad, Lyon, France). Cell lysate (30 μg of protein) was resolved on an 10% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose membrane (GE Healthcare, USA) and incubated for 1 h 30 min in Tris-buffered saline with Tween (TBST) (10mM Tris, pH 8.0, 150mM NaCl, and 0.1% Tween 20) containing 5% Bovine Serum Albumin (BSA) at room temperature. The membrane was then incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies at the following dilutions: Anti-nitrotyrosine (1:1000) (Millipore, Billerica, MA, USA), iNOS (1:1000) (BD biosciences, San Jose, CA, USA). After washing with TBST, the membrane was then incubated for 1 h with horseradish peroxidase–conjugated secondary antibody (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). The protein–antibody complexes were detected by chemiluminescence using the Western Blotting Luminol Reagent plus kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). To control for sample loading and protein transfer, the membrane was stripped and reprobed to detect β-actin. The intensities were quantified by chemi-capt 5000 Molecular Imaging Software version 12.9 for windows (Vibert Lourmat, Marne-la-Vallée, France).

Total RNA isolation and quantitative real-time PCR analysis:

Total RNA was isolated from cultured cells using an RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's recommendations. Concentration of the extracted mRNA was determined using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo-Scientific). RNA integrity was determined by a Bio-Analyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). The reverse transcription was performed on 1µg total RNA using BD Bioscience kit according to manufacturer's recommendations (Clontech, Palo Alto, CA, USA). Quantitative real-time PCR was performed by iQTM SYBR® Green Supermix kit (Bio-Rad) using the CFX96TM Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). 2µl of cDNA template were used for a 20µl final volume reaction mixture. Real-time PCR cycle parameters included 3 min at 95 °C followed by 40 cycles involving denaturation at 95 °C for 10 s, annealing and elongation at 60 °C for 30s.

Copies number was determined using a standard curve with known copy numbers for each gene. Expression of selected genes was normalized to β-actin gene, used as an internal housekeeping control. All the real-time PCR experiments were performed in duplicate and data were expressed as the mean of at least four independent experiments.

Adenine nucleotide measurement:

Cells were seeded, allowed to attach overnight then treated with either control medium containing DMSO or medium containing toxics for 48 h. After treatments, cells were harvested by trypsinization, washed with complete medium and centrifuged. The pellet was resuspended in PBS. Cell number was determined using *Nebauer* counting chamber. 10⁶ cells were taken for adenylate extraction using chloroform methanol. Adenine nucleotides were separated by high-performance liquid chromatography (HPLC) on a IonPac AS11 column (Dionex Corp., Sunnyvale, CA, USA). Quantification of ATP and ADP was done using standard curve of known concentrations. Results are expressed in nmol/10⁶ cells.

Lactate quantification:

Cells were seeded at the density of 10^6 cells /25 cm² culture flasks, allowed to attach overnight, then the medium was replaced either by control medium or medium containing chlordécone or lindane for 24h and 48 h. The L-lactate in the culture medium was measured at 24h and 48h by enzymatic method analysis on Cobas Integra 400TM automat (Roche diagnostics, Rotkreuz, Switzerland) following the manufacturer's instructions.

Lipid staining in cells:

Cells were seeded in 6 well cell culture plates (Costar, USA), allowed to attach overnight then treated with either control medium containing DMSO or medium containing toxics for 48. After treatment, the cultures were fixed for 15 min with formalin (10% v/v in PBS), washed with 60% isopropanol solution and then stained with Oil Red for 20 min at room temperature. After staining, cultures were washed 3 times with distilled water. To solubilize Oil Red fixed, 1mL of isopropanol was added in each well and absorbance was read at 500 nm using the Mithras LB940 (Berthold Technologies, Thoiry, France). Results are expressed as percentage of absorbance of treated cultures to control cultures.

Statistical analysis:

Results were expressed as mean \pm S.E.M. Significant differences ($p < 0.05$) within treatment groups were determined by one-way ANOVA.

Results:

Cell viability:

The MTT assay was used to assess the effect of the low concentrations of lindane and chlordécone on the viability of HepG2 cells. It was found that neither of the compound, at the low concentrations used, compromised cell viability after 24 or 48 h of exposure (Figure 1). These results were confirmed using the blue Trypan viability assay (data not shown). This indicates that at these low concentrations the cells viability is not impaired.

Cellular respiration:

Cellular respiration was measured by polarography. Oxygen uptake was normalized to protein content of each sample. Results are presented as percentage of Control cells. No significant effects could be observed on mitochondrial respiration after 24 hour of exposure (data not shown). After 48h of exposure, basal respiration (oxygen consumption without any complex inhibitor) was not altered in cells exposed to the two organochlorines (Figure 2A).

Compared to unexposed cells, uncoupled respiration (oxygen consumption after the inhibition of complex V) was not altered after 48h exposure to chlordécone. However, lindane exposure reduced significantly (60%) uncoupled respiration (Figure 2B).

Maximal respiratory capacity (oxygen consumption after mitochondrial potential dissipation) was reduced by 30% after 48h exposure to chlordécone. On the other hand, 48h exposure to lindane enhanced by 24% the maximal respiratory capacity (Figure 2C).

The inhibition of NO pathway by L-nitro Arginine (L-NA) restored lindane effect on mitochondrial respiration with value comparable to control cells (with or without L-NA). However, the inhibition of NO pathway in cells exposed to chlordécone decreased routine respiration, and increased both uncoupling respiration and maximal respiratory capacity. Our results suggest possible involvement of NO in the observed effect of chlordécone / lindane on mitochondrial respiration.

ETC activity:

ETC enzymatic activity was measured by spectrophotometry. Results are expressed as percentage to control cells. Cells exposed to chlordécone showed a decrease of the activity of complex II (Figure 3) while the activity of the other complexes of the mitochondrial ETC remained unchanged (figure 3). Exposure to lindane increased complex I activity (A) but had no remarkable effect on the activity of the other complexes of the ETC (Figure 3).

Free radicals:

Aiming to explore the effect of exposure to low concentration of chlordécone and lindane on oxidative and nitrosative stresses in HepG2 cell line, O_2^- and NO were quantified using the EPR and spin-trapping method. Under the experimental conditions used, exposure to both organochlorines had no effect on O_2^- production compared to control cells after 24 or 48h (Figure 4A).

Neither chlordécone nor lindane did affect NO release of HepG2 cells after 24 hours of exposure. However, after 48 hours, cells exposed to chlordécone showed an increase of more than 100% in NO release compared to unexposed cell. Cell exposed to lindane showed a significant but lower increase of NO release (19%) (Figure 4 B).

Western Blot:

Western blot analysis was used in order to quantify iNOS expression and tyrosine nitration. Results are normalized to β -Actine expression and expressed in arbitrary unites (AU).

Both chlordécone and lindane exposure induced an increase of iNOS expression and protein nitration in HepG2 cells compared to unexposed cells. The increase of iNOS expression and tyrosine nitration induced by chlordécone exposure was more important compared to the one induced by lindane exposure.

Gene expression:

RTqPCR was used to quantify mRNA level of genes implicated in nucleo-mitochondrial cross-talk and cellular energetic metabolism. Results are presented as fold to control of the transcript ratio with reference to *β-actin*.

PGC1α (Peroxisome proliferator-activated receptor Gamma Coactivator 1-alpha): chlordécone exposure induced an overexpression of PGC1α compared to unexposed cells. This expression trends to increase after 24h exposure and increased significantly after 48h and 72h (3.23fold, 2.13 fold respectively) (Figure 5). In parallel, lindane exposure also induced an overexpression of PGC1. However, this overexpression was more important and earlier compared with that induced by chlordécone exposure. PGC1α expression was drastically increased after 24h exposure (3.95 fold). It decreased after 48h and 72h of lindane exposure but remained higher compared to unexposed cells (1.8 fold, 1,7 fold respectively) (Figure 5).

PRC (PGC-1-related Coactivator): chlordécone exposure increased expression level of *PRC* gene at 24h. After 48h of chlordécone exposure, *PRC* expression was significantly upregulated (3.23 fold) compared to unexposed cells. Expression level of *PRC* gene decreased after 72h of chlordécone exposure to reach comparable level to unexposed cell. In parallel, lindane exposure also induced an over expression of *PRC*. However, this overexpression was more important and earlier compared with that induced by chlordécone exposure. *PRC* expression was drastically increased after 24h exposure (3.35 fold). It decreased after 48h and 72h of lindane exposure but remained higher compared to unexposed cells (1.6 fold, 2.08 fold respectively) (Figure 5).

TFAM (Transcription factor A, mitochondrial): chlordécone exposure had no impact on *TFAM* expression level at 24h compared to unexposed cells. However, *TFAM* expression level increased at 48 h (1.5 fold) and 72 h (1.7 fold) as seen in Figure 5C. In the case of lindane exposed cells, *TFAM* expression level was strongly increased compared to unexposed cells at 24 hours exposure (2.4 fold). Its expression decreased after 48h and 72h exposure but remained higher compared to unexposed cells (1.3 fold and 1.4 fold respectively) (Figure 5 C).

NRF1 (Nuclear respiratory factor 1): Compared to unexposed cells, chlordécone exposure induced an over expression of *NRF1* after 24h (1.6 fold). This expression

decreased and reached a comparable level to unexposed cells after 48h and 72h (Figure 5B). In a comparable way, lindane exposure induced an over expression of *NRF1* after 24h (3.6 fold). Its expression decreased at 48h but remained higher compared to unexposed cells (1.3 fold). After 72h of lindane exposure, NRF1 reached a comparable expression level to unexposed cells (Figure 5B).

TFB2M (Mitochondrial transcription factors B2) :

chlordécone exposure had no impact on *TFB2M* expression level at 24h compared to unexposed cells. However, TFB2M expression level trends to increase at 48 h (1.5 fold) and 72 h (1.3 fold) as seen in Figure 5B and 5C. In the case of lindane exposed cells, *TFB2M* expression level was strongly increased compared to unexposed cells at 24 hours exposure (2.8 fold). Its expression decreased after 48h and 72h exposure but remained higher compared to unexposed cells (1.4 fold and 1.5 fold respectively) (Figure 5).

DAP3 (Death Associated Protein 3):

chlordécone exposure had no impact on *DAP3* expression level at 24h compared to unexposed cells. However, *DAP3* expression level was increased at 48 h (1.4 fold) and 72 h (1.3 fold) as seen in Figure 5. In the case of lindane exposed cells, *DAP3* expression level was slightly increased compared to unexposed cells at 24 hours exposure (1.82 fold). Its expression decreased after 48h and 72h exposure but remained higher compared to unexposed cells (1.5 fold and 1.4 fold respectively) (Figure 5).

ERR- α (Estrogen-related receptor alpha): chlordécone exposure decreased significantly the expression level of *ERR α* after 24h exposure compared to unexposed cells (0.2 fold). However, after 48 and 72h of chlordécone exposure, *ERR α* reached a comparable expression level to unexposed cell. Lindane exposure had no significant effect on *ERR α* expression level at 24 and 48h. Its expression level increased after 72h of lindane exposure (1.7 fold).

ATP Synth (ATP Synthase): chlordécone exposure trends to decrease expression level of ATP synth after 24h (0.59 fold). However, after 48 and 72h, chlordécone exposure increased the expression level of ATP Synth (1.43 fold, 1.49 fold respectively). Lindane

exposure trends stimulated ATP Synth expression level compared to unexposed cell after 24, 48 and 72h (1.31 fold, 1.26 fold and 1.36 fold respectively).

Energy metabolism:

In order to assess the repercussion of disruptions induced on mitochondrial respiration by organochlorine exposure, cellular ATP concentration was measured using HPLC. Results showed that 48 h exposure to chlordécone or lindane induced a strong increase (almost 2 and 3 fold, respectively) in cellular ATP levels (Figure 6 A). In the same conditions ADP concentration remained unchanged. Lactate level in culture medium was thus measured in order to estimate the contribution of anaerobic energy metabolism in cells after exposure to plasmatic concentrations of organochlorines. Results showed that after 24 h of exposure cell did not exhibit any change in L-lactate level in medium compared to control cells. However both organochlorines induced a significant decrease of lactate level after 48h of exposure compared to unexposed cells (Figure 6B).

Intra cellular lipids accumulation:

As pathophysiological end point, we measured intracellular lipid accumulation in HepG2 cells after exposure to plasmatic concentration of chlordécone/lindane. Intracellular lipid were measured by Oil Red staining and results are expressed as percentage to control.

While chlordécone exposure induced a slight increase of intracellular lipid after 24h, there was no significant difference between cells exposed to lindane and unexposed cells. Both chlordécone and lindane exposure had no effect on lipid accumulation after 48h compared to unexposed cells. However Both chlordécone and lindane exposure induced a slight but significant increase in lipid content of HepG2 cells after 72h exposure.

Discussion:

Previous studies about chlordécone and lindane toxicity have used doses much higher than those that can be found in environment or plasma blood of people living in the contaminated area, and have not assessed effects on mitochondria and/or nucleo-mitochondrial cross-talk (Dehn *et al.*, 2005; Zucchini-Pascal *et al.*, 2011). Here, we have used concentration found in plasma of exposed people (16 pM for chlordécone, 50 nM for lindane) (Krauthacker *et al.*, 1980; Drummond *et al.*, 1988; Mariscal-Arcas *et al.*, 2010), and our data clearly demonstrated that plasmatic concentrations of chlordécone, lindane are able to impair mitochondrial function and regulation with an impact on cellular energetic metabolism and lipid accumulation without compromising HepG2 cell viability.

The impact of the organochlorines on mitochondrial respiration is likely due to perturbations of the ETC. Indeed, cell exposure to chlordécone induced a decrease of the complex II activity. A comparable effect has been observed in estuarine bacteria for which inhibition of complex II was associated to a reduction of oxygen uptake (Mahaffey *et al.*, 1982). In contrast to chlordécone exposure, lindane exposure induced an increase of complex I. Complexes I and II are the main entry of electrons in the mitochondrial ETC. We suggest that the decrease of the complex II activity participate in part in the decrease of the maximal respiratory capacity of cells exposed to chlordécone. In the same way, the increase of complex I activity may explain the increase of the maximal respiratory capacity of cells which were exposed to lindane. Comparable effects on maximal respiratory capacity were observed in vitro on rat liver isolated mitochondria (Gopalaswamy and Aiyar, 1984).

chlordécone and lindane are described in literature as having the ability to stimulate reactive oxygen species release (Ledirac *et al.*, 2005; Piskac-Collier and Smith, 2009; Zucchini-Pascal *et al.*, 2011). This effect is mainly associated to a decrease of the activity of anti-oxidant enzymes, namely superoxide dismutase and catalase (Singh and Sharma, 2011). However, the concentrations that were used in these studies are much higher than in the present work (micromolar level). The fact that we did not find any difference in the production of superoxide anion in our experimental conditions can likely be due to the formation of peroxynitrite. Indeed as that has been described in our

results, exposure to chlordécone/ lindane increased protein nitration. These results suggest an increase of ONOO⁻ formation which may explain the absence of difference in O₂⁻ release.

Both chlordécone and lindane exposure led to an increase in NO release in HepG2 cells. Increased production of NO after exposure to both organochlorines can be explained by their ability to increase the expression of the inducible isoform of NO-synthase (iNOS). We observed that both chlordécone and lindane exposure led to an increase of iNOS expression. Interestingly, another organochlorine (endosulfan) was shown to induce the overexpression of iNOS associated to a strong NO release (Bernabò *et al.*, 2008). NO release induced by chlordécone exposure was higher than in the case of lindane exposure, which is likely related to a stronger induction of iNOS triggered by chlordécone. It is well established that NO plays an important role in mitochondrial function and regulation (Gao, 2010). Depending on its concentration, NO stimulates mitochondrial biogenesis when present at low concentrations. This effect has been demonstrated in different cell types (Nisoli *et al.*, 2003; Carew *et al.*, 2004). However, when present in high amount, NO inhibits mitochondrial respiration through its derivative peroxynitrite (ONOO⁻) (Gao, 2010). Therefore, we suggest that NO may play a crucial role in the observed differential effects of chlordécone and lindane on mitochondrial respiration. Indeed, when NO pathway was inhibited by the addition of L-NA, chlordécone and lindane effects on mitochondrial respiration disappeared. Moreover, chlordécone induced a dramatic increase of NO release which conducted to the increase of ONOO⁻ and mitochondrial protein tyrosine nitration. It is well known that mitochondrial protein tyrosine nitration reduces mitochondrial function and respiration (Castro *et al.*, 2011; Kassab and Piwowar, 2012). In our results, we suggest that protein nitration impaired ETC complexes function and leads to decreased mitochondrial respiratory chain activity, mainly complex II after chlordécone exposure. On the other hand, the slight NO release resulting from lindane exposure was found to induce the activation of mitochondrial biogenesis genes namely *PGC1α*, *PRC*, *NRF1*, *DAP3*. It has been well established that NO when present in slight concentration induces mitochondrial biogenesis via cGMP pathway and activation of *PGC1α* (Nisoli *et al.*, 2003; Gao, 2010). Our results thus suggest that the slight increase in NO release

after lindane exposure leads to mitochondrial biogenesis, which explains in turn the increase of maximal respiratory capacity.

This study revealed that exposure to low concentrations of the organochlorines chlordécone and lindane alters the expression of key mitochondrial biogenesis regulators genes: *PGC1 α* , *PRC*, *ERR α* , *DAP3*, *NRF1* and *TFAM*, as well as other genes implicated in cell energy metabolism (*ATP synthase*). The effects were variable according to the compound and duration of exposure, but the expression level for the three genes was always higher, with likely consequences on mitochondrial respiration and cellular metabolism. Moreover, besides regulating mitochondrial function, these genes are also implicated in other cellular process. *PGC1 α* , *PRC* and *ERR α* are transcriptional coactivators that regulate genes involved in the physiopathology of several diseases. They provide a direct link between external physiological stimuli and the regulation of mitochondrial biogenesis. PGC-1 α has also been implicated in the pathogenic conditions including obesity, type 2 diabetes, neurodegenerative diseases, and cardiomyopathy (Finck, 2006; Liu and Lin, 2011; Pooya *et al.*, 2012). Indeed high levels of *PGC1 α* mRNA were found in liver of rodent model of type 2 diabetes; this was likely due to hepatic insulin resistance. Modulating PGC1 α activity in the liver has important implication for systemic glucose homeostasis (Lin *et al.*, 2005). NRF1 functions as a transcription factor activating the expression of key metabolic genes regulating cellular growth and nuclear genes required for mitochondrial respiration (Scarpulla, 2008). The NRF1 protein is also important for the up regulation of antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzymes (Biswas and Chan, 2010). A recent study showed that prolonged overexpression of the transcription factor NRF1 triggers adipocyte inflammation and insulin resistance (van Tienen *et al.*, 2010). Moreover, NRF-1 is a potent stimulator of the expression of TFAM which is a potent stimulator of the duplication of mitochondrial DNA. Indeed, TFAM is the ultimate gene in mitochondrial biogenesis pathway induced by PGC1 α (Choi *et al.*, 2004; Viña *et al.*, 2009). The persistent overexpression of these genes suggests that exposure to plasmatic concentration of chlordécone, lindane led to a prolonged mitochondrial stress with the observed consequences on cell energy metabolism and lipid accumulation. In fact, at the metabolic level, cells exposed to the two organochlorines displayed an increase in their intracellular ATP/ADP ratio associated with a decrease in lactate concentration in the

medium. Such results indicate that both organochlorines shifted cellular energetic metabolism from an anaerobic to a more oxidative metabolism and an increase, albeit modest, in intracellular lipid accumulation.

As previously highlighted, exposure to organochlorines is positively correlated with the metabolic syndrome and development of insulin resistance (Lim *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011). In addition, mitochondrial dysfunctions were observed in the metabolic syndrome (Lee, 2011). Here, we have shown that exposure to low concentration of chlordécone and lindane is able to induce mitochondrial stress. chlordécone and lindane exposure induced also a slight but significant increase of intracellular lipid in HepG2 cell. Recent studies suggest that lipid accumulation, together with mitochondrial dysfunction potentiate hepatic insulin resistance and may cause steatohepatitis (Longato *et al.*, 2012; Machado *et al.*, 2012). Our results are in line with the hypothesis that exposure to organochlorines is a risk factor for insulin resistance and cancer in a manner that involve mitochondrial regulation and nitrosative stress. In line with this study, we have recently reported that chlordécone and lindane promote angiogenesis via estrogen receptor alpha activation that may potentiate the occurrence of cancer (Clere *et al.* 2012).

This *in vitro* study has clearly highlighted the consequences of exposure of cells to low concentrations of organochlorines that can be found in the plasma of populations exposed in polluted areas. Although chlordécone and lindane belong to same organochlorines family, their effects on mitochondrial function and biogenesis were not identical, which suggests they do not act through the same mechanism. Cellular bioenergetics and mitochondrial biogenesis were found to be impacted by the compounds, forcing cells to modify their metabolism to cope with the longue exposure to pollutants. It will be therefore of primary interest to explore the effects of such chronic exposure to low concentration of organochlorine on mitochondrial functions in animal models to better understand the links with different disorders associated with their exposure (tumerogenesis, metabolic syndrome, Parkinson disease). In another hand, this data highlighted the hypersensitivity of mitochondria to xenobiotic exposure. Undeniably, we suggest the use of mitochondrial stress assessment as a toxicological tool in evaluating effects of relatively low concentrations of xenobiotics. Where

classical tool of toxicology are unable to detect changes after exposure, it turned out that cells expressed a marked mitochondrial stress. Because of its central position in cell metabolism and regulation, the functional analysis of the mitochondrial network appears as a powerful tool not only in xenobiotics effects assessment but also in drug development process.

References:

- Aguilar, Victor, Samira Alliouachene, Athanassia Sotiropoulos, Andrew Sobering, Yoni Athea, Fatima Djouadi, Sylvain Miraux, et al. 2007. « S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase ». *Cell metabolism* 5 (6) (juin): 476-487. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.006.
- Anderson, S, A T Bankier, B G Barrell, M H de Bruijn, A R Coulson, J Drouin, I C Eperon, et al. 1981. « Sequence and organization of the human mitochondrial genome ». *Nature* 290 (5806) (avril 9): 457-465.
- Arany, Zoltan, Huamei He, Jiandie Lin, Kirsten Hoyer, Christoph Handschin, Okan Toka, Ferhaan Ahmad, et al. 2005. « Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle ». *Cell metabolism* 1 (4) (avril): 259-271. doi:10.1016/j.cmet.2005.03.002.
- Ashley, Neil, et Joanna Poulton. 2009. « Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (3) (janvier 16): 450-455. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.059.
- Belfiore, Carol J, Raymond S H Yang, Laura S Chubb, Manupat Lohitnavy, Ornat S Lohitnavy, et Melvin E Andersen. 2007. « Hepatic sequestration of chlordecone and hexafluoroacetone evaluated by pharmacokinetic modeling ». *Toxicology* 234 (1-2) (mai 5): 59-72. doi:10.1016/j.tox.2007.02.002.
- Belyaeva, Elena A., Tatyana V. Sokolova, Larisa V. Emelyanova, et Irina O. Zakharova. 2012. « Mitochondrial Electron Transport Chain in Heavy Metal-Induced Neurotoxicity: Effects of Cadmium, Mercury, and Copper ». *The Scientific World Journal* 2012: 1-14. doi:10.1100/2012/136063.
- Benard, G, N Bellance, C Jose, S Melser, K Nouette-Gaulain, et R Rossignol. 2010. « Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production ». *Biochimica et biophysica acta* 1797 (6-7) (juillet): 698-709. doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.030.
- Benard, G, B Faustin, E Passerieux, A Galinier, C Rocher, N Bellance, J-P Delage, L Casteilla, T Letellier, et R Rossignol. 2006. « Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation ». *American journal of physiology. Cell physiology* 291 (6) (décembre): C1172-1182. doi:10.1152/ajpcell.00195.2006.
- Benard, Giovanni, Nadège Bellance, Dominic James, Philippe Parrone, Helder Fernandez, Thierry Letellier, et Rodrigue Rossignol. 2007. « Mitochondrial bioenergetics and structural network organization ». *Journal of cell science* 120 (Pt 5) (mars 1): 838-848. doi:10.1242/jcs.03381.
- Benbrik, E, P Chariot, S Bonavaud, M Ammi-Saïd, E Frisdal, C Rey, R Gherardi, et G Barlovatz-Meimon. 1997. « Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells ». *Journal of the neurological sciences* 149 (1) (juillet): 19-25.
- Bernabò, Ilaria, Elvira Brunelli, Cecilia Berg, Antonella Bonacci, et Sandro Tripepi. 2008. « Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: ultrastructural

- changes and nitric oxide synthase localization ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 86 (3) (février 18): 447-456. doi:10.1016/j.aquatox.2007.12.006.
- Bianchi, Cristina, Maria Luisa Genova, Giovanna Parenti Castelli, et Giorgio Lenaz. 2004. « The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis ». *The Journal of biological chemistry* 279 (35) (août 27): 36562-36569. doi:10.1074/jbc.M405135200.
- Biswas, G, O A Adebajo, B D Freedman, H K Anandatheerthavarada, C Vijayasarathy, M Zaidi, M Kotlikoff, et N G Avadhani. 1999. « Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk ». *The EMBO journal* 18 (3) (février 1): 522-533. doi:10.1093/emboj/18.3.522.
- Biswas, Madhurima, et Jefferson Y Chan. 2010. « Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 244 (1) (avril 1): 16-20. doi:10.1016/j.taap.2009.07.034.
- Boffa, M J, P A Brough, et R D Ead. 1995. « Lindane neurotoxicity ». *The British Journal of Dermatology* 133 (6) (décembre): 1013.
- Bourgeron, T, P Rustin, D Chretien, M Birch-Machin, M Bourgeois, E Viegas-Péquignot, A Munnich, et A Rötig. 1995. « Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency ». *Nature genetics* 11 (2) (octobre): 144-149. doi:10.1038/ng1095-144.
- Boyer, P D. 1997. « The ATP synthase--a splendid molecular machine ». *Annual review of biochemistry* 66: 717-749. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
- Breivik, K, J M Pacyna, et J Münch. 1999. « Use of alpha-, beta- and gamma-hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996 ». *The Science of the total environment* 239 (1-3) (octobre 1): 151-163.
- de Brito, Olga Martins, et Luca Scorrano. 2008. « Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria ». *Nature* 456 (7222) (décembre 4): 605-610. doi:10.1038/nature07534.
- Brown, Guy C. 2007. « Nitric oxide and mitochondria ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12: 1024-1033.
- Brown, Guy C. 1999. « Nitric oxide and mitochondrial respiration ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411 (2-3) (mai 5): 351-369. doi:10.1016/S0005-2728(99)00025-0.
- Buler, Marcin, Sanna-Mari Aatsinki, Réka Skoumal, Zsolt Komka, Miklós Tóth, Risto Kerkelä, Anastasia Georgiadi, Sander Kersten, et Jukka Hakola. 2012. « Energy-sensing factors coactivator peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α (PGC-1 α) and AMP-activated protein kinase control expression of inflammatory mediators in liver: induction of interleukin 1 receptor antagonist ». *The Journal of biological chemistry* 287 (3) (janvier 13): 1847-1860. doi:10.1074/jbc.M111.302356.

- Campbell, Christopher T, Jill E Kolesar, et Brett A Kaufman. 2012. « Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number ». *Biochimica et biophysica acta* (mars 21). doi:10.1016/j.bbagr.2012.03.002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465614>.
- Cannino, Giuseppe, Elisa Ferruggia, Claudio Luparello, et Anna Maria Rinaldi. 2009. « Cadmium and mitochondria ». *Mitochondrion* 9 (6) (novembre): 377-384. doi:10.1016/j.mito.2009.08.009.
- Cannon, S B, J M Veazey Jr, R S Jackson, V W Burse, C Hayes, W E Straub, P J Landrigan, et J A Liddle. 1978. « Epidemic kepone poisoning in chemical workers ». *American journal of epidemiology* 107 (6) (juin): 529-537.
- Cantó, Carles, et Johan Auwerx. 2009. « PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure ». *Current opinion in lipidology* 20 (2) (avril): 98-105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- Capaldi, R A, D G Halphen, Y Z Zhang, et W Yanamura. 1988. « Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain ». *Journal of bioenergetics and biomembranes* 20 (3) (juin): 291-311.
- Carew, J S, S T Nawrocki, R H Xu, K Dunner, D J McConkey, W G Wierda, M J Keating, et P Huang. 2004. « Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabine ». *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 18 (12) (décembre): 1934-1940. doi:10.1038/sj.leu.2403545.
- Carroll, Joe, Ian M Fearnley, J Mark Skehel, Michael J Runswick, Richard J Shannon, Judy Hirst, et John E Walker. 2005. « The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria ». *Molecular & cellular proteomics: MCP* 4 (5) (mai): 693-699. doi:10.1074/mcp.M500014-MCP200.
- Carroll, Joe, Ian M Fearnley, J Mark Skehel, Richard J Shannon, Judy Hirst, et John E Walker. 2006. « Bovine complex I is a complex of 45 different subunits ». *The Journal of biological chemistry* 281 (43) (octobre 27): 32724-32727. doi:10.1074/jbc.M607135200.
- Castro, Laura, Verónica Demicheli, Verónica Tórtora, et Rafael Radi. 2011. « Mitochondrial protein tyrosine nitration ». *Free radical research* 45 (1) (janvier): 37-52. doi:10.3109/10715762.2010.516254.
- Cecchini, Gary. 2003. « Function and structure of complex II of the respiratory chain ». *Annual review of biochemistry* 72: 77-109. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700.
- Choi, Seok-Yong, Ping Huang, Gary M Jenkins, David C Chan, Juergen Schiller, et Michael A Frohman. 2006. « A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis ». *Nature cell biology* 8 (11) (novembre): 1255-1262. doi:10.1038/ncb1487.

- Choi, Yon Sik, Ki-Up Lee, et Youngmi Kim Pak. 2004. « Regulation of mitochondrial transcription factor A expression by high glucose ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011 (avril): 69-77.
- Clementi, Emilio, et Enzo Nisoli. 2005. « Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 142 (2) (octobre): 102-110. doi:10.1016/j.cbpb.2005.04.022.
- Coat, Sophie, Dominique Monti, Pierre Legendre, Claude Bouchon, Félix Massat, et Gilles Lepoint. 2011. « Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 159 (6) (juin): 1692-1701. doi:10.1016/j.envpol.2011.02.036.
- D'Aurelio, Marilena, Carl D Gajewski, Giorgio Lenaz, et Giovanni Manfredi. 2006. « Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids ». *Human molecular genetics* 15 (13) (juillet 1): 2157-2169. doi:10.1093/hmg/ddl141.
- Dagorn, M, M Poul, P Guillot, et P Sanders. 1988. « Residues of lindane in plasma and fat of sheep after dipping ». *Food Additives and Contaminants* 5 (1) (mars): 51-58. doi:10.1080/02652038809373662.
- Dalmonte, Maria Elena, Elena Forte, Maria Luisa Genova, Alessandro Giuffrè, Paolo Sarti, et Giorgio Lenaz. 2009. « Control of respiration by cytochrome c oxidase in intact cells: role of the membrane potential ». *The Journal of biological chemistry* 284 (47) (novembre 20): 32331-32335. doi:10.1074/jbc.M109.050146.
- Das, T K, C Pecoraro, F L Tomson, R B Gennis, et D L Rousseau. 1998. « The post-translational modification in cytochrome c oxidase is required to establish a functional environment of the catalytic site ». *Biochemistry* 37 (41) (octobre 13): 14471-14476. doi:10.1021/bi981500w.
- Dehn, P F, S Allen-Mocherie, J Karek, et A Thenappan. 2005. « Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 19 (2) (mars): 261-273. doi:10.1016/j.tiv.2004.10.002.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, et al. (2000). "Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy". *Nat. Genet.* **26** (2): 207–10.
- Dirinck, Eveline, Philippe G Jorens, Adrian Covaci, Tinne Geens, Laurence Roosens, Hugo Neels, Ilse Mertens, et Luc Van Gaal. 2011. « Obesity and persistent organic pollutants: possible obesogenic effect of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19 (4) (avril): 709-714. doi:10.1038/oby.2010.133.
- Drummond, L, E M Gillanders, et H K Wilson. 1988. « Plasma gamma-hexachlorocyclohexane concentrations in forestry workers exposed to lindane. » *British Journal of Industrial Medicine* 45 (7) (juillet): 493-497.

- Evans, M J, et R C Scarpulla. 1989. « Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences ». *The Journal of biological chemistry* 264 (24) (août 25): 14361-14368.
- Feychting, Maria. 2011. « Mobile phones, radiofrequency fields, and health effects in children – Epidemiological studies ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107 (3) (décembre): 343-348. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2011.09.016.
- Finck, B. N. 2006. « PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease ». *Journal of Clinical Investigation* 116 (3) (mars 1): 615-622. doi:10.1172/JCI27794.
- Furt, Fabienne, et Patrick Moreau. 2009. « Importance of lipid metabolism for intracellular and mitochondrial membrane fusion/fission processes ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (10) (octobre): 1828-1836. doi:10.1016/j.biocel.2009.02.005.
- Gao, Yuansheng. 2010. « The multiple actions of NO ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 459 (6) (mai): 829-839. doi:10.1007/s00424-009-0773-9.
- Garcia-Roves, Pablo M. 2011. « Mitochondrial pathophysiology and type 2 diabetes mellitus ». *Archives of physiology and biochemistry* 117 (3) (juillet): 177-187. doi:10.3109/13813455.2011.584538.
- Garesse, Rafael, et Carmen G. Vallejo. 2001. « Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes ». *Gene* 263 (1–2) (janvier 24): 1-16. doi:10.1016/S0378-1119(00)00582-5.
- Glancy, Brian, et Robert S Balaban. 2012. « Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics ». *Biochemistry* 51 (14) (avril 10): 2959-2973. doi:10.1021/bi2018909.
- Gnaiger, E, G Méndez, et S C Hand. 2000. « High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (20) (septembre 26): 11080-11085.
- Gopaldaswamy, U V, et A S Aiyar. 1984. « Effects of lindane on liver mitochondrial function in the rat ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 33 (1) (juillet): 106-113.
- Gouvernement du Canada, Agence de la santé publique du Canada. 1999. « Le diabète au Canada - Annexe B - Renseignements généraux - Agence de santé publique du Canada ». <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/dic-dac99/d20-fra.php>.
- Green, D R. 1998. « Apoptotic pathways: the roads to ruin ». *Cell* 94 (6) (septembre 18): 695-698.
- Greer, Eric L, Philip R Oskoui, Max R Banko, Jay M Maniar, Melanie P Gygi, Steven P Gygi, et Anne Brunet. 2007. « The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor ». *The Journal of biological chemistry* 282 (41) (octobre 12): 30107-30119. doi:10.1074/jbc.M705325200.

- Guldner, Laurence, Luc Multigner, Fanny Héraud, Christine Monfort, Jean Pierre Thomé, Arnaud Giusti, Philippe Kadhel, et Sylvaine Cordier. 2010. « Pesticide exposure of pregnant women in Guadeloupe: ability of a food frequency questionnaire to estimate blood concentration of chlordecone ». *Environmental Research* 110 (2) (février): 146-151. doi:10.1016/j.envres.2009.10.015.
- Hackenbrock, C R, T G Rehn, E C Weinbach, et J J Lemasters. 1971. « Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell ». *The Journal of cell biology* 51 (1) (octobre): 123-137.
- Hajnóczky, György, György Csordás, Sudipto Das, Cecilia Garcia-Perez, Masao Saotome, Soumya Sinha Roy, et Muqing Yi. 2006. « Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis ». *Cell Calcium* 40 (5-6) (décembre): 553-560. doi:10.1016/j.ceca.2006.08.016.
- Hardie, D Grahame. 2007. « AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (10) (octobre): 774-785. doi:10.1038/nrm2249.
- He, Xin, Chen Sun, Feng Wang, Aijing Shan, Ting Guo, Weiqiong Gu, Bin Cui, et Guang Ning. 2012. « Peri-implantation lethality in mice lacking the PGC-1-related coactivator protein ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 241 (5) (mai): 975-983. doi:10.1002/dvdy.23769.
- Herrmann, J M, et W Neupert. 2000. « Protein transport into mitochondria ». *Current opinion in microbiology* 3 (2) (avril): 210-214.
- Herzig, S, F Long, U S Jhala, S Hedrick, R Quinn, A Bauer, D Rudolph, et al. 2001. « CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1 ». *Nature* 413 (6852) (septembre 13): 179-183. doi:10.1038/35093131.
- Heusinkveld, Harm J, et Remco H S Westerink. 2012. « Organochlorine insecticides lindane and dieldrin and their binary mixture disturb calcium homeostasis in dopaminergic PC12 cells ». *Environmental science & technology* 46 (3) (février 7): 1842-1848. doi:10.1021/es203303r.
- Hfaiedh, Najla, Jean-Claude Murat, et Abdelfettah Elfeki. 2012. « A combination of ascorbic acid and α -tocopherol or a combination of Mg and Zn are both able to reduce the adverse effects of lindane-poisoning on rat brain and liver ». *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* (juin 5). doi:10.1016/j.jtemb.2012.04.002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677539>.
- Hirst, J. 2005. « Energy transduction by respiratory complex I--an evaluation of current knowledge ». *Biochemical Society transactions* 33 (Pt 3) (juin): 525-529. doi:10.1042/BST0330525.
- Huss, Janice M, et Daniel P Kelly. 2004. « Nuclear receptor signaling and cardiac energetics ». *Circulation research* 95 (6) (septembre 17): 568-578. doi:10.1161/01.RES.0000141774.29937.e3.

- Ikeuchi, Masaki, Hidenori Matsusaka, Dongchon Kang, Shouji Matsushima, Tomomi Ide, Toru Kubota, Toshiyuki Fujiwara, et al. 2005. « Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction ». *Circulation* 112 (5) (août 2): 683-690. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.524835.
- Iwata, S, J W Lee, K Okada, J K Lee, M Iwata, B Rasmussen, T A Link, S Ramaswamy, et B K Jap. 1998. « Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5373) (juillet 3): 64-71.
- Jones, Aleck W.E., Zhi Yao, Jose Miguel Vicencio, Agnieszka Karkucinska-Wieckowska, et Gyorgy Szabadkai. 2012. « PGC-1 family coactivators and cell fate: Roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria–nucleus signalling ». *Mitochondrion* 12 (1) (janvier): 86-99. doi:10.1016/j.mito.2011.09.009.
- Joseph, Anna-Maria, Denis R Joannis, Richard G Baillot, et David A Hood. 2012. « Mitochondrial dysregulation in the pathogenesis of diabetes: potential for mitochondrial biogenesis-mediated interventions ». *Experimental diabetes research* 2012: 642038. doi:10.1155/2012/642038.
- Kassab, Asma, et Agnieszka Piwowar. 2012. « Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes ». *Biochimie* (février 7). doi:10.1016/j.biochi.2012.01.020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333037>.
- Keeney, Paula M, Caitlin K Quigley, Lisa D Dunham, Christina M Papageorge, Shilpa Iyer, Ravindar R Thomas, Kathleen M Schwarz, et al. 2009. « Mitochondrial gene therapy augments mitochondrial physiology in a Parkinson's disease cell model ». *Human gene therapy* 20 (8) (août): 897-907. doi:10.1089/hum.2009.023.
- Kim, Hyung-Ryong, Han-Jung Chae, Michael Thomas, Tadaaki Miyazaki, Anna Monosov, Edward Monosov, Maryla Krajewska, Stan Krajewski, et John C. Reed. 2007. « Mammalian dap3 is an essential gene required for mitochondrial homeostasis in vivo and contributing to the extrinsic pathway for apoptosis ». *The FASEB Journal* 21 (1) (janvier 1): 188 -196. doi:10.1096/fj.06-6283com.
- Kim, Jeong-a, Yongzhong Wei, et James R. Sowers. 2008. « Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance ». *Circ Res* 102 (4) (février 29): 401-414. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165472.
- Kinosita, Kazuhiko, Jr. 2012. « F(1)-ATPase: a prototypical rotary molecular motor ». *Advances in experimental medicine and biology* 726: 5-16. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9_2.
- Klimcakova, Eva, Valérie Chénard, Shawn McGuirk, David Germain, Daina Avizonis, William J Muller, et Julie St-Pierre. 2012. « PGC-1 α promotes the growth of ErbB2/Neu-induced mammary tumors by regulating nutrient supply ». *Cancer research* 72 (6) (mars 15): 1538-1546. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2967.

- Kmetić, Ivana, Kristina Radosević, Teuta Murati, Branimir Simić, Zlatko Kniewald, et Jasna Kniewald. 2009. « Lindane-induced cytotoxicity and the role of vitamin E in Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells ». *Toxicology Mechanisms and Methods* 19 (8) (octobre): 518-523. doi:10.1080/15376510903280107.
- Knott, A. B., et E. Bossy-Wetzel. 2010. « Impact of Nitric Oxide on Metabolism in Health and Age-related Disease ». *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12: 126–133. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01267.x.
- Knott, Andrew B, et Ella Bossy-Wetzel. 2009. « Nitric oxide in health and disease of the nervous system ». *Antioxidants & redox signaling* 11 (3) (mars): 541-554. doi:10.1089/ARS.2008.2234.
- Knowles, R G, et S Moncada. 1994. « Nitric oxide synthases in mammals ». *The Biochemical journal* 298 (Pt 2) (mars 1): 249-258.
- Kong, George Y. X., Nicole J. Van Bergen, Ian A. Trounce, et Jonathan G. Crowston. 2009. « Mitochondrial Dysfunction and Glaucoma ». *Journal of Glaucoma* 18 (2) (février): 93-100. doi:10.1097/IJG.0b013e318181284f.
- Koutnikova, Hana, Terrie-Anne Cock, Mitsuhiro Watanabe, Sander M. Houten, Marie-France Champy, Andrée Dierich, et Johan Auwerx. 2003. « Compensation by the Muscle Limits the Metabolic Consequences of Lipodystrophy in PPAR γ Hypomorphic Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (24) (novembre 25): 14457-14462. doi:10.1073/pnas.2336090100.
- Kozieł, Katarzyna, Magdalena Lebieżńska, György Szabadkai, Marta Onopiuk, Wojciech Brutkowski, Katarzyna Wierzbicka, Grzegorz Wilczyński, et al. 2009. « Plasma membrane associated membranes (PAM) from Jurkat cells contain STIM1 protein is PAM involved in the capacitative calcium entry? ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (12) (décembre): 2440-2449. doi:10.1016/j.biocel.2009.07.003.
- Krauthacker, B, T Alebić-Kolbah, M Kralj, B Tkalcević, et E Reiner. 1980. « Organochlorine pesticides in blood serum of the general Yugoslav population and in occupationally exposed workers ». *International Archives of Occupational and Environmental Health* 45 (3): 217-220.
- Ledirac, Nathalie, Sebastien Antherieu, Anne Dupuy d' Uby, Jean-Claude Caron, et Roger Rahmani. 2005. « Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 86 (2) (août): 444-452. doi:10.1093/toxsci/kfi192.
- Lee, Duk-Hee, Michael W Steffes, Andreas Sjödin, Richard S Jones, Larry L Needham, et David R Jacobs Jr. 2011a. « Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes ». *PloS One* 6 (1): e15977. doi:10.1371/journal.pone.0015977.
- Lee, Duk-Hee, Michael W. Steffes, Andreas Sjödin, Richard S. Jones, Larry L. Needham, et David R. Jacobs. 2010. « Low Dose of Some Persistent Organic

- Pollutants Predicts Type 2 Diabetes: A Nested Case–Control Study ». *Environmental Health Perspectives* 118 (9) (septembre): 1235-1242. doi:10.1289/ehp.0901480.
- 2011b. « Low Dose Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Predict Obesity, Dyslipidemia, and Insulin Resistance among People Free of Diabetes ». *PLoS ONE* 6 (1) (janvier 26): e15977. doi:10.1371/journal.pone.0015977.
- Lee, Hong Kyu. 2011. « Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: the contribution of dioxin-like substances ». *Diabetes & Metabolism Journal* 35 (3) (juin): 207-215. doi:10.4093/dmj.2011.35.3.207.
- Lee, Hsin-Chen, et Yau-Huei Wei. 2012. « Mitochondria and aging ». *Advances in experimental medicine and biology* 942: 311-327. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_14.
- Lefebvre, Philippe, Giulia Chinetti, Jean-Charles Fruchart, et Bart Staels. 2006. « Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis ». *The Journal of clinical investigation* 116 (3) (mars): 571-580. doi:10.1172/JCI27989.
- Lenaz, Giorgio. 2012. « Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? ». *Advances in experimental medicine and biology* 942: 93-136. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_5.
- Li, Ching-Hao, Su-Liang Tzeng, Yu-Wen Cheng, et Jaw-Jou Kang. 2005. « Chloramphenicol-induced mitochondrial stress increases p21 expression and prevents cell apoptosis through a p21-dependent pathway ». *The Journal of biological chemistry* 280 (28) (juillet 15): 26193-26199. doi:10.1074/jbc.M501371200.
- Lim, Soo, Young Min Cho, Kyong Soo Park, et Hong Kyu Lee. 2010. « Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201 (juillet): 166-176. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05622.x.
- Lin, Jiandie, Christoph Handschin, et Bruce M. Spiegelman. 2005. « Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators ». *Cell Metabolism* 1 (6) (juin): 361-370. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.004.
- Lin, Jiandie, Pere Puigserver, Jerry Donovan, Paul Tarr, et Bruce M Spiegelman. 2002. « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor ». *The Journal of biological chemistry* 277 (3) (janvier 18): 1645-1648. doi:10.1074/jbc.C100631200.
- Liu, Chang, et Jiandie D Lin. 2011. « PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 43 (4) (avril): 248-257. doi:10.1093/abbs/gmr007.
- Liu, Zhengchang, et Ronald A Butow. 2006. « Mitochondrial retrograde signaling ». *Annual review of genetics* 40: 159-185. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090613.

- Longato, Lisa, Kelsey Ripp, Mashiko Setshedi, Miroslav Dostalek, Fatemeh Akhlaghi, Mark Branda, Jack R Wands, et Suzanne M de la Monte. 2012. « Insulin resistance, ceramide accumulation, and endoplasmic reticulum stress in human chronic alcohol-related liver disease ». *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012: 479348. doi:10.1155/2012/479348.
- Luo, Yuan, Joshua D. Bond, et Vernon M. Ingram. 1997. « Compromised Mitochondrial Function Leads to Increased Cytosolic Calcium and to Activation of MAP Kinases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (18) (février 9): 9705-9710.
- Machado, Mariana Verdelho, Duarte M S Ferreira, Rui E Castro, Ana Rita Silvestre, Teresinha Evangelista, João Coutinho, Fátima Carepa, Adília Costa, Cecília M P Rodrigues, et Helena Cortez-Pinto. 2012. « Liver and muscle in morbid obesity: the interplay of fatty liver and insulin resistance ». *PloS one* 7 (2): e31738. doi:10.1371/journal.pone.0031738.
- Mahaffey, W R, P H Pritchard, et A W Bourquin. 1982. « Effects of kepone on growth and respiration of several estuarine bacteria ». *Applied and Environmental Microbiology* 43 (6) (juin): 1419-1424.
- Manczak, Maria, Thimmappa S Anekonda, Edward Henson, Byung S Park, Joseph Quinn, et P Hemachandra Reddy. 2006. « Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression ». *Human molecular genetics* 15 (9) (mai 1): 1437-1449. doi:10.1093/hmg/ddl066.
- Mariscal-Arcas, M, C Lopez-Martinez, A Granada, N Olea, M L Lorenzo-Tovar, et F Olea-Serrano. 2010. « Organochlorine pesticides in umbilical cord blood serum of women from Southern Spain and adherence to the Mediterranean diet ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 48 (5) (mai): 1311-1315. doi:10.1016/j.fct.2010.02.029.
- Marongiu, Roberta, Brian Spencer, Leslie Crews, Anthony Adame, Christina Patrick, Margarita Trejo, Bruno Dallapiccola, Enza Maria Valente, et Eliezer Masliah. 2009. « Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux ». *Journal of neurochemistry* 108 (6) (mars): 1561-1574. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05932.x.
- Martin, J L, C E Brown, N Matthews-Davis, et J E Reardon. 1994. « Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (12) (décembre): 2743-2749.
- McBride, Heidi M, Margaret Neuspiel, et Sylwia Wasiak. 2006. « Mitochondria: more than just a powerhouse ». *Current Biology: CB* 16 (14) (juillet 25): R551-560. doi:10.1016/j.cub.2006.06.054.
- Meirhaeghe, Aline, Vivion Crowley, Carol Lenaghan, Christopher Lelliott, Kath Green, Abigail Stewart, Kevin Hart, et al. 2003. « Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-

- gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo ». *The Biochemical journal* 373 (Pt 1) (juillet 1): 155-165. doi:10.1042/BJ20030200.
- Miccadei, Stefania, et Aristide Floridi. 1993. « Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by cadmium ». *Chemico-Biological Interactions* 89 (2-3) (décembre): 159-167. doi:10.1016/0009-2797(93)90006-K.
- Michalik, Liliane, Johan Auwerx, Joel P Berger, V Krishna Chatterjee, Christopher K Glass, Frank J Gonzalez, Paul A Grimaldi, et al. 2006. « International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors ». *Pharmacological reviews* 58 (4) (décembre): 726-741. doi:10.1124/pr.58.4.5.
- Miglio, Gianluca, Arianna C Rosa, Lorenza Rattazzi, Massimo Collino, Grazia Lombardi, et Roberto Fantozzi. 2009. « PPARgamma stimulation promotes mitochondrial biogenesis and prevents glucose deprivation-induced neuronal cell loss ». *Neurochemistry international* 55 (7) (décembre): 496-504. doi:10.1016/j.neuint.2009.05.001.
- Mishra, K, et Ramesh C Sharma. 2011. « Assessment of organochlorine pesticides in human milk and risk exposure to infants from North-East India ». *The Science of the Total Environment* 409 (23) (novembre 1): 4939-4949. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.038.
- Mootha, Vamsi K, Christoph Handschin, Dan Arlow, Xiaohui Xie, Julie St Pierre, Smita Sihag, Wenli Yang, et al. 2004. « Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17) (avril 27): 6570-6575. doi:10.1073/pnas.0401401101.
- Mordente, Alvaro, Elisabetta Meucci, Andrea Silvestrini, Giuseppe Ettore Martorana, et Bruno Giardina. 2012. « Anthracyclines and mitochondria ». *Advances in experimental medicine and biology* 942: 385-419. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_18.
- Multigner, L., J.-R. Ndong, A. Oliva, et P. Blanchet. 2008. « Polluants environnementaux et cancer de la prostate : données épidémiologiques ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36 (9) (septembre): 848-856. doi:10.1016/j.gyobfe.2008.07.005.
- Multigner, Luc, Jean Rodrigue Ndong, Arnaud Giusti, Marc Romana, Helene Delacroix-Maillard, Sylvaine Cordier, Bernard Jégou, Jean Pierre Thome, et Pascal Blanchet. 2010. « Chlordecone exposure and risk of prostate cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (21) (juillet 20): 3457-3462. doi:10.1200/JCO.2009.27.2153.
- Muoio, Deborah M, et Timothy R Koves. 2007. « Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease ». *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme* 32 (5) (octobre): 874-883. doi:10.1139/H07-083.

- Nadra, Karim, Silvia I. Anghel, Elisabeth Joye, Nguan Soon Tan, Sharmila Basu-Modak, Didier Trono, Walter Wahli, et Béatrice Desvergne. 2006. « Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions Are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor B/ δ ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (8) (avril 15): 3266-3281. doi:10.1128/MCB.26.8.3266-3281.2006.
- Narendra, Derek P, Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, Clement A Gautier, Jie Shen, Mark R Cookson, et Richard J Youle. 2010. « PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin ». *PLoS biology* 8 (1) (janvier): e1000298. doi:10.1371/journal.pbio.1000298.
- Newsholme, Philip, Celine Gaudel, et Maurico Krause. 2012. « Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role ». *Advances in experimental medicine and biology* 942: 235-247. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_10.
- Nicholls, David G. 2002. « Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (11) (novembre): 1372-1381.
- Nisoli, Enzo, et Michele O. Carruba. 2006. « Nitric oxide and mitochondrial biogenesis ». *Journal of Cell Science* 119 (14) (juillet 15): 2855 -2862. doi:10.1242/jcs.03062.
- Nisoli, Enzo, Emilio Clementi, Clara Paolucci, Valeria Cozzi, Cristina Tonello, Clara Sciorati, Renata Bracale, et al. 2003. « Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide ». *Science (New York, N.Y.)* 299 (5608) (février 7): 896-899. doi:10.1126/science.1079368.
- Parker, Nadeene, Paul G Crichton, Antonio J Vidal-Puig, et Martin D Brand. 2009. « Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria ». *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41 (4) (août): 335-342. doi:10.1007/s10863-009-9232-8.
- Piccoli, Claudia, Rosella Scrima, Domenico Boffoli, et Nazzareno Capitanio. 2006. « Control by cytochrome c oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state ». *The Biochemical journal* 396 (3) (juin 15): 573-583. doi:10.1042/BJ20060077.
- Piskac-Collier, Amanda L, et Mary Ann Smith. 2009. « Lindane-induced generation of reactive oxygen species and depletion of glutathione do not result in necrosis in renal distal tubule cells ». *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 72 (19): 1160-1167. doi:10.1080/15287390903091780.
- Pooya, Shabnam, Sébastien Blaise, Maira Moreno Garcia, Jean Giudicelli, Jean-Marc Alberto, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Elise Jeannesson, et al. 2012. « Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α and HNF-4 α in rat liver ». *Journal of hepatology* (avril 17). doi:10.1016/j.jhep.2012.03.028. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521344>.

- Priyadarshi, A, S A Khuder, E A Schaub, et S S Priyadarshi. 2001. « Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis ». *Environmental research* 86 (2) (juin): 122-127. doi:10.1006/enrs.2001.4264.
- Puigserver, P. 2005. « Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1-alpha ». *International journal of obesity (2005)* 29 Suppl 1 (mars): S5-9. doi:10.1038/sj.ijo.0802905.
- Raharijaona, Mahatsangy, Soazig Le Pennec, Julie Poirier, Delphine Mirebeau-Prunier, Clothilde Rouxel, Caroline Jacques, Jean-Fred Fontaine, Yves Malthiery, Rémi Houlgatte, et Frédérique Savagner. 2009. « PGC-1-Related Coactivator Modulates Mitochondrial-Nuclear Crosstalk through Endogenous Nitric Oxide in a Cellular Model of Oncocytic Thyroid Tumours ». *PLoS ONE* 4 (11) (novembre 23): e7964. doi:10.1371/journal.pone.0007964.
- Ritov, Vladimir B, Elizabeth V Menshikova, Koichiro Azuma, Richard Wood, Frederico G S Toledo, Bret H Goodpaster, Neil B Ruderman, et David E Kelley. 2010. « Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity ». *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298 (1) (janvier): E49-58. doi:10.1152/ajpendo.00317.2009.
- Rolo, Anabela P., João S. Teodoro, et Carlos M. Palmeira. 2012. « Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis ». *Free Radical Biology and Medicine* 52 (1) (janvier 1): 59-69. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.003.
- Rosenson, Robert S. 2004. « Current overview of statin-induced myopathy ». *The American journal of medicine* 116 (6) (mars 15): 408-416. doi:10.1016/j.amjmed.2003.10.033.
- Roses, A. D., M. W. Lutz, H. Amrine-Madsen, A. M. Saunders, D. G. Crenshaw, S. S. Sundseth, M. J. Huentelman, K. A. Welsh-Bohmer, et E. M. Reiman. 2010. « A TOMM40 Variable-length Polymorphism Predicts the Age of Late-onset Alzheimer's Disease ». *The Pharmacogenomics Journal* 10 (5): 375-384. doi:10.1038/tpj.2009.69.
- Rötig, Agnès, et Arnold Munnich. 2003. « Genetic Features of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders ». *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (12) (janvier 12): 2995-3007. doi:10.1097/01.ASN.0000095481.24091.C9.
- Rubinstein, John L, John E Walker, et Richard Henderson. 2003. « Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy ». *The EMBO journal* 22 (23) (décembre 1): 6182-6192. doi:10.1093/emboj/cdg608.
- Rustin, P, D Chretien, T Bourgeron, B Gérard, A Rötig, J M Saudubray, et A Munnich. 1994. « Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 228 (1) (juillet): 35-51.
- Sazanov, Leonid A. 2007. « Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain ». *Biochemistry* 46 (9) (mars 6): 2275-2288. doi:10.1021/bi602508x.

- Scarpulla, Richard C. 2008. « Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function ». *Physiological Reviews* 88 (2) (avril): 611-638. doi:10.1152/physrev.00025.2007.
- Scarpulla, Richard C. 2006. « Nuclear Control of Respiratory Gene Expression in Mammalian Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (4): 673-683. doi:10.1002/jcb.20743.
- Schapira, Anthony HV. 12. « Mitochondrial diseases ». *The Lancet* 379 (9828): 1825-1834. doi:10.1016/S0140-6736(11)61305-6.
- Schreiber, Sylvia N, Roger Emter, M Benjamin Hock, Darko Knutti, Jessica Cardenas, Michael Podvinec, Edward J Oakeley, et Anastasia Kralli. 2004. « The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17) (avril 27): 6472-6477. doi:10.1073/pnas.0308686101.
- Singh, Rambir, et Poonam Sharma. 2011. « Hepatoprotective Effect of Curcumin on Lindane-induced Oxidative Stress in Male Wistar Rats ». *Toxicology International* 18 (2) (juillet): 124-129. doi:10.4103/0971-6580.84264.
- Sladek, Robert, Ghislain Rocheleau, Johan Rung, Christian Dina, Lishuang Shen, David Serre, Philippe Boutin, et al. 2007. « A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes ». *Nature* 445 (7130) (février 22): 881-885. doi:10.1038/nature05616.
- Slaninova, Andrea, Miriam Smutna, Helena Modra, et Zdenka Svobodova. 2009. « A review: oxidative stress in fish induced by pesticides ». *Neuroendocrinology letters* 30 Suppl 1: 2-12.
- Soileau, S D, et D E Moreland. 1983. « Effects of chlordecone and its alteration products on isolated rat liver mitochondria ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 67 (1) (janvier): 89-99.
- Spiegelman, Bruce M. 2007. « Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators ». *Novartis Foundation symposium* 287: 60-63; discussion 63-69.
- Srinivasan, K, et R Radhakrishnamurty. 1983. « Studies on the distribution of beta- and gamma-isomers of hexachlorocyclohexane in rat tissues ». *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* 18 (3): 401-418. doi:10.1080/03601238309372378.
- Stamler, J S, S Lamas, et F C Fang. 2001. « Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism ». *Cell* 106 (6) (septembre 21): 675-683.
- Teuschler, Linda, James Klaunig, Ed Carney, Janice Chambers, Rory Conolly, Chris Gennings, John Giesy, et al. 2002. « Support of science-based decisions concerning the evaluation of the toxicology of mixtures: a new beginning ». *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 36 (1) (août): 34-39.
- van Tienen, Florence H, Patrick J Lindsey, Carla J van der Kallen, et Hubert J Smeets. 2010. « Prolonged Nrf1 overexpression triggers adipocyte inflammation

- and insulin resistance ». *Journal of Cellular Biochemistry* 111 (6) (décembre 15): 1575-1585. doi:10.1002/jcb.22889.
- Tomelleri, G., P. Tonin, M. Spadaro, G. Tilia, D. Orrico, A. Barelli, B. Bonetti, et al. 1992. « AZT-induced mitochondrial myopathy ». *The Italian Journal of Neurological Sciences* 13 (9): 723-728. doi:10.1007/BF02229156.
- Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J A Molina, Hibo Mohamed, Jakob D Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, et al. 2008. « Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy ». *The EMBO journal* 27 (2) (janvier 23): 433-446. doi:10.1038/sj.emboj.7601963.
- Ventura-Clapier, Renée, Anne Garnier, et Vladimir Veksler. 2008. « Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha ». *Cardiovascular research* 79 (2) (juillet 15): 208-217. doi:10.1093/cvr/cvn098.
- Vercauteren, Kristel, Natalie Gleyzer, et Richard C Scarpulla. 2008. « PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression ». *The Journal of biological chemistry* 283 (18) (mai 2): 12102-12111. doi:10.1074/jbc.M710150200.
2009. « Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria ». *The Journal of biological chemistry* 284 (4) (janvier 23): 2307-2319. doi:10.1074/jbc.M806434200.
- Vercauteren, Kristel, Raymond A Pasko, Natalie Gleyzer, Vita Maria Marino, et Richard C Scarpulla. 2006. « PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth ». *Molecular and cellular biology* 26 (20) (octobre): 7409-7419. doi:10.1128/MCB.00585-06.
- Viña, Jose, Mari Carmen Gomez-Cabrera, Consuelo Borrás, Teresa Froio, Fabian Sanchis-Gomar, Vladimir E Martinez-Bello, et Federico V Pallardo. 2009. « Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (14) (novembre 30): 1369-1374. doi:10.1016/j.addr.2009.06.006.
- Weinhold, B. 2001. « Last call for Lindane ». *Environmental health perspectives* 109 (6) (juin): A254.
- Xue, Miao, Guofeng Shen, Jialing Yu, Diyu Zhang, Zhijiang Lu, Bin Wang, Yan Lu, Jun Cao, et Shu Tao. 2010. « Dynamic changes of α -hexachlorocyclohexane and its enantiomers in various tissues of Japanese Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) after oral or dermal exposure ». *Chemosphere* 81 (11) (décembre): 1486-1491. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.08.046.
- Yoon, J C, P Puigserver, G Chen, J Donovan, Z Wu, J Rhee, G Adelmant, et al. 2001. « Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 ». *Nature* 413 (6852) (septembre 13): 131-138. doi:10.1038/35093050.

- Yoshida, M, E Muneyuki, et T Hisabori. 2001. « ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (9) (septembre): 669-677. doi:10.1038/35089509.
- Younglai, Edward V, Yanjing Wu, et Warren G Foster. 2006. « Rapid action of pesticides on cytosolic calcium concentrations in cultures of human umbilical vein endothelial cells ». *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 21 (3) (avril): 271-279. doi:10.1016/j.reprotox.2005.09.006.
- Zhang, Qun, Jin-Tai Yu, Ping Wang, Wei Chen, Zhong-Chen Wu, Hong Jiang, et Lan Tan. 2011. « Mitochondrial transcription factor A (TFAM) polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese ». *Brain research* 1368 (janvier 12): 355-360. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.074.
- Zucchini-Pascal, Nathalie, Georges de Sousa, Jérôme Pizzol, et Roger Rahmani. 2011. « Molecular investigation of the effects of lindane in rat hepatocytes: Microarray and mechanistic studies ». *Food and Chemical Toxicology* 49 (12) (décembre): 3128-3135. doi:10.1016/j.fct.2011.09.033.

Figures:

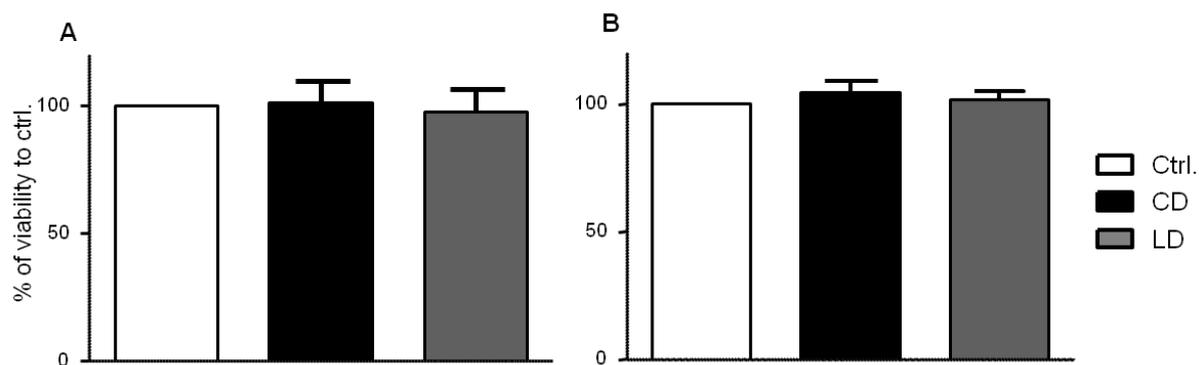


Figure 6: Cell viability.

Effect of chlordecone, lindane exposure on HepG2 cell viability tested by MTT.

A: 24h exposure, B: 48h exposure. Results are presented as percentage of the control.

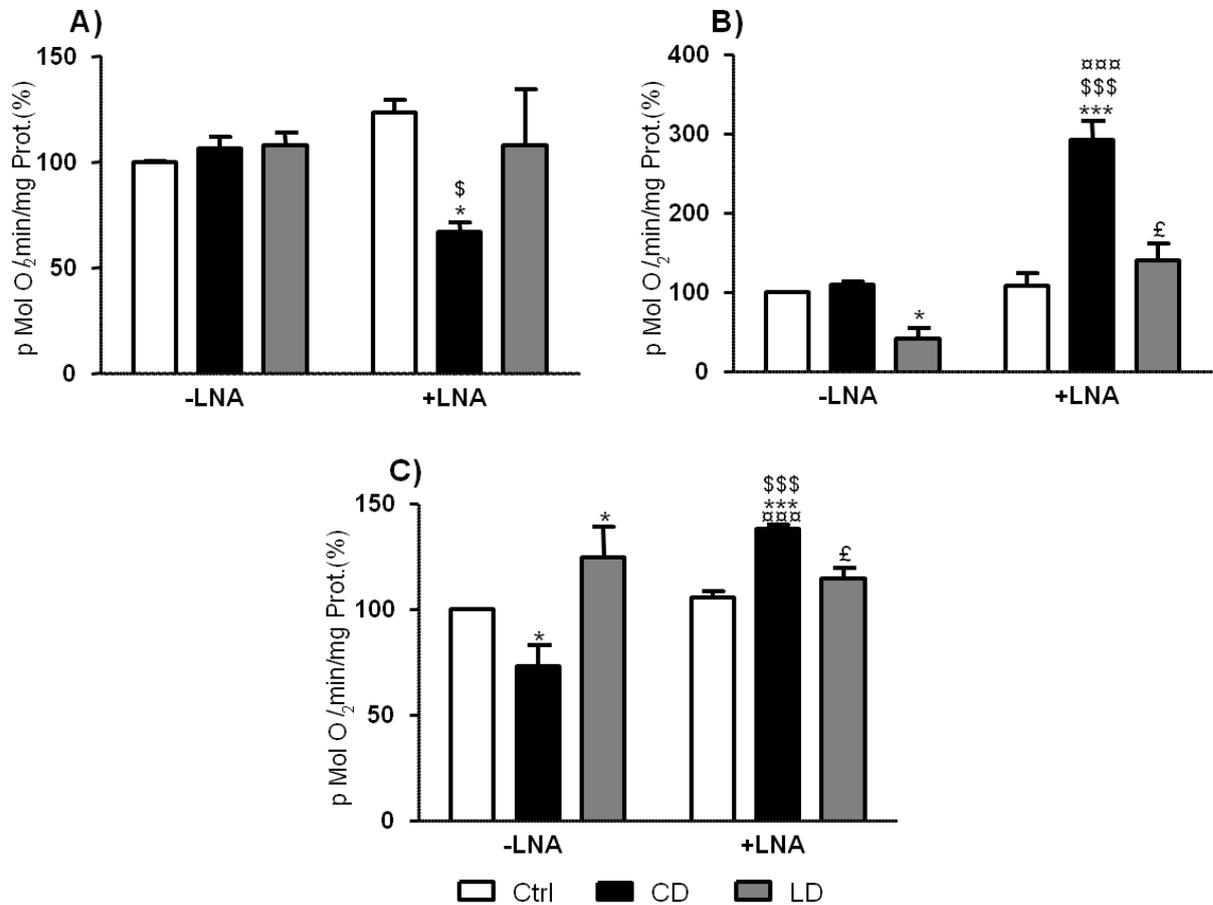


Figure 7: Cellular respiration.

A) Routine respiration oxygen consumption at the basal state. B) Decoupled respiration, oxygen consumption after inhibition of complex V by Oligomycine. C) Maximal respiratory capacity, oxygen consumption after membrane potential dissipation by stepwise addition of FCCP.

* $p < 0.05$ vs Ctrl -LNA, *** $p < 0.001$ vs Ctrl -LNA, \$ $p < 0.05$ vs chlordécone -LNA, \$\$\$ $p < 0.001$ vs chlordécone -LNA, **** $p < 0.001$ vs Ctrl +LNA, £ $p < 0.05$ vs lindane -LNA.

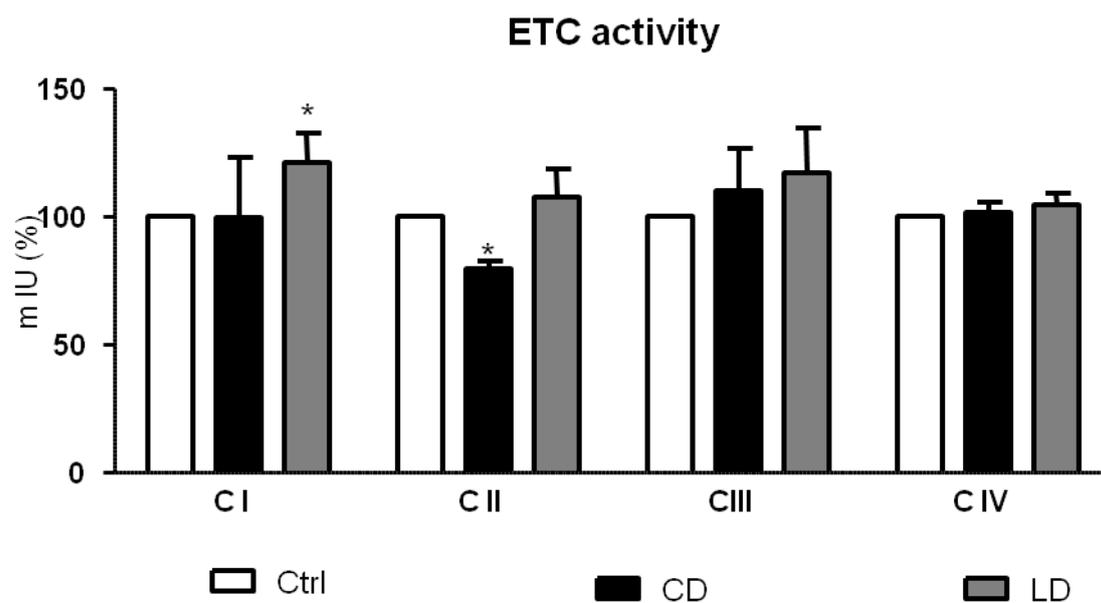


Figure 8 Enzymatic electron transport chain complex activities.

Effects of chlordecone, lindane exposure on electron transport chain enzymatic activity. Depending on the complex analyzed, the kinetic of appearance or disappearance of product was monitored. Results are expressed as percentage of the control (unexposed cells). * $p < 0.05$ vs control.

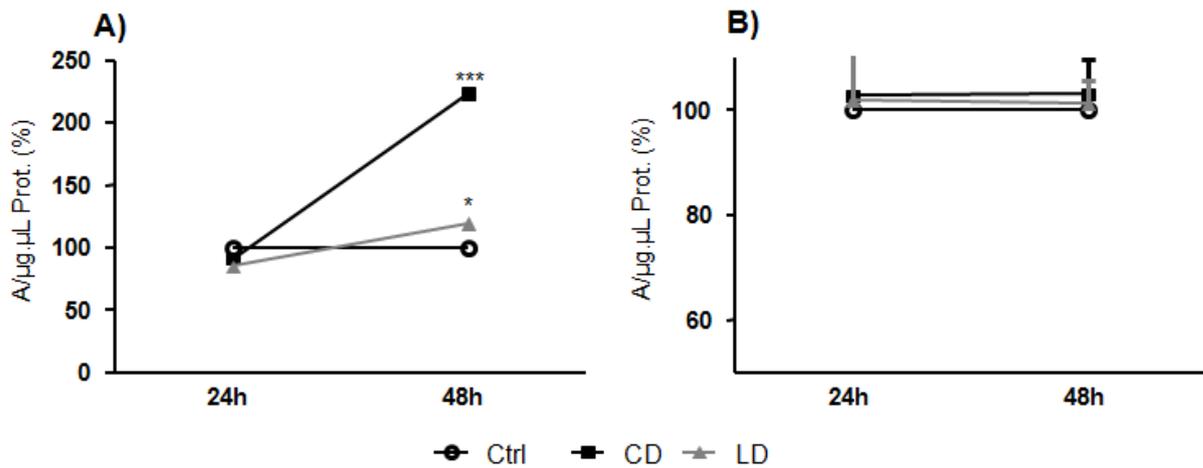


Figure 9: Free radical release.

A) Nitric oxide (NO) release measured by the spin trapping technique with EPR spectra analysis. The amplitude of the specific spectra to NO is normalized by protein concentration of sample. Results are expressed as percentage of the control. * $p < 0,05$ vs control, *** $p < 0,001$ vs control.

B) Superoxide anion release measured by the spin trapping technique with EPR spectra analysis. The amplitude of the specific spectra to NO is normalized by protein concentration of sample. Results are expressed as percentage of the control.

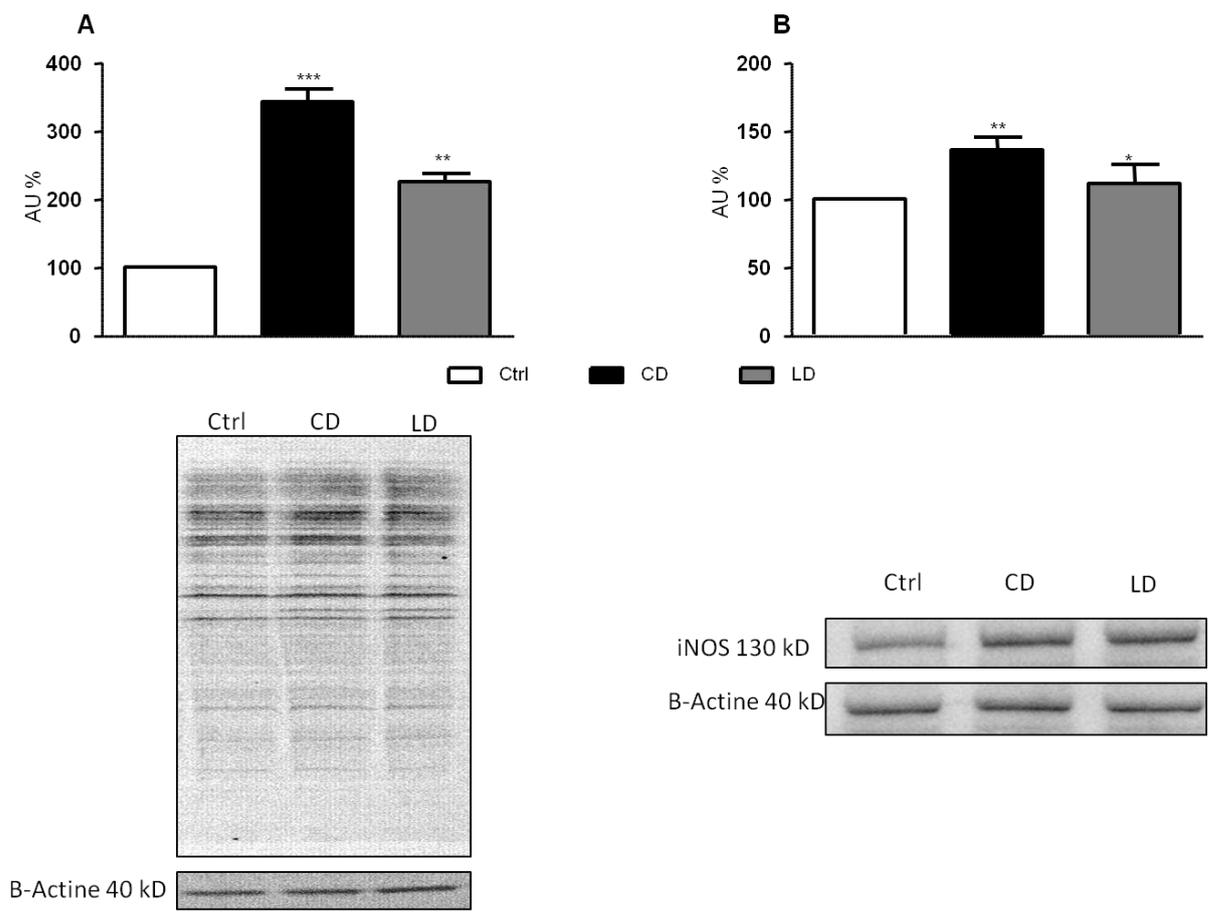


Figure 5: nitrosative stress.

A) Tyrosine nitration western blot quantification, results are normalized to beta actin expression; ** p<0.01, *** p<0.001

B) iNOS expression after chlordécone/ lindane exposure western blot quantification. Results are normalized to beta actin expression. * p<0.05, ** p<0.01.

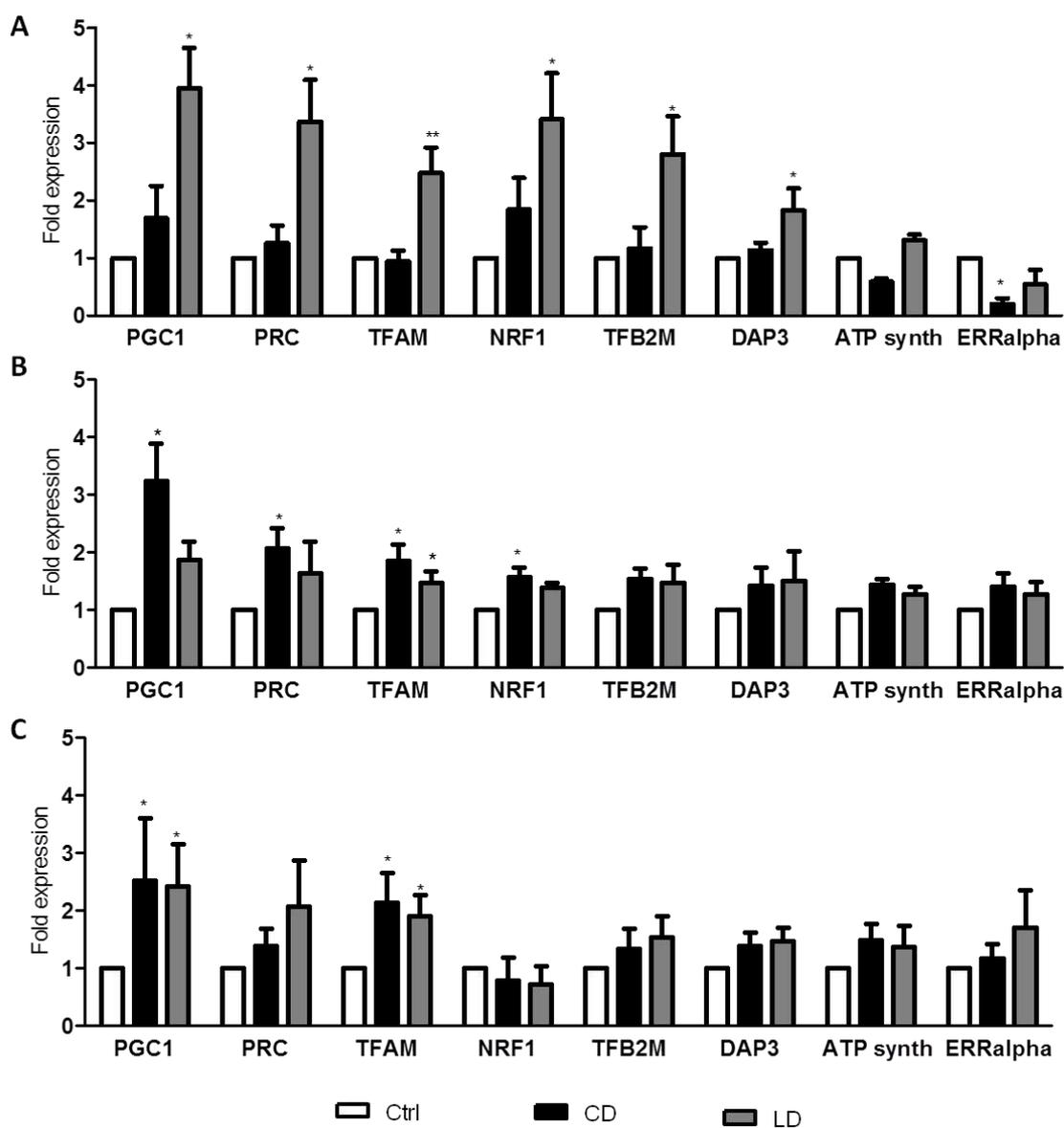


Figure 10: nucleo-mitochondrial cross-talk gene expression.

A) 24h exposure effects on mRNA level of nucleo-mitochondrial cross-talk genes. Results are normalized to beta actin mRNA level and expressed as fold expression to control. * $p < 0.05$ vs control, ** $p < 0.01$ vs Ctrl.

B) 48h exposure effects on mRNA level of nucleo-mitochondrial cross-talk genes. Results are normalized to beta actin mRNA level and expressed as fold expression to control. * $p < 0.05$ vs control.

C) 72h exposure effects on mRNA level of nucleo-mitochondrial cross-talk genes. Results are normalized to beta actin mRNA level and expressed as fold expression to control. * $p < 0.05$ vs control.

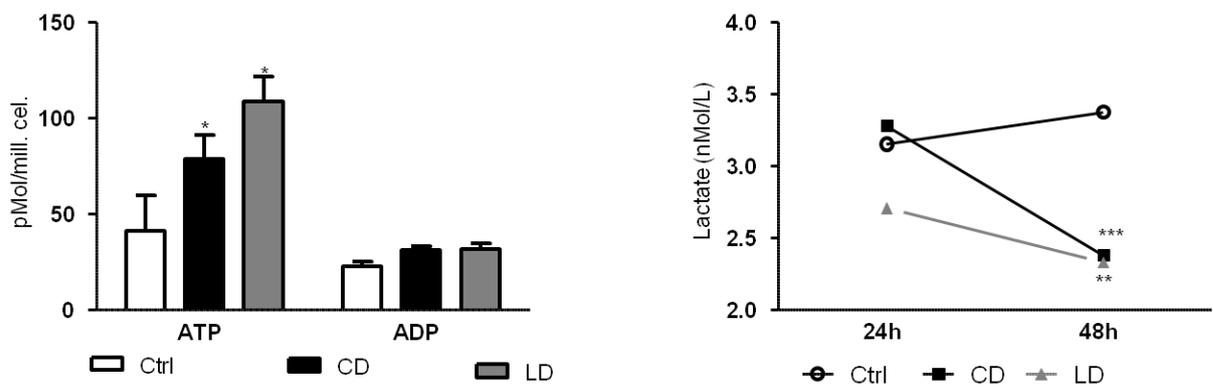


Figure 7: Energetic metabolism.

Effects of chlordecone, lindane exposure on cellular ATP/ADP concentration and lactate level in culture medium.

A) Cellular ATP/ ADP concentration. * $p < 0.05$ vs control.

B) L-Lactate level in the medium ** $p < 0.01$ vs control. *** $p < 0.001$ vs control.

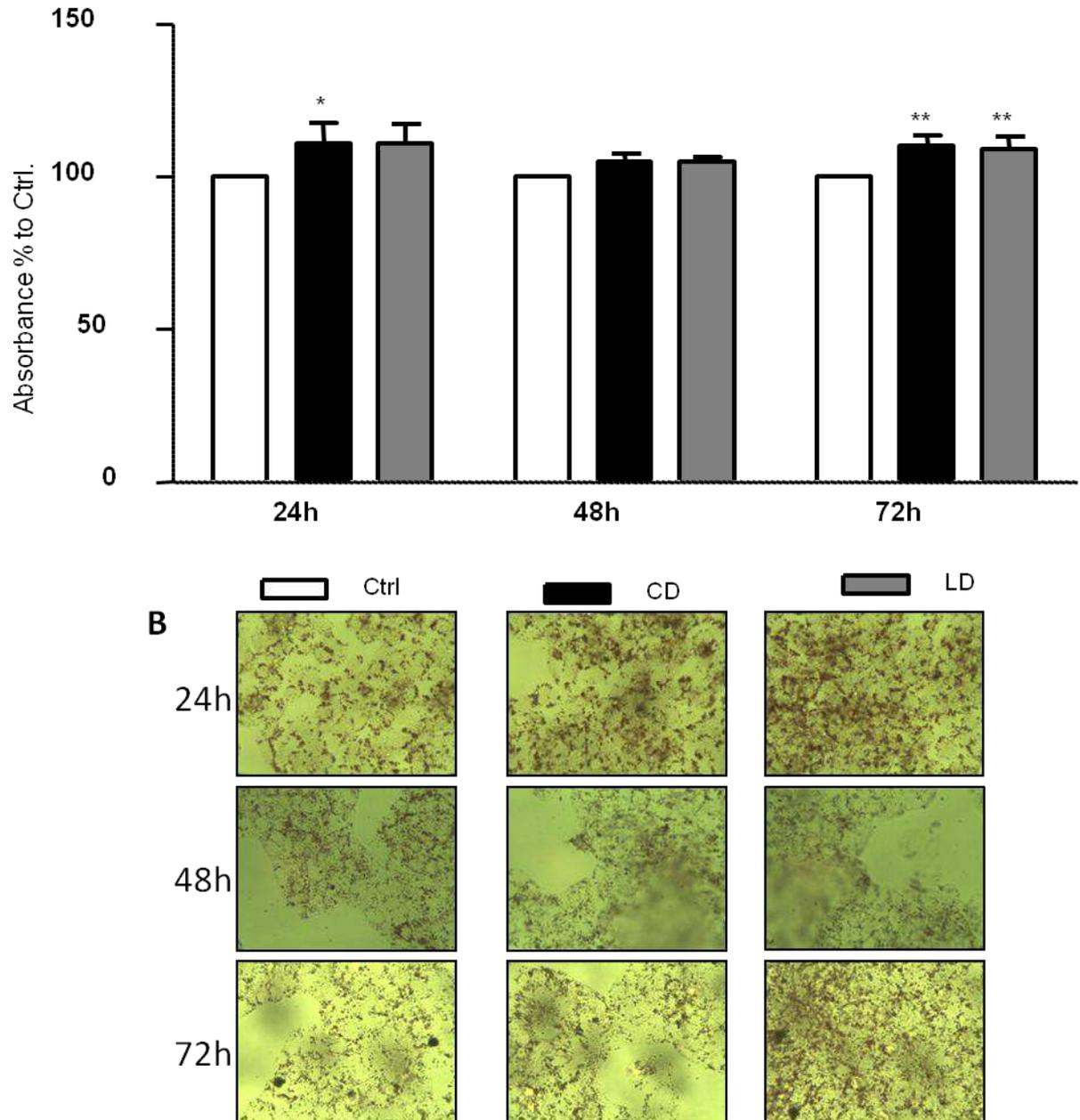


Figure 8: Intracellular lipid accumulation:

A) Effect of chlordecone/lindane exposure on intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. Results of Oil red staining and solubilization (A_{500}) are expressed as percentage of the control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

B) Images of HepG2 cell after Oil Red intracellular lipid staining, 400X.

IV. Discussion et perspectives

A. Discussion :

Les polluants environnementaux persistants (pesticides, métaux lourds...) et les contaminants alimentaires constituent un sérieux problème de santé publique, ils sont à l'origine de divers troubles dans différents organes et fonctions physiologiques, troubles assez mineurs comme la dysfonction intestinale, mais également des troubles plus graves comme des atteintes neurodégénératives, des atteintes prolifératives, des troubles hormonaux, des troubles de la reproduction et même des processus malformatifs (Multigner et al. 2010; Lim et al. 2010; Lee et al. 2011). Notre étude *in vitro* a été menée avec des faibles concentrations de toxiques, concentrations correspondant aux concentrations plasmatiques moyennes des populations exposées reflétant l'exposition moyenne de tous les individus. Cette étude, menée sur un modèle cellulaire hépatique, a montré que l'exposition de ces cellules à de faibles concentrations d'organochlorés (lindane et chlordécone) avait un impact sur la régulation et la fonction mitochondriale, provoquant un stress mitochondrial.

Dans les conditions expérimentales de notre travail, sur les cellules HepG2 et dans des temps de culture courts de 48 heures maximum, les faibles concentrations de lidane ou chlordécone utilisées ne nous ont pas permis d'observer d'effet sur la viabilité cellulaire. Ce résultat est à mettre en relation avec le travail de Dehn qui montre qu'une exposition de 48h à une concentration de chlordécone supérieure à 50 μ M est nécessaire pour induire 50 % de mortalité sur les cellules HepG2 (Dehn et al. 2005). Quant au lindane, des études faites sur la lignée cellulaire CHO montrent que l'IC₅₀ est de 250 μ M (Kmetc et al. 2009). Les concentrations utilisées pour la réalisation de notre étude sont largement inférieures à ces concentrations, ce qui pourrait expliquer l'absence d'effets sur la viabilité cellulaire, tant sur la croissance cellulaire que sur une éventuelle apoptose. Cette absence d'effets sur le paramètre "viabilité cellulaire", un des principaux paramètres analysés en toxicologie *in vitro*, n'exclut pas des effets sur d'autres paramètres cellulaires, tout particulièrement la respiration mitochondriale et le métabolisme énergétique.

Les résultats de notre étude montrent que l'exposition des cellules HepG2 aux faibles concentrations de chlordécone réduit la capacité respiratoire mitochondriale maximale

et n'a pas d'effet sur la respiration non couplée à la synthèse d'ATP, tandis que l'exposition aux faibles concentrations de lindane augmente la capacité maximale respiratoire et réduit la respiration non couplée à la synthèse d'ATP dans les temps courts étudiés (24 et 48 heures). Bien que chlordécone et lindane appartiennent à une même famille chimique, celle des organochlorés, leurs effets sur la fonction et la biogénèse mitochondriale ne sont pas strictement identiques, comme nous avons pu le démontrer dans notre travail. Cette différence d'effets suggère que ces deux organochlorés n'agissent pas par le même mécanisme (ça restera à prouver). Il y a peu de données sur l'effet de l'exposition à ces deux organochlorés sur la respiration mitochondriale. Une étude faite sur des mitochondries isolées à partir de foie de rat montre que l'exposition au chlordécone entraîne des altérations de l'ultra-structure mitochondriale avec des conséquences sur son fonctionnement engendrant une augmentation de la respiration à l'état IV et une réduction de la respiration à l'état III (Soileau et Moreland 1983). Les concentrations utilisées dans cette étude sont de 2 à 100 μM , soit bien supérieures à celles de notre étude. La concentration la plus élevée que nous ayons utilisée, correspondant à celle rencontrée au niveau environnemental, est de 50 nM pour le chlordécone. Ceci explique très probablement la différence de nos résultats par rapport à ceux de la littérature scientifique. Dans une autre étude, les effets de l'exposition au lindane sur des mitochondries isolées de foie de rat montrent une altération de leur structure, les rendant plus larges avec des conséquences sur le métabolisme oxydatif, notamment une augmentation de la respiration mitochondriale aux concentrations de 25 et 50 nM (Gopaldaswamy et Aiyar 1984). Les résultats de notre étude avec les expositions de lindane ne sont pas contradictoires avec ces résultats.

Le monoxyde d'azote joue un rôle important dans les effets observés sur la respiration mitochondriale. L'inhibition de la voie de la signalisation par la L-nitro-argénine induit la disparition des effets de l'exposition au lindane sur la respiration mitochondriale des cellules. Le rôle du monoxyde d'azote dans la régulation de la fonction mitochondriale a été largement démontré. Plusieurs études montrent qu'il peut à la fois être stimulateur de la fonction métabolique et de la biogénèse mitochondriale (Carew et al. 2004; Brown 1999; Clementi et Nisoli 2005; Carew et al. 2004) et être inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons. Cette inhibition peut être réversible lorsque le monoxyde d'azote se lie au complexe IV de la chaîne respiratoire, ou bien irréversible lorsqu'elle est

induite par la nitration des protéines des différents complexes de la chaîne respiratoire, par action de son dérivé, le peroxy-nitrite (Brown 2007).

Nous suggérons, à travers nos résultats, que la différence d'effets de l'exposition aux deux organochlorés sur la respiration mitochondriale serait due à la différence de production de monoxyde d'azote induite à la suite de l'exposition à chacune des deux molécules. En effet, l'exposition des cellules HepG2 aux faibles concentrations de chlordécone conduit à une activation de l'isoforme inductible de la NO synthase, plus importante que celle induite par l'exposition aux faibles concentrations de lindane. Cela explique la plus forte production de monoxyde d'azote dans les cellules exposées aux faibles concentrations de chlordécone par rapport à celles exposées au lindane ou aux cellules contrôles. La forte production de monoxyde d'azote induite par l'activation de la iNOS conduit à la formation de peroxy-nitrite mis en évidence, dans nos résultats, par la mise en évidence de protéines nitrées en Western Blot. Le peroxy-nitrite formé provoque une nitration des protéines des complexes de la chaîne respiratoire, ce qui explique la diminution de la capacité respiratoire maximale des cellules exposées aux faibles concentrations de chlordécone. Par ailleurs, dans les cellules exposées aux faibles concentrations de lindane, la faible production de monoxyde d'azote produite par une plus faible activation de la iNOS entrainerait une biogénèse mitochondriale via l'activation des principaux facteurs de biogénèse mitochondriale, à savoir les facteurs de transcription cellulaires (PRC, PGC1 α , NRF1), les facteurs de transcription mitochondriaux (TFAM, TFB2M) ainsi, probablement, que d'autres gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale tels que DAP3 (H.-R. Kim et al. 2007). Cette voie d'activation de la biogénèse mitochondriale est bien documentée. En effet, plusieurs études démontrent l'implication du NO dans l'induction de cette voie de signalisation dans plusieurs lignées cellulaires (Clementi et Nisoli 2005; Nisoli et Carruba 2006).

Le chlordécone et le lindane sont décrits, dans la littérature scientifique, comme des composés ayant la capacité d'induire une production de radicaux libres (Ledirac et al. 2005; Piskac-Collier et Smith 2009; Zucchini-Pascal et al. 2011). Cet effet est principalement associé à une diminution de l'activité du système de défense cellulaire des enzymes anti-oxydantes, à savoir la superoxyde dismutase et la catalase (Singh et Sharma, 2011). Cependant, les concentrations utilisées dans ces études sont beaucoup plus élevées que celles utilisées dans notre propre étude. Elles sont de l'ordre de 25 μ M

pour la plus faible, à 150 μM pour la plus élevée. Le fait que nous n'ayons pas observé de différence dans la production d'anion superoxyde dans nos conditions expérimentales peut être dû à son épuisement dans le processus de formation de peroxy-nitrite. En effet, comme cela a été décrit dans nos résultats, l'exposition à de faibles concentrations de chlordécone et de lindane augmente la nitration des protéines. Ces résultats suggèrent une augmentation de la formation de peroxy-nitrite, nécessitant l'anion superoxyde lors de sa formation.

Le métabolisme énergétique cellulaire ainsi que la régulation de la biogenèse mitochondriale ont été particulièrement affectés à la suite de l'exposition à ces deux composés organochlorés. La production d'ATP s'est vue augmentée et a été accompagnée d'une réduction de la libération de lactate dans le milieu. Ces deux données combinées indiquent que les cellules ont orienté leur métabolisme énergétique vers un métabolisme plus oxydatif. Des études récentes ont démontré que l'exposition au lindane augmente la production de triglycérides (Hfaiedh, Murat, et Elfeki 2012). La synthèse de triglycérides étant un processus consommateur d'énergie peut expliquer, au moins en partie, l'augmentation de la production d'ATP. Cette hypothèse est confortée par l'observation d'une augmentation des lipides intracellulaires dans les cellules HepG2 à la suite de leur exposition aux deux organochlorés. Afin de répondre à cette augmentation de la demande énergétique cellulaire, à la suite de l'exposition aux organochlorés, les cellules vont activer la voie de biogenèse mitochondriale. En effet, comme on a pu le voir dans nos résultats, l'exposition aux faibles concentrations d'organochlorés modifie l'expression des gènes des principaux régulateurs de la biogenèse mitochondriale, à savoir PGC1 α , PRC, ERR α , DAP3, NRF1 TFB2Mb et TFAM, ainsi d'ailleurs, que d'autres gènes impliqués dans le métabolisme énergétique cellulaire (ATP synthase). Les effets sont variables selon le composé et la durée de l'exposition, mais le niveau d'expression pour les trois gènes est toujours plus élevé que dans les cellules témoins, avec des conséquences probables sur la respiration mitochondriale et le métabolisme cellulaire.

Par ailleurs, outre la régulation de la fonction mitochondriale, ces gènes sont également impliqués dans d'autres processus cellulaires. PGC1 α , PRC et ERR α sont des coactivateurs transcriptionnels régulant l'expression de plusieurs gènes et impliqués dans la physiopathologie de plusieurs maladies, telles que le syndrome métabolique, le

diabète de type 2 (Muio et Koves 2007), certains troubles neuro-dégénératifs (Spiegelman 2007). Ces facteurs de transcription fournissent un lien direct entre les stimuli externes et la régulation des voies de signalisation amenant les cellules à une adaptation à leur environnement. L'altération de l'expression de PGC-1 α , surexpression comme sous-expression, est impliquée dans diverses conditions physiopathologiques, dont la surcharge lipidique et l'obésité, le diabète type 2, les maladies neurodégénératives et certaines cardiomyopathies (Finck, 2006; Liu et Lin, 2011; Pooya et al, 2012). En effet, des niveaux élevés d'ARNm de PGC1 α ont été trouvés dans les cellules hépatiques d'un modèle rongeur de diabète de type 2, ce qui était probablement à l'origine de l'activation des voies de néoglucogenèse et de l'augmentation du niveau de glucose sanguin conduisant à l'insulino-résistance hépatique (Yoon et al. 2001). La modulation de l'activité PGC1 α , dans le foie, a des répercussions importantes sur l'homéostasie du glucose systémique (Lin *et al.*, 2005).

Dans la cascade de gènes activés dans la voie de signalisation de PGC1 α se trouve NRF1. NRF1 fonctionne comme un facteur de transcription activant l'expression de certains gènes clés du métabolisme et de la régulation de la prolifération cellulaire ainsi que des gènes nucléaires nécessaires pour la respiration mitochondriale (Scarpulla, 2008). La protéine NRF1 est également importante pour la régulation des enzymes antioxydantes et celles métabolisant les xénobiotiques (Biswas et Chan, 2010). Une étude récente a montré que la surexpression prolongée du facteur de transcription NRF1 induit une inflammation et une insulino-résistance au niveau des adipocytes (van Tienen *et al.*, 2010). Durant le processus de biogenèse mitochondriale, NRF1 active l'expression de TFAM qui stimule la duplication de l'ADN mitochondrial, TFAM le facteur régulateur ultime dans la voie de la biogenèse mitochondriale induite par PGC1 α (Choi *et al.*, 2004; Viña *et al.*, 2009).

Les régulations faites via l'expression de ces différents gènes sont tissu-spécifiques. Le contrôle des voies métaboliques, en réponse aux stimuli environnementaux, se fait à différents niveaux (Puigserver 2005). PGC1 α , par exemple, est activé par des signaux contrôlant la demande énergétique et l'homéostasie des apports énergétiques cellulaires. Au niveau du tissu adipeux, PGC1 α induit et coordonne l'expression des gènes stimulant la biogenèse mitochondriale et le processus de thermogenèse. Au niveau hépatique, il contrôle les voies métaboliques liées à la réponse au jeûne. PGC-1 α active

l'expression des gènes par interaction spécifique avec des facteurs de transcription qui se lient aux promoteurs des gènes impliqués dans les régulations métaboliques. Ces facteurs de transcription peuvent être ubiquitaires comme NRF1 & NRF2, ou tissu-spécifiques tels que PPAR δ (dans le tissu adipeux brun), le "Facteur Nucléaire Hépatocytaire" HNF4 α (dans le foie et le pancréas) et le "Muscle Enhancer Factor" MEF2s dans le tissu musculaire.

La surexpression persistante de ces gènes suggère que l'exposition aux faibles concentrations plasmatiques de chlordécone ou lindane conduit à un stress mitochondrial prolongé avec des conséquences observées sur le métabolisme énergétique cellulaire et l'accumulation de lipides dans les cellules. Au niveau métabolique, les cellules exposées aux deux composés organochlorés affichent une augmentation de leur niveau intracellulaire d'ATP associé à une diminution de la concentration de lactate dans le milieu. Ces résultats indiquent que les deux composés organochlorés conduisent les cellules à décaler leur métabolisme énergétique vers un métabolisme oxydatif plus efficace en matière de conversion énergétique. La diminution du taux de lactate dans le milieu de culture est un indicateur de la diminution de la voie anaérobie dans la production énergétique. Cette augmentation du métabolisme oxydatif produisant une augmentation de l'ATP intracellulaire, serait corrélée à l'accumulation des lipides intracellulaires. L'exposition des cellules HepG2 aux deux organochlorés a conduit une augmentation significative des lipides intracellulaires. La synthèse de ces lipides intracellulaires est un processus nécessitant de l'énergie, ce qui favorise une augmentation du métabolisme oxydatif et se traduit par l'augmentation de l'ATP intracellulaire.

L'exposition aux composés organochlorés est positivement corrélée avec le développement d'un syndrome métabolique et d'une insulino-résistance (Lim et al, 2010; Lee et al, 2011). Par ailleurs, des dysfonctionnements mitochondriaux ont été observés dans le syndrome métabolique (Lee, 2011). Ici, nous montrons que l'exposition à de faibles doses de chlordécone et de lindane est capable d'induire un stress mitochondrial. Cette exposition induit également une augmentation légère, mais significative, de lipides intracellulaires dans les cellules HepG2. Il est vrai que notre travail a porté sur des expositions à de faibles doses d'organochlorés, pendant un temps court de 72 heures maximum. Des études récentes suggèrent que l'accumulation de

lipides, avec une dysfonction mitochondriale potentialise la résistance hépatique à l'insuline et peut causer une stéatose hépatique (Longato et al, 2012; Machado et al, 2012). Nos résultats sont cohérents avec l'hypothèse que l'exposition aux composés organochlorés est un facteur de risque du développement de l'insulino-résistance, de diabète de type 2, ainsi que de surcharges lipidiques, associant régulation mitochondriale et stress nitrosant.

B. Conclusion et perspectives :

Même si l'implication des dysfonctionnements mitochondriaux dans les processus pathologiques tels que l'insulino-résistance (Ritov et al. 2010), le cancer ou les maladies neurodégénératives (Manczak et al. 2006), est de plus en plus confirmée par les études épidémiologiques, il n'en demeure pas moins que la genèse de ces derniers reste un processus complexe et multifactoriel. En effet, il existe plusieurs facteurs de risques de développement de ces pathologies dont certains sont intrinsèques à l'individu, tels que le fond génétique ou les antécédents familiaux. Par exemple, un rapport récent de l'agence de santé canadienne met le point sur l'importance du facteur génétique et de la susceptibilité de développer ces pathologies, notamment le diabète de type 2 et les pathologies de surcharge (Gouvernement du Canada 1999). De nombreuses études génétiques ont permis d'identifier des gènes impliqués dans ces pathologies multifactorielles. Plusieurs loci constituent, de la sorte, des marqueurs génétiques du diabète de type 2 (Sladek et al. 2007). Dans ces pathologies multifactorielles, les facteurs extrinsèques à l'individu, tels que l'environnement et le mode de vie jouent un rôle aussi important que les facteurs intrinsèques. Il n'en est pour preuve que de nombreuses études épidémiologiques et la progression très importante de ces pathologies au cours des dernières décennies, progression trop rapide pour n'impliquer que des facteurs génétiques. Dans les facteurs environnementaux, la progression très importante de l'utilisation des produits phytosanitaires prend une place de choix au cours de ces dernières décennies. La France est le troisième plus gros consommateur de produits pesticides au monde, et le premier en Europe. Le développement de molécules, utilisées notamment comme phytosanitaires, est plus rapide que les études permettant une analyse approfondie de leur toxicité. La réglementation REACH, en Europe, ne

concerne que les molécules produites en grande quantité et les fortes doses.

En outre, plusieurs études récentes, ainsi que notre propre étude, montrent que les pesticides peuvent avoir un effet physiologique même à faibles doses. Les mécanismes en cause sont peu ou pas connus, mais cet effet des faibles doses est aujourd'hui avéré. Une des difficultés d'étude de ces mécanismes est qu'ils échappent aux techniques d'analyse en toxicologie, tant pour les méthodologies utilisées que pour les démarches conceptuelles en cause. En effet, les notions de DJA (Dose Journalière Admissible), de MRL (Maximum Residue Limits), de NOAEL (No Observed Adverse Effect Level), LOAEL (Lowest Observed Adverse Effect Level) ou MOAEL (Minimum Observed Adverse Effect Level) ne sont applicables dans l'étude des effets des faibles doses.

Il est par ailleurs évident que les expositions les plus fréquentes aux toxiques environnementaux sont des expositions chroniques à de faibles doses plutôt que des expositions aiguës à des doses fortes. Il y a donc un intérêt certain à explorer les effets d'une exposition chronique aux faibles concentrations d'organochlorés sur les fonctions cellulaires. Nous avons montré, sur des modèles cellulaires, que la fonction mitochondriale était perturbée par ces expositions et que la mitochondrie est particulièrement sensible à l'exposition aux xénobiotiques. Nous proposons donc d'utiliser ce modèle mitochondrial pour l'exploration et la compréhension des mécanismes induits par l'exposition aux xénobiotiques. Cette fonction mitochondriale pourra être analysée sur un modèle cellulaire exposé à une molécule potentiellement toxique, ainsi que sur un modèle animal pour une exploration plus "physiologique" de l'effet toxique d'un xénobiotique. Nous suggérons ce modèle de stress mitochondrial comme un outil d'évaluation des effets toxicologiques des concentrations faibles de xénobiotiques.

Ce modèle pourra, par ailleurs, constituer une voie d'étude des pathologies liées aux effets de l'environnement, tout particulièrement dans les pathologies telles que le syndrome métabolique, le diabète de type 2, les maladies neurodégénératives et la maladie de Parkinson, ainsi que les processus prolifératifs. Ces études pourraient également constituer une voie de recherche intéressante en thérapeutique.

Les résultats de notre étude répondent, au moins pour partie, aux questions initialement posées, mais d'autres apparaissent :

- Par exemple, peut-on, par cette approche, tester "l'effet cocktail" expliquant la synergie toxique entre deux ou plusieurs molécules toxiques à faible dose ?
- Le fait d'être exposé à une dose, même très faible, pendant une longue durée est-il sans effets délétères sur l'organisme ? Autrement dit, quel est l'effet d'une exposition chronique à une faible dose d'un toxique environnemental ?
- Comment considérer la notion de DJA sachant que les effets détectés sur les fonctions cellulaires se produisent bien en deçà de celle-ci ?

Dans notre étude, nous avons investigué l'effet de deux substances décrites comme étant des perturbateurs endocriniens et nous avons pu démontrer *in vitro* que ces perturbateurs endocriniens étaient aussi des perturbateurs métaboliques. Mais nous sommes constamment exposés à une multitude de xénobiotiques environnementaux dans lesquels nous devons inclure certains facteurs nutritionnels, ainsi d'ailleurs que les médicaments traitant les maladies chroniques ingérés durant de longues périodes.

Ainsi sont posés des défis majeurs que la toxicologie moderne doit relever. Pour notre part nous suggérons comme méthodologie à explorer, l'utilisation de marqueurs de stress mitochondrial (la respiration, l'activité des complexes respiratoires, l'ADNmt) comme outils dans le processus d'évaluation des faibles concentrations des substances, aussi bien toxiques que pharmacologiques. L'identification de substances capables d'induire un stress mitochondrial pourrait prédire l'effet nocif de certaines substances médicamenteuses et peut-être revoir à la baisse les doses et les concentrations "tolérées" des substances nuisibles dans nos aliments et notre eau.

Notre étude a été réalisée sur la lignée HepG2 issue d'un hépatocarcinome. Même si plusieurs études montrent que ce modèle cellulaire exprime une grande majorité d'enzymes des cellules hépatiques et qu'il est idéal pour des études d'hépatotoxicologie, il n'en demeure pas moins qu'il soit issu d'un tissu cancéreux. Il serait d'un intérêt majeur d'étudier l'effet de ces faibles concentrations sur le métabolisme mitochondrial des cellules "cibles" primaires telles que les adipocytes, les hépatocytes et les cellules endothéliales. Ce type d'étude permettra d'investiguer les effets d'une telle exposition sur le métabolisme mitochondrial et de comparer avec les résultats obtenus avec les cellules HepG2.

Nous proposons également, dans nos perspectives, de mener des études d'exposition aux faibles concentrations de long terme *in vivo*, permettant de savoir si les effets observés *in vitro* se confirment *in vivo*. L'étude *in vivo* peut aussi mettre en évidence le lien entre d'éventuels effets sur le métabolisme mitochondrial et les troubles fonctionnels observables à l'échelle de l'organisme, tels que la surcharge graisseuse, l'insulino-résistance et le développement de tumeurs.

V. Références bibliographiques

- Aguilar, Victor, Samira Alliouachene, Athanassia Sotiropoulos, Andrew Sobering, Yoni Athea, Fatima Djouadi, Sylvain Miraux, et al. 2007. « S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase ». *Cell metabolism* 5 (6) (juin): 476-487. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.006.
- Anderson, S, A T Bankier, B G Barrell, M H de Bruijn, A R Coulson, J Drouin, I C Eperon, et al. 1981. « Sequence and organization of the human mitochondrial genome ». *Nature* 290 (5806) (avril 9): 457-465.
- Arany, Zoltan, Huamei He, Jiandie Lin, Kirsten Hoyer, Christoph Handschin, Okan Toka, Ferhaan Ahmad, et al. 2005. « Transcriptional coactivator PGC-1 alpha controls the energy state and contractile function of cardiac muscle ». *Cell metabolism* 1 (4) (avril): 259-271. doi:10.1016/j.cmet.2005.03.002.
- Ashley, Neil, et Joanna Poulton. 2009. « Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 378 (3) (janvier 16): 450-455. doi:10.1016/j.bbrc.2008.11.059.
- Belfiore, Carol J, Raymond S H Yang, Laura S Chubb, Manupat Lohitnavy, Ornrat S Lohitnavy, et Melvin E Andersen. 2007. « Hepatic sequestration of chlordecone and hexafluoroacetone evaluated by pharmacokinetic modeling ». *Toxicology* 234 (1-2) (mai 5): 59-72. doi:10.1016/j.tox.2007.02.002.
- Belyaeva, Elena A., Tatyana V. Sokolova, Larisa V. Emelyanova, et Irina O. Zakharova. 2012. « Mitochondrial Electron Transport Chain in Heavy Metal-

- Induced Neurotoxicity: Effects of Cadmium, Mercury, and Copper ». *The Scientific World Journal* 2012: 1-14. doi:10.1100/2012/136063.
- Benard, G, N Bellance, C Jose, S Melsner, K Nouette-Gaulain, et R Rossignol. 2010. « Multi-site control and regulation of mitochondrial energy production ». *Biochimica et biophysica acta* 1797 (6-7) (juillet): 698-709. doi:10.1016/j.bbabi.2010.02.030.
- Benard, G, B Faustin, E Passerieux, A Galinier, C Rocher, N Bellance, J-P Delage, L Casteilla, T Letellier, et R Rossignol. 2006. « Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation ». *American journal of physiology. Cell physiology* 291 (6) (décembre): C1172-1182. doi:10.1152/ajpcell.00195.2006.
- Benard, Giovanni, Nadège Bellance, Dominic James, Philippe Parrone, Helder Fernandez, Thierry Letellier, et Rodrigue Rossignol. 2007. « Mitochondrial bioenergetics and structural network organization ». *Journal of cell science* 120 (Pt 5) (mars 1): 838-848. doi:10.1242/jcs.03381.
- Benbrik, E, P Chariot, S Bonavaud, M Ammi-Saïd, E Frisdal, C Rey, R Gherardi, et G Barlovatz-Meimon. 1997. « Cellular and mitochondrial toxicity of zidovudine (AZT), didanosine (ddI) and zalcitabine (ddC) on cultured human muscle cells ». *Journal of the neurological sciences* 149 (1) (juillet): 19-25.
- Bernabò, Ilaria, Elvira Brunelli, Cecilia Berg, Antonella Bonacci, et Sandro Tripepi. 2008. « Endosulfan acute toxicity in *Bufo bufo* gills: ultrastructural changes and nitric oxide synthase localization ». *Aquatic Toxicology (Amsterdam, Netherlands)* 86 (3) (février 18): 447-456. doi:10.1016/j.aquatox.2007.12.006.
- Bianchi, Cristina, Maria Luisa Genova, Giovanna Parenti Castelli, et Giorgio Lenaz. 2004. « The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis ». *The Journal of biological chemistry* 279 (35) (août 27): 36562-36569. doi:10.1074/jbc.M405135200.
- Biswas, G, O A Adebajo, B D Freedman, H K Anandatheerthavarada, C Vijayarathy, M Zaidi, M Kotlikoff, et N G Avadhani. 1999. « Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk ». *The EMBO journal* 18 (3) (février 1): 522-533. doi:10.1093/emboj/18.3.522.
- Biswas, Madhurima, et Jefferson Y Chan. 2010. « Role of Nrf1 in antioxidant response element-mediated gene expression and beyond ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 244 (1) (avril 1): 16-20. doi:10.1016/j.taap.2009.07.034.
- Boffa, M J, P A Brough, et R D Ead. 1995. « Lindane neurotoxicity ». *The British Journal of Dermatology* 133 (6) (décembre): 1013.
- Bourgeron, T, P Rustin, D Chretien, M Birch-Machin, M Bourgeois, E Viegas-Péquignot, A Munnich, et A Rötig. 1995. « Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency ». *Nature genetics* 11 (2) (octobre): 144-149. doi:10.1038/ng1095-144.
- Boyer, P D. 1997. « The ATP synthase--a splendid molecular machine ». *Annual review of biochemistry* 66: 717-749. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.

- Breivik, K, J M Pacyna, et J Münch. 1999. « Use of alpha-, beta- and gamma-hexachlorocyclohexane in Europe, 1970-1996 ». *The Science of the total environment* 239 (1-3) (octobre 1): 151-163.
- de Brito, Olga Martins, et Luca Scorrano. 2008. « Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria ». *Nature* 456 (7222) (décembre 4): 605-610. doi:10.1038/nature07534.
- Brown, Guy C. 2007. « Nitric oxide and mitochondria ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 12: 1024-1033.
- Brown, Guy C. 1999. « Nitric oxide and mitochondrial respiration ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411 (2-3) (mai 5): 351-369. doi:10.1016/S0005-2728(99)00025-0.
- Buler, Marcin, Sanna-Mari Aatsinki, Réka Skoumal, Zsolt Komka, Miklós Tóth, Risto Kerkelä, Anastasia Georgiadi, Sander Kersten, et Jukka Hakkola. 2012. « Energy-sensing factors coactivator peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α (PGC-1 α) and AMP-activated protein kinase control expression of inflammatory mediators in liver: induction of interleukin 1 receptor antagonist ». *The Journal of biological chemistry* 287 (3) (janvier 13): 1847-1860. doi:10.1074/jbc.M111.302356.
- Campbell, Christopher T, Jill E Kolesar, et Brett A Kaufman. 2012. « Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number ». *Biochimica et biophysica acta* (mars 21). doi:10.1016/j.bbagr.2012.03.002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22465614>.
- Cannino, Giuseppe, Elisa Ferruggia, Claudio Luparello, et Anna Maria Rinaldi. 2009. « Cadmium and mitochondria ». *Mitochondrion* 9 (6) (novembre): 377-384. doi:10.1016/j.mito.2009.08.009.
- Cannon, S B, J M Veazey Jr, R S Jackson, V W Burse, C Hayes, W E Straub, P J Landrigan, et J A Liddle. 1978. « Epidemic kepone poisoning in chemical workers ». *American journal of epidemiology* 107 (6) (juin): 529-537.
- Cantó, Carles, et Johan Auwerx. 2009. « PGC-1 α , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure ». *Current opinion in lipidology* 20 (2) (avril): 98-105. doi:10.1097/MOL.0b013e328328d0a4.
- Capaldi, R A, D G Halphen, Y Z Zhang, et W Yanamura. 1988. « Complexity and tissue specificity of the mitochondrial respiratory chain ». *Journal of bioenergetics and biomembranes* 20 (3) (juin): 291-311.
- Carew, J S, S T Nawrocki, R H Xu, K Dunner, D J McConkey, W G Wierda, M J Keating, et P Huang. 2004. « Increased mitochondrial biogenesis in primary leukemia cells: the role of endogenous nitric oxide and impact on sensitivity to fludarabine ». *Leukemia: Official Journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, U.K* 18 (12) (décembre): 1934-1940. doi:10.1038/sj.leu.2403545.

- Carroll, Joe, Ian M Fearnley, J Mark Skehel, Michael J Runswick, Richard J Shannon, Judy Hirst, et John E Walker. 2005. « The post-translational modifications of the nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria ». *Molecular & cellular proteomics: MCP* 4 (5) (mai): 693-699. doi:10.1074/mcp.M500014-MCP200.
- Carroll, Joe, Ian M Fearnley, J Mark Skehel, Richard J Shannon, Judy Hirst, et John E Walker. 2006. « Bovine complex I is a complex of 45 different subunits ». *The Journal of biological chemistry* 281 (43) (octobre 27): 32724-32727. doi:10.1074/jbc.M607135200.
- Castro, Laura, Verónica Demicheli, Verónica Tórtora, et Rafael Radi. 2011. « Mitochondrial protein tyrosine nitration ». *Free radical research* 45 (1) (janvier): 37-52. doi:10.3109/10715762.2010.516254.
- Cecchini, Gary. 2003. « Function and structure of complex II of the respiratory chain ». *Annual review of biochemistry* 72: 77-109. doi:10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700.
- Choi, Seok-Yong, Ping Huang, Gary M Jenkins, David C Chan, Juergen Schiller, et Michael A Frohman. 2006. « A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis ». *Nature cell biology* 8 (11) (novembre): 1255-1262. doi:10.1038/ncb1487.
- Choi, Yon Sik, Ki-Up Lee, et Youngmi Kim Pak. 2004. « Regulation of mitochondrial transcription factor A expression by high glucose ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1011 (avril): 69-77.
- Clementi, Emilio, et Enzo Nisoli. 2005. « Nitric oxide and mitochondrial biogenesis: a key to long-term regulation of cellular metabolism ». *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology* 142 (2) (octobre): 102-110. doi:10.1016/j.cbpb.2005.04.022.
- Coat, Sophie, Dominique Monti, Pierre Legendre, Claude Bouchon, Félix Massat, et Gilles Lepoint. 2011. « Organochlorine pollution in tropical rivers (Guadeloupe): Role of ecological factors in food web bioaccumulation ». *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)* 159 (6) (juin): 1692-1701. doi:10.1016/j.envpol.2011.02.036.
- D'Aurelio, Marilena, Carl D Gajewski, Giorgio Lenaz, et Giovanni Manfredi. 2006. « Respiratory chain supercomplexes set the threshold for respiration defects in human mtDNA mutant cybrids ». *Human molecular genetics* 15 (13) (juillet 1): 2157-2169. doi:10.1093/hmg/ddl141.
- Dagorn, M, M Poul, P Guillot, et P Sanders. 1988. « Residues of lindane in plasma and fat of sheep after dipping ». *Food Additives and Contaminants* 5 (1) (mars): 51-58. doi:10.1080/02652038809373662.
- Dalmonte, Maria Elena, Elena Forte, Maria Luisa Genova, Alessandro Giuffrè, Paolo Sarti, et Giorgio Lenaz. 2009. « Control of respiration by cytochrome c oxidase in intact cells: role of the membrane potential ». *The Journal of biological chemistry* 284 (47) (novembre 20): 32331-32335. doi:10.1074/jbc.M109.050146.

- Das, T K, C Pecoraro, F L Tomson, R B Gennis, et D L Rousseau. 1998. « The post-translational modification in cytochrome c oxidase is required to establish a functional environment of the catalytic site ». *Biochemistry* 37 (41) (octobre 13): 14471-14476. doi:10.1021/bi981500w.
- Dehn, P F, S Allen-Mocherie, J Karek, et A Thenappan. 2005. « Organochlorine insecticides: impacts on human HepG2 cytochrome P4501A, 2B activities and glutathione levels ». *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA* 19 (2) (mars): 261-273. doi:10.1016/j.tiv.2004.10.002.
- Dirinck, Eveline, Philippe G Jorens, Adrian Covaci, Tinne Geens, Laurence Roosens, Hugo Neels, Ilse Mertens, et Luc Van Gaal. 2011. « Obesity and persistent organic pollutants: possible obesogenic effect of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls ». *Obesity (Silver Spring, Md.)* 19 (4) (avril): 709-714. doi:10.1038/oby.2010.133.
- Drummond, L, E M Gillanders, et H K Wilson. 1988. « Plasma gamma-hexachlorocyclohexane concentrations in forestry workers exposed to lindane. » *British Journal of Industrial Medicine* 45 (7) (juillet): 493-497.
- Evans, M J, et R C Scarpulla. 1989. « Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences ». *The Journal of biological chemistry* 264 (24) (août 25): 14361-14368.
- Feychting, Maria. 2011. « Mobile phones, radiofrequency fields, and health effects in children – Epidemiological studies ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 107 (3) (décembre): 343-348. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2011.09.016.
- Finck, B. N. 2006. « PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease ». *Journal of Clinical Investigation* 116 (3) (mars 1): 615-622. doi:10.1172/JCI27794.
- Furt, Fabienne, et Patrick Moreau. 2009. « Importance of lipid metabolism for intracellular and mitochondrial membrane fusion/fission processes ». *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (10) (octobre): 1828-1836. doi:10.1016/j.biocel.2009.02.005.
- Gao, Yuansheng. 2010. « The multiple actions of NO ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 459 (6) (mai): 829-839. doi:10.1007/s00424-009-0773-9.
- Garcia-Roves, Pablo M. 2011. « Mitochondrial pathophysiology and type 2 diabetes mellitus ». *Archives of physiology and biochemistry* 117 (3) (juillet): 177-187. doi:10.3109/13813455.2011.584538.
- Garesse, Rafael, et Carmen G. Vallejo. 2001. « Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes ». *Gene* 263 (1-2) (janvier 24): 1-16. doi:10.1016/S0378-1119(00)00582-5.
- Glancy, Brian, et Robert S Balaban. 2012. « Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics ». *Biochemistry* 51 (14) (avril 10): 2959-2973. doi:10.1021/bi2018909.

- Gnaiger, E, G Méndez, et S C Hand. 2000. « High phosphorylation efficiency and depression of uncoupled respiration in mitochondria under hypoxia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (20) (septembre 26): 11080-11085.
- Gopalaswamy, U V, et A S Aiyar. 1984. « Effects of lindane on liver mitochondrial function in the rat ». *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 33 (1) (juillet): 106-113.
- Gouvernement du Canada, Agence de la santé publique du Canada. 1999. « Le diabète au Canada - Annexe B - Renseignements généraux - Agence de santé publique du Canada ». <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/dic-dac99/d20-fra.php>.
- Green, D R. 1998. « Apoptotic pathways: the roads to ruin ». *Cell* 94 (6) (septembre 18): 695-698.
- Greer, Eric L, Philip R Oskoui, Max R Banko, Jay M Maniar, Melanie P Gygi, Steven P Gygi, et Anne Brunet. 2007. « The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor ». *The Journal of biological chemistry* 282 (41) (octobre 12): 30107-30119. doi:10.1074/jbc.M705325200.
- Guldner, Laurence, Luc Multigner, Fanny Héraud, Christine Monfort, Jean Pierre Thomé, Arnaud Giusti, Philippe Kadhel, et Sylvaine Cordier. 2010. « Pesticide exposure of pregnant women in Guadeloupe: ability of a food frequency questionnaire to estimate blood concentration of chlordecone ». *Environmental Research* 110 (2) (février): 146-151. doi:10.1016/j.envres.2009.10.015.
- Hackenbrock, C R, T G Rehn, E C Weinbach, et J J Lemasters. 1971. « Oxidative phosphorylation and ultrastructural transformation in mitochondria in the intact ascites tumor cell ». *The Journal of cell biology* 51 (1) (octobre): 123-137.
- Hajnóczky, György, György Csordás, Sudipto Das, Cecilia Garcia-Perez, Masao Saotome, Soumya Sinha Roy, et Muqing Yi. 2006. « Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis ». *Cell Calcium* 40 (5-6) (décembre): 553-560. doi:10.1016/j.ceca.2006.08.016.
- Hardie, D Grahame. 2007. « AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 8 (10) (octobre): 774-785. doi:10.1038/nrm2249.
- He, Xin, Chen Sun, Feng Wang, Aijing Shan, Ting Guo, Weiqiong Gu, Bin Cui, et Guang Ning. 2012. « Peri-implantation lethality in mice lacking the PGC-1-related coactivator protein ». *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* 241 (5) (mai): 975-983. doi:10.1002/dvdy.23769.
- Herrmann, J M, et W Neupert. 2000. « Protein transport into mitochondria ». *Current opinion in microbiology* 3 (2) (avril): 210-214.

- Herzig, S, F Long, U S Jhala, S Hedrick, R Quinn, A Bauer, D Rudolph, et al. 2001. « CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1 ». *Nature* 413 (6852) (septembre 13): 179-183. doi:10.1038/35093131.
- Heusinkveld, Harm J, et Remco H S Westerink. 2012. « Organochlorine insecticides lindane and dieldrin and their binary mixture disturb calcium homeostasis in dopaminergic PC12 cells ». *Environmental science & technology* 46 (3) (février 7): 1842-1848. doi:10.1021/es203303r.
- Hfaiedh, Najla, Jean-Claude Murat, et Abdelfettah Elfeki. 2012. « A combination of ascorbic acid and α -tocopherol or a combination of Mg and Zn are both able to reduce the adverse effects of lindane-poisoning on rat brain and liver ». *Journal of trace elements in medicine and biology: organ of the Society for Minerals and Trace Elements (GMS)* (juin 5). doi:10.1016/j.jtemb.2012.04.002. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22677539>.
- Hirst, J. 2005. « Energy transduction by respiratory complex I--an evaluation of current knowledge ». *Biochemical Society transactions* 33 (Pt 3) (juin): 525-529. doi:10.1042/BST0330525.
- Huss, Janice M, et Daniel P Kelly. 2004. « Nuclear receptor signaling and cardiac energetics ». *Circulation research* 95 (6) (septembre 17): 568-578. doi:10.1161/01.RES.0000141774.29937.e3.
- Ikeuchi, Masaki, Hidenori Matsusaka, Dongchon Kang, Shouji Matsushima, Tomomi Ide, Toru Kubota, Toshiyuki Fujiwara, et al. 2005. « Overexpression of mitochondrial transcription factor a ameliorates mitochondrial deficiencies and cardiac failure after myocardial infarction ». *Circulation* 112 (5) (août 2): 683-690. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.524835.
- Iwata, S, J W Lee, K Okada, J K Lee, M Iwata, B Rasmussen, T A Link, S Ramaswamy, et B K Jap. 1998. « Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5373) (juillet 3): 64-71.
- Jones, Aleck W.E., Zhi Yao, Jose Miguel Vicencio, Agnieszka Karkucinska-Wieckowska, et Gyorgy Szabadkai. 2012. « PGC-1 family coactivators and cell fate: Roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria–nucleus signalling ». *Mitochondrion* 12 (1) (janvier): 86-99. doi:10.1016/j.mito.2011.09.009.
- Joseph, Anna-Maria, Denis R Joannisse, Richard G Baillot, et David A Hood. 2012. « Mitochondrial dysregulation in the pathogenesis of diabetes: potential for mitochondrial biogenesis-mediated interventions ». *Experimental diabetes research* 2012: 642038. doi:10.1155/2012/642038.
- Kassab, Asma, et Agnieszka Piwowar. 2012. « Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 diabetes ». *Biochimie* (février 7). doi:10.1016/j.biochi.2012.01.020. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22333037>.

- Keeney, Paula M, Caitlin K Quigley, Lisa D Dunham, Christina M Papageorge, Shilpa Iyer, Ravindar R Thomas, Kathleen M Schwarz, et al. 2009. « Mitochondrial gene therapy augments mitochondrial physiology in a Parkinson's disease cell model ». *Human gene therapy* 20 (8) (août): 897-907. doi:10.1089/hum.2009.023.
- Kim, Hyung-Ryong, Han-Jung Chae, Michael Thomas, Tadaaki Miyazaki, Anna Monosov, Edward Monosov, Maryla Krajewska, Stan Krajewski, et John C. Reed. 2007. « Mammalian dap3 is an essential gene required for mitochondrial homeostasis in vivo and contributing to the extrinsic pathway for apoptosis ». *The FASEB Journal* 21 (1) (janvier 1): 188 -196. doi:10.1096/fj.06-6283com.
- Kim, Jeong-a, Yongzhong Wei, et James R. Sowers. 2008. « Role of Mitochondrial Dysfunction in Insulin Resistance ». *Circ Res* 102 (4) (février 29): 401-414. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.165472.
- Kinosita, Kazuhiko, Jr. 2012. « F(1)-ATPase: a prototypical rotary molecular motor ». *Advances in experimental medicine and biology* 726: 5-16. doi:10.1007/978-1-4614-0980-9_2.
- Klimcakova, Eva, Valérie Chénard, Shawn McGuirk, David Germain, Daina Avizonis, William J Muller, et Julie St-Pierre. 2012. « PGC-1 α promotes the growth of ErbB2/Neu-induced mammary tumors by regulating nutrient supply ». *Cancer research* 72 (6) (mars 15): 1538-1546. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2967.
- Kmetc, Ivana, Kristina Radosević, Teuta Murati, Branimir Simić, Zlatko Kniewald, et Jasna Kniewald. 2009. « Lindane-induced cytotoxicity and the role of vitamin E in Chinese Hamster Ovary (CHO-K1) cells ». *Toxicology Mechanisms and Methods* 19 (8) (octobre): 518-523. doi:10.1080/15376510903280107.
- Knott, A. B., et E. Bossy-Wetzel. 2010. « Impact of Nitric Oxide on Metabolism in Health and Age-related Disease ». *Diabetes, Obesity and Metabolism* 12: 126–133. doi:10.1111/j.1463-1326.2010.01267.x.
- Knott, Andrew B, et Ella Bossy-Wetzel. 2009. « Nitric oxide in health and disease of the nervous system ». *Antioxidants & redox signaling* 11 (3) (mars): 541-554. doi:10.1089/ARS.2008.2234.
- Knowles, R G, et S Moncada. 1994. « Nitric oxide synthases in mammals ». *The Biochemical journal* 298 (Pt 2) (mars 1): 249-258.
- Kong, George Y. X., Nicole J. Van Bergen, Ian A. Trounce, et Jonathan G. Crowston. 2009. « Mitochondrial Dysfunction and Glaucoma ». *Journal of Glaucoma* 18 (2) (février): 93-100. doi:10.1097/IJG.0b013e318181284f.
- Koutnikova, Hana, Terrie-Anne Cock, Mitsuhiro Watanabe, Sander M. Houten, Marie-France Champy, Andrée Dierich, et Johan Auwerx. 2003. « Compensation by the Muscle Limits the Metabolic Consequences of Lipodystrophy in PPAR γ Hypomorphic Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (24) (novembre 25): 14457-14462. doi:10.1073/pnas.2336090100.

- Kozieł, Katarzyna, Magdalena Lebieczinska, Gyorgy Szabadkai, Marta Onopiuk, Wojciech Brutkowski, Katarzyna Wierzbicka, Grzegorz Wilczyński, et al. 2009. « Plasma membrane associated membranes (PAM) from Jurkat cells contain STIM1 protein is PAM involved in the capacitative calcium entry? » *The international journal of biochemistry & cell biology* 41 (12) (décembre): 2440-2449. doi:10.1016/j.biocel.2009.07.003.
- Krauthacker, B, T Alebić-Kolbah, M Kralj, B Tkalcevic, et E Reiner. 1980. « Organochlorine pesticides in blood serum of the general Yugoslav population and in occupationally exposed workers ». *International Archives of Occupational and Environmental Health* 45 (3): 217-220.
- Ledirac, Nathalie, Sebastien Antherieu, Anne Dupuy d' Uby, Jean-Claude Caron, et Roger Rahmani. 2005. « Effects of organochlorine insecticides on MAP kinase pathways in human HaCaT keratinocytes: key role of reactive oxygen species ». *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology* 86 (2) (août): 444-452. doi:10.1093/toxsci/kfi192.
- Lee, Duk-Hee, Michael W Steffes, Andreas Sjödin, Richard S Jones, Larry L Needham, et David R Jacobs Jr. 2011a. « Low dose organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls predict obesity, dyslipidemia, and insulin resistance among people free of diabetes ». *PloS One* 6 (1): e15977. doi:10.1371/journal.pone.0015977.
- Lee, Duk-Hee, Michael W. Steffes, Andreas Sjödin, Richard S. Jones, Larry L. Needham, et David R. Jacobs. 2010. « Low Dose of Some Persistent Organic Pollutants Predicts Type 2 Diabetes: A Nested Case-Control Study ». *Environmental Health Perspectives* 118 (9) (septembre): 1235-1242. doi:10.1289/ehp.0901480.
- . 2011b. « Low Dose Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls Predict Obesity, Dyslipidemia, and Insulin Resistance among People Free of Diabetes ». *PLoS ONE* 6 (1) (janvier 26): e15977. doi:10.1371/journal.pone.0015977.
- Lee, Hong Kyu. 2011. « Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: the contribution of dioxin-like substances ». *Diabetes & Metabolism Journal* 35 (3) (juin): 207-215. doi:10.4093/dmj.2011.35.3.207.
- Lee, Hsin-Chen, et Yau-Huei Wei. 2012. « Mitochondria and aging ». *Advances in experimental medicine and biology* 942: 311-327. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_14.
- Lefebvre, Philippe, Giulia Chinetti, Jean-Charles Fruchart, et Bart Staels. 2006. « Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis ». *The Journal of clinical investigation* 116 (3) (mars): 571-580. doi:10.1172/JCI27989.
- Lenaz, Giorgio. 2012. « Mitochondria and reactive oxygen species. Which role in physiology and pathology? » *Advances in experimental medicine and biology* 942: 93-136. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_5.

- Li, Ching-Hao, Su-Liang Tzeng, Yu-Wen Cheng, et Jaw-Jou Kang. 2005. « Chloramphenicol-induced mitochondrial stress increases p21 expression and prevents cell apoptosis through a p21-dependent pathway ». *The Journal of biological chemistry* 280 (28) (juillet 15): 26193-26199. doi:10.1074/jbc.M501371200.
- Lim, Soo, Young Min Cho, Kyong Soo Park, et Hong Kyu Lee. 2010. « Persistent organic pollutants, mitochondrial dysfunction, and metabolic syndrome ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1201 (juillet): 166-176. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05622.x.
- Lin, Jiandie, Christoph Handschin, et Bruce M. Spiegelman. 2005. « Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators ». *Cell Metabolism* 1 (6) (juin): 361-370. doi:10.1016/j.cmet.2005.05.004.
- Lin, Jiandie, Pere Puigserver, Jerry Donovan, Paul Tarr, et Bruce M Spiegelman. 2002. « Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor ». *The Journal of biological chemistry* 277 (3) (janvier 18): 1645-1648. doi:10.1074/jbc.C100631200.
- Liu, Chang, et Jiandie D Lin. 2011. « PGC-1 coactivators in the control of energy metabolism ». *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 43 (4) (avril): 248-257. doi:10.1093/abbs/gmr007.
- Liu, Zhengchang, et Ronald A Butow. 2006. « Mitochondrial retrograde signaling ». *Annual review of genetics* 40: 159-185. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090613.
- Longato, Lisa, Kelsey Ripp, Mashiko Setshedi, Miroslav Dostalek, Fatemeh Akhlaghi, Mark Branda, Jack R Wands, et Suzanne M de la Monte. 2012. « Insulin resistance, ceramide accumulation, and endoplasmic reticulum stress in human chronic alcohol-related liver disease ». *Oxidative medicine and cellular longevity* 2012: 479348. doi:10.1155/2012/479348.
- Luo, Yuan, Joshua D. Bond, et Vernon M. Ingram. 1997. « Compromised Mitochondrial Function Leads to Increased Cytosolic Calcium and to Activation of MAP Kinases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94 (18) (février 9): 9705-9710.
- Machado, Mariana Verdelho, Duarte M S Ferreira, Rui E Castro, Ana Rita Silvestre, Teresinha Evangelista, João Coutinho, Fátima Carepa, Adília Costa, Cecília M P Rodrigues, et Helena Cortez-Pinto. 2012. « Liver and muscle in morbid obesity: the interplay of fatty liver and insulin resistance ». *PloS one* 7 (2): e31738. doi:10.1371/journal.pone.0031738.
- Mahaffey, W R, P H Pritchard, et A W Bourquin. 1982. « Effects of kepone on growth and respiration of several estuarine bacteria ». *Applied and Environmental Microbiology* 43 (6) (juin): 1419-1424.

- Manczak, Maria, Thimmappa S Anekonda, Edward Henson, Byung S Park, Joseph Quinn, et P Hemachandra Reddy. 2006. « Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression ». *Human molecular genetics* 15 (9) (mai 1): 1437-1449. doi:10.1093/hmg/ddl066.
- Mariscal-Arcas, M, C Lopez-Martinez, A Granada, N Olea, M L Lorenzo-Tovar, et F Olea-Serrano. 2010. « Organochlorine pesticides in umbilical cord blood serum of women from Southern Spain and adherence to the Mediterranean diet ». *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 48 (5) (mai): 1311-1315. doi:10.1016/j.fct.2010.02.029.
- Marongiu, Roberta, Brian Spencer, Leslie Crews, Anthony Adame, Christina Patrick, Margarita Trejo, Bruno Dallapiccola, Enza Maria Valente, et Eliezer Masliah. 2009. « Mutant Pink1 induces mitochondrial dysfunction in a neuronal cell model of Parkinson's disease by disturbing calcium flux ». *Journal of neurochemistry* 108 (6) (mars): 1561-1574. doi:10.1111/j.1471-4159.2009.05932.x.
- Martin, J L, C E Brown, N Matthews-Davis, et J E Reardon. 1994. « Effects of antiviral nucleoside analogs on human DNA polymerases and mitochondrial DNA synthesis. » *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38 (12) (décembre): 2743-2749.
- McBride, Heidi M, Margaret Neuspiel, et Sylwia Wasiak. 2006. « Mitochondria: more than just a powerhouse ». *Current Biology: CB* 16 (14) (juillet 25): R551-560. doi:10.1016/j.cub.2006.06.054.
- Meirhaeghe, Aline, Vivion Crowley, Carol Lenaghan, Christopher Lelliott, Kath Green, Abigail Stewart, Kevin Hart, et al. 2003. « Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo ». *The Biochemical journal* 373 (Pt 1) (juillet 1): 155-165. doi:10.1042/BJ20030200.
- Miccadei, Stefania, et Aristide Floridi. 1993. « Sites of inhibition of mitochondrial electron transport by cadmium ». *Chemico-Biological Interactions* 89 (2-3) (décembre): 159-167. doi:10.1016/0009-2797(93)90006-K.
- Michalik, Liliane, Johan Auwerx, Joel P Berger, V Krishna Chatterjee, Christopher K Glass, Frank J Gonzalez, Paul A Grimaldi, et al. 2006. « International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome proliferator-activated receptors ». *Pharmacological reviews* 58 (4) (décembre): 726-741. doi:10.1124/pr.58.4.5.
- Miglio, Gianluca, Arianna C Rosa, Lorenza Rattazzi, Massimo Collino, Grazia Lombardi, et Roberto Fantozzi. 2009. « PPARgamma stimulation promotes mitochondrial biogenesis and prevents glucose deprivation-induced neuronal cell loss ». *Neurochemistry international* 55 (7) (décembre): 496-504. doi:10.1016/j.neuint.2009.05.001.
- Mishra, K, et Ramesh C Sharma. 2011. « Assessment of organochlorine pesticides in human milk and risk exposure to infants from North-East India ». *The Science of the Total Environment* 409 (23) (novembre 1): 4939-4949. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.038.

- Mootha, Vamsi K, Christoph Handschin, Dan Arlow, Xiaohui Xie, Julie St Pierre, Smita Sihag, Wenli Yang, et al. 2004. « Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17) (avril 27): 6570-6575. doi:10.1073/pnas.0401401101.
- Mordente, Alvaro, Elisabetta Meucci, Andrea Silvestrini, Giuseppe Ettore Martorana, et Bruno Giardina. 2012. « Anthracyclines and mitochondria ». *Advances in experimental medicine and biology* 942: 385-419. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_18.
- Multigner, L., J.-R. Ndong, A. Oliva, et P. Blanchet. 2008. « Polluants environnementaux et cancer de la prostate : données épidémiologiques ». *Gynécologie Obstétrique & Fertilité* 36 (9) (septembre): 848-856. doi:10.1016/j.gyobfe.2008.07.005.
- Multigner, Luc, Jean Rodrigue Ndong, Arnaud Giusti, Marc Romana, Helene Delacroix-Maillard, Sylvaine Cordier, Bernard Jégou, Jean Pierre Thome, et Pascal Blanchet. 2010. « Chlordecone exposure and risk of prostate cancer ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (21) (juillet 20): 3457-3462. doi:10.1200/JCO.2009.27.2153.
- Muoio, Deborah M, et Timothy R Koves. 2007. « Skeletal muscle adaptation to fatty acid depends on coordinated actions of the PPARs and PGC1 alpha: implications for metabolic disease ». *Applied physiology, nutrition, and metabolism = Physiologie appliquée, nutrition et métabolisme* 32 (5) (octobre): 874-883. doi:10.1139/H07-083.
- Nadra, Karim, Silvia I. Anghel, Elisabeth Joye, Nguan Soon Tan, Sharmila Basu-Modak, Didier Trono, Walter Wahli, et Béatrice Desvergne. 2006. « Differentiation of Trophoblast Giant Cells and Their Metabolic Functions Are Dependent on Peroxisome Proliferator-Activated Receptor B/delta ». *Molecular and Cellular Biology* 26 (8) (avril 15): 3266-3281. doi:10.1128/MCB.26.8.3266-3281.2006.
- Narendra, Derek P, Seok Min Jin, Atsushi Tanaka, Der-Fen Suen, Clement A Gautier, Jie Shen, Mark R Cookson, et Richard J Youle. 2010. « PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin ». *PLoS biology* 8 (1) (janvier): e1000298. doi:10.1371/journal.pbio.1000298.
- Newsholme, Philip, Celine Gaudel, et Maurico Krause. 2012. « Mitochondria and diabetes. An intriguing pathogenetic role ». *Advances in experimental medicine and biology* 942: 235-247. doi:10.1007/978-94-007-2869-1_10.
- Nicholls, David G. 2002. « Mitochondrial function and dysfunction in the cell: its relevance to aging and aging-related disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (11) (novembre): 1372-1381.
- Nisoli, Enzo, et Michele O. Carruba. 2006. « Nitric oxide and mitochondrial biogenesis ». *Journal of Cell Science* 119 (14) (juillet 15): 2855 -2862. doi:10.1242/jcs.03062.

- Nisoli, Enzo, Emilio Clementi, Clara Paolucci, Valeria Cozzi, Cristina Tonello, Clara Sciorati, Renata Bracale, et al. 2003. « Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide ». *Science (New York, N.Y.)* 299 (5608) (février 7): 896-899. doi:10.1126/science.1079368.
- Parker, Nadeene, Paul G Crichton, Antonio J Vidal-Puig, et Martin D Brand. 2009. « Uncoupling protein-1 (UCP1) contributes to the basal proton conductance of brown adipose tissue mitochondria ». *Journal of bioenergetics and biomembranes* 41 (4) (août): 335-342. doi:10.1007/s10863-009-9232-8.
- Piccoli, Claudia, Rosella Scrima, Domenico Boffoli, et Nazzareno Capitanio. 2006. « Control by cytochrome c oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state ». *The Biochemical journal* 396 (3) (juin 15): 573-583. doi:10.1042/BJ20060077.
- Piskac-Collier, Amanda L, et Mary Ann Smith. 2009. « Lindane-induced generation of reactive oxygen species and depletion of glutathione do not result in necrosis in renal distal tubule cells ». *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* 72 (19): 1160-1167. doi:10.1080/15287390903091780.
- Pooya, Shabnam, Sébastien Blaise, Maira Moreno Garcia, Jean Giudicelli, Jean-Marc Alberto, Rosa-Maria Guéant-Rodriguez, Elise Jeannesson, et al. 2012. « Methyl donor deficiency impairs fatty acid oxidation through PGC-1 α hypomethylation and decreased ER- α , ERR- α and HNF-4 α in rat liver ». *Journal of hepatology* (avril 17). doi:10.1016/j.jhep.2012.03.028. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521344>.
- Priyadarshi, A, S A Khuder, E A Schaub, et S S Priyadarshi. 2001. « Environmental risk factors and Parkinson's disease: a metaanalysis ». *Environmental research* 86 (2) (juin): 122-127. doi:10.1006/enrs.2001.4264.
- Puigserver, P. 2005. « Tissue-specific regulation of metabolic pathways through the transcriptional coactivator PGC1- α ». *International journal of obesity (2005)* 29 Suppl 1 (mars): S5-9. doi:10.1038/sj.ijo.0802905.
- Raharijaona, Mahatsangy, Soazig Le Pennec, Julie Poirier, Delphine Mirebeau-Prunier, Clothilde Rouxel, Caroline Jacques, Jean-Fred Fontaine, Yves Malthiery, Rémi Houlgatte, et Frédérique Savagner. 2009. « PGC-1-Related Coactivator Modulates Mitochondrial-Nuclear Crosstalk through Endogenous Nitric Oxide in a Cellular Model of Oncocytic Thyroid Tumours ». *PLoS ONE* 4 (11) (novembre 23): e7964. doi:10.1371/journal.pone.0007964.
- Ritov, Vladimir B, Elizabeth V Menshikova, Koichiro Azuma, Richard Wood, Frederico G S Toledo, Bret H Goodpaster, Neil B Ruderman, et David E Kelley. 2010. « Deficiency of electron transport chain in human skeletal muscle mitochondria in type 2 diabetes mellitus and obesity ». *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 298 (1) (janvier): E49-58. doi:10.1152/ajpendo.00317.2009.
- Rolo, Anabela P., João S. Teodoro, et Carlos M. Palmeira. 2012. « Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis ». *Free Radical Biology and Medicine* 52 (1) (janvier 1): 59-69. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.10.003.

- Rosenson, Robert S. 2004. « Current overview of statin-induced myopathy ». *The American journal of medicine* 116 (6) (mars 15): 408-416. doi:10.1016/j.amjmed.2003.10.033.
- Roses, A. D., M. W. Lutz, H. Amrine-Madsen, A. M. Saunders, D. G. Crenshaw, S. S. Sundseth, M. J. Huentelman, K. A. Welsh-Bohmer, et E. M. Reiman. 2010. « A TOMM40 Variable-length Polymorphism Predicts the Age of Late-onset Alzheimer's Disease ». *The Pharmacogenomics Journal* 10 (5): 375-384. doi:10.1038/tpj.2009.69.
- Rötig, Agnès, et Arnold Munnich. 2003. « Genetic Features of Mitochondrial Respiratory Chain Disorders ». *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (12) (janvier 12): 2995-3007. doi:10.1097/01.ASN.0000095481.24091.C9.
- Rubinstein, John L, John E Walker, et Richard Henderson. 2003. « Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy ». *The EMBO journal* 22 (23) (décembre 1): 6182-6192. doi:10.1093/emboj/cdg608.
- Rustin, P, D Chretien, T Bourgeron, B Gérard, A Rötig, J M Saudubray, et A Munnich. 1994. « Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies ». *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* 228 (1) (juillet): 35-51.
- Sazanov, Leonid A. 2007. « Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain ». *Biochemistry* 46 (9) (mars 6): 2275-2288. doi:10.1021/bi602508x.
- Scarpulla, Richard C. 2008. « Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function ». *Physiological Reviews* 88 (2) (avril): 611-638. doi:10.1152/physrev.00025.2007.
- Scarpulla, Richard C. 2006. « Nuclear Control of Respiratory Gene Expression in Mammalian Cells ». *Journal of Cellular Biochemistry* 97 (4): 673-683. doi:10.1002/jcb.20743.
- Schapira, Anthony HV. 12. « Mitochondrial diseases ». *The Lancet* 379 (9828): 1825-1834. doi:10.1016/S0140-6736(11)61305-6.
- Schreiber, Sylvia N, Roger Emter, M Benjamin Hock, Darko Knutti, Jessica Cardenas, Michael Podvynec, Edward J Oakeley, et Anastasia Kralli. 2004. « The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (17) (avril 27): 6472-6477. doi:10.1073/pnas.0308686101.
- Singh, Rambir, et Poonam Sharma. 2011. « Hepatoprotective Effect of Curcumin on Lindane-induced Oxidative Stress in Male Wistar Rats ». *Toxicology International* 18 (2) (juillet): 124-129. doi:10.4103/0971-6580.84264.
- Sladek, Robert, Ghislain Rocheleau, Johan Rung, Christian Dina, Lishuang Shen, David Serre, Philippe Boutin, et al. 2007. « A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes ». *Nature* 445 (7130) (février 22): 881-885. doi:10.1038/nature05616.

- Slaninova, Andrea, Miriam Smutna, Helena Modra, et Zdenka Svobodova. 2009. « A review: oxidative stress in fish induced by pesticides ». *Neuro endocrinology letters* 30 Suppl 1: 2-12.
- Soileau, S D, et D E Moreland. 1983. « Effects of chlordecone and its alteration products on isolated rat liver mitochondria ». *Toxicology and Applied Pharmacology* 67 (1) (janvier): 89-99.
- Spiegelman, Bruce M. 2007. « Transcriptional control of mitochondrial energy metabolism through the PGC1 coactivators ». *Novartis Foundation symposium* 287: 60-63; discussion 63-69.
- Srinivasan, K, et R Radhakrishnamurty. 1983. « Studies on the distribution of beta- and gamma-isomers of hexachlorocyclohexane in rat tissues ». *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes* 18 (3): 401-418. doi:10.1080/03601238309372378.
- Stamler, J S, S Lamas, et F C Fang. 2001. « Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism ». *Cell* 106 (6) (septembre 21): 675-683.
- Teuschler, Linda, James Klaunig, Ed Carney, Janice Chambers, Rory Conolly, Chris Gennings, John Giesy, et al. 2002. « Support of science-based decisions concerning the evaluation of the toxicology of mixtures: a new beginning ». *Regulatory toxicology and pharmacology: RTP* 36 (1) (août): 34-39.
- van Tienen, Florence H, Patrick J Lindsey, Carla J van der Kallen, et Hubert J Smeets. 2010. « Prolonged Nrf1 overexpression triggers adipocyte inflammation and insulin resistance ». *Journal of Cellular Biochemistry* 111 (6) (décembre 15): 1575-1585. doi:10.1002/jcb.22889.
- Tomelleri, G., P. Tonin, M. Spadaro, G. Tilia, D. Orrico, A. Barelli, B. Bonetti, et al. 1992. « AZT-induced mitochondrial myopathy ». *The Italian Journal of Neurological Sciences* 13 (9): 723-728. doi:10.1007/BF02229156.
- Twig, Gilad, Alvaro Elorza, Anthony J A Molina, Hibo Mohamed, Jakob D Wikstrom, Gil Walzer, Linsey Stiles, et al. 2008. « Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy ». *The EMBO journal* 27 (2) (janvier 23): 433-446. doi:10.1038/sj.emboj.7601963.
- Ventura-Clapier, Renée, Anne Garnier, et Vladimir Veksler. 2008. « Transcriptional control of mitochondrial biogenesis: the central role of PGC-1alpha ». *Cardiovascular research* 79 (2) (juillet 15): 208-217. doi:10.1093/cvr/cvn098.
- Vercauteren, Kristel, Natalie Gleyzer, et Richard C Scarpulla. 2008. « PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression ». *The Journal of biological chemistry* 283 (18) (mai 2): 12102-12111. doi:10.1074/jbc.M710150200.
- . 2009. « Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria ». *The Journal of biological chemistry* 284 (4) (janvier 23): 2307-2319. doi:10.1074/jbc.M806434200.

- Vercauteren, Kristel, Raymond A Pasko, Natalie Gleyzer, Vita Maria Marino, et Richard C Scarpulla. 2006. « PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth ». *Molecular and cellular biology* 26 (20) (octobre): 7409-7419. doi:10.1128/MCB.00585-06.
- Viña, Jose, Mari Carmen Gomez-Cabrera, Consuelo Borrás, Teresa Froio, Fabian Sanchis-Gomar, Vladimir E Martínez-Bello, et Federico V Pallardo. 2009. « Mitochondrial biogenesis in exercise and in ageing ». *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 (14) (novembre 30): 1369-1374. doi:10.1016/j.addr.2009.06.006.
- Weinhold, B. 2001. « Last call for Lindane ». *Environmental health perspectives* 109 (6) (juin): A254.
- Xue, Miao, Guofeng Shen, Jialing Yu, Diyu Zhang, Zhijiang Lu, Bin Wang, Yan Lu, Jun Cao, et Shu Tao. 2010. « Dynamic changes of α -hexachlorocyclohexane and its enantiomers in various tissues of Japanese Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) after oral or dermal exposure ». *Chemosphere* 81 (11) (décembre): 1486-1491. doi:10.1016/j.chemosphere.2010.08.046.
- Yoon, J C, P Puigserver, G Chen, J Donovan, Z Wu, J Rhee, G Adelmant, et al. 2001. « Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1 ». *Nature* 413 (6852) (septembre 13): 131-138. doi:10.1038/35093050.
- Yoshida, M, E Muneyuki, et T Hisabori. 2001. « ATP synthase--a marvellous rotary engine of the cell ». *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (9) (septembre): 669-677. doi:10.1038/35089509.
- Younglai, Edward V, Yanjing Wu, et Warren G Foster. 2006. « Rapid action of pesticides on cytosolic calcium concentrations in cultures of human umbilical vein endothelial cells ». *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)* 21 (3) (avril): 271-279. doi:10.1016/j.reprotox.2005.09.006.
- Zhang, Qun, Jin-Tai Yu, Ping Wang, Wei Chen, Zhong-Chen Wu, Hong Jiang, et Lan Tan. 2011. « Mitochondrial transcription factor A (TFAM) polymorphisms and risk of late-onset Alzheimer's disease in Han Chinese ». *Brain research* 1368 (janvier 12): 355-360. doi:10.1016/j.brainres.2010.10.074.
- Zucchini-Pascal, Nathalie, Georges de Sousa, Jérôme Pizzol, et Roger Rahmani. 2011. « Molecular investigation of the effects of lindane in rat hepatocytes: Microarray and mechanistic studies ». *Food and Chemical Toxicology* 49 (12) (décembre): 3128-3135. doi:10.1016/j.fct.2011.09.033.