HAL
open science

Mesure par microscopie confocale du métabolisme mitochondrial et du niveau énergétique cellulaire au cours d'épisodes de carences en substrats et/ou en oxygène

Cécile Cottet-rousselle

To cite this version:

Cécile Cottet-rousselle. Mesure par microscopie confocale du métabolisme mitochondrial et du niveau énergétique cellulaire au cours d'épisodes de carences en substrats et/ou en oxygène. Biologie cellulaire. École pratique des hautes études - EPHE PARIS, 2016. Français. NNT : 2016EPHE3096 . tel-02105228

HAL Id: tel-02105228

https://theses.hal.science/tel-02105228v1

Submitted on 20 Apr 2019

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.

École Pratique des Hautes Études
Mention « Systèmes intégrés, environnement et biodiversité »

École doctorale de l'École Pratique des Hautes Études
Laboratoire CaCyS / Inserm-UGA 1209-CNRS URM 5309

Et
Université Grenoble Alpes, LBFA Inserm U1055

Mesure par microscopie confocale du métabolisme mitochondrial et du niveau énergétique cellulaire au cours d'épisodes de carences en substrats et/ou en oxygène.

Par **Cécile COTTET-ROUSSELLE**

Thèse de Doctorat de Biologie Cellulaire, Moléculaire Et Sciences de la Santé

Sous la co-direction de

Mme Véronique FRACHET , Maître de Conférences, EPHE

Et M. Eric FONTAINE, PuPH, Université Grenoble-Alpes

Soutenue le 14 décembre 2016

Devant un jury composé de :

Mme Béatrice MORIO , DR INRA, CARMEN U1060(Présidente)

M. Michel RIGOULET, PU émérite, Université de Bordeaux (Rapporteur)

M. Frédéric BOUILLAUD , DR Inserm, Institut Cochin (Rapporteur)

Mme. Christelle MONTEIL, PU, Université de Rouen(Examinatrice)

REMERCIEMENTS

« Tout est une question de rencontres, il n'y a pas de hasard, il n'y a que des rendez-vous »

J'adresse mes remerciements à :

Xavier Ronot : c'est en faisant mes premiers pas de stagiaire dans votre (ton) laboratoire en 1994 que j'ai découvert le monde de la recherche et choisi mon métier. Merci d'avoir toujours été présent comme un pair et d'avoir contribué à mon évolution : mon recrutement à l'Inserm grâce au diplôme de l'EPHE , mon retour à Grenoble en me recommandant auprès de Xavier Leverve, puis de m'avoir encouragée, soutenue dans ce projet de thèse tardive….Merci de m'avoir permis de croiser la route de Didier. A vous deux vous m'avez transmis votre passion pour la cytométrie et l'imagerie, votre savoir et le goût de la transmission. Ça m'arrange bien de vous remercier tous les deux en même temps, ça me permet encore une fois de ne pas hésiter entre le « tu » et le « vous » ...

Véronique Frachet : merci d'avoir pris le relai de Xavier dans la poursuite de ma thèse et d'assurer mon encadrement. Merci de consacrer du temps pour m'accompagner dans ce travail, à des moments qui ne sont pas toujours propices. Merci de me faire confiance en me permettant d'intervenir dans le cadre du DIU de cytométrie. Nos échanges sont toujours riches et constructifs, et j'espère que l'on pourra poursuivre notre collaboration.

Uwe Schlattner : merci d'avoir accepté que je me lance dans ce défi doctoral en plus de mon activité d'ingénieur, de mon implication dans la mise en place de la démarche qualité et dans l'organisation « technique » du labo. Tu m'as dit « tu es sûre que ça ne fait pas un peu beaucoup ? » mais tu m'as fait confiance et j'ai essayé de rester à la hauteur de mes ambitions, persuadée que « c'est une question d'organisation » ! Merci de ta confiance et de continuer à m'impliquer dans de beaux projets pour lesquels chaque nouvelle approche d'imagerie et d'analyse d'images est un nouveau défi.

Eric Fontaine : merci également de m'avoir soutenue et encouragée dans ce projet. Avant d'arriver au labo, la bioénergétique avait le goût amer du mauvais souvenir de mes années de cours aussi abstraits que la toile d'un peintre excentrique contemporain. Xavier Leverve et toi m'avez appris à concrétiser toute la complexité du métabolisme énergétique, grâce aux belles images de vraies mitochondries de vraies cellules vivantes, même si je suis encore parfois un peu longue à la comprenette. Merci de ta disponibilité, de ta confiance et de ton soutien, de m'avoir dit un jour de doute «si parfois on doit faire des choix, il y a des choses qu'il ne faut pas abandonner ». J'ai hâte d'avoir un nouveau laser et que l'on continue l'aventure avec encore d'autres types cellulaires. Merci aussi pour vos valeurs humaines, Michèle et toi, votre générosité et les chouettes moments de partage.

Béatrice Morio : merci d'avoir accepté de juger ce travail. Nos échanges sont toujours constructifs et enrichissants et j'ai hâte que nous les poursuivions.

Michel Rigoulet et Frédéric Bouillaud : merci d'avoir accepté d'évaluer ce travail. Je suis très honorée de pouvoir bénéficier de votre expertise.

Christelle Monteil : un grand merci aussi d'avoir accepté d'examiner ce travail. Merci de cette discussion lors du colloque Meetochondrie à La Colle-sur-Loup au cours de laquelle tu m'as vivement encouragée à me lancer dans ce projet de thèse. Quelques mois plus tard, l'approche (ou la crise) de la quarantaine m'a décidée « si ce n'est pas maintenant, ça ne sera plus jamais » ! Merci de participer à l'aboutissement de ce projet.

Etienne Lefai et Vanessa Euthine du laboratoire CARMEN à Lyon : merci de nous avoir préparé les adénovirus, de m'avoir expliqué très pédagogiquement chaque étape de leur production, de vos conseils et de nos discussions.

Mes copines de bureau :
Sandrine : je suis désolée mais je maintiens que la fondue est meilleure dans un vraie caquelon en fonte, et c'est quand vous voulez pour refaire l'expérience, il faut toujours augmenter le « n » pour que le résultat soit significatif. Je te remercie de ne plus m'en vouloir de t'avoir fait vérifier mes pipettes lors de ton arrivée,… enfin, j'espère que ce n'est pas pour ça que tu as changé de bureau ? Je remercie Eric de t'avoir fait débarquer dans le labo, de m'avoir permis de travailler avec toi, et que cela se poursuive avec des supers projets même s'ils m'ont fait subir une séance de shooting photo ! Merci pour tous nos moments de partage, dans le bureau ou ailleurs, ton soutien, ta force et bref, ton amitié.
Christine : merci de ta présence quasi quotidienne même si souvent on se croise à peine. Merci pour nos moments d'échanges et de tes valeurs humaines. Merci pour ton sourire, ton énergie, ton œil qui pétille, ta bonne humeur, …qui m'apportent une bouffée d'oxygène dans des moments un peu tendus…
J'ai beaucoup d'admiration pour vous deux, vous êtes mes modèles de superwomen hyper efficaces !

Mes précieux collègues
Gégé et Sarah : merci pour votre disponibilité, votre précieuse collaboration quotidienne pour le bon fonctionnement du labo. Merci pour votre soutien, votre amitié, les jolies photos et le sponsoring en tablettes de chocolats qui redonnent du peps ! J'apprécie de vous avoir dans ma vie et pourvu que ça dure !
Régis : MacGyver du labo, combien de fois tu as sauvé nos manips pour une bouteille de gaz vide, et ce satané tuyau de laser qui se bouche ! Merci de ta disponibilité quotidienne et ta conscience professionnelle qui participe au bon fonctionnement du labo.
Cindy : merci pour ta présence quotidienne, tous nos moments autour d'une tasse de thé, ou ailleurs, toutes tes valeurs humaines en toute discrétion ! Merci de me faire profiter de tout ça et de ton amitié

Fred : mon fournisseur officiel d'hépatocytes isolés ; merci à Guillaume de nous avoir appris la technique, et c'est une précieuse aide que tu m'as apportée en acceptant de prendre le relai et de me les préparer. J'apprécie particulièrement ta rigueur, ton exigence, ta franchise qui permettent une confiance absolue et un vrai travail d'équipe.
Steph : toujours souriant et prêt à rendre service, merci pour ton aide pour les dosages ATP à l'HPLC.

Merci aux autres membres du LBFA, Laurence, Karine, d'avoir accepté de me suivre dans l'aventure « qualité » ; même si ça n'a pas grand chose à voir avec ma thèse, je vous remercie de votre implication, dans un but commun d'améliorer l'organisation du labo.

Christophe, mon amoureux, mes loulous Ugo et Piero, « mes belles-grandes-filles » Mélodie et Elsa, qui m'ont supportée, au sens propre comme au sens figuré, durant cette thèse, pendant laquelle je n'ai pas toujours été complètement disponible et détendue…
Mais promis je vais rattraper ça !

Bruno G (pour ne pas confondre avec Bruno frère…) sans qui je serai peut-être en toujours en train de vendre du fromage à Intermarché, ou, au mieux, à faire des prises de sang … Merci de m'avoir encouragée et de m'avoir permis de reprendre mes études ; Merci d'être là dans nos vies, comme un frère, comme une évidence.

Amanda, mon âme-sœur, 30 ans qu'on se connaît par cœur, Merci d'être ce que tu es, d'être là, ton courage, ta façon de voir la vie. Je t'embrasse

Claude et Robert, merci pour tout, votre accueil si chaleureux lors de mes déplacements parisiens, tous nos moments de partage. J'ai de la chance de faire partie de votre famille.

Papa, merci de tout ce que tu m'as transmis, d'avoir relu cette thèse pour chercher les fautes d'orthographe (honnêtement, t'en as trouvé beaucoup ?). Merci pour chacun de tes séjours et reste jeune éternellement, 80 ans, on a encore du chemin à faire, mais promis, on descendra en téléphérique !

Maman, merci de m'avoir transmis ta force de caractère, l'envie d'aller au bout des choses, d'en entreprendre de nouvelles, le goût d'apprendre des choses et d'apprendre des autres, d'être fière de moi souvent et d'être toujours là pour nous.

Ma famille, mes amis,
Ma Grand-Mère, ma belle-mère, ces femmes-courage, et exceptionnelles parties avant la fin de cette thèse et qui étaient fières par avance de me savoir Docteur…

TABLE des MATIERES

Liste des abréviations……..……p11

Liste des figures ……...……p13

Liste des tableaux……...……...p19

Avant-propos ……p20

Introduction……..……p23

CHAPITRE I. Le Métabolisme énergétique……..p24

1. Les voies métaboliques……..p25
2. Structure et fonction de la mitochondrie……p28
   2.1. Chaîne respiratoire et oxydation phosphorylante…..……..……..p30
      2.1.1. Les différents complexes……p31
      2.1.2. L'oxydation phosphorylante au niveau de l'ATP synthase_……..p36
      2.1.3. La théorie des supercomplexes……p38
   2.2. Le pore de transition de perméabilité…...……..p41
   2.3. Le stress oxydant……....p43
3. L'AMPK, enzyme clé du métabolisme énergétique……..p44
   3.1. Structure de l'AMPK……..p44
   3.2. Régulation……...p45
   3.3. Fonction……..p46
4. Les outils de mesure de la fonction mitochondriale……..p48
   4.1. Mesure de l'activité des complexes isolés..…….....p48
   4.2. Mesure de la respiration ou oxygraphie……...p48
   4.3. Mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante……p49
   4.4. Mesure de la production d'H_2O_2……..p49
   4.5. Mesure de la capacité de rétention calcique (CRC)……p50
   4.6. Utilisation de Sondes fluorescentes……p50

CHAPITRE II : Ischémie-reperfusion et fonction mitochondriale……p56
1. Définitions……..p57
2. Mécanismes des atteintes cellulaires induites par l'ischémie-reperfusion ……p58
2.1. La phase d'ischémie…….....p58
2.2. La phase de reperfusion……...p59
2.2.1. Modifications ioniques et altération de l'homéostasie calcique……..p59
2.2.2. Stress oxydant……..p59
3. Situations cliniques d'ischémie-reperfusion……p61
3.1. L'ischémie-reperfusion myocardique……p61
3.2. L'ischémie-reperfusion cérébrale……..p64
3.3. L'ischémie-reperfusion lors des transplantations d'organes……p67
3.4. Ischémie-reperfusion et cellules cancéreuses……p69

CHAPITRE III. **Les Techniques d'imagerie**……..p73
1. La fluorescence : rappels……p74
2. La microscopie confocale……..……..p76
2.1. Principe……p76
2.2. Vers les nouvelles technologies : les F-Techniques……....p78
2.2.1. Les protéines fluorescentes……p78
2.2.2. Les F-Techniques……p79
2.2.3. Le FRET……...p79
2.3. Les Biosenseurs……..p82
3. Le traitement d'images……..p85
3.1. Définition d'une image numérique……p85
3.2. Définition et exemples de filtres de convolution……p86
3.3. Pourquoi et comment filtrer les images ?.....p87
3.4. Les étapes de l'analyse d'images……p90
3.4.1. La segmentation et extraction de masque binaire.……...p91
3.4.2. Les transformations binaires ……..p91
3.4.3. L'extraction des mesures pour l'analyse de données……p96
3.5. Traitement d'images adapté au réseau mitochondrial
Filtrage par Chapeau Haut-de-forme ou Tophat……p97

Objectifs……...p100

Partie expérimentale……p101

I. Approche méthodologique……p102

1. Choix du matériel biologique……p102
2. Stratégie expérimentale…….....p103

II. Matériel et méthodes……p104

1. Culture cellulaire……p104
   1.1. Conditions de culture……p104
   1.2. Conditions expérimentales : milieux sans substrats…….....p106
2. Visualisation et quantification de l'ouverture du PTP par microscopie confocale...p107
   2.1. Mesure des variations de potentiel membranaire mitochondrial…….p107
      2.1.1. Marquage des cellules au TMRM et Mitotracker……..p107
      2.1.2. Acquisition des images……..p108
      2.1.3. Principe de la visualisation de l'ouverture du PTP……p108
   2.2. Analyse d'images et quantification de l'ouverture du PTP……..p109
      2.2.1. Etape de segmentation : réalisation de macro au moyen d'ImageJ ..p109
         2.2.1.1. Détermination du compartiment mitochondrial à partir de l'image de Mitotracker……p110
         2.2.1.2. Discrimination des signaux NADH à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment mitochondrial……p110
         2.2.1.3. Discrimination du signal TMRM lié au potentielmitochondrial.P110
      2.2.2. Etape d'extraction des mesures au moyen du logiciel Volocity…….p111
      2.2.3. Etape d'analyse des données dans le logiciel Excel……..p111
3. Production d'adénovirus et infection des cellules…….p111
   3.1. Préparation des vecteurs……p112
   3.2. Recombinaison……..p112
   3.3. Transfection cellulaire au phosphate de calcium……..p112
   3.4. Récupération des adénovirus…….p113
4. Privation de substrats et d'oxygène : l'ischémie-reperfusion simulée……..p113
   4.1. Protocole établi pour l'analyse par imagerie des effets de ces carences sur le PTP……..p113
   4.2. Protocole établi pour l'analyse des effets de ces carences sur les variations énergétiques……p115
      4.2.1. Test de concentration des adénovirus…….p115

4.2.2. Visualisation des variations de fluorescence des biosenseurs ATeam et AMPKAR au cours de l'ischémie-reperfusion simulée……..p115
5. Détermination du contenu en nucléotides adényliques……p117
5 .1. Mise en culture et hypoxie…….....p117
5.2. Récupération des cellules pour le dosage des nucléotides……p118
5.3. Protocole HPLC…….....p119

Résultats……..p120
1ère Partie : Visualisation et quantification de la fonction mitochondriale par microscopie confocale……..p121
1. Principe de la visualisation de l'ouverture PTP : Réalisation du programme d'analyse d'images…….....p122
1.1. Etape de segmentation par tophat……..p123
1.1.1.Discrimination du compartiment mitochondrial avec mitotracker green……....p123
1.1.2. Discrimination de signaux NADH……..p130
1.1.3. Détermination du NADH global……p134
1.1.4. Détermination du signal TMRM……p135
1.2. Validation du modèle d'ouverture du PTP……p136
1.2.1. HMEC……p136
1.2.2. Hépatocytes primaires……....p137
1.2.3. RT112……p138
1.2.4. INS1……p139
2 . Effets des inhibiteurs de la CRM……p141
2.1 HMEC……..p141
2.2 Hepatocytes……p143
2.3 INS1……p148
3 . Effets du découplant CCCP sur la CRM……p150
3.1 HMEC……p150
3.2 Hepatocytes……p152
3.3 INS1……p154
4. Effets de stress énergétique sur le PTP : Effets de la carence en substrats énergétiques et en O2 sur les différentes lignées……p155
3.1 HMEC……p155

3.2 RT112……...p158
3.3 Hépatocytes……p162
3.4. INS1……..p171
Conclusion 1ERE partie……p178
2ème Partie : Visualisation des effets de stress énergétique sur la production d'ATP……..p181
1. Validation de l'utilisation des Biosenseurs ATeam et AMPKAR sur la lignée cellulaire INS1……p182
1.1. ATeam et GO-ATeam……...p182
1.2. AMPKAR……..p186
2. Optimisation par adénovirus…….....p188
2.1 Tests de concentrations et d'efficacité d'infection d'adénovirus par cytométrie en flux……..p188
2.2 Détermination du pourcentage de cellules infectées……p194
2.3 Evaluation de la présence de FRET…….....p195
3. Validation de l'utilisation des Biosenseurs ATEAM et AMPKAR les cellules primaires (hépatocytes) : réponses à l'oligomycine et au CCCP.....p198
1.1. Ad-ATeam et GO-ATeam……p198
1.2. AMPKAR……..p203
4. Visualisation des effets de la carence en substrats énergétiques et en oxygène par ATeam……..p209
4.1. RT112……p209
4.2. Hépatocytes……...p214
5. Evaluation du rapport ATP/ADP par HPLC……p217
5.1. Effets des inhibiteurs de la CRM…….....p217
5.2. Effets de la carence en substrats énergétiques et en oxygène……p218
6. Visualisation des effets de la carence en substrats énergétiques et en oxygène par AMPKAR……p220
Conclusion 2ème partie……p224
Discussion générale……p226
1. L'approche d'analyse d'images par tophat……p228
2. Visualisation et quantification de la fonction mitochondriale……p231

3. Visualisation des variations d'ATP et AMPK avec l'utilisation des biosenseurs et de FRET…….....p238

Conclusion et Perspectives…….p243

Références bibliographiques……..p246

Annexes :
-liste de Publications
- article Dumas et al 2009
-Article Lablanche et al 2015

LISTE DES ABREVIATIONS

Δp	force proton-motrice
ΔpH	gradient de pH
ΔΨ	gradient électrique
ACC	Acétyl-CoA carboxylase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside
AMP	Adénosine monophosphate
AMPK	AMP-activated protein kinase
ANT	Adénine nucléotide translocase
APD	avalanche photo diode
ATP	Adénosine triphosphate
AVC	Accident Vasculaire Cérébral
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca^{2+}	ion calcium
$CaCl_2$	Chlorure de calcium
CaMKKb	Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinase kinase β
$Ca(NO_3)_2$	dinitrate de calcium
cDNA	ADN complémentaire
CFP	Cyan fluorescent protein
CRC	capacité de rétention calcique
CRM	chaîne respiratoire mitochondriale
CsA	Cyclosporine A
DCCD	dicyclocarbodiimide (inhibiteur de l'ATPsynhase)
DO	densité optique
DNP	2,4- dinitrophénol
E.Coli	Escherichia coli
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EGF	Epidermal growth factor
eGFP	enhanced Green Fluorescent Protéin
EOA	Espèces oxygénées actives
ERO	Espèces réactives de l'oxygène
$FAD/FADH_2$	Flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite
FCS	Fluorescent correlation spectroscopy
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
FMN	Flavin mononucleotide
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
FRET	Förster resonance energy transfer ou fluorescence resonance energy transfer
G6Pase	Glucose 6-phosphatase

GFP	Green Fluorescent Protein
HIF1-α	Hypoxia factor 1 alpha
HMEC-1	Human Microvessels Endothelial Cells
HPLC	High performance liquid chromatography
HRP	Horseradish peroxydase
H_2O_2	peroxyde d'hydrogène
IRM	Imagerie par résonance magnétique
KCl	Chlorure de potassium
$KClO_4$	Perchlorate de potassium
KOH	Hydroxyde de potassium
KOMO	Préparation à base de KOH et MOPS
KH_2PO_4	Dihydrogénophosphate de potasssium ou phosphate de monopotassium
LP	Lactate Pyruvate
LPO	Lactate Pyruvate Octanoate
LKB1	Liver kinase hépatique B1 ou kinase hépatique
MC	Milieu complet
MCT	Monocarboxylate transporteur
MTG	Mitotracker Green
$MgSO_4$	Sulfate de magnésium
m.o.i	**m**ultipiants **o**f **i**nfection
MOPS	Acide 3 (N-morpholino)-propane sulfonique
NaCl	Chlorure de sodium
NAD+/NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide oxydée/réduite
$NaHCO_3$	Bicarbonate de sodium ou hydrogénocarbonate de sodium
Na_2HPO_4	phosphate de sodium dibasique ou phosphate disodique ou hydrogénophosphate de sodium
NF-κB	nuclear factor-κB
NO	Nitric Oxyde ou monoxyde d'azote
NOS	NO-synthéthase
$ONOO^-$	peroxynitrite
OH°	radical hydroxyle
OSCP	Oligomycin Sensitivity Conferral Protein
PCR	Polymerase chain reaction
PGC1α	proliferator-activated receptor coactivator 1-alpha
PEPCK	Phosphoénol puryvate carboxykinase
PTP	Pore de transition de perméabilité
PFK-2	Phosphofructokinase -2
PMT	photo-multiplier tube
ROS	Reactive Oxygen Species
RNS	Reactive Nitrogen Species
SERCA	Sarco endoplasmic reticulum calcium-ATPase
SVF	Serum de veau foetal
SS	Sans susbtrats
TNFα	Tumor necrosis factor
TCSPC	Time-correlated single-photon counting
TMRM	TetraMethyl Rhodamine Methyl Ester
u.i Ad	unité d'adénovirus par cellule
VDAC	Voltage dependant anion channel
YFP	Yellow Fluorescent Protein

LISTE des FIGURES

INTRODUCTION

CHAPITRE I

Figure 1. Représentation schématique des principales voies métaboliques……..p27

Figure 2. Schéma de la structure d'une mitochondrie…… p29

Figure 3. Comparaison de l'organisation du réseau mitochondrial révélé par marquage au TMRM dans différentes lignées……....……....p29

Figure 4. Organisation du réseau mitochondrial dans les cellules musculaires marquées au Mitotracker Red……..p29

Figure 5 . Les différents complexes de la chaîne respiratoire ……p31

Figure 6. Structure du compexe I de T. thermophilus……..p32

Figure 7. Structure de la cytochrome oxydase……..p35

Figure 8. Structure de l'ATPsynthase……...p37

Figure 9. Schematic representation of FOF1 ATP synthase dimers……p38

Figure 10. Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale selon le « plasticity model »……p40

Figure 11. Transition hypothétique des dimères de l'ATPsynthase formant le PTP…….p42

Figure 12. Les différentes espèces radicalaires produites par la mitochondrie……p44

Figure 13. Structure de l'AMPK……p45

Figure 14. Schéma de régulation de l'AMPK……p46

Figure 15. Schéma des voies métaboliques contrôlées par l'AMPK……p47

Figure 16. Les différents états de respiration mitochondriale……p49

Figure 17 : Spectres d'excitation et d'émission du TMRM (A) et du Mitotracker Green (B). Issus de https://www.thermofisher.com.....p54

Figure 18 : Visualisation de l'ouverture du PTP induite par 0.05µM A23187, avec la technique Calcénie-Cobalt. ……p55

CHAPITRE II

Figure 19 : Production de ROS lors de la reperfusion……...p61

Figure 20 : Représentation schématique de la pénombre ischémique en neurologie selon N. Nighoghossian……p65

Figure 21 : Mécanismes des lésions de l'ischémie-reperfusion lors de la transplantation d'organes. ……...p69

CHAPITRE III

Figure 22. Diagramme de Jablonski……..p75
Figure 23 : Schéma de principe d'un microscope confocal……..p77
Figure 24 : Acquisition d'image et obtention d'image numérique……p77
Figure 25 : Spectres d'excitation et d'émission des protéines fluorescentes dérivées de GFP……p78
Figure 26 : principe et caractéristiques du FRET…….....p80
Figure 27 : Principe du FLIM……....p82
Figure 28 : Représentation schématique du fonctionnement d'un biosenseur ……p83
Figure 296 : Représentation schématique des constructions des biosenseurs ATeam (A) et AMPKAR (B)…… p85
Figure 30 : Définition d'une image numérique ……p86
Figure 31 : Exemple de convolution d'une matrice par un noyau 3x3 ……p86
Figure 32: Exemples de traitement d'image par différents filtres de convolution……p90
Figure 33. Exemples de segmentation d'image……p91
Figure 34 : Exemples d'éléments structurants……...p92
Figure 35 : Exemples d'érosion……p93
Figure 36 : Exemples de dilatation……p93
Figure 37 : Exemples de d'opération arithmétiques ……p96

PARTIE EXPERIMENTALE

Figure 38 : Cloche à hypoxie……...p118
Figure 39 : Exemple de chromatogramme et ses résultats……..p119

RESULTATS

1ère PARTIE

Figure 40 : Visualisation de l'ouverture du PTP induite par A23187 sur des cellules endothéliales dont les mitochondries ont été marquées au TMRM……..p123
Figure 41 : Comparaison d'un seuillage classique et d'une segmentation par chapeau haut de forme à partir d'une même image de mitochondries marquées par Mitotracker Green…...p125
Figure 42 : illustration de la macro Image J pour la réalisation du tophat étape par étape..p127

Figure 43 : Illustration des étapes de la macro permettant de déterminer le compartiment mitochondrial à partir d'une image de mitochondries marquées par Mitotracker Green….p129
Figure 44 : Représentation des différentes étapes de la macro Image J permettant la discrimination du signal NADH à l'intérieur et en dehors du compartiment mitochondrial.....p133
Figure 45 : Effet de l'A23187 sur les cellules HMEC…….p136
Figure 46 : Effet de l'A23187 sur les hépatocytes isolés…….p137
Figure 47 : Effet de l'A23187 sur les RT112……..p138
Figure 48 : Effet de l'A23187 sur les cellules INS1……p139
Figure 49 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de cellules HMEC……p142
Figure 50 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de hépatocytes fraîchement isolés et incubés en présence de Lactate Pyruvate Octanoate……..p143
Figure 51 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de hépatocytes fraîchement isolés et incubés en présence de Lactate Pyruvate……p144
Figure 52 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH des hépatocytes isolés cultivés 24 en milieu complet……...p145
Figure 53 : Effets de la roténone sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de cellules INS1……p147
Figure 54 : Cinétique de l'effet du CCCP sur le potentiel membranaire de cellules HMEC……...p151
Figure 55 : Effets du CCCP sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH des HMEC……...p152
Figure 56 : Effets du CCCP sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH des hépatocytes……...p153
Figure 57: Effets du CCCP sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH des INS1…….....p154
Figure 58 : Carences en substrat et oxygène de cellules HMEC. …….....p156
Figure 59 : Carences en substrat et oxygène de cellules RT112. …….....p159
Figure 60 : Carences en substrat et oxygène sur des hépatocytes de 48h…….....p163
Figure 61 : Carences en oxygène sur des hépatocytes de 48h en présence ou non de CsA p168
Figure 62 : Carences en oxygène sur des hépatocytes de 48h en présence ou non de CsA p170

Figure 63 : Carences en oxygène de cellules INS1…….p173
Figure 64 : Carences en substrats et en oxygène de cellules INS1……..p175
Figure 65 : Carences en substrats et en oxygène de cellules INS1 en présence ou non de CsA……...p176

2ème PARTIE

Figure 66 : Transfection à la lipofectamine des cellules INS1 avec ATEAM……p183
Figure 67 : Test de réponse du biosenseur ATEAM à l'oligomycine des cellules INS1 transfectées……p184
Figure 68 : Test de réponse du biosenseur GO-ATEAM (contrôle négatif de ATEAM) à l'oligomycine des cellules INS1 transfectées ……..p185
Figure 69 : Transfection à la lipofectamine des cellules HeLa avec AMPKAR et réponses à l'activation par AICAR ou à l'oligomycine……..p186
Figure 70 : Représentation des spectres d'émission de ECFP et EYFP……..p189
Figure 71 : Test doses d'adénovirus par CMF à 24h.....p191
Figure 72: Test doses d'adénovirus par CMF à 48h……p193
Figure 73 : Test doses d'adénovirus AMPKAR par CMF à 24 et 48h : détermination du pourcentage de cellules infectées……..p194
Figure 74 : Test doses d'adénovirus AMPKAR par CMF à 24 et 48h : évaluation du FRET par le ratio YFP/CFP……p197
Figure 75 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 40 minutes (sham) des hépatocytes de 48h infectés avec ATEAM 25 m.o.i……p199
Figure 76 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET sous l'effet de l'oligomycine et du CCCP……..p200
Figure 77 : Graphes de quantification des fluorescences CFP et YFP et du ratio YFP/CFP sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes de 48h infectés avec ATEAM 25 m.o.i…….p201
Figure 78: Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes de 48h infectés avec AMPKAR 25 m.o.i……p205
Figure 79 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes de 48h infectés avec AMPKAR 25 m.o.i. ……p207

Figure 80 : Graphes de quantification des fluorescences CFP et YFP et du ratio YFP/CFP sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes de 48h infectés avec ATEAM 25 m.o.i. ……p208
Figure 81 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 2h heures (=sham ischémie-reperfusion) de cellules RT112 infectées par ATEAM 25 m.o.i……...p209
Figure 82 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET après 60 minutes d'ischémie (FiO2 3% en milieu sans substrat) puis 1 heure de reperfusion de cellules RT112 infectées par ATEAM 25 m.o.i……..p211
Figure 83 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET après 60 minutes d'ischémie (FiO2 3% en milieu sans substrat) puis 1 heure de reperfusion de cellules RT112 infectées par GO-ATEAM 25 m.o.i. …….p213
Figure 84 : Ratios accepteur/Donneur au cours de l'ischémie-reperfusion…….p213
Figure 85 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 2h (=sham ischémie-reperfusion)des hépatocytes infectés 48h par ATEAM 25moi…….p215
Figure 86 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 1 heure d'ischémie (FiO2 0% sans substrat) puis 1h de reperfusion des hépatocytes primaires infectées par ATEAM 25 m.o.i. ……p216
Figure 87 : Effets des inhibiteurs de la CRM sur ATP/ADP mesuré par HPLC…….p218
Figure 88 : Effets de la carence en substrats et en oxygène par dosage ATP/ADP…….p219
Figure 89 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 2h heures (=sham ischémie-reperfusion) des hépatocytes infectés 48h par AMPKAR 25 m.o.i. ……p221
Figure 90 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET après 60 minutes d'ischémie (FiO2 0% en milieu sans substrat) puis 1 heure de reperfusion des hépatocytes infectés 48h par AMPKAR 25 m.o.i…….p222
Figure 91 : Graphes de quantificiation des fluorescences CFP et YFP et du ratio YFP/CFP pendant 1 heure d'ischémie (FiO2 0% sans substrat) puis 1h de reperfusion, comparés aux contrôles (sham) des hépatocytes infectés 48h par AMPKAR 25 m.o.i……..p223
Figure 92 : Paramètres mitochondriaux visualisés par imagerie ……p228
Figure 93 : Organisation du protocole Icy pour la quantification du signal TMRM……..p231
Figure 94 : Représentation schématique du métabolisme des cellules INS1…….p234

LISTE des TABLEAUX

Tableau 1. Les supercomplexes de la chaîne respiratoire dans différents organismes…… .p39
Tableau 2. Sondes fluorescentes pour la mitochondrie et son activité……..p51
Tableau 3 : Biosenseurs disponibles pour l'étude du métabolisme……...p84
Tableau 4. Exemples de filtres de convolution pour le traitement d'images…….p88
Tableau 5. Composition des milieux sans substrats pour chaque type cellulaire……....p107
Tableau 6 : Récapitulatif des effets des carences en Oxygène…….....p178
Tableau 7 : Récapitulatif des effets des carences en substrats et Oxygène…….....p179

AVANT-PROPOS

AVANT-PROPOS

La fonction mitochondriale se définit par un ensemble des mécanismes conduisant à la production d'énergie sous forme d'ATP (produit par la chaine respiratoire et l'oxydation phosphorylante), et permettant à la cellule de maintenir un équilibre énergétique même lorsqu'elle se trouve exposée à une situation de stress (privation ou excès de substrats et/ou d'oxygène, exposition à des facteurs externes délétères, etc..). Les protéines comme l'AMP-kinase (AMPK) interviennent dans la régulation du métabolisme énergétique en permettant l'ajustement précis des besoins et disponibilités énergétiques cellulaires. Les mitochondries peuvent être considérées comme étant un carrefour d'informations au centre du fonctionnement cellulaire. En effet, elles contribuent à la production d'ATP cellulaire à travers la beta-oxydation, le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire et le processus d'oxydation phosphorylante. La mitochondrie est également le siège de production de radicaux libres (stress oxydant), et est impliquée dans la mort cellulaire programmée par différents processus comme le relargage de protéines pro-apoptotiques ou par l'intervention du pore de transition de perméabilité ou PTP.
Par conséquent, un dysfonctionnement de la mitochondrie peut être à l'origine de nombreux désordres conduisant à de nombreuses pathologies dont les maladies métaboliques (syndrome métabolique, obésité, diabète, etc…), mais aussi des maladies neuro-dégénératives, cardiovasculaires ou encore des cancers.

L'ischémie-reperfusion, au cours de laquelle une privation de nutriments associée ou non à une privation d'oxygène, est un phénomène qui constitue un stress commun à de nombreuses pathologies, puisque ce type de stress métabolique est à l'origine d'atteinte de la fonction mitochondriale, dont le degré dépend du type cellulaire capable ou non de gérer ce type de stress métabolique.

Ainsi, l'étude des mécanismes mitochondriaux impliqués dans le stress métabolique lié au phénomène d'ischémie-reperfusion présente un intérêt dans divers contextes cliniques et peut contribuer à la compréhension de mécanismes permettant d'améliorer certaines pistes thérapeutiques.

L'approche développée dans ce travail de thèse est issue de différents travaux du laboratoire, plus ou moins récents, qui ont nourri une réflexion progressive notamment au niveau du rôle du fameux PTP comme un mécanisme essentiel à la cellule pour s'adapter à leur environnement ou stress métaboliques et lui permettre peut-être de décider si elle doit mourir ou survivre. Mon métier d'ingénieur d'études, dont l'activité principale est d'être responsable du plateau technique d'imagerie du laboratoire, m'a permis d'être impliquée dans ces différents travaux de recherche. A partir de cette expérience, il m'est apparu incontournable d'établir un lien entre les différents contextes de ces projets. Ce lien place le PTP au cœur de nos préoccupations, de façon non dissociée du fonctionnement de la mitochondrie. Ainsi, ce travail est en soi une thèse méthodologique permettant d'explorer l'ensemble de la fonction mitochondriale : chaîne respiratoire, PTP et production d'ATP, dans le contexte clinique d'ischémie-reperfusion.

La partie introductive de ce manuscrit commence par une présentation du métabolisme énergétique, de la mitochondrie et des méthodes disponibles pour étudier son fonctionnement. Un second chapitre sera consacré au phénomène d'ischémie-reperfusion et les contextes cliniques concernés. La dernière partie abordera les notions et techniques d'imagerie adaptées à l'étude de la mitochondrie et de son fonctionnement.

A la suite de la description des procédures expérimentales, les résultats seront organisés en deux parties. La première concerne la méthodologie mise au point pour la visualisation et la quantification de l'ouverture du PTP par microscopie confocale et ses applications dans l'étude du fonctionnement de la chaîne respiratoire dans un contexte d'ischémie-reperfusion. La seconde partie s'intéressera à la méthodologie testée pour visualiser et quantifier la production d'ATP à l'aide de biosenseurs liés soit à la présence d'ATP, soit à l'activité de l'AMPK.

La discussion permettra d'aborder de façon critique les deux approches méthodologiques proposées et d'apporter des arguments quant à leur mise en œuvre et à leur faisabilité.

INTRODUCTION

CHAPITRE I

LE METABOLISME ENERGETIQUE

CHAPITRE I

LE METABOLISME ENERGETIQUE

1. Les voies métaboliques des cellules animales

Le métabolisme se définit comme un ensemble de réactions couplées se produisant dans l'organisme et permettant d'extraire l'énergie des nutriments (protides, lipides, glucides) par leur dégradation (= catabolisme) ou de consommer cette énergie pour synthétiser les constituants nécessaires à la structure et au fonctionnement des cellules (=anabolisme).

On estime que chaque individu consomme la totalité de l'ATP présent en 2 à 3 minutes, ce qui implique un renouvellement permanent afin de maintenir un équilibre entre production et consommation d'énergie. En amont de la synthèse d'ATP, l'énergie peut être stockée sous forme de glycogène hépatique et musculaire ainsi que d'acides gras adipocytaires, et l'ATP peut être produit par voie soit aérobie, soit anaérobie. En effet, le glucose peut être dégradé lors de la glycolyse produisant 2 molécules d'ATP par molécule de glucose sans consommation d'oxygène. Cette glycolyse anaérobie va libérer du lactate qui sera retransformé en glucose au niveau du foie pour être à nouveau oxydé. En présence d'oxygène, le glucose sera totalement dégradé par le cycle de Krebs qui fournit les équivalents réduits (NADH et $FADH_2$) dont l'énergie sera convertie en ATP au cours de l'oxydation phosphorylante, au sein de la mitochondrie.

Les principales voies du métabolisme énergétique, schématisées dans la figure 1 sont :

- la glycogénogénèse : synthèse du glycogène à partir du glucose-6-phosphate ;
- la glycogénolyse : dégradation du glycogène en glucose-6-phosphate, qui sera converti en glucose dans le foie et en lactate dans le muscle ;
- la glycolyse : dégradation du glucose en acide pyruvique qui sera transformé en lactate dans la glycolyse anaérobie ou en acétyl-CoA dans la glycolyse aérobie ;
- la gluconéogénèse : synthèse du glucose et du glycogène à partir des acides aminés et du lactate ;
- la lipolyse : dégradation des triglycérides en glycérol et acides gras, eux-mêmes dégradés en acétyl-CoA dans la bêta-oxydation ;

- la lipogénèse *de novo* : synthèse d'acides gras à partir de l'acétyl-CoA puis des triglycérides à partir des acides gras et du glycérol-phosphate ;
- la cétogenèse : synthèse de produits à 4 carbones (C4) à partir de l'acétyl-CoA.

Les voies principales aboutissant à la production d'ATP débutent dans le cytosol et se poursuivent dans la mitochondrie, au niveau du cycle de Krebs (ou cycle des acides tricarboxyliques) et de la β-oxydation lipidique, aboutissant à la formation de l'acétyl-coenzyme A ou acétyl Co-A. Pour maintenir un équilibre entre production et consommation d'ATP, et permettre un bon fonctionnement de l'organisme, les substrats doivent être disponibles pour maintenir l'oxydation phosphorylante : le taux d'acides aminés doit être ajusté à la prise de protéines alimentaires et la quantité de glucose utilisée doit être équivalente à celle absorbée du fait d'une faible réserve en glycogène par rapport à sa mobilisation.

Ces principes voies placent la mitochondrie au cœur du métabolisme énergétique, et au centre d'intérêt de cette présente étude concernant l'effet des carences en substrats et oxygène sur le métabolisme énergétique et en particulier la fonction mitochondriale de différents types cellulaires, puisque toutes ces voies métaboliques n'existent pas de la même manière dans tous les tissus (foie, muscle, cerveau, tumeurs…).

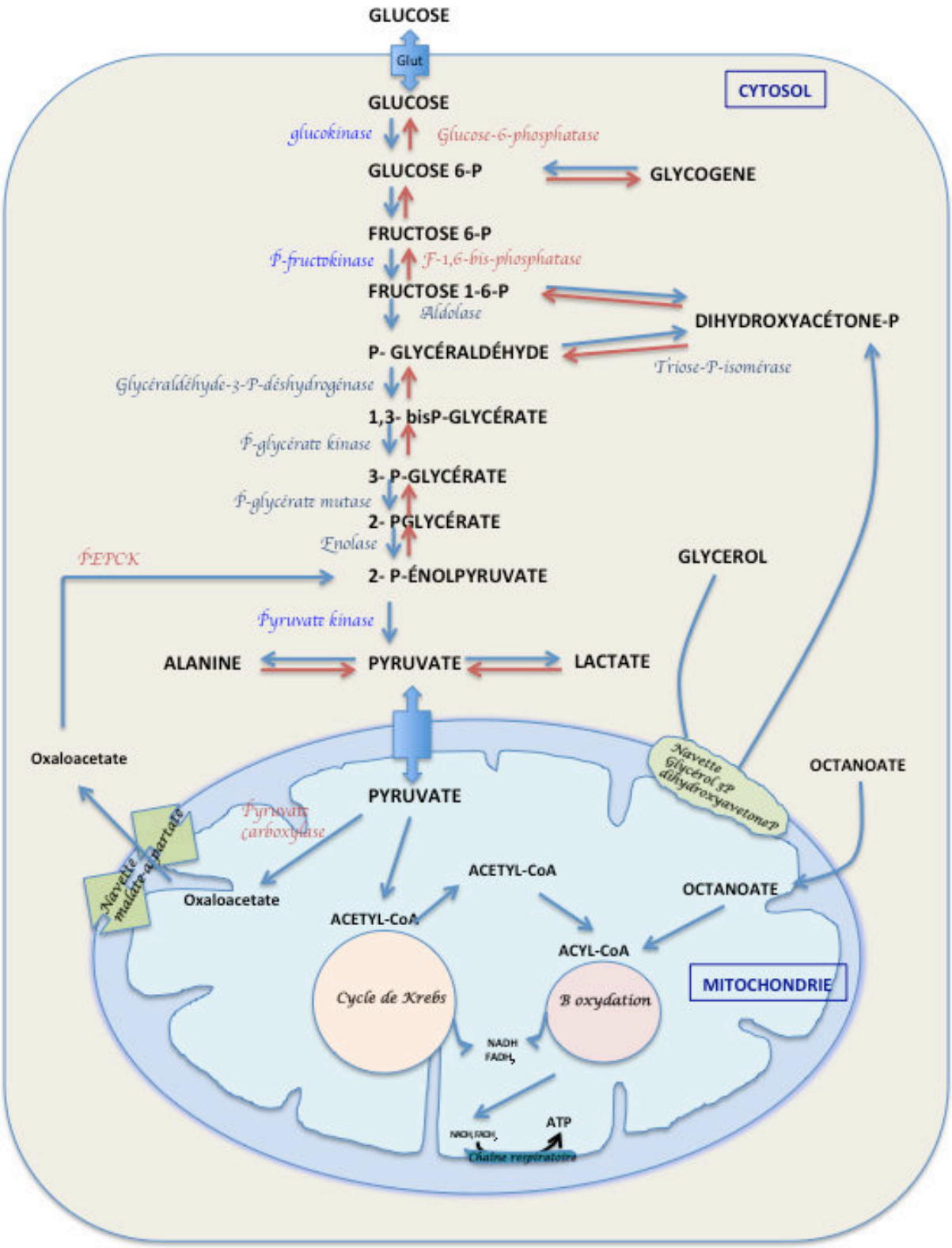


Figure 1. Représentation schématique des principales voies métaboliques. Dans le cytosol, les flèches bleues indiquent le sens de la glycolyse, les rouges la néoglucogénèse.

2. Structure et fonction de la mitochondrie

Le rôle physiologique des mitochondries consiste à récupérer l'énergie fournie par la dégradation des produits issus de notre alimentation (glucide, acides gras, acides aminés) pour la transformer en ATP. La régulation de l'homéostasie énergétique est une fonction majeure de la mitochondrie, grâce au processus d'oxydation phosphorylante qui permet d'assurer une coordination entre la consommation et les besoins énergétiques.

Les mitochondries mesurent de 1 à 10µm de longueur sur 0,5 à 1µm de largeur. Elles se composent de 2 membranes : une externe et une interne formant des crêtes, qui délimitent 3 milieux : le milieu extra mitochondrial (le cytoplasme de la cellule), l'espace inter-membranaire et la matrice (fig. 2). La membrane externe est formée d'une bicouche lipidique et contient de nombreuses protéines appelées porines (exemple VDAC) laissant passer toutes les molécules hydrophiles de taille moléculaire inférieure à 10kDa.
La membrane interne est moins perméable et contient davantage de protéines que de lipides. Elle contient notamment quantité de cardiolipines, rendant cette membrane imperméable aux ions. Les autres molécules doivent donc passer par des transporteurs. Les crêtes permettent d'augmenter la surface de cette membrane interne et donc la capacité de phosphorylation oxydative, puisque c'est sur cette membrane que l'on retrouve les protéines de transport spécifiques aux petites molécules, la chaîne respiratoire et ses complexes, et l'ATP-synthase. On peut donc déduire du nombre de crêtes le niveau d'activité de la cellule : plus il y a de crêtes, plus la mitochondrie est en mesure de fournir de l'ATP, indiquant donc un fort besoin potentiel en énergie. La structure, l'organisation en réseau et le nombre de mitochondries diffèrent selon les types cellulaires, donc les tissus (Cottet-Rousselle, Ronot et al. 2011). Dans la plupart des lignées cellulaires adhérentes, les mitochondries sont organisées en un réseau plus ou moins « étoilé », alors que les cellules en suspension possèdent un réseau diffus de mitochondries (fig 3). Il existe un lien étroit entre l'organisation de ce réseau de mitochondries, ses différents états énergétiques et les différentes phases du cycle cellulaire, durant lesquelles les mitochondries peuvent subir des phénomènes de fusion ou fission, sous l'influence de protéines (Mfn2…)(Hyde, Twig et al. 2010; Zorzano, Liesa et al. 2010). Vendelin *et al* (Vendelin, Beraud et al. 2005) ont montré que des modifications du cytosquelette qui engendrent une perturbation du réseau mitochondrial peuvent être à l'origine du processus de mort programmée des cellules musculaires (Fig 4B).

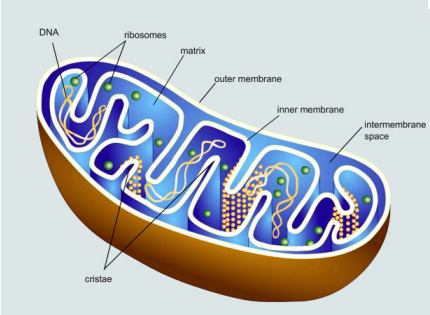


Figure 2. Schéma de la structure d'une mitochondrie

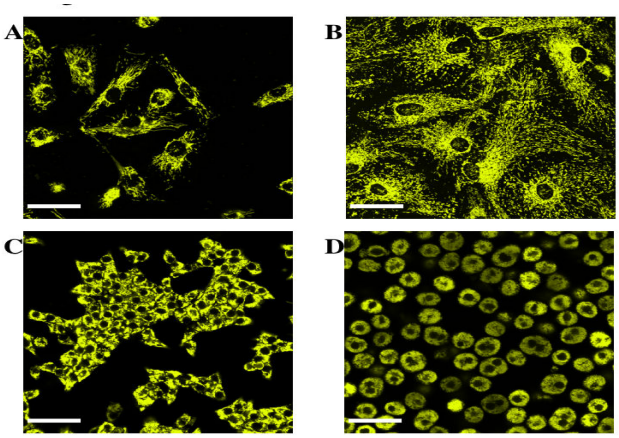


Figure 3. Comparaison de l'organisation du réseau mitochondrial révélé par marquage au TMRM (marqueur spécifique du potentiel mitochondrial) dans différentes lignées : A, cellules endothéliales (HMEC) ; B, astrocytes primaires ; C, cellules β d' insulinome de rat (INS1) ; D, hépatocytes primaires. Barre d'échelle 29µm pour A, 47µm pour B,C,D (Cottet-Rousselle, Ronot et al. 2011)

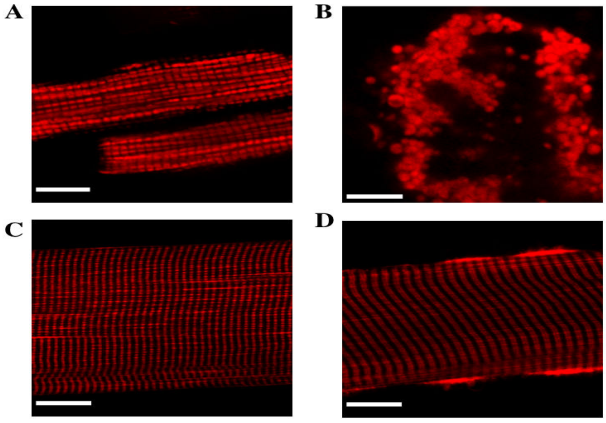


Figure 4. Organisation du réseau mitochondrial dans les cellules musculaires marquées au Mitotracker Red. A, cardiomyocyte intact ; B, cardiomyocyte perméabilisé à la trypsine qui a perturbé l'organisation du cytosquelette ce qui aboutit à l'apoptose ; C, fibre de muscle gastrocnémien de rat ; D, fibre de muscle soléaire de rat. Barre d'échelle 35µm.(Cottet-Rousselle, Ronot et al. 2011).

Les mitochondries sont aussi régulatrices de l'homéostasie ionique, de l'état redox et constituent un site de production de radicaux libres de l'oxygène.
Impliquée dans ces nombreuses fonctions, la mitochondrie se présente donc comme un organite jouant un rôle majeur dans la régulation de la mort cellulaire en participant à l'apoptose par fuite du cytochrome c dans le cytoplasme, mais aussi par l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité (PTP). Il est admis que l'apoptose est un processus crucial dans le maintien de l'homéostasie des organismes pluricellulaires, dans l'embryogénèse et la métamorphose d'organes en cours de développement.
Il existe donc un lien évident entre un dysfonctionnement mitochondrial et un grand nombre de pathologies dans lesquelles les fonctions tissulaires sont atteintes, puisque les mitochondries sont des systèmes ubiquitaires présents dans la majorité des cellules de l'organisme.

2.1. Chaîne respiratoire et Oxydation phosphorylante

Située sur la membrane interne de la mitochondrie, la chaîne respiratoire est composée de quatre complexes protéiques structurellement indépendants. A travers ces complexes, elle est le siège de réactions d'oxydo-réductions, servant notamment à réoxyder les coenzymes NADH et $FADH_2$ qui ont été réduits au cours du cycle de Krebs ou de la bêta oxydation.
Il se crée ainsi un transfert d'électrons entre les différents complexes de la chaîne, qui s'accompagne d'un gradient transmembranaire de protons. Ce gradient de protons va servir à fabriquer l'ATP au niveau de l'ATP-synthase. Le transport de protons génère un gradient électrique et définit le potentiel membranaire mitochondrial (ψ). Ce potentiel est accompagné d'une différence de pH de part et d'autre de la membrane interne : la matrice constitue un milieu alcalin alors que l'espace intermembranaire est acide.
La force proto-motrice est déterminée par :

$$\Delta p = \Delta\Psi - (2{,}3RT/F) \times \Delta pH$$

où R est la constante des gaz parfaits ($8.314 J.mol^{-1}.K^{-1}$), T la température en Kelvin, F la constante de Faraday ($96485 C. mol^{-1}$).
La découverte de ce mécanisme de phosphorylation oxydative a permis à Peter Mitchell d'obtenir le prix Nobel de Chimie en 1978 et est connu sous le terme de Théorie Chimio-osmotique de Mitchell.

2.1.1. Les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM).

Les complexes I à IV sont des enzymes constituées de plusieurs sous-unités qui travaillent de concert pour créer un gradient électrochimique de protons à travers la membrane interne, utilisé par l'ATP synthase (Complexe V) pour produire l'ATP par phosphorylation oxydative. Seul le complexe II ne participe pas au transport de protons.
Le schéma suivant propose une représentation classique de la chaîne respiratoire mitochondriale :

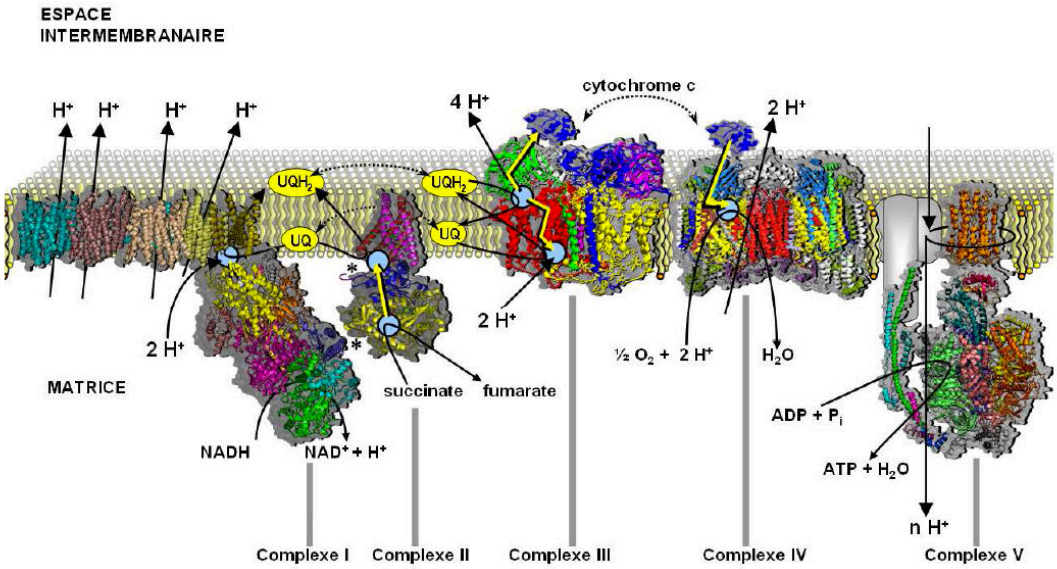


Figure 5. Les différents complexes de la chaîne respiratoire et de l'oxydation phosphorylante (d'après F. Haraux, Meetochondrie2012).

<u>Le complexe I ou NADH déshydrogénase :</u>

Composé de 44 sous-unités pour 980kDa, le complexe I constitue l'enzyme la plus importante de la chaîne et le premier point d'entrée des électrons. Il est caractérisé par une forme en L qui résulte d'une association orthogonale de deux bras :

- le bras périphérique hydrophile, côté matrice, constitué de 8 sous–unités, de tous les centres rédox de l'enzyme et de 9 centres Fer-Soufre liés à la Flavine MonoNucleotide (FMN) ;
- le bras membranaire, hydrophobique, dont la principale fonction est la translocation de protons. Baradaran *et al* (Baradaran, Berrisford et al. 2013) ont récemment déterminé

l'architecture du complexe I, notamment l'arrangement des sous-unités et des hélices alpha du domaine membranaire. Des données de structure haute résolution du Complexe I d'E.Coli montrent la présence de 60 hélices alpha transmembranaires, avec 1 site de liaison et 1 canal d'accès pour la quinone à l'interface avec le bras périphérique.

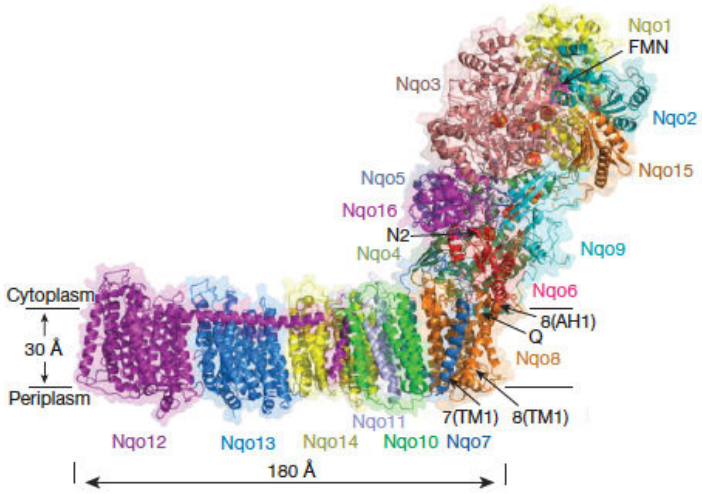


Figure 6. Structure du compexe I de T. thermophilus. (Baradaran, Berrisford *et al*. 2013)

Le Complexe I lie son substrat NADH sur la partie terminale du bras hydrophile et transfert 2 électrons à l'ubiquinone. La réduction de l'ubiquinone en ubiquinol induit des changements conformationnels du bras membranaire résultant en un transport de 4 protons à travers la membrane interne (Dudkina, Kouril et al. 2010) (Chaban, Boekema et al. 2014).

Cette NADH déshydrogénase catalyse la réduction de l'ubiquinone par le NADH :

$$NADH + Q_{10} + 5\ H^{+}_{\text{matriciels}} \rightarrow NAD^{+} + Q_{10}H_2 + 4H^{+}_{\text{intermembranaires}}$$

Le bilan de l'oxydation du NADH est :

$NADH + H+ CoQ \rightarrow NAD^{+} + CoQH_2$

$CoQH_2 + 2\ Cytc\ Fe^{3+} \rightarrow CoQ + 2\ Cytc\ Fe^{2+} + 2H^{+}$

$2\ Cytc\ Fe^{2+} + ½\ O_2 + 2H^{+} \rightarrow 2\ Cytc\ Fe^{3+} + H_2O$

$\mathbf{NADH + H^{+} + ½\ O2 \rightarrow NAD^{+} + H_2O}$

Inhibition du Complexe I

Le Complexe I peut être inhibé par la roténone, certains médicaments sédatifs comme les barbituriques ou antidiabétiques comme la metformine.

- La roténone est une molécule produite par certaines plantes tropicales et entre dans la composition de certains pesticides et insecticides. Son administration par injection chronique à faible dose provoque la maladie de Parkinson chez le rat. Il a également été montré dans une étude publiée en 2011 (Tanner, Kamel et al. 2011) que la maladie de Parkinson est 2,5 fois plus fréquente chez les sujets ayant utilisé de la roténone (souvent des agriculteurs). Son activité s'exerce au niveau du complexe I où elle bloque le flux d'électrons entre les centres Fer-Soufre et l'ubiquinone.
- La metformine est l'antidiabétique le plus couramment utilisé dans le traitement du diabète de type 2, notamment chez les patients en surpoids et obèses, eu égard à sa faible capacité à provoquer des hypoglycémies et à son absence de conséquence sur la prise de poids du patient. La metformine cible particulièrement le foie puisque son action principale est d'améliorer l'hyperglycémie par inhibition de la néoglucogénèse hépatique (Foretz, Hebrard et al. 2010). El-Mir et ses collaborateurs ont montré dans les années 2000 que la cible d'action de la Metformine consiste en une inhibition partielle du complexe I entrainant une modification des potentiels phosphate et redox, d'où une modification des flux métaboliques hépatiques (El-Mir, Nogueira et al. 2000). Elle agit également sur les voies de signalisation métabolique en activant l'AMP kinase (voir chapitre AMPK), a un effet inhibiteur sur l'apoptose (via le PTP) ainsi qu'un effet réducteur de la production de radicaux libres liée au flux réverse d'électrons dans le complexe I.

<u>Le Complexe II ou Succinate déshydrogénase</u>

Constitué de 4 sous-unités protéiques, ce complexe de 130 000 daltons catalyse l'oxydation du succinate en fumarate, en lien direct avec le cycle de Krebs. Il constitue un deuxième point d'entrée indépendant puisqu'il transmet les électrons du succinate à l'ubiquinone :

$$\text{Succinate} + \text{FAD} \rightarrow \text{fumarate} + \text{FADH}_2$$

$$\text{FADH}_2 + \text{CoQ}_{10} \rightarrow \text{FAD} + \text{Q}_{10}\text{H}_2$$

d'où le bilan $\mathbf{Succinate + CoQ_{10} \rightarrow fumarate + Q_{10}H_2}$

L'énergie libérée par cette réaction n'est pas suffisante pour qu'il y ait un pompage de protons, donc le complexe II ne contribue pas directement à la formation du gradient de protons.

Inhibition du Complexe II

Le Malonate est l'inhibiteur du complexe II et inhibiteur compétitif de l'échangeur du succinate. Il ralentit la réduction du coenzyme Q ce qui privera le complexe III de son coenzyme donneur d'hydrogène et inhibera donc la réduction du cytochrome c ferrique en cytochrome c ferreux. L'activité de la cytochrome oxydase sera réduite, utilisera moins d'oxygène d'où une baisse de la respiration et de la synthèse d'ATP.

<u>Le Complexe III ou cytochrome c oxidoréductase ou Bc1 Complexe</u>

Il est connu pour exister sous forme de dimère (appelé aussi complexe bc1 en raison des cytochromes b et c qui le constituent) au niveau de la membrane interne et reçoit les électrons de l'ubiquinone. L'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone permet le pompage de 2 protons vers l'espace intermembranaire. Les électrons de l'ubiquinol sont transportés par le cytochrome c vers le complexe IV.

$$QH_2 + 2\ CytC\ Fe^{3+} + 2H^{+}_{matriciels} \rightarrow Q + 2\ CytC\ Fe^{2+} + 4H^{+}_{intermembranaires}$$

Les cytochromes sont des protéines comportant un hème dont l'atome de Fer peut passer alternativement d'un état réduit ferreux Fe^{2+} à un état oxydé ferrique Fe^{3+}.

Le complexe III est composé du site Qi au niveau de la membrane interne du côté de la matrice, et du site Q0 orienté vers l'espace intermembranaire (Lai, Zhang et al. 2006).

Inhibition du Complexe III

Les inhibiteurs de référence du complexe III sont l'antimycine A et le myxothiazol qui agissent respectivement au niveau du cytochrome bK et du centre Fer-Souffre.

En se liant sur le site Q1 de la cytochrome c réductase, l'antimycine A inhibe l'oxydation de l'ubiquinol, ce qui empêche la formation du gradient de protons, et donc la synthèse d'ATP. Cette inhibition provoque ainsi une forte production du radical superoxide.

Lai *et al* (Lai, Zhang et al. 2006) ont utilisé le myxothiazol en tant qu'inhibiteur du site Q0 du complexe III pour mettre en évidence les voies de signalisation et les conséquences fonctionnelles d'une inhibition de ce même site au cours de l'hypoxie.

Le Complexe IV ou cytochrome c oxidase

Il constitue la dernière enzyme de la chaîne de transport des électrons : il accepte les électrons du cytochrome c et les utilise pour réduire l'oxygène en une molécule d'eau, ce qui permet le pompage des protons. Cette réduction a lieu au niveau d'un site bimétallique hème-cuivre caractéristique de cette famille d'oxydases (fig.7).

$$4CytC\ Fe^{2+} + O_2 + 8H^+ \rightarrow 4\ CytC\ Fe^{3+} + 2\ H_2O + 4H^+$$

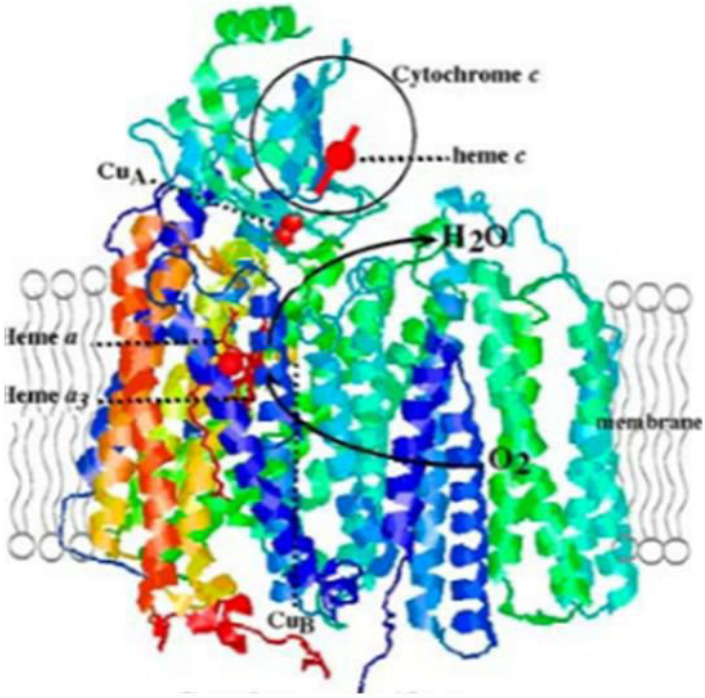


Figure 7. Structure de la cytochrome oxydase (source web : http://cbc.arizona.edu)

Bien que certaines sous-unités présentent plusieurs isoformes et que des sous-unités supplémentaires existent chez les eucaryotes, les sous-unités I, II et III se retrouvent chez tous les organismes. La sous-unité I contient le site catalytique, alors que la sous-unité II contient le site de fixation du cytochrome c.

Inhibition du Complexe IV

Le cyanure est un poison respiratoire qui agit en se liant à l'hème a3-CU_B de la cytochrome c oxydase ce qui inhibe à la fois l'utilisation de l'oxygène et la production d'ATP liée à une baisse du potentiel membranaire mitochondrial. Cette inhibition engendre une cascade de réactions conduisant à des dysfonctionnements neuronaux et myocardiques qui peuvent entrainer la mort si l'inhibition n'est pas levée immédiatement (Way 1984; Leavesley, Li et al. 2008) . Le monoxyde d'azote peut également se lier au même site dans certaines conditions physiologiques, ce qui a permis à Cooper et Giulivi (Cooper and Giulivi 2007) de le décrire en tant que modulateur endogénique de l'oxydation phosphorylante.

Le cyanure et le monoxyde d'azote semblent ainsi être en compétition pour le même site de la cytochrome oxydase, puisqu'un excès de cyanure empêche la liaison du NO sur l'hème a3. (Leavesley, Li et al. 2008). De plus, si le cyanure et le NO sont présents en même temps mais à des concentrations 10 fois supérieures pour le NO, la cytochrome c oxydase n'est pas inhibée (Pearce, Bominaar et al. 2003).

2.1.2. L'oxydation phosphorylante au niveau de <u>l'ATP synthase ou Complexe V</u>

Ce complexe protéique est constitué de 15 à 18 sous-unités et une masse de 600kDa, utilise l'énergie du gradient de protons pour transformer l'ADP en ATP.

Il permet donc de convertir une énergie électrochimique en une énergie chimique véhiculée par les molécules d'ATP. Cependant ce phénomène est réversible car l'ATP synthase est capable d'expulser des protons vers l'espace intermembranaire en hydrolysant l'ATP. Son sens d'action dépend de la force protomotrice et du rapport ATP/ADP.

Andrianaivomananjaona décrit précisément la structure de l'ATP synthase (Andrianaivomananjaona, Moune-Dimala et al. 2011). Les structures les plus étudiées d'un point de vue génomique et biochimique sont les ATP synthases de *E. Coli*, *S. Cervisiae* et *B. Taurus*, la structure de base présentée le plus souvent étant celle d'*E. Coli*. Pour chaque espèce, les sous-unités des ATP synthases sont nombreuses, avec une nomenclature qui peut varier selon les organismes. D'un point de vue général, l'ATP synthase est constituée de 8 sous-unités différentes : α, β, γ, δ, ε, a ,b, c , et formée de deux parties (fig.8) :

- F_0 ancrée dans la membrane, forme un pore de transport transmembranaire de protons et est constituée de 10 à 15 sous-unités membranaires « c », chargées négativement ainsi que des sous-unités γ et ε. C'est la force proton-motrice (gradient de protons) qui permet le flux de protons à travers le domaine F0 et qui déclenche la rotation de F_1 accompagnée par la phosphorylation d'une molécule d'ADP en ATP. Ce sont les 3

sous-unités β catalytiques qui sont responsables de la synthèse d'ATP. F0 est constitué également d'un pied périphérique contenant la sous-unité OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferral Protein).

- F1 au contact de la matrice est composée d'une tête globulaire qui contient 3 sites catalytiques α et β au niveau d'une partie fixe (dénommée stator) ainsi que les sous-unités ε, γ et δ au niveau du pied central rotatif (dénommée rotor). En l'absence de gradient de protons, F1 ne peut pas assurer la synthèse d'ATP mais uniquement son hydrolyse.

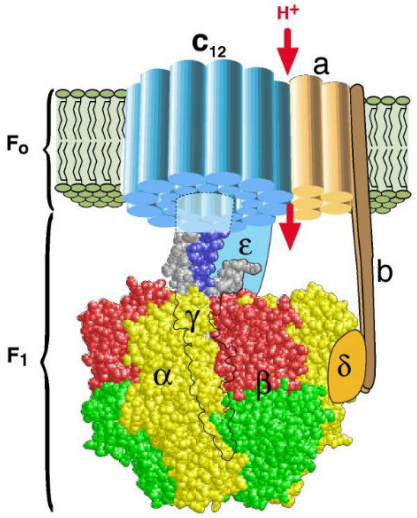


Figure 8. Structure de l'ATPsynthase (issu de (Wang and Oster 1998)

L'ATP synthase est souvent isolée sous forme monomérique, alors qu'elle forme une structure oligomérique dans la membrane interne à partir de dimères (fig.9). Ces dimères seraient potentiellement impliqués dans la régulation métabolique des mitochondries et des cellules et interagiraient physiquement avec le complexe IV. Bien que l'angle formé par les dimères soit variable, il est admis que ces dimères constituent l'unité physiologique du complexe V au niveau de la membrane interne (Thomas, Bron et al. 2008; Bernardi 2013) et que ces dimères sont responsables de l'incurvation de la membrane interne pour former les crêtes mitochondriales (Davies, Anselmi et al. 2012).

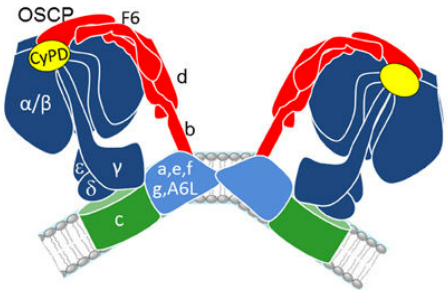


Figure 9. Représentation schématique des dimères FOF1 de l'ATP synthase. F1 (bleu foncé), FO (vert et bleu clair), et les sous-unités (rouge) sont illustrées à partir d'études structurelles récentes. (Strauss, Hofhaus et al. 2008; Baker, Watt et al. 2012; Davies, Anselmi et al. 2012).

Inhibition du Complexe V

Plusieurs molécules inhibitrices se liant sur les deux parties de l'ATP synthase ont été répertoriées:

- le DCCD et l'oligomycine inhibent le transport de protons à travers la partie F0 alors que plusieurs sites de fixation aux inhibiteurs ont été décrits sur la partie F1 :

- les sites catalytiques sont la cible des analogues non hydrolysables de l'ATP et des analogues covalents des nucléotides ;
- les deux sites de fixation de l'aurovertine ;
- le site de fixation de l'efrapeptine
- le site de fixation du peptide IF1 qui n'agit qu'en absence de force proto-motrice. IF1 se fixe entre les sous-unités de l'interface catalytique a b, ce qui bloque le cycle enzymatique en empêchant la rotation de l'enzyme. Lorsque la membrane est à nouveau énergisée, la rotation forcée de la sous-unité g dans le sens activité synthase décroche IF1 qui a donc une action unidirectionnelle.

Le bilan de l'oxydation phosphorylante dépend du nombre de protons pompés par les complexes I, III et IV, du nombre de protons utilisés pour synthétiser 3 ATP (une rotation complète de l'ATP synthase) ainsi que de l'utilisation d'énergie proton-motrice par la mitochondrie pour importer de l'ADP ainsi que du phosphate et pour exporter de l'ATP.

2.1.3. La théorie des supercomplexes

Historiquement, Chance *et al* ont décrit le premier modèle d'organisation supramoléculaire de la chaîne respiratoire (Chance and Williams 1955). Dans ce « solid-state model » les complexes sont liés physiquement les uns aux autres et les électrons sont transférés d'un

complexe à l'autre grâce à ce contact. En 1986, Hackenbrock *et al* remettent en cause cette première théorie et proposent un « random collission model », dans lequel les complexes sont isolés les uns des autres et l'échange des électrons se fait au hasard des collisions selon leur mobilité dans la bicouche lipidique (Hackenbrock, Chazotte et al. 1986). Ce modèle - nommé « liquid-state model » - a été admis jusqu'au développement de nouvelles technologies (par exemple la migration sur « blue-native page » ou BN-page, la microscopie électronique haute résolution, etc…). Celles-ci ont permis d'identifier des associations privilégiées et reproductibles de certains complexes entre eux ayant d'abord donné le terme de supercomplexes dont le respirasome (Lenaz, Baracca et al. 2010) et ont abouti à « the plasticity model » décrit par Acin-Perez (Acin-Perez and Enriquez 2014).

Les supercomplexes respiratoires ont été retrouvés chez plusieurs organismes eucaryotes et peuvent être classés en quatre groupes principaux présentés dans le tableau suivant proposé par Chaban *et al* (Chaban, Boekema et al. 2014).

Table 1
[a]Representation of respiratory supercomplexes in the various kingdoms of living organisms.

Organism		$I+III_2$	III_2+IV_{1-2}	$I+III_2+IV_{1-4}$	V_2	Refs
Plants	*Arabidopsis thaliana*	x			x	[14]
	Hordeum vulgare	x				[14]
	Phaseolus vulgaris	x				[14]
	Solanum tuberosum	x[b]	x	x	x	[14,15,28]
	Spinacia oleracea	x	x	x	x	[29]
	Nicotiana sylvestris	x				[87]
	Pisum sativum	x				[88]
	Helianthus annuus			(x)[c]		[89]
	Zea mays	x			x	[27,66]
	Asparagus officinalis	x	x			[30]
Algae	*Chlamydomonas reinhardtii*				x	[90]
	Polytomella sp.	x			x	[8,91]
Fungi	*S. cerevisiae*	-[d]	x	-[d]	x	[6,7]
	Yarrowia lipolytica	x[e]	x	x[e]	x	[20,92]
	Podospora anserina	x	x	x	x	[93,96]
	Neurospora crassa		x	x[e]	x	[97]
Protozoa	*Tetrahymena thermophila*	x			x	[63]
	Plasmodium falciparum				x	[94]
Animals	*Bos taurus*	x	x	x	x	[7]
	Homo sapiens	x	x	x	x	[95,98]

[a] Empty cells in the table indicate that the corresponding supercomplexes have not been discovered.
[b] In potato, two forms of $I + III$ supercomplexes occur, which have $I + III_2$ and $I_2 + III_4$ composition.
[c] In sunflower, a complex IV containing supercomplex of >1000 kDa was described, which probably has $I + III_2 + IV_{1-4}$ composition.
[d] The OXPHOS system of *S. cerevisiae* does not have complex I and, therefore, contains no $I + III_2$ and $I + III_2 + IV_{1-4}$ supercomplexes.
[e] In *Neurospora crassa* and *Yarrowia lipolytica*, a I_2 supercomplex was described.

Tableau 1. Les supercomplexes de la chaîne respiratoire dans différents organismes

Le supercomplexe I+ III_2 est retrouvé en majorité chez les plantes ; le supercomplexe I+III_2+IV_{1-4} constitue le respirasome , en abondance chez les mammifères et dont on retrouve un équivalent dépourvu de complexe I chez la levure (III_2+IV $_{1-2}$) ; le supercomplexe III_2+IV_2 existe chez les champignons. L'ATP synthase forme des dimères et constitue une chaîne oligomérique. Le complexe II est la seule enzyme de la chaîne qui n'est pas retrouvée dans les supercomplexes mais participe à la respiration et au cycle de Krebs. C'est le pool de CoQ qui permet les interactions entre les complexes I et II, notamment lors du flux reverse d'électrons, et les récents travaux de Efremov (Efremov and Sazanov 2011) et Baradaran (Baradaran, Berrisford et al. 2013) ont mis en évidence deux conformations différentes du complexe I dont l'une permet une meilleure accessibilité au site du CoQ lors du flux reverse.

Dynamique et rôle des supercomplexes

Acin-Perez *et al* (Acin-Perez and Enriquez 2014) ont mesuré une respiration du respirasome purifié grâce à une électrode de Clark et montré qu'il existait d'autres types d'associations entre les complexes I+III ou I+IV. Ces observations suggèrent que ces supercomplexes co-existent avec les complexes sous forme libre et que les associations entre complexes sont dépendantes des conditions physiologiques. Cette théorie définit le « plasticity model ».

Comme décrit précédemment dans le modèle « classique » de la chaîne respiratoire, les électrons sont transférés d'une enzyme à l'autre, et l'ubiquinone interconnecte les complexes I et III. Ces complexes I et III sont associés dans le respirasome de telle sorte que les sites de liaison de l'ubiquinone sont rapprochés d'une distance de 13nm (Lenaz and Genova 2009; Lenaz, Baracca et al. 2010). Le transfert d'électrons peut non seulement être accéléré, mais la perte d'électrons ainsi que la production de radicaux libres peuvent également être minimisés (Genova and Lenaz 2014).

Chaban *et al.* (Chaban, Boekema et al. 2014) proposent ainsi une nouvelle représentation de l'oxydation phosphorylante basée sur le « plasticity model » (fig.10).

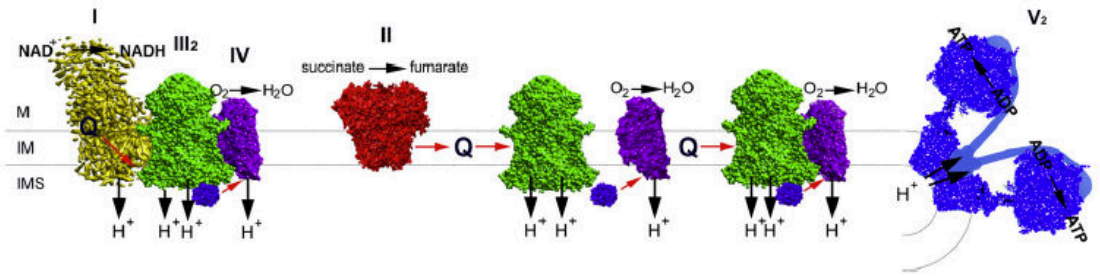


Figure 10. Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale selon le « plasicity model »

2.2. **Le Pore de Transition de Perméabilité**

Dans certaines situations, la membrane interne devient librement perméable à tous les composés de taille inférieure à 1,5kDA. Cette modification de la perméabilité appelée transition de perméabilité, est due à l'ouverture d'un canal non spécifique appelé le Pore de Transition de Perméabilité (PTP).

Sa structure moléculaire fait encore l'objet de débat. Il est admis que c'est un complexe multi-protéique régulé par des interactions protéines-protéines. Historiquement, la structure du PTP était décrite selon le modèle hexokinase/VDAC/ANT couplé à des récepteurs aux benzodiazépines et à Bcl-2. Plusieurs études ont montré que l'ANT n'était pas un constituant essentiel du PTP puisque celui-ci pouvait toujours être inhibé par la cyclosporine dans des mitochondries dépourvues d'ANT, ce qui prouve que l'ANT n'est pas un site de liaison de la cyclophiline D (Kokoszka, Waymire et al. 2004). De la même manière, d'autres études sur des souris VDAC-/- ont démontré que VDAC n'était pas du tout indispensable à l'ouverture du PTP ni à sa régulation (Krauskopf, Eriksson et al. 2006; Baines, Kaiser et al. 2007).

Le seul composant unanimement reconnu comme faisant partie du PTP est la Cyclophiline D, qui favorise la transition de perméabilité. Les autres composants restent hypothétiques. A défaut d'avoir identifié la nature moléculaire du PTP, sa régulation est relativement bien connue :

- le calcium est l'inducteur majeur de l'ouverture du PTP
- les autres principaux acteurs physiologiques de l'ouverture du PTP sont le phosphate, la dépolarisation mitochondriale et toutes les situations pro-oxydantes.
- l'inhibiteur pharmacologique de référence du PTP est la Cyclosporine A (CsA) qui agit en détachant la Cyclophiline D du reste du PTP.
- la Roténone et la Metformine, inhibiteurs du complexe I de la chaîne respiratoire, inhibent aussi l'ouverture du PTP.

En revanche, des études très récentes ont mis en évidence que le dimère de l'ATP synthase constitue le PTP mais avec une divergence au niveau du site : Alavian (Alavian, Beutner et al. 2014) affirment que c'est la sous-unité c qui est le PTP, alors que d'autres (Bernardi 2013; Giorgio, von Stockum et al. 2013), avaient démontré que le site de fixation de la cyclophyline D est le site OSCP au niveau de la tige latérale de l'ATP synthase, et propose le schéma de régulation du PTP suivant :

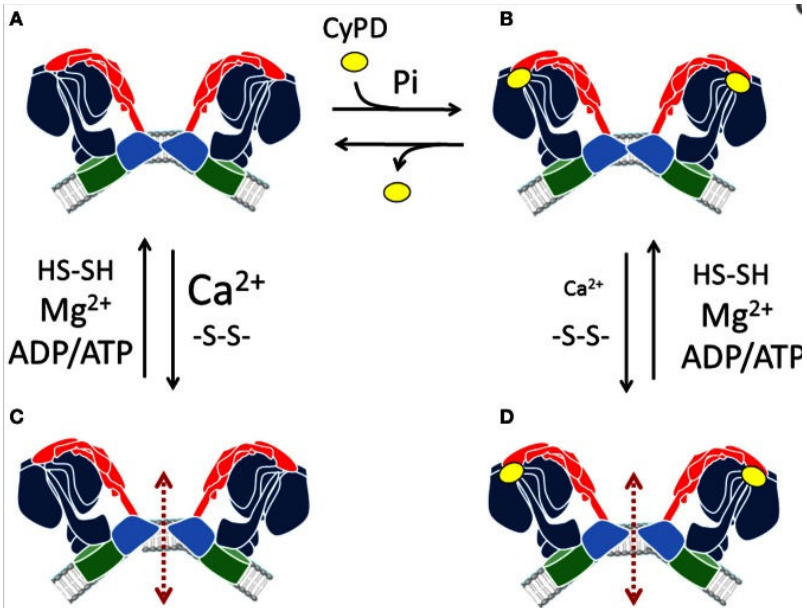


Figure 11. Transition hypothétique des dimères de l'ATP-synthase formant le PTP : les dimères de l'ATP-synthase peuvent former le PTP (A) quand le Ca^{2+} se lie à la place de Mg^{2+} sur le site catalytique, selon un processus réversible grâce à l'oxydation des thiols(C). La liaison de CyPD favorisée par le Pi (B) augmente l'accessibilité aux sites de liaison des métaux, permettant la formation du PTP à faible concentration de $Ca^{2+(}$D). Les nucléotides adényliques empêchent la formation du PTP en synergie avec le $Mg^{2+.}$ Les flèches rouges représentent le passage hypothétique des solutés entre les deux sous-unités F_0. (Bernardi 2013; Giorgio, von Stockum et al. 2013)

La mitochondrie est également impliquée dans le processus de mort cellulaire programmée, l'apoptose. En réponse à des signaux de stress, la mitochondrie va libérer du cytochrome c par un phénomène de perméabilité via le PTP. Le cytochrome c va alors s'associer à l'Apaf1 et la caspase 9 pour former l'apoptosome qui déclenchera la cascade d'activation des caspases conduisant à la mort cellulaire.

Dans les mitochondries isolées, il est établi que l'ouverture du PTP induit un gonflement des mitochondries, une libération de calcium, de cytochrome c et autres solutés et protéines pro-apoptotiques, également une sortie de NADH et NAD+ accompagnée d'une chute de potentiel mitochondrial(Fontaine, Eriksson et al. 1998) .

En utilisant un spectrofluorimètre qui mesure la diffusion de la lumière à travers un échantillon et sa fluorescence, des travaux précédents effectués au laboratoire (voir en annexe (Dumas, Argaud et al. 2009)) ont permis de vérifier expérimentalement ce gonflement mitochondrial de mitochondries isolées après ajout de calcium pour induire l'ouverture du PTP, et une diminution du signal de fluorescence du NADH (probablement due à son

oxydation) a été mesurée. Lorsque du NAD+ a été ajouté, soit avant, soit après avoir provoqué l'ouverture du PTP, le signal de fluorescence du NADH augmente, parce que le cycle de Krebs peut fonctionner et les capacités d'oxydation du NADH sont inférieures aux capacités de production.

Dans une cellule entière, le NAD+ est présent dans la cellule, tout autour de la mitochondrie, donc lorsqu'il y a ouverture du PTP, on peut s'attendre également à voir augmenter le NADH, ce que nous avons pu vérifier expérimentalement en imagerie (Dumas, Argaud et al. 2009).

2.3. Le Stress oxydant

En condition expérimentale de saturation en substrats et forte concentration d'O_2, environ 0,4 à 4% de l'oxygène n'est pas correctement converti en eau suite à des fuites électroniques résultant d'imperfections de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par réduction monoélectronique, l'oxygène donnera naissance à des espèces oxygénées activées (EOA ou ROS pour Reactive Oxygen Species) parmi lesquelles figurent des radicaux libres comme l'anion superoxyde ou le radical hydroxyle (OH°). D'autres entités non radicalaires de l'oxygène peuvent être produites comme le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou l'oxygène singulet.

Ces espèces réactives produites en quantité trop importante auront des effets néfastes en induisant un phénomène d'apoptose dans des cellules saines ou en activant divers gènes codant pour l'expression de cytokines pro-inflammatoires ou de protéines d'adhérence. Par ailleurs, elles seront capables de provoquer des dommages cellulaires importants en induisant des cassures et des mutations de l'ADN, en inactivant des protéines et des enzymes, en oxydant les sucres (glucose) ou en induisant des processus de peroxydation lipidique au sein des acides gras polyinsaturés des lipoprotéines ou de la membrane cellulaire.

L'utilisation d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire comme la roténone, le myxothiazol ou l'antimycine A a permis d'identifier les complexes I et III comme étant les principaux sites de production de ROS (Gusdon, Chen et al. 2009). Le complexe I produit de l'ion superoxide exclusivement dans la matrice mitochondriale alors que le complexe III en produit également dans l'espace intermembranaire. Les ROS tels que l'ion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène ou le radical hydroxyl résultent d'une réduction incomplète de l'oxygène. Au niveau du complexe I, le FMN est le principal donneur d'électrons à l'oxygène pour former l'anion superoxyde, ainsi qu'un centre Fer-Soufre. Lenaz et ses collaborateurs (Lenaz, Baracca et al.

2010) émettent l'hypothèse que le site FMN est exposé à l'oxygène uniquement quand le complexe I est dissocié du complexe III, conférant un rôle protecteur du supercomplexe I-III contre la production de ROS. De façon plus générale, ils proposent que des mutations génétiques ou des facteurs exogènes comme l'ischémie-reperfusion agissent sur la péroxydation lipidique de la membrane ce qui engendre une perte de l'organisation en super-complexes induisant un stress oxydant.

Même si les mitochondries sont les principales sources de production de ROS, d'autres radicaux libres sont présents dans le cytosol et doivent être pris en considération lors des mesures de production d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (ROS et RNS), comme le montre le schéma suivant :

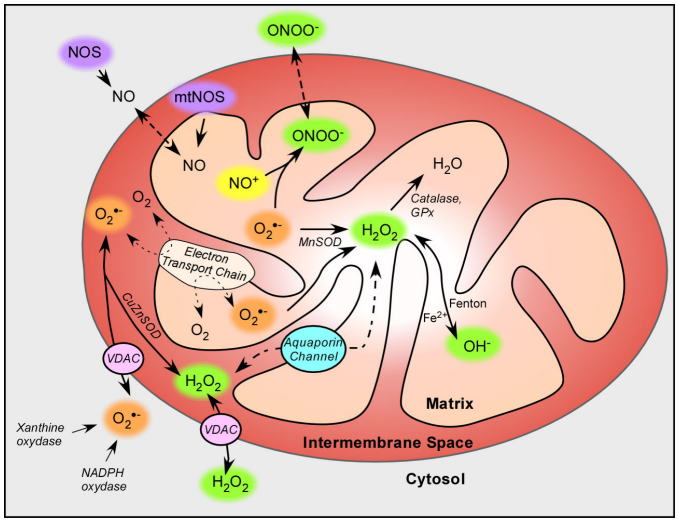


Figure 12. Les différentes espèces radicalaires produites par la mitochondrie (Cottet-Rousselle, Ronot et al. 2011)

3. L'AMPK, enzyme clé du métabolisme énergétique

(pour revue (Hardie, Schaffer et al. 2016)

3.1. Structure

L'AMP-activated protein kinase, AMPK, est une enzyme ubiquitaire de type sérine thréonine kinase. Sa structure révèle un complexe hétérotrimérique constitué d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ avec différentes isoformes (α1, α2, β1, β2, γ1, γ2 et γ3)(Fig.13). Les 12 combinaisons possibles de ces isoformes sont présentes dans

différents organismes ou tissus, et confèrent à l'AMPK différentes fonctions, d'où la complexité de la compréhension de son mode d'action et de son rôle physiologique. Elle intervient dans la régulation du métabolisme énergétique et a été décrite comme un senseur incontournable permettant l'ajustement précis des besoins et disponibilités énergétiques cellulaires (Foretz, Taleux et al. 2006).

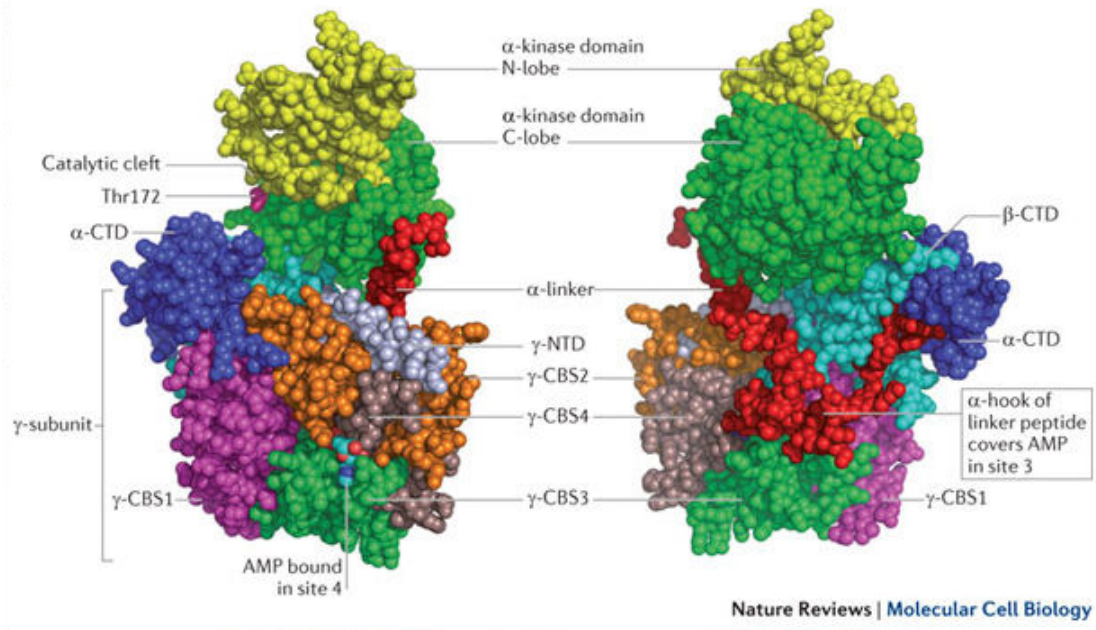


Figure 13. Structure de l'AMPK (Hardie 2011).

3.2. Régulation

L'activité de l'APMK répond de manière très sensible à de faibles variations de la concentration d'AMP qui induisent une activation allostérique. L'AMPK peut également être activée par phosphorylation de la Thr^{172} favorisée par la liaison de l'AMP.

Cette liaison de l'AMP protège également l'AMPK d'une déphosphorylation par les protéines phosphatases. Les protéines LKB1 et CaMKKb sont également capables de phosphoryler et d'activer l'AMPK.

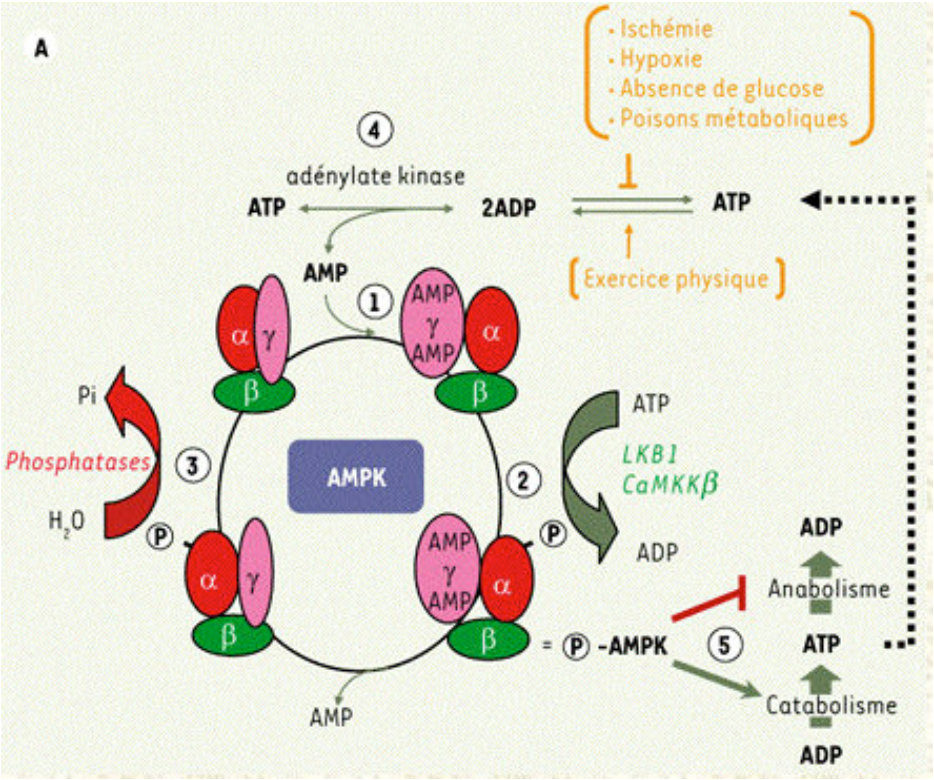


Figure 14. Schéma de régulation de l'AMPK d'après Foretz (Foretz, Taleux et al. 2006)
Source : http://biochimej.univ-angers.fr/

3.3. Fonction

Un équilibre énergétique se caractérise par un rapport ATP/ADP élevé. Un facteur environnemental peut perturber cet équilibre et faire chuter la production d'ATP, conduisant à une modification des rapports ATP/ADP et ATP/AMP par l'intervention de l'adénylate kinase. L'augmentation du rapport AMP/ATP détermine l'activation de l'APMK en réponse à un stress énergétique comme l'absence de glucose, l'exercice physique, l'ischémie ou l'hypoxie.

Au niveau hépatique, afin de réajuster la balance énergétique cellulaire, l'activation de l'AMPK inhibe les voies métaboliques consommatrices d'ATP et favorise les voies cataboliques productrices d'ATP. Activée par l'AICAR ou l'adiponectine, l'AMPK inhibe également la production hépatique de glucose en réprimant l'expression des gènes impliqués dans la néoglucogénèse (G6Pase et PEPCK).

Au niveau musculaire, l'AMPK agit sur l'expression de PGC1α qui contrôle la biogénèse mitochondriale.

L'AMPK inactive l'ACC (Acétyl-CoA carboxylase) en la phosphorylant. Cette enzyme catalyse la transformation de l'acétyl-CoA en malonyl-CoA, première réaction de la

biosynthèse des acides gras dans le foie et dans le tissu adipeux. Par cette inhibition, l'AMPK est donc responsable de l'inhibition de la synthèse d'acides gras dans ces tissus.

L'AMPK participe également à la régulation du métabolisme glucidique, en inhibant la glycogène synthase dans le muscle squelettique, ou en stimulant la glycolyse par phosphorylation et activation de la PFK-2.

En l'absence d'oxygène, la seule voie métabolique susceptible de produire de l'ATP est la glycolyse anaérobie, où l'énergie est produite à partir du glucose exogène et de la glycogénolyse. Dans cette condition de stress, l'AMPK joue un rôle de stimulation de la glycolyse pour fournir le minimum d'énergie nécessaire à la survie cellulaire. Les voies anaboliques consommatrices d'énergie sont également inhibées (Fig.15).

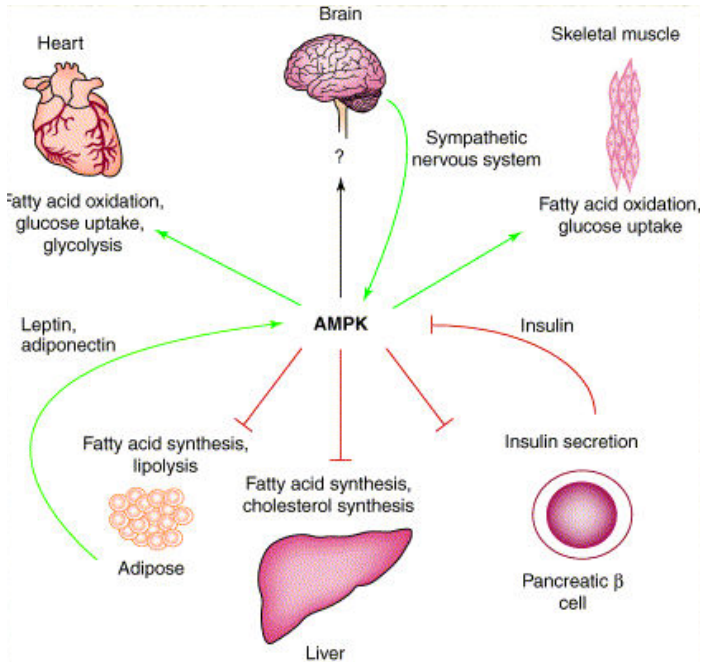


Figure 15. Schéma des voies métaboliques contrôlées par l'AMPK (Carling 2004)

Source http://biochimej.univ-angers.fr/

L'AMPK est une enzyme clé dans la régulation du métabolisme puisque son rôle est de maintenir la balance énergétique entre les processus de catabolisme et d'anabolisme. Elle agit par exemple au niveau de l'oxydation des acides gras, intervient dans l'inhibition de la biosynthèse de macromolécules et peut coordonner divers processus physiologiques tels que l'autophagie, la biogénèse mitochondriale, la division cellulaire (Hardie 2004; Reznick and Shulman 2006; Banko, Allen et al. 2011).

4. Les outils de mesure de la fonction mitochondriale

La mesure de la fonction mitochondriale repose sur différentes méthodes permettant d'évaluer à la fois le fonctionnement de l'oxydation phosphorylante, de l'activité des différents complexes à l'évaluation de la respiration, en passant par la production de radicaux libres, la production d'ATP ou l'activité du PTP.

4.1. Mesure de l'activité des complexes isolés

Ces mesures sont réalisées sur des préparations de mitochondries isolées ayant subi des cycles de congélation/décongélation permettant l'accès des substrats aux enzymes membranaires. Les mesures sont réalisées par spectrophotométrie en suivant les densités optiques des différentes enzymes correspondant aux complexes dont on veut mesurer l'activité (DO à 340nm pour le NADH par exemple) en présence de leurs substrats et/ou inhibiteurs spécifiques.

4.2. Mesure de la respiration ou oxygraphie

La consommation d'oxygène de mitochondries isolées est mesurée grâce à un oxygraphe constitué d'une chambre thermostaté munie d'une électrode de Clark.

L'état I correspond à une consommation d'oxygène basale ; l'addition de différents substrats de la chaîne respiratoire détermine l'état 2 ; l'ajout d'ADP permet d'obtenir la respiration à l'état 3 c'est-à-dire en condition phosphorylante ; l'oligomycine reflète une entrée passive de protons et détermine l'état 4 ; enfin l'addition d'un découplant (DNP) permet d'obtenir une respiration découplée de la synthèse d'ATP (fig.16)

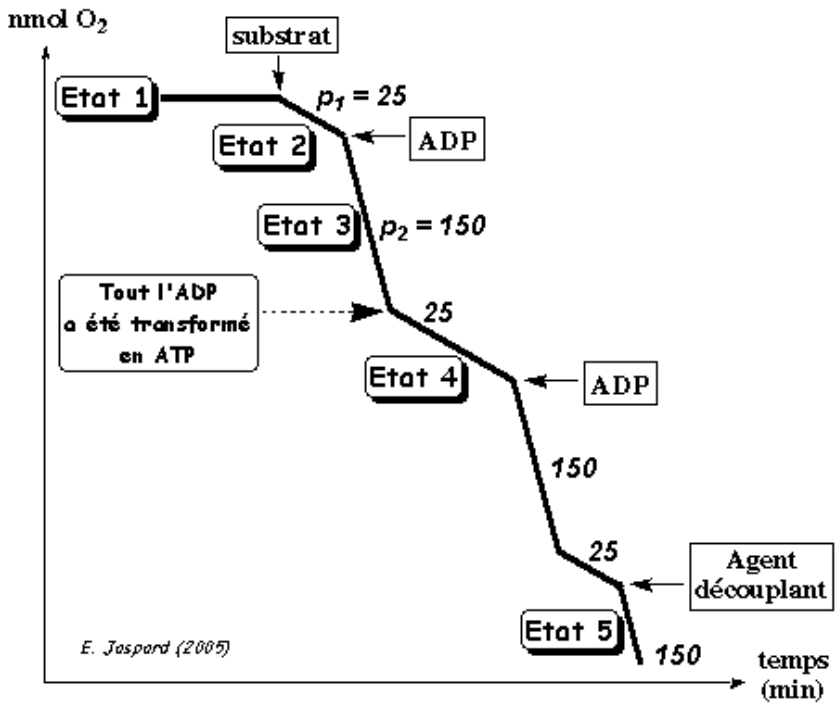


Figure 16. Les différents états de respiration mitochondriale

4.3. Mesure du rendement de l'oxydation phosphorylante : ATP/O_2

Le rendement de l'oxydation phosphorylante est apprécié par une estimation du rapport entre la vitesse de production d'ATP et la consommation d'oxygène par les mitochondries : cela traduit l'efficacité avec laquelle l'énergie d'oxydo-réduction est convertie en énergie chimique sous forme d'ATP. Ce rendement reflète à la fois la fuite de protons à travers la membrane interne mitochondriale (« leak »), le patinage des pompes à protons (« slipping ») et l'efficacité de l'ATP synthase.

Les mesures en parallèle de la respiration mitochondriale (par oxygraphie) et de la vitesse de phosphorylation de l'ADP permettent de déterminer ce rendement. Le résultat est exprimé en ratio ATP/O_2.

4.4. Mesure de production d'H_2O_2

La production de ROS par les mitochondries peut être estimée par la mesure de la libération d'H_2O_2 par fluorimétrie. Une sonde fluorescente Amplex Red est oxydée, en présence de peroxydase de radis noir (HRP), en Résorufine qui émet une fluorescence à

584nm après excitation à 560nm. La mesure de la fluorescence émise reflète la vitesse de production d' H_2O_2.

Cette mesure est là encore réalisée à partir de mitochondries isolées, en présence de différents substrats (état 2) et d'inhibiteurs des complexes I et III.

4.5. Mesure de la Capacité de Rétention calcique (CRC)

La capacité de rétention calcique est estimée par la quantité de calcium nécessaire et suffisante pour provoquer l'ouverture du PTP. La méthode repose sur la mesure de la fluorescence du Calcium Green, sonde fluorescence spécifique du Calcium extra-mitochondrial, qui ne diffuse pas au travers des membranes. Puissant inducteur de l'ouverture du PTP, le calcium est ajouté à doses fixes répétées à une suspension de mitochondries isolées. A chaque addition de calcium, une augmentation de fluorescence est observée avant de diminuer au fur et à mesure que le calcium est capté par les mitochondries. Lorsque l'ouverture du PTP survient, le calcium est libéré par les mitochondries et la fluorescence augmente fortement. La quantité de calcium utilisée pour déclencher cette ouverture détermine la capacité de rétention calcique.

Bien qu'utilisées en routine pour évaluer la fonction mitochondriale, l'ensemble de ces méthodes s'effectue sur mitochondries isolées, ce qui ne permet pas de prendre en compte l'ensemble des contraintes métaboliques environnantes.

4.6. Utilisation de sondes fluorescentes pour l'étude du compartiment mitochondrial

Les avancées technologiques combinées à l'émergence de sondes fluorescentes permettent d'étudier les mitochondries et leur activité sans altérer l'intégrité des cellules, aussi bien par cytométrie en flux que par imagerie. Ces sondes fluorescentes sont nombreuses et possèdent des caractéristiques particulières qui imposent des précautions d'utilisation. En effet, outre leurs propriétés spectrales, certaines sondes sont sensibles aux variations du potentiel membranaire alors que d'autres répondent à la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Le tableau suivant regroupe la plupart des sondes fluorescentes couramment utilisées pour étudier les mitochondries et leurs caractéristiques spectrales. Les caractéristiques, avantages et limites d'utilisation de ces sondes sont décrites par Cottet-Rousselle *et al.*(Cottet-Rousselle, Ronot et al. 2011).

NOM	Spécificité	Excitation max (nm)	Emission max (nm)
Mitotracker Green FM	Masse mitochondriale Non dépendant du Δψ	490	516
MitoFluor Green		489	517
Nonyl Acridine Orange		495	519
MitoFluor Red 589		588	622
MitoTracker Red 580		580	644
Mitotracker Deep red 633		644	665
Mito-ID Red		558	690
$DiOC_6(3)$	Dépendant du Δψ	484	501
Rhodamine 123		507	529
JC-1		514	529 ou 590
JC-9		522	535 ou 635
TMRE		549	574
TMRM		548	573
Mitotracker Orange CMTM Ros		551	576
Mitotracker Orange CM-H_2TM Ros		551	576
Mitotracker Red CMX Ros		578	599
MitoFluor Red 584		604	637
Amplex Red (=resorufin)	Détection de ROS (H_2O_2)	560	590
Famille des H_2DCFDA	Détection de ROS (H_2O_2, HOO^-, $ONOO^-$, OH^-, $O2^{-}$)	504	529
DAF-FM (DA)	Détection de NO^+	495	515
Dihydrorhodamine RhH_2	Détection de ROS (H_2O_2, HOCl, $ONOO^-$)	505	534
Dihydroethidium	Détection de ROS ($O2^{-}$)	355 (cyto) 518 (ADN)	420(cyto) 605 (ADN)
MitoSOX	Détection de ROS ($O2^{-}$ mitochondrial)	510	580
RedoxSensor Red CC-1	Détection de ROS (H_2O_2, HOO^-, $O2^{-}$)	540	600

Tableau 2. Exemples de sondes fluorescentes pour la mitochondrie et son activité

La spécificité des sondes fluorescentes envers les mitochondries dépend de leur capacité à entrer dans la mitochondrie en fonction de son état de polarisation : on distingue ainsi les sondes structurelles (liées uniquement à la masse mitochondriale) des sondes fonctionnelles dépendantes du $\Delta\psi$. Grâce à l'affinité de ces sondes envers certaines composants spécifiques des mitochondries (cardiolipines de la membrane interne mitochondriale ou autres protéines mitochondriales, résidus cystéine ou groupements thiols,…) l'intensité de fluorescence des cellules marquées est proportionnelle à leur contenu en mitochondries, ce qui permet donc d'évaluer la masse mitochondriale (Septinus, Seiffert et al. 1983; Maftah, Petit et al. 1990; Presley, Fuller et al. 2003). Cependant, des variations d'intensité peuvent résulter de modifications d'état métabolique ou d'organisation et de forme des mitochondries et non de variations de la masse mitochondriale (Mannella 2006). Par ailleurs, bien qu'étant décrites comme non-dépendantes du $\Delta\psi$, le marquage par certaines de ces sondes mitochondriales peut être influencé par des modifications de potentiel. Par exemple, le marquage par le Mitotracker Green nécessite une polarisation des mitochondries pour que la sonde entre dans ce compartiment : si les mitochondries sont inactives, dépolarisées ou découplées, le Mitotracker Green ne pourra pas atteindre son site de fixation dans les mitochondries. Cela implique qu'un marquage au Mitotracker Green ne pourra pas être réalisé sur des cellules fixées. Certaines sondes mitochondriales sont toutefois compatibles avec une fixation ultérieure des cellules si l'échantillon ne peut être observé immédiatement ou nécessite un co-marquage par immunofluorescence. Dans ce cas, le fixateur le plus adapté est le formaldéhyde. De plus, la sensibilité de certaines de ces sondes structurelles envers le $\Delta\psi$ peut dépendre du type cellulaire étudié. Aussi, il convient de réaliser des contrôles rigoureux pour tester les conditions expérimentales de concentration de sonde à utiliser d'une part, et d'effectuer des tests de réponse de la fluorescence en présence de découplants (FCCP ou CCCP) ou d'hyperpolarisation induite par la nigericine. Ces contrôles permettent d'évaluer la présence éventuelle d'artéfact de fluorescence liée à une sensibilité aux variations de potentiel non décrite.

Les sondes fluorescentes dépendantes du potentiel mitochondrial sont répertoriées en plusieurs familles :

- Les Rhodamines : Rhodamine 123, TMRE, TMRM ;

- Les carbocyanines : JC-1, JC-9, $DiOC_6(3)$;
- Les rosamines : les Mitotrackers dont orange, red et infra-red

Ces sondes cationiques s'accumulent et se localisent préférentiellement dans la matrice mitochondriale grâce au potentiel membranaire établit par l'équilibre de Nernst selon la formule suivante :

$$V= -RT/ZF \ln (Ci/Co)$$

V étant le potentiel membranaire, Z la charge ionique, R la constante de gaz, T la température absolue, F la constante de Faraday, Ci et Co les concentrations de sonde à l'intérieur et à l'extérieur de la cellule, respectivement.

Ainsi, puisque le potentiel théorique de la membrane plasmique est de -60mV et celui de la membrane mitochondriale de -180mV, il en résulte un différentiel de concentration de la sonde cationique entre les différents compartiments se traduisant par une accumulation d'un facteur 10 dans le cytosol et de 10 000 fois dans le compartiment mitochondrial.
Du fait de cette accumulation, des précautions d'utilisation de ces sondes cationiques doivent être respectées, notamment concernant la concentration limite au-delà de laquelle un quenching de fluorescence peut se produire en cas d'excès de sonde.
Par ailleurs, l'équilibre de Nernst étant réversible, une redistribution de la sonde dans les différents compartiments (cytosol et mitochondries) s'effectue lorsque le milieu d'incubation est remplacé par du milieu dépourvu de sonde. Ainsi, après un changement de milieu, le milieu ou tampon de remplacement après marquage par le TMRM doit contenir également de la sonde mais à une concentration correspondant à celle atteinte à l'équilibre, soit un quart à un tiers de la concentration initiale afin d'éviter une décroissance de l'intensité de fluorescence liée à un « lavage » de la sonde mais qui pourrait interprétée à tort comme une baisse de potentiel (Lemasters and Ramshesh 2007).

Pour la présente étude, nous avons choisi d'utiliser le Mitotracker Green pour révéler le compartiment mitochondrial, associé au TMRM pour le suivi des variations du potentiel membranaire. En effet, leurs différents spectres d'excitation et d'émission permettent de les utiliser conjointement en évitant un chevauchement (fig 17). De plus, le TMRM est décrit comme le plus spécifique du potentiel mitochondrial sans artéfacts liés à la présence de ROS (contrairement à la Rh123) ou d'effet sur la respiration (contrairement au DiOC6) et moins sensible au photobleaching que le JC-1 (Cottet-Rousselle, Ronot et al. 2011).

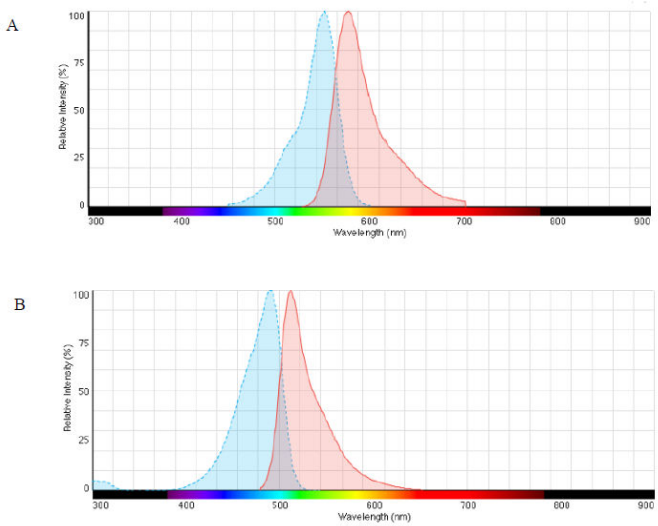


Figure 17 : Spectres d'excitation et d'émission du TMRM (A) et du Mitotracker Green (B). Issus de https://www.thermofisher.com

4.6. Visualisation du phénomène d'ouverture du PTP dans des cellules intactes.

La technique de référence pour visualiser par imagerie l'ouverture du PTP est basée sur l'utilisation de Calcéine-Cobalt (fig. 18)(Petronilli, Miotto et al. 1999). La calcéine est une sonde fluorescente perméante qui se diffuse dans toute la cellule où elle émet de la fluorescence tant que la membrane plasmique reste intègre. Par contre, le cobalt n'entre pas dans les mitochondries et quenche la fluorescence de la calcéine dans le cytosol, ce qui permet de révéler les mitochondries. Lorsque l'on provoque l'ouverture du PTP avec un ionophore au calcium, le cobalt diffuse alors partout, ce qui induit une distribution homogène de la calcéine puisqu'elle est alors décompartimentée. Pour prouver que cet effet est bien lié à l'ouverture du PTP, l'expérience est réalisée en présence de CsA qui prévient le phénomène de décompartimentation. L'expérience présentée sur la figure 18 a été effectuée pendant une courte durée (6 minutes), mais à long terme, même en présence de CsA, le PTP finirait par s'ouvrir. En effet, la CsA retarde son ouverture donc « l'inhibition » par la CsA signifie plus exactement qu'il faut davantage de calcium pour induire l'ouverture du PTP.

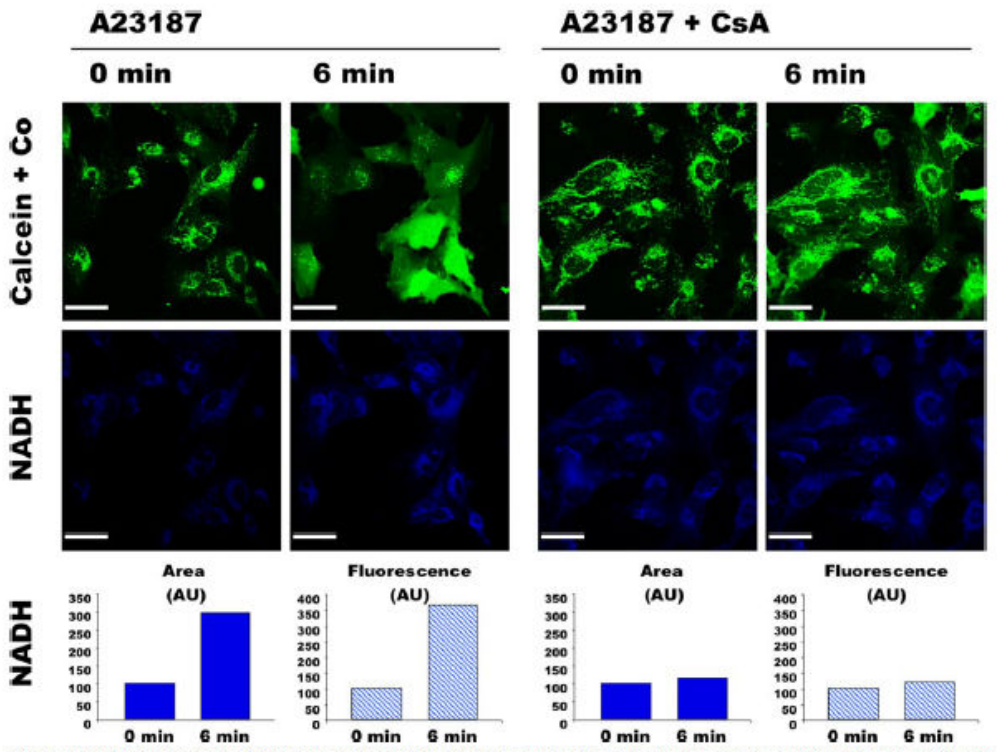


Figure 18 : Visualisation de l'ouverture du PTP induite par 0.05µM A23187, avec la technique Calcénie-Cobalt. Les cellules HMEC-1 sont incubées avec une solution de 0.25µM calcéine-8mM cobalt (fluorescence verte), avec ou sans CsA (1µM). L'autofluorescence du NADPH est recueillie parallèlement. Source (Dumas, Argaud et al. 2009)

Lors de cette expérience, l'autofluorescence du NADH a été parallèlement recueillie et la quantification du signal correspondant a révélé une forte augmentation lors de l'ouverture du PTP, prévenue par la CsA, ce qui va dans le sens de l'hypothèse évoquée dans le paragraphe 2.2. Cependant, bien que cette technique soit considérée comme la technique de référence pour la visualisation de l'ouverture du PTP, elle permet uniquement d'interpréter deux statuts du PTP : « ouvert » ou « fermé ». Cela ne permet pas de visualiser le phénomène d'ouverture transitoire du PTP ou flickering, durant lequel il y a libération de certains solutés sans diminution du potentiel membranaire mitochondrial, puisque ce dernier n'est pas mesuré.

Nous avons donc mis au point au laboratoire une nouvelle approche qui consiste cette fois à mesurer les variations de potentiel membranaire mitochondrial par la sonde TMRM, parallèlement à celles de l'autofluorescence du NADH, dans des conditions expérimentales similaires d'induction de l'ouverture du PTP (Dumas, Argaud et al. 2009). La première partie du présent travail a consisté à développé une méthode de quantification précise de ces signaux de fluorescence à partir de cette approche.

CHAPITRE II

ISCHEMIE-REPERFUSION et FONCTION MITOCHONDRIALE

CHAPITRE II

ISCHEMIE-REPERFUSION et FONCTION MITOCHONDRIALE

1. Définitions

Le fonctionnement physiologique des différents organes nécessite le maintien d'une oxygénation adéquate permettant un métabolisme normal.

L'ischémie, au sens médical du terme, correspond à un arrêt ou à une insuffisance de la circulation du sang dans un tissu ou un organe. L'accident ischémique peut induire des lésions dramatiques et laisser des séquelles indélébiles. De nombreux organes sont concernés : cœur, cerveau, reins, tube digestif, muscles, pancréas, etc…Cette situation est rencontrée au niveau des tissus où la circulation sera interrompue par des situations qui peuvent être multiples : thrombose, embolie, phénomène compressif, geste chirurgical, transplantation…

Un épisode ischémique se traduit par un appauvrissement - voire un manque total -de substrats énergétiques, accompagné d'une privation partielle ou totale d'oxygène, pendant une durée déterminée. Durant cette phase d'ischémie, une augmentation de la glycolyse accompagnée d'une diminution de pH (acidose) est observée, conduisant à des lésions tissulaires plus ou moins sévères.

La reperfusion correspond à la reprise d'une circulation sanguine suffisante dans l'organe ou le tissu, et au rétablissement de substrats. Lorsque la ré-oxygénation est restaurée, une aggravation de l'état initial est parfois observée selon la durée de l'ischémie, accompagnée d'une nécrose tissulaire. Cet effet paradoxal constitue le syndrome de reperfusion : « Oxygen paradox » ou « Reperfusion injury » pour les anglo-saxons.

L'interruption ou la réduction du flux sanguin induit des dégâts tissulaires qui sont le résultat de deux phénomènes : l'effet direct de l'hypoxie-ischémie suivi de l'effet indirect de la reperfusion-réoxygénation.

2. Mécanismes des atteintes cellulaires induites par l'ischémie-reperfusion

2.1. La phase d'ischémie

L'ischémie est à l'origine de modifications métaboliques, de syndromes inflammatoires et de la mise en place de facteurs d'adaptation ou de défense.

Ses effets sont maintenant bien documentés, et quelles que soient les situations à l'origine de l'ischémie, les mécanismes mis en jeu sont communs et recensés comme suit (Hicks, Hing et al. 2006) :

- Le manque de substrats et d'oxygène induit une perte des composés énergétiques tels que l'ATP. La glycolyse se fait par la voie anaérobie, ce qui permet de maintenir le fonctionnement des pompes ioniques pendant une durée limitée. L'utilisation des acides gras est interrompue.
- Les altérations ioniques sont à l'origine d'une accumulation intracellulaire de sodium, calcium et de protons. En effet, lorsque les pompes Na^+/H^+ et Na^+/K^+ dysfonctionnent, le sodium (Na^+) entre massivement dans la cellule. Parallèlement, le calcium (Ca^{2+}) qui n'est plus recapté par le réticulum par manque d'ATP, s'accumule dans le cytoplasme et altère la perméabilité mitochondriale. Cet excès de calcium est effectivement un des facteurs de déclenchement de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale (voir chapitre I).
- L'atteinte mitochondriale se manifeste par une altération de la phosphorylation oxydative, une transition de la perméabilité mitochondriale et une libération de cytochrome c qui engendre l'activation de la cascade des caspases. Ces facteurs sont tous reconnus comme inducteurs de l'apoptose (Suleiman, Halestrap et al. 2001).
- L'activation d'enzymes, telles que des protéases, Nitric Oxyde (NO) synthase, phospholipases ou endonucléases, provoque des lésions du cytosquelette, de l'ADN et des membranes cellulaires, mécanismes déclencheurs de la mort cellulaire par apoptose ou nécrose.
- L'ATP se dégrade en AMP.
- La xanthine-déshydrogénase est convertie en xanthine oxydase par l'action de protéases calcium-dépendantes. Lors de la réoxygénation, la xanthine oxydase catalysera la réduction de l'oxygène en radical libre : l'anion superoxide.

2.2. La phase de reperfusion

Ce n'est qu'à la fin du siècle dernier qu'on a admis que, paradoxalement, durant la phase de reperfusion – bien que soient rétablies alors les conditions d'apport en énergie, oxygène et pH – pouvaient se produire des lésions cellulaires graves (Park, Zhang et al. 1999).

Le paradoxe de la reperfusion dépend donc de l'oxygène et le calcium : si leur manque peut être initiateur de la mort cellulaire, leur apport soudain déclenche dans la cellule qui en a été privée une cascade d'évènements provoquant des dégâts cellulaires secondaires aggravant ceux apparus durant l'ischémie.

2.2.1. Modifications ioniques et altération de l'homéostasie calcique

Les dysfonctionnements des canaux transporteurs d'ions apparaissent aussi bien dans la membrane cellulaire qu'au niveau mitochondrial. La reperfusion provoque un changement du gradient osmotique qui attire l'eau et les électrolytes (Na^+, Ca^{2+}) à l'intérieur de la cellule, induisant un œdème cellulaire. L'échangeur Na^+/Ca^{2+} fait entrer une grande quantité de Ca^{2+} dans la cellule alors que la pompe SERCA du reticulum endoplasmique, dépendante de l'ATP, n'est plus apte à repomper ce calcium dans le reticulum. Cette élévation massive du calcium intracellulaire s'accompagne donc d'une fuite de sodium et de potassium. L'excès de calcium active le pompage par les mitochondries, ce qui les empêche de synthétiser l'ATP.

La pompe Na^+/K^+, dont le rôle est de maintenir l'équilibre des concentrations intracellulaires de sodium et potassium est inhibée par le manque d'ATP lié à l'ischémie.

Les canaux Na^+/H^+, dont le rôle est de maintenir le pH intracellulaire en expulsant les H^+, sont stimulés lors de l'ischémie, d'où une accumulation de Na^+ intracellulaire qui est ensuite échangé avec le Ca^+, aggravant encore son accumulation.

2.2.2. Stress oxydant

La plupart des études effectuées sur des animaux ou des organes prétendaient que le retour de l'apport en oxygène lors des premières minutes de la reperfusion déclenchait la production d'espèces réactives de l'oxygène (radicaux libres, ou ERO ou ROS) : radicaux superoxides ($O^{2\bullet-}$), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et RNS (espèces nitrées ou RNOS)

monoxyde d'azote (NO•) et peroxynitrites ($ONOO^-$) (chapitre I) (Garlick, Davies et al. 1987), (Henry, Archer et al. 1990; Zweier, Chzhan et al. 1994).

Plus récemment, d'autres travaux ont montré que des ROS étaient aussi produites en masse lors de l'hypoxie de cardiomyocytes isolés, durant laquelle la chaîne mitochondriale fournit un électron à l'oxygène résiduel pour former du superoxyde (Vanden Hoek, Shao et al. 1997).

Produites lors de l'ischémie puis de la reperfusion, les radicaux libres induisent donc une cascade d'évènements délétères incluant la peroxydation des lipides, le clivage des protéines et des dommages à l'ADN (fig.19) (Nelson, Case et al. 2005).

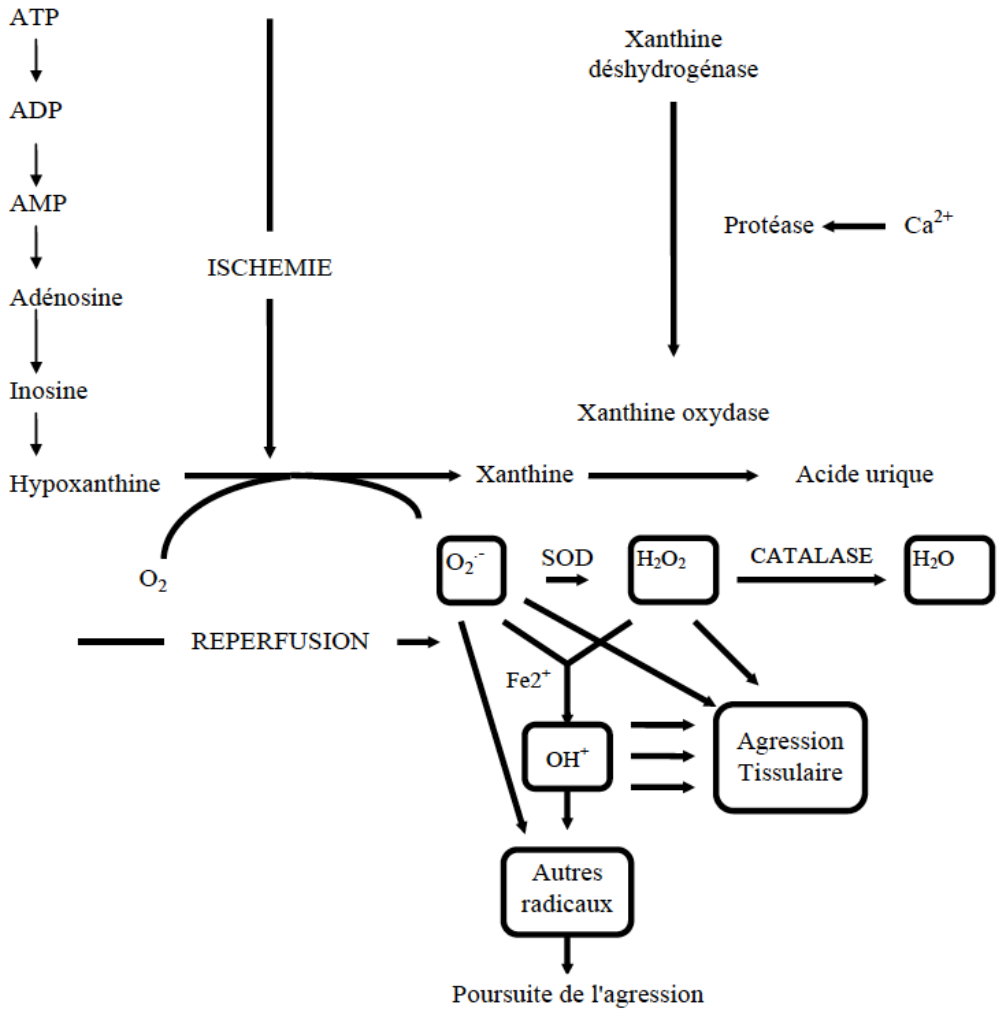


Figure 19 : Production de ROS lors de la reperfusion, d'après Bulkley (Bulkley 1994)

3. Situations cliniques d'ischémie-reperfusion

Comme cela vient d'être décrit, l'ischémie-reperfusion est responsable de nombreux désordres métaboliques, en particulier dus à des variations du contenu en ATP, à une surcharge calcique et à une production d'espèces radicalaires. La reperfusion est généralement la phase durant laquelle cette surproduction radicalaire est responsable de dysfonctionnements du tissu endothélial et d'une inflammation systémique. Une meilleure compréhension des altérations métaboliques consécutives à une ischémie-reperfusion devrait permettre d'envisager de nombreuses perspectives thérapeutiques. L'ischémie-reperfusion est un phénomène physiologique fréquemment observé en clinique, que ce soit dans les maladies thrombo-emboliques (infarctus du myocarde, accidents vasculaires), en chirurgie et clampage vasculaire (aortique, hépatique, orthopédique) ou encore lors des transplantations d'organes.

3.1. L'ischémie-reperfusion myocardique

L'infarctus du myocarde, communément appelé crise cardiaque, touche 120 000 personnes par an en France, et est responsable de 18 000 décès par an. Environ 10% des victimes décèdent dans l'heure qui suit, et le taux de mortalité à un an est de 15% (source Inserm).

L'infarctus du myocarde correspond à la destruction partielle du muscle cardiaque, déclenchée par l'obstruction d'une artère qui alimente le cœur en sang, donc en oxygène (artère coronaire). Cette obstruction est due à différents facteurs comme l'âge, la rupture de plaques d'athéromes (constituées de cholestérol et s'agrégeant sur la paroi des artères) formant un caillot libéré dans la circulation, réduisant ou interrompant brutalement le débit sanguin. Cette hypoxie-ischémie engendre la mort des cellules musculaires cardiaques sur une zone plus ou moins étendue, se manifestant par une insuffisance cardiaque voire l'arrêt du cœur. Une minute après l'interruption de l'apport en oxygène, le taux d'ATP s'effondre et la glycolyse passe en mode anaérobie, qui permet le travail des pompes ioniques, mais pas la contraction musculaire. Les foyers de nécrose ischémique apparaissent après 20 minutes d'arrêt circulatoire local.

La solution est alors de déboucher l'artère le plus rapidement possible après le début des symptômes, ce qui diminue la mortalité. Paradoxalement, cette reperfusion après l'épisode ischémique, supposée limiter les lésions myocardiques, contribue à l'aggravation des dégâts

cellulaires secondaires à l'occlusion cellulaire et compte dans l'étendue finale de l'infarctus. En clinique, cela se traduit par différents types de lésions (issu de PAC : précis d'anesthésie cardiaque) :

- La sidération myocardique (« stunning ») ; dysfonction contractile aigüe sans lésion cellulaire apparente, qui survient après rétablissement d'un flux coronaire normal ;
- La rigidification des myofibrilles, qui aboutit au « coeur de pierre » non contractile (« stone heart ») ;
- Le phénomène de no-reflow : incapacité à revasculariser une zone ischémique ;
- Les arythmies de reperfusion, le plus souvent des tachy-arythmies ventriculaires ;
- Les lésions de reperfusion léthales, qui entraînent directement la mort cellulaire.

Certains facteurs de risque d'athérome, et donc d'infarctus du myocarde, peuvent être corrigés : le cas du tabagisme, de l'hypercholestérolémie, du diabète, de l'obésité, de l'hypertension, du stress, de la sédentarité. D'autres facteurs sont non modifiables, comme l'hérédité cardiovasculaire, l'âge (risque augmenté après 55 ans) et le sexe. Avant la ménopause, les femmes ont quatre fois moins de risque de faire un infarctus que les hommes. La proportion de femmes jeunes aujourd'hui victimes d'infarctus du myocarde a toutefois tendance à s'accroître, notamment en raison de l'augmentation du tabagisme et de l'obésité chez ces dernières. Après la ménopause, les risques sont équivalents pour les deux sexes.

La prévention de l'infarctus du myocarde repose sur la connaissance de ces facteurs de risques modifiables, mais nécessite encore des investigations permettant de mieux identifier les causes des ruptures des plaques d'athéromes, de façon à limiter les infarctus voire d'empêcher leur survenue. La piste de l'inflammation et de l'immunologie de la plaque d'athérome est à l'étude, notamment pour déterminer si les cellules de la paroi artérielle desquamées qui circulent dans le sang avant l'infarctus pourraient servir de marqueur prédictif.

Les progrès thérapeutiques sont permanents, que ce soit dans la mise au point de stents en biomatériaux (évitant leur recolonisation par les cellules de la paroi artérielle et donc un risque de ré-obstruction) pour lesquels des essais cliniques sont en cours en France (ARTDIVA à Toulouse) ou de thérapie cellulaire visant à regénérer les zones lésées du muscle cardiaque par injection de myoblastes au niveau du cœur (cellules souches musculaires du patient qui deviendront des cellules musculaires matures capables de restaurer

la contraction du cœur au niveau des zones lésées). Bien que quelques patients aient pu bénéficier de ces techniques dans le cadre d'essais cliniques, celles-ci sont toujours en cours de développement par des équipes Inserm (P. Menasché à Paris, ou P. Lemarchand à Nantes)

D'autres pistes thérapeutiques s'intéressent davantage à prévenir les dégâts causés par la reperfusion.

Des études expérimentales datant de 1986 (Bernier, Hearse et al. 1986) sur un modèle de cœur isolé de rat soumis à 15 minutes d'ischémie par ligature de l'artère coronaire avant d'être reperfusé, ont mis en évidence que l'incidence des troubles du rythme à la reperfusion et sur la sidération myocardique était significativement réduite par l'utilisation de diverses substances ayant des propriétés anti-oxydantes. A l'inverse, l'utilisation de composés stimulant les réactions génératrices de ROS augmentent ces troubles. Pucheu et Coudray (Pucheu, Coudray et al. 1995) ont montré qu'une surcharge du tissu cardiaque en Fer, dont la présence favorise la réaction de Fenton génératrice de radicaux OH-, augmente la vulnérabilité du myocarde soumis à un épisode d'ischémie-reperfusion. Par ailleurs, ils ont montré qu'un régime alimentaire enrichi en oligo-éléments, agissant comme co-facteurs d'activité anti-oxydante impliquée dans les mécanismes de défense anti-radicalaire, a un effet cardioprotecteur, alors qu'une carence de ces mêmes oligo-éléments aggrave les lésions de la reperfusion. Ces oligo-éléments sont le Zinc, le Cuivre, le Manganèse et le Sélénium. En clinique, certains composés possèdent, en plus de leur indication privilégiée, des propriétés anti-oxydantes qui leur confèrent un effet protecteur vis-à-vis du syndrome de reperfusion. C'est le cas de la trimétazidine (cytoprotecteur) ou de l'indapamide (diurétique). D'autres agents de synthèse (allopurinol, oxypurinol, diméthylthiource, desferal,…) ou naturels (mannitol, vitamine C ou vitamine E) ou enzymes (superoxyde dismutase, glutathion peroxydase, catalase) ayant des propriétés anti-oxydantes ont fait l'objet de nombreuses études sur des modèles expérimentaux d'ischémie-reperfusion. Si les résultats expérimentaux étaient encourageants, l'administration exogène est un échec à plusieurs niveaux : demi-vie trop courte, administration parentérale, passage transmembranaire impossible du fait de la taille des molécules…Certains de ces composés entrent toutefois dans la composition de solutions de cardioplégie (technique médicale destinée à provoquer un arrêt de l'activité du muscle cardiaque afin de protéger le cœur au cours d'interventions chirurgicales cardiaques ou thoraciques) afin de prévenir ou limiter le stress oxydatif lié à la reperfusion.

Enfin, l'équipe Inserm dirigée par M. Ovize (Laboratoire Carmen, Lyon) a confirmé chez l'homme que le fait de déboucher l'artère par à-coups permet de limiter la nécrose du

muscle cardiaque liée à la reperfusion brutale et l'apport soudain en oxygène. Ce post-conditionnement permettrait de rendre le cœur plus résistant suite à l'infarctus ((Argaud, Gateau-Roesch et al. 2004). Ces chercheurs ont aussi montré que l'administration de la cyclosporine (médicament couramment utilisé comme immunosuppresseur) au moment de la reperfusion réduit de façon significative la taille de la zone nécrosée et ce de façon d'autant plus importante que l'infarctus est sévère. En effet, la cyclosporine est également connue pour être l'inhibiteur de référence de l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondriale, impliqué dans la production de ROS observée lors du phénomène d'ischémie-reperfusion (Cung, Morel et al. 2015). Malheureusement, leur étude clinique CIRCUS a produit des résultats négatifs et les raisons de cet échec sont en cours d'exploration.

3.2. L'ischémie-reperfusion cérébrale

Les Accidents Vasculaires Cérébraux, au nombre de 150 000 par an en France (soit 1 toutes les 4 minute)s et provoquant 62 000 décès représentent la première cause de handicap physique chez l'adulte et la deuxième cause de décès dans la plupart des pays occidentaux. L'âge moyen des individus touchés est de 68 à 70 ans, mais un AVC peut se produire à tout âge : 25% des AVC se produit avant 55 ans. Différentes classes de facteurs de risques ont été répertoriées : l'hypertension artérielle, la fibrillation auriculaire, l'arythmie cardiaque, l'alcoolisme chronique sévère et l'âge (augmentation de la rigidité vasculaire) sont des risques majeurs ; le diabète, le tabac, la prise d'œstroprogestatifs, les antécédents familiaux sont des risques moyens ; l'hypercholestérolémie, la migraine avec aura , l'obésité et la dépression sont des risques faibles voire discutés.

Il existe plusieurs mécanismes vasculaires à l'origine d'une ischémie cérébrale : le mécanisme embolique d'origine cardiaque, le mécanisme hémodynamique et l'atteinte des artères perforantes. Le terme d'Accident Vasculaire Cérébral (AVC) englobe ces trois mécanismes liés chacun à une perturbation de l'irrigation de certaines cellules du cerveau, conduisant à un déficit neurologique localisé. Les AVC sont classés en deux types en fonction de leur cause principale : les accidents ischémiques et les accidents hémorragiques.

Les accidents ischémiques représentent 80% des AVC, et sont provoqués par l'occlusion d'une artère cérébrale ou à destination cérébrale (artères carotides ou vertébrales), entraînant un infarctus cérébral. La cause de cette occlusion est souvent due à un caillot, un athérome obstructif ou une embolie, le plus souvent d'origine cardiaque. Une déchirure de la

paroi artérielle ou une compression par une tumeur peuvent aussi être à l'origine de cette occlusion. Les accidents hémorragiques sont dus à la rupture d'un vaisseau, ce qui engendre la formation d'un hématome. La formation d'un œdème autour de cet hématome augmente la compression du cerveau dans la boîte crânienne et donc l'hypertension intra-crânienne. Ce type d'accidents cérébral est plus communément associé au terme de rupture d'anévrisme.

Dans tous les cas, cette obstruction induit une diminution du débit sanguin dans le cerveau qui peut varier en fonction de l'état de dilatation ou de contraction des artères cérébrales selon l'âge, et l'existence de pathologies (diabète ou hypertension artérielle). Les artères cérébrales ont la capacité de mettre en place des systèmes d'auto-régulation du débit sanguin cérébral lorsque celui-ci atteint un seuil critique (inférieur à 50ml/min/100g de tissu cérébral). Le métabolisme tissulaire est altéré et des symptômes neurologiques apparaissent lorsque ce débit atteint 20ml/min/100g de tissu cérébral. L'activité électrique est nulle à l'électroencéphalogramme lorsque le débit passe sous le seuil de 15ml/min/100g de tissu. Ce silence électrique complet est réversible à condition que le flux artériel soit rétabli. N. Nighoghossian décrit la zone tolérée entre 15 et 20ml/min/100g de tissu comme la pénombre ischémique (Nighoghossian, 2005), et propose le schéma suivant (fig.20) où il est décrit que si l'état d'ischémie se prolonge et le débit devient inférieur à 10ml/min/100g de tissu pendant plus de 3 minutes, on atteint un stade de nécrose tissulaire.

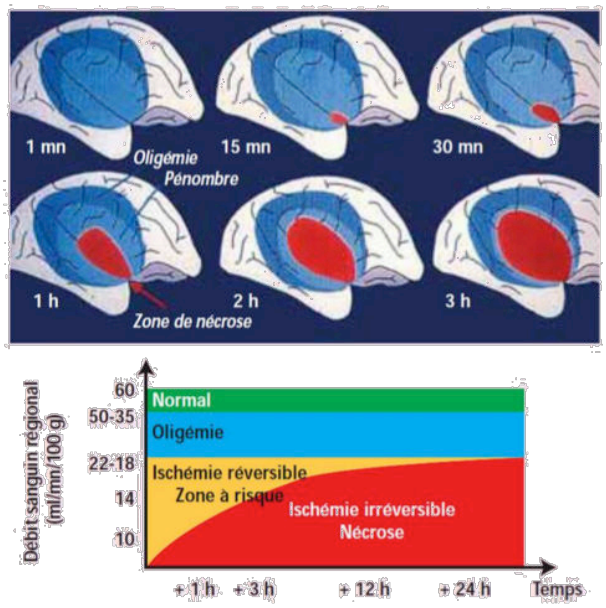


Figure 20 : Représentation schématique de la pénombre ischémique en neurologie selon N. Nighoghossian (2005).

Les lésions tissulaires causées par l'ischémie cérébrale ne se résument pas seulement aux effets directs de la privation en substrats énergétiques et en oxygène.

Le cœur de l'ischémie est le siège de la nécrose résultant de la mort cellulaire d'origine cytoplasmique liée à une libération massive de calcium, déclenchée par la déprivation énergétique et l'anoxie. Parallèlement, le déclenchement de plusieurs systèmes enzymatiques (tels que les protéines kinases, protéases, NO-synthéthase (NOS) est responsable d'une inhibition de la synthèse protéique, de la production de ROS et de l'altération des protéines du cytosquelette. Plus tardivement, la mort cellulaire qui se produit dans la zone de pénombre où persiste une perfusion minimale est liée à un processus apoptotique. Là encore, c'est l'augmentation de calcium qui va être le signal activateur de l'apoptose par l'activation de facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl2.

Comme il a été dit précédemment, les lésions engendrées lors de la zone de pénombre ischémique sont réversibles si le flux sanguin est rétabli. La reperfusion se présente donc comme un phénomène pouvant limiter les lésions neurologiques. Cependant, cette correction brutale de l'hypoxie va exacerber le stress oxydant déjà déclenché et va paradoxalement aggraver les lésions cérébrales (Dirnagl, Iadecola et al. 1999).

Les approches thérapeutiques proposées sont la prise soit d'anti-coagulants d'antiagrégants plaquettaires, de médicaments anti-hypertenseurs, voire un traitement neuro-chirurgical. L'utilisation d'agents pharmacologiques de type thrombolytiques fibrynolytiques permettant la dissolution du caillot sont utilisés en cas d'AVC ischémique, dont la prise en charge doit être effectuée dans les 90 minutes ou en moins de 4h30 maximum après les premiers symptômes. Cependant, même s'ils permettent une récupération plus fréquente et une diminution de la mortalité, la balance bénéfice-risque est discutée en raison d'effets secondaires potentiels d'hémorragie intra-crânienne.

Sanderson *et al* (Sanderson, Reynolds et al. 2013) ont confirmé le rôle des mitochondries dans la mort cellulaire lors de l'ischémie-reperfusion cérébrale. Leur modèle suggère que les altérations ischémiques de l'oxydation phosphorylante précèdent l'hyperpolarisation des mitochondries induite par la reperfusion, la génération de ROS et la perte de fonction mitochondriale et donc une baisse de production d'ATP. Ce manque d'énergie empêche l'ATP synthase de maintenir le potentiel membranaire mitochondrial par fonctionnement en mode inverse par hydrolyse d'ATP (phénomène qui se produit grâce à la glycolyse).

Le stress oxydant est associé au dysfonctionnement mitochondrial durant la reperfusion durant laquelle la production de ROS excède les capacités endogènes anti-oxydantes. Ainsi,

prévenir ou réduire les lésions cérébrales dues à l'ischémie-reperfusion en ciblant les ROS auraient pu constituer une stratégie d'empêchement de la mort cellulaire.

3.3. L'ischémie-reperfusion lors des transplantations d'organes

Selon l'Agence française de Biomédecine, plus de 18 000 patients sont en attente de greffes d'organe, et environ 5000 greffes sont réalisées par an. Tous les organes destinés à la transplantation proviennent de personnes ayant été victimes d'accidents de la route, d'AVC ou de crises cardiaques et considérés en état de mort encéphalique, et deviennent alors des donneurs potentiels d'organes considérées consentantes au don de leurs organes dès lors qu'elles n'y ont pas manifesté d'opposition de leur vivant. Selon la même agence, chaque année en France sont réalisées environ 2 500 greffes de rein, 900 greffes de foie, 320 greffes de cœur, 150 greffes de poumons, une centaine de greffes du pancréas et quelques greffes d'intestin. De nombreux obstacles conditionnent la réussite d'une transplantation d'organes, dont le rejet par réaction immunitaire, qui est maitrisé par traitement du receveur par des immunosuppresseurs.

Les lésions causées par l'ischémie-reperfusion sont également un paramètre majeur de la transplantation d'organes. En effet, ces épisodes d'ichémie-reperfusion apparaissent au cours des différentes étapes de chirurgie d'ablation de l'organe (lorsqu'un clampage est nécessaire), puis des conditions hypoxiques de son isolation et de sa conservation, et enfin de réoxygénation au moment de la reperfusion (Rauen and de Groot 2004)source http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/?sequence=12). Par ailleurs, la phase de réanimation du donneur, la mort encéphalique, les difficultés de prélèvement et les conditions de transplantation chez le receveur constituent autant de situations exposant l'organe au processus d'ischémie-reperfusion (Pratschke, Tullius et al. 2004; Bos, van Rijn et al. 2007).

Les conditions de conservation de l'organe ou du greffon consistent en général en une conservation dans une solution à 4°C afin de maintenir la viabilité des organes le plus longtemps possible jusqu'à la transplantation. La durée maximale d'ischémie est variable et dépend du type d'organe : si un cœur doit être ischémié au maximum pendant 6 heures, le rein peut attendre 24 à 36 heures. La durée de conservation est un des facteurs prépondérants à la reprise de fonction du greffon (Opelz and Dohler 2007). Hicks et ses collaborateurs ((Hicks, Hing et al. 2006) proposaient des principes essentiels de conservation reposant sur l'hypothermie à 4°C permettant une diminution du métabolisme de 50% par paliers de 10°C

de diminution de la temperature, et sur la composition d'une solution de conservation qui doit ressembler au milieu intra-cellulaire de l'organe, en étant hyperpotassique. Cependant, cet excès de potassium peut avoir des effets indésirables, notamment une chute d'ATP, créant des acidoses, et autres lésions vasculaires provoquées par des conservations prolongées (Dragun, Hoff et al. 2001).

Nous ne détaillerons pas dans ce paragraphe toutes les phases opératoires de transplantations d'organes, tant les situations sont nombreuses. Cependant, outre l'apparition de réactions immunitaires, inflammatoires lors de la transplantation chez le patient, il est primordial avant tout de prendre en considération l'importance des lésions du greffon liées à toutes les étapes opératoires dans lesquelles le processus d'ischémie-reperfusion est inévitable.
La figure 21 illustre les principaux mécanismes lésionnels rencontrés au cours des différents épisodes d'ischémie (froide puis chaude) puis de la reperfusion lors des étapes de transplantations. (Cette figure est issue d'un cours de DIU de transplantation d'organes du CHU de Poitiers, par T. Hauet)
Au niveau cellulaire, l'ischémie engendre une inhibition du métabolisme oxydatif, qui s'oriente alors vers une glycolyse anaérobie provoquant une augmentation de production d'acide lactique, une diminution de pH, des altérations du cytosquelette et autres activations de protéases qui conduisent in fine à la mort cellulaire. Cette inhibition du métabolisme induit également une déplétion en ATP, une chute du gradient électrochimique, une inhibition des pompes sodium/potassium et une augmentation de la concentration de calcium cytosolique. Ces évènements sont à l'origine d'une production de radicaux libres responsables d'un dysfonctionnement mitochondrial induisant également la mort cellulaire. Lors de la reperfusion, la réaction inflammatoire qui se produit est aussi un facteur de production de radicaux libres. Le « ré-apport » en oxygène réactive la voie hypoxanthine-xanthine qui était inhibée pendant l'ischémie, et qui transforme l'oxygène en superoxide. Ainsi la reperfusion aggrave la production radicalaire à l'origine du dysfonctionnement mitochondrial et donc de la mort cellulaire (Barrou et al., 2009). Toutes ces réactions désignent donc la mitochondrie comme acteur majeur des dégâts cellulaires induits lors de l'ischémie-reperfusion, par altération de la perméabilité associée à l'accumulation de calcium, ouverture du PTP, libération de cytochrome c, etc… ((Jassem, Fuggle et al. 2002; Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2015) .
Une meilleure connaissance et une meilleure compréhension du métabolisme permettrait d'envisager des pistes thérapeutiques adaptées à chaque type d'organe greffé, basées sur la

protection cellulaire contre la production de ROS et autres dysfonctionnements mitochondriaux liés à la privation de nutriments et d'oxygène lors de ces épisodes successifs d'ichémie-reperfusion. D'ores et déjà, quelques travaux ont proposé des stratégies de protection des greffons (cardiaques par exemple) et sont basés soit sur des mécanismes de protection endogènes (pré- ou post-conditionnement, consistant à réaliser soit des courtes périodes d'ischémie suivies de la reperfusion, soit des courtes périodes répétées de reperfusion après l'ischémie, respectivement) (Murry, Jennings et al. 1986) (http://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/92/?sequence=14) et ont permis d'améliorer la compréhension des facteurs mis en jeux notamment sur l'activation des canaux potassiques dépendants de l'ATP (Ambros, Herrero-Fresneda et al. 2007) ou le rôle de la sirtuin-3 sur la cyclophylin-D (Bochaton, Crola-Da-Silva et al. 2015)2015 #194].

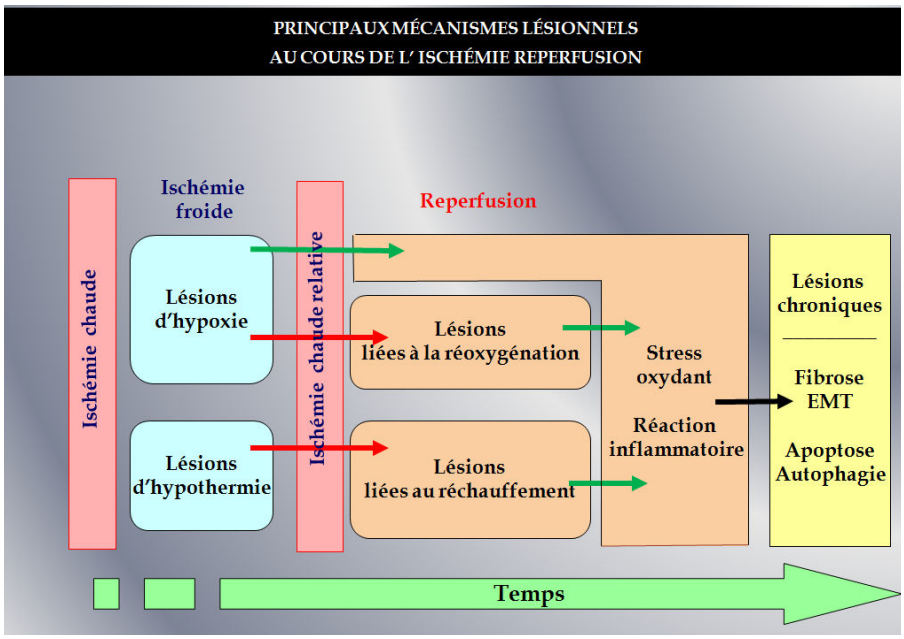


Figure 21 : mécanismes des lésions de l'ischémie-reperfusion lors de la transplantation d'organes.

(Source http://spiralconnect.univ-lyon1.fr/webapp/website/blank_page_content.html?websiteId=5128868&pageId=358748)

3.4. Ischémie-reperfusion et cellules cancéreuses

Le cancer touche 350 000 personnes par an en France et demeure la première cause de mortalité.Les cellules cancéreuses, alimentées en oxygène par la circulation sanguine, ont un métabolisme énergétique différent des cellules normales. Pour produire de l'énergie, sous forme d'ATP, elles transforment le glucose en lactate par la glycolyse anaérobie, même en présence d'oxygène. Cette caractéristique a été nommée « effet Warburg » (prix Nobel de

médecine en 1931). Les cellules tumorales sont très consommatrices de glucose afin de compenser le mauvais rendement de la glycolyse anaérobie, ce qui leur permet de maintenir une prolifération cellulaire intense. Le métabolisme énergétique varie selon le type de tumeurs, leur stade d'évolution, les gènes exprimés et le micro-environnement tumoral. Une modification du métabolisme est cruciale pour que les cellules cancéreuses puissent proliférer et migrer. Par contre, les cellules tumorales sont plus sensibles aux perturbations métaboliques. La plupart des cellules cancéreuses ont des mitochondries fonctionnelles. L'augmentation de leur activité nécessite une augmentation de l'uptake de nutriments, mais aussi une augmentation de la production de NADPH pour maintenir un équilibre redox. Il est important pour les cellules cancéreuses de maintenir un équilibre de production de ROS car leur production en trop grande quantité entraîne la mort cellulaire.

Les radicaux libres sont à l'origine de mutations de l'ADN et agissent sur les voies de signalisation impliquées dans la prolifération cellulaire, l'inflammation ou autres processus cellulaires responsables de l'évolution de cellules normales en cellules cancéreuses (Fiaschi and Chiarugi 2012). En effet, de nombreuses études ont décrit que les marqueurs de stress oxydant sont fortement exprimés dans divers cancers tels que les cancers du sein, de la prostate, du colon. Les ROS sont impliqués la prolifération cellulaire, dans l'invasion tissulaire la dissémination des métastases et l'angiogénèse des tumeurs (Fiaschi and Chiarugi 2012).

Comme décrit dans les paragraphes précédents, une des conséquences de l'ischémie-reperfusion est la production de ROS. Or, contrairement aux cellules normales, les cellules cancéreuses exploitent de ROS à leur avantage et les utilisent pour proliférer, pour leur angiogénèse, etc… tumeurs (Fiaschi and Chiarugi 2012).

Il est donc intéressant de s'interroger sur le lien entre cette production de ROS lors de l'ischémie-reperfusion et ses conséquences sur les cellules cancéreuses. Autrement dit : plusieurs questions sous-jacentes peuvent se poser :

> 1/ est-ce que les ROS produites pendant une ischémie-reperfusion peuvent être à l'origine de l'apparition de cellules cancéreuses ?

En ce qui concerne les tumeurs solides localisées, l'intervention thérapeutique consiste généralement en une chirurgie d'ablation (notamment pour le foie, le cancer colorectal, le sein…). Cette intervention constitue donc une situation d'ischémie-reperfusion qui va créer un environnement riche en ROS qui risque de favoriser la récidive ou la progression tumorale,

en accélérant la croissance de la tumeur et en favorisant la formation de métastases (van der Bilt, Kranenburg et al. 2005; Man, Ng et al. 2007; Ozaki and Todo 2007).

Pour l'instant, il n'y a pas d'études concernant le cancer de la vessie qui est pourtant largement répandu. Pour autant, on sait que l'ischémie-reperfusion lors de la chirurgie au niveau de la vessie induit des lésions des parois vésicales qui provoquent une baisse de la contractilité musculaire entraînant des rétentions d'urine (Lamonerie L. et Marret E. « la dysfonction vésicale post-opératoire MAPAR 2005).

Lors des chirurgies cardiaques, Alameddine et al (Alameddine, Visintainer et al. 2014)ont suivi une cohorte de patients pendant cinq ans et ont observé une augmentation du taux de développement de cancers associée à des procédures de revascularisation du cœur, provoquant une forte réponse inflammatoire par augmentation de l'activation des cytokines inflammatoires et aux lésions d'ischémie-reperfusion.

Concernant la chirurgie du foie, Orci et al (Orci, Lacotte et al. 2014) décrivent dans leur revue les risques de développement de cancer hépatique post-chirurgicaux, dus à l'apparition de facteurs angiogéniques suivant la phase d'ischémie. Ils soulignent l'importance de la prise en compte des lésions d'ischémie-reperfusion dans la stratégie thérapeutique pour améliorer la fonction de l'organe après transplantation et limiter le risque de développement de cancer.

2/ comment des cellules cancéreuses se comportent-elles en situation d'hypoxie ou d'ischémie-reperfusion ?

Du fait de leurs faibles vascularisation et oxygénation, les cellules cancéreuses ont un métabolisme glycolytique dans lequel un facteur de transcription HIF (Hypoxic-inducible factor) permet cette glycolyse, réduit la respiration mitochondriale et agit sur la régulation de pyruvate dehydrogenate kinase 1. De ce fait, les cellules cancéreuses survivent en hypoxie en maintenant leur production d'ATP et en bloquant la production de ROS, ce qui leur confère une capacité à résister au phénomène de mort cellulaire. Ce mécanisme apoptique faisant intervenir la mitochondrie et en particulier la perméabilité mitochondriale notamment à travers le PTP. Il existe un canal transporteur de nucléotides adényliques ATP, ADP, d'autres métabolites et se présentant comme régulateur du transport de calcium à travers la membrane

externe de la mitochondrie : il s'agit de VDAC ou voltage-dependent anion channel. Or, l'équipe de N. Mazure a identifié une forme tronquée de VDAC présente dans différents types de cellules cancéreuses, et a breveté l'utilisation d'un peptide VDAC1-S comme marqueur d'un phénotype de résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses hypoxiques (Patent WO2012156928A1) (Mazure 2017).

Même si la structure moléculaire du PTP est encore controversée et notamment sur le fait que VDAC fait partie de ce pore (voir chapitre I, paragraphe 2), Rasola et Bernardi (Rasola and Bernardi 2014) ont également suggéré que les cellules tumorales développent une résistance à l'apoptose par désensibilisation du PTP au calcium et à la production de ROS qui empêcheraient son ouverture. Ils proposent de cibler l'approche thérapeutique en utilisant des composés utilisés en chimiothérapie dont un des mécanismes d'actions serait de cibler le PTP en restaurant cette sensibilité et donc la capacité du PTP à s'ouvrir en présence de ROS et de calcium, permettant ainsi à la cellule d'enclencher le mécanisme apoptotique (Rasola et Bernardi 2014).

CHAPITRE III

LES TECHNIQUES d'IMAGERIE

CHAPITRE III
LES TECHNIQUES d'IMAGERIE

Ce chapitre vise à rappeler les notions nécessaires à la compréhension de l'approche méthodologique mise en œuvre dans ce travail, reposant essentiellement sur la fluorescence, la microscopie confocale, accompagnées de l'utilisation de biosenseurs développés pour mesurer une activité métabolique dans les cellules grâce à la technique de FRET. Enfin, le traitement et l'analyse d'images seront également abordés puisqu'ils constituent les principaux outils nécessaires au développement du programme créé dans ce projet et aboutissant à la quantification des phénomènes métaboliques observés.

6. La fluorescence : rappels

La fluorescence se définit comme une émission lumineuse provoquée par l'excitation d'une molécule par absorption d'un photon immédiatement suivie par une émission spontanée. Elle est donc liée à la capacité d'une molécule à absorber de l'énergie lumineuse, ce qui est observable pour les composés dont la structure possède des cycles aromatiques. Cette absorption fait passer la molécule d'un état stable, appelé état fondamental S_0 à un état électroniquement excité d'énergie plus élevée S_1, S_2,…Cet état est transitoire et les molécules retrouvent une meilleure stabilité en repassant à leur état fondamental. Cette désexcitation provoque une libération d'énergie qui peut se produire sous deux formes : l'émission d'un photon de manière très rapide produit la fluorescence ; le passage transitoire par un état triplet caractérise la phosphorescence, qui se produit lorsqu'une matière émet de la lumière de façon continue après avoir été éclairée. Le diagramme de Jablonski schématise ces 2 phénomènes de luminescence (fig. 22). Le Transfert d'Energie de Resonance de Forster (FRET) fait partie des phénomènes de désexcitation non radiative. La phosphorescence se caractérise par des transitions électroniques entre l'état triplet excité et l'état fondamental. Dans ce cas, la durée de vie à l'état excité est plus longue.

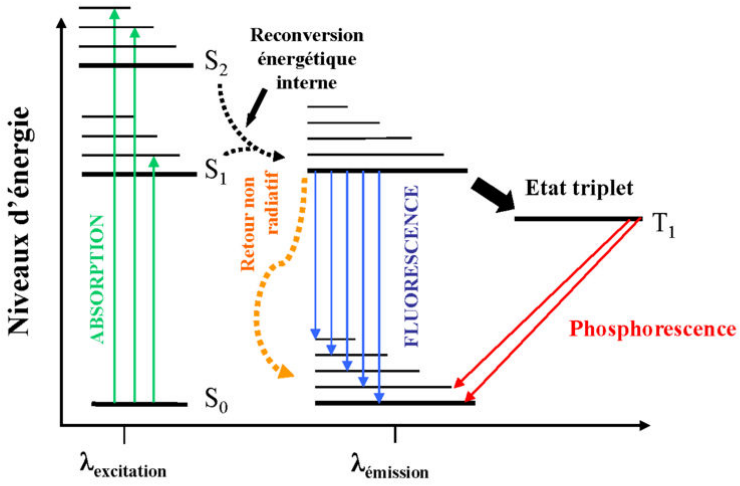


Figure 22. Diagramme de Jablonski

Le phénomène de fluorescence est lié non seulement à la structure moléculaire, mais il dépend également de l'environnement de la molécule (pH, Température, présence de métaux ou d'oxygène dans le milieu…).

L'énergie emmagasinée par un photon est inversement proportionnelle à sa longueur d'onde. Du fait de sa dissipation, l'énergie émise est plus faible que l'énergie excitatrice, et comme $E=hc/\lambda$, la longueur d'onde d'excitation est toujours inférieure à la longueur d'onde d'émission. La distance entre les maxima d'excitation et d'émission définit le Déplacement de Stokes.

L'intensité de fluorescence est directement liée à l'intensité de l'excitation et aux capacités d'absorption du fluorochrome à la longueur d'onde choisie.

Ainsi, un fluorochrome se caractérise par plusieurs propriétés, qui peuvent constituer des critères de choix :

- chaque fluorochrome se définit par son spectre d'excitation et son spectre d'émission ;
- Le rendement quantique d'un fluorochrome correspond au rapport entre la quantité de photons absorbés et la quantité de photons émis. Il dépend de la concentration de fluorochrome, du pH, de la concentration ionique et de la longueur d'onde d'excitation. Plus son rendement quantique est élevé, plus un fluorochrome sera capable d'émettre de la fluorescence dans des conditions d'excitation faibles.
- L'accessibilité au sein de la cellule diffère selon les fluorochromes : à l'exception des sondes fluorescentes « vitales » et perméantes, la plupart d'entre eux nécessitent une

fixation ou perméabilisation préalable des cellules pour atteindre leur cible. Les fluorochromes vitaux peuvent perturber les fonctions des cellules vivantes (cycle cellulaire, respiration,…) et ces effets doivent être pris en considération.

- La spécificité d'un fluorochrome détermine la détection d'un constituant cellulaire particulier (acides nucléiques, mitochondries, protéines, indicateurs d'ions, réticulum, etc…)
- Le Coefficient d'extinction correspond à la probabilité d'absorption d'un photon : plus il est élevé, plus la fluorescence est élevée, à intensité incidente et rendement quantique égaux.
- La Durée de Vie de fluorescence correspond au temps moyen qu'une molécule passe à l'état excité.
- La Photo-destruction (ou photo-blanchiment, ou photo-bleaching) correspond à une « usure » de la molécule qui, en fonction de la quantité d'énergie absorbée, ne sera plus capable d'émettre de la fluorescence.

7. La microscopie confocale

7.1. Principe

Le principe du microscope confocal a été décrit par Marvin Minsky en 1953, permettant de conjuguer le plan de la source lumineuse avec celui de l'image. Ce n'est qu'au début des années 1980 que les premiers microscopes confocaux ont été commercialisés et sont apparus dans les laboratoires. Le développement des technologies autour de l'imagerie (lasers, informatique, sondes fluorescentes…) connaît un tel avènement depuis la fin des années 1990 que la microscopie confocale est devenue un outil incontournable dans l'étude des systèmes biologiques, à l'échelle cellulaire, tissulaire ou encore à celle du du petit animal. En effet, ces nouvelles technologies permettent la compréhension de questions biologiques par des approches d'observation des structures, de leur localisation et de leur dynamique.

L'inconvénient majeur de la microscopie à fluorescence conventionnelle réside dans la perte de résolution axiale due à la superposition d'informations issues de différents plans de l'objet.

L'utilisation d'un laser comme source d'excitation permet de limiter la profondeur de champ et d'améliorer la résolution. Les diaphragmes de champ, du détecteur et du plan focal sont tous trois conjugués. Seule la lumière de fluorescence émise par le plan focal parvient au

détecteur, la fluorescence des objets situés en dehors de ce plan étant arrêtée par le « pinhole » faisant fonction de diaphragme du détecteur. Ainsi, seuls les objets situés dans le plan de mise au point contribuent à la constitution de l'image (fig.23). De ces caractéristiques découle la propriété majeure du microscope confocal : réaliser des sections optiques au travers de l'échantillon.

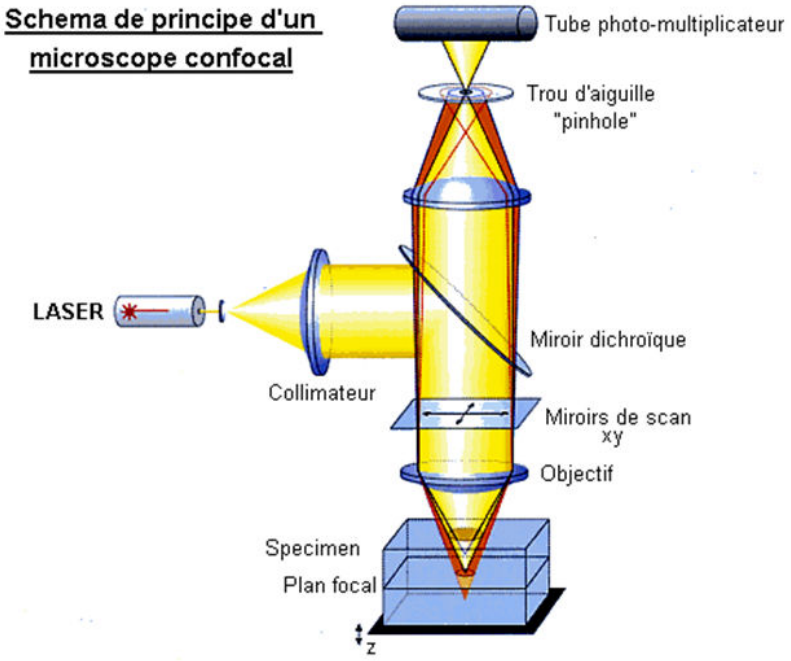


Figure 23 : Schéma de principe d'un microscope confocal

Les photons reçus par le photomultiplicateur sont convertis en électrons et contribuent à la formation d'une image numérique (fig.24) :

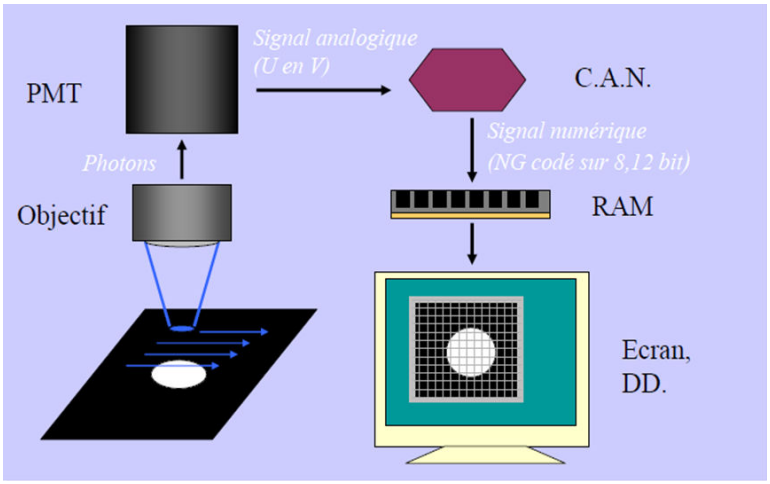


Figure 24 : Acquisition d'image et obtention d'image numérique

7.2. Vers les nouvelles technologies : les F-Techniques

De nombreuses applications autour de la microscopie confocale se sont développées pour déterminer les interactions entre protéines, ou leur localisation subcellulaire. La découverte de protéines naturellement fluorescentes a été à l'origine de l'essor de ces techniques.

7.2.1. Les protéines fluorescentes

Issue de la méduse *Aequorea victoria*, la Green Fluorescent Protein ou GFP a été isolée pour la première fois en 1962. Son gène peut être fusionné in vitro au gène d'une protéine d'intérêt. Le gène recombinant est ensuite réintroduit dans des cellules qui vont alors synthétiser la protéine chimérique fluorescente. Cette approche permet d'étudier les protéines dans leur environnement naturel : la cellule vivante.

La GFP sauvage a un pic d'excitation majeur à 400nm, et un pic mineur à 476nm. Dans la forme mutée de la GFP nommée eGFP (« enhanced GFP »), le pic prédominant d'excitation est porté à 488nm, permettant l'utilisation d'un laser bleu standard.
D'autres mutants de la GFP ont été développés avec des propriétés spectrales distinctes permettant une multiple utilisation au sein d'une même cellule (fig.25).

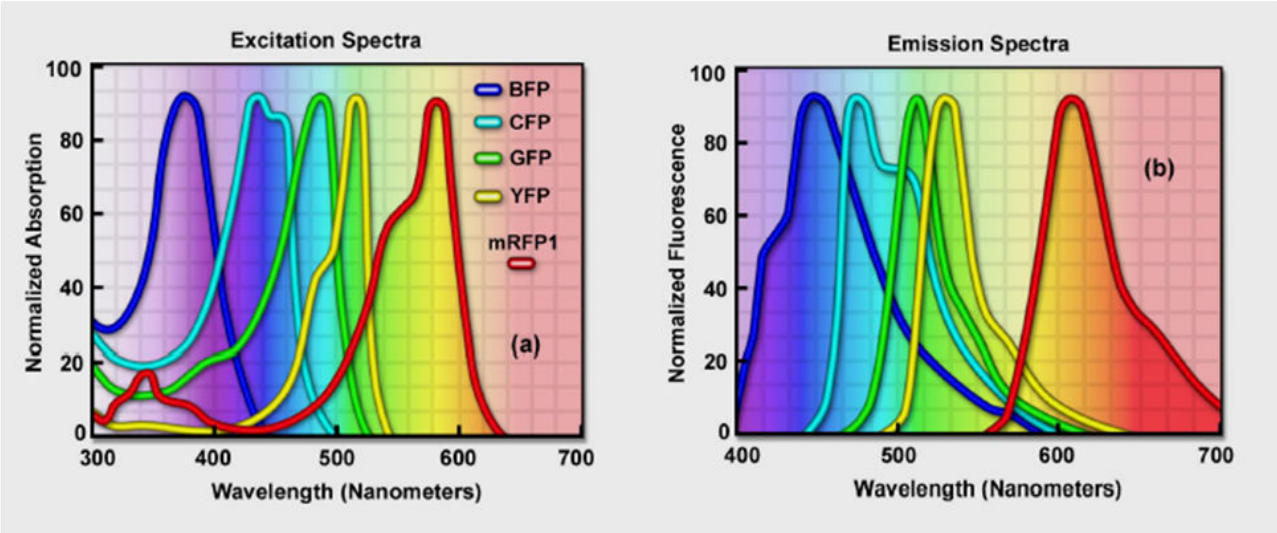


Figure 25 : Spectres d'excitation et d'émission des protéines fluorescentes dérivées de GFP

7.2.2. **Les F-Techniques**

Les F-Techniques sont issues de développements instrumentaux de la biophysique et ont pris leur essor grâce aux protéines fluorescentes dérivées de la GFP. La mise sur le marché d'instruments commerciaux ont rendu ces techniques incontournables pour étudier la dynamique de molécules d'intérêt (FRAP, FCS) ainsi que leurs interactions (FRET, FLIM). Seule la technique de FRET sera mise en œuvre au cours de cette thèse.

2.2.3. Le FRET

Définition

La désexcitation par FRET est le résultat d'une interaction entre deux composés fluorescents, le premier étant le donneur d'énergie et le second l'accepteur. Dès que le donneur a transféré son énergie, il retourne à son état fondamental et ce transfert d'énergie déclenche l'excitation de l'accepteur qui, en retournant à son tour à l'état fondamental, émettra alors un photon de fluorescence.

Plusieurs conditions sont requises à la réalisation de ce phénomène de transfert :

- Le donneur et l'accepteur doivent être des composés fluorescents ;
- L'énergie de transition en photon de l'accepteur doit être proche de celle du donneur. Autrement dit, le spectre d'émission du donneur doit recouvrir une partie du spectre d'excitation de l'accepteur (fig.26A);
- La distance entre le donneur et l'accepteur doit être inférieure à 100 Angström, soit 10 nm (fig.26 B) ;
- L'orientation des dipôles électroniques des chromophores doit être appropriée : le facteur d'orientation K^2 doit être compris entre 0 et 4. Cette orientation est cependant très difficile à estimer dans des processus dynamiques (fig.26C) ;

Förster a déterminé le taux de désexcitation par FRET, en fonction de la distance entre le donneur et l'accepteur (R, exprimée en Angströms), la durée de vie du donneur en absence de l'accepteur (*Td*), le facteur d'orientation pour l'interaction des deux molécules fluorescentes (K^2 avec K^2=2/3), le rendement quantique (Qd) du donneur en l'absence d'accepteur, l'indice de réfraction du milieu (n), et la distance de Forster (R_0) correspondant à la valeur de R pour laquelle l'efficacité de FRET est diminuée de moitié.

$R_0 = 8.79.10^3[Qd\ K^2n\text{-}4J\lambda]^{1/6}$

$$k_{Förster} = \frac{1}{\tau_D}\left(\frac{R_0}{R}\right)^6$$

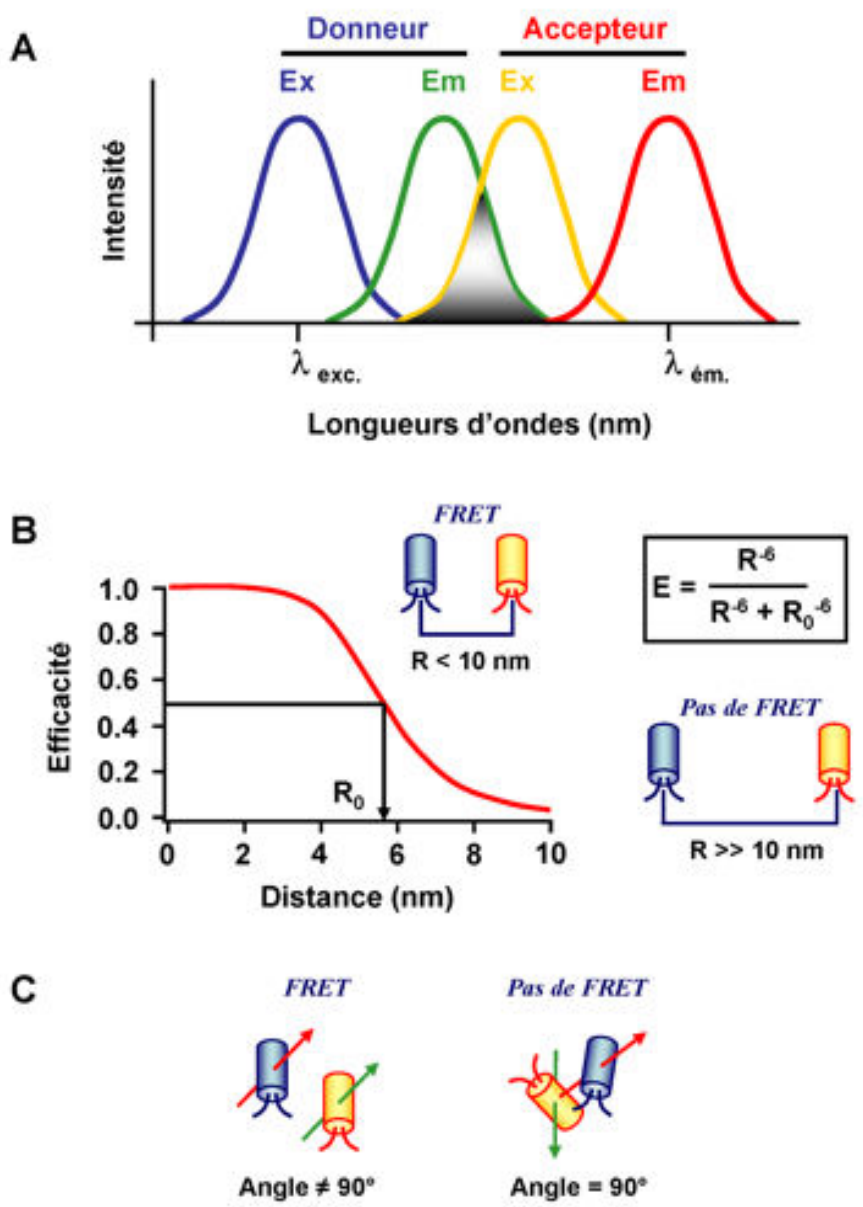


Figure 26 : principe et caractéristiques du FRET

Méthodes de mesure du FRET

Mesure de l'efficacité de FRET

L'efficacité de FRET se définit comme la fraction des molécules donneuses excitées qui transfèrent leur énergie à l'accepteur. Autrement dit, l'efficacité de FRET correspond à la quantité de fluorescence du donneur perdue au bénéfice du transfert d'énergie.

$E_{FRET} = (F_D - F_{DA})/F_D$

Où F_D est la Fluorescence du Donneur et F_{DA} celle de l'accepteur

Mesure de la durée de vie de fluorescence ou FLIM

Par définition du FRET, dès que le donneur a transféré son énergie à l'accepteur, il retourne à son état initial, ce qui a pour effet de diminuer sa durée de vie. L'efficacité de FRET peut alors également être estimée en comparant les durées de vie de vie de fluorescence du donneur en présence (T_{DA}) et en absence (T_D) de l'accepteur, donc de FRET :

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$$

Les mesures de temps de vie de fluorescence définissent la technique de FLIM ou Fluorescence Lifetime Imaging, ou Microscopie d'Imagerie en Temps de Vie de Fluorescence.

Cette technique consiste à mesurer les temps de vie de fluorescence d'un fluorophore pour chaque pixel de l'image. Ils ne sont alors plus détectés selon leurs longueurs d'ondes d'émission mais seulement selon leur temps de vie. Le principal avantage de cette technique découle du fait que le temps de vie de fluorescence est un paramètre intrinsèque qui ne dépend pas de la concentration en donneur et de la puissance d'excitation du laser.

La durée de vie de fluorescence peut être déterminée en utilisant une source d'excitation pulsée : quand la population de fluorophores est excitée par une succession de pulse d'excitations très courts, la fluorescence va décroître exponentiellement : on mesure le déclin de fluorescence. Lors d'un phénomène de FRET, la durée de vie du donneur diminue (fig.27).

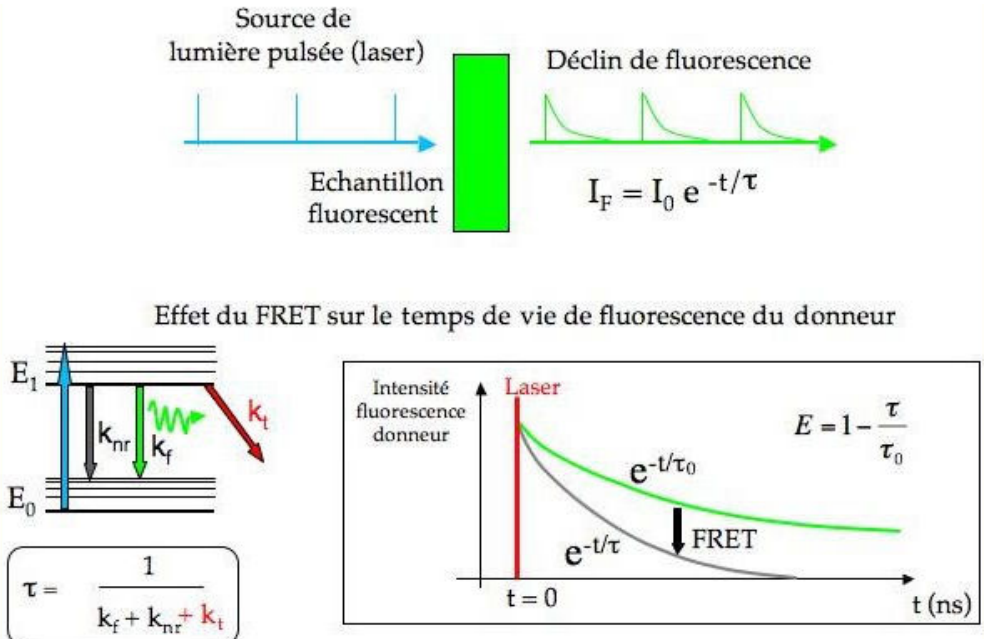


Figure 27 : Principe du FLIM

Ratiométrie

L'approche ratiométrique consiste à exprimer le résultat de FRET sous forme de ratio Fluorescence de l'Accepteur/ Fluorescence du Donneur.

Cette méthode est la plus facile et la plus largement utilisée puisqu'elle ne nécessite pas de laser pulsé. Cependant, la mesure des fluorescences émises doit être précise et spécifique des émissions attendues. Par exemple, il est possible de réduire les largeurs des bandes d'émission à quelques dizaines de nm de large autour de la valeur théorique du pic maximum d'émission. C'est cette approche qui sera mise en œuvre dans cette thèse.

3.2. Les Biosenseurs

Un Biosenseur se définit littéralement comme un indicateur biologique. Il constitue un outil adapté pour évaluer la présence de molécules ou mesurer des phénomènes biologiques. (Scheller, Schubert et al. 1991). La plupart des biosenseurs sont constitués d'une macromolécule telle qu'une enzyme, un anticorps, une séquence génétique codant pour une protéine, associés à un signal physique spécifique de la molécule en question, et adapté au système de détection. Ainsi, les techniques modernes de biologie moléculaire permettent de fabriquer génétiquement des biosenseurs, de les modifier et de les adresser à des zones d'intérêts de la cellule. Les protéines fluorescentes ont été intégrées dans la construction des biosenseurs qui occupent maintenant une part majeure dans la recherche en biologie cellulaire

grâce au développement de techniques de microscopie de fluorescence adaptées. Cependant, la compréhension de leurs caractéristiques mérite encore des investigations de façon à améliorer les caractéristiques de ces biosenseurs, notamment spectrales, mais aussi en augmentant leur brillance, leur photostabilité de façon à les rendre plus facilement détectables tout en réduisant leur sensibilité à l'environnement cellulaire (fig.28).

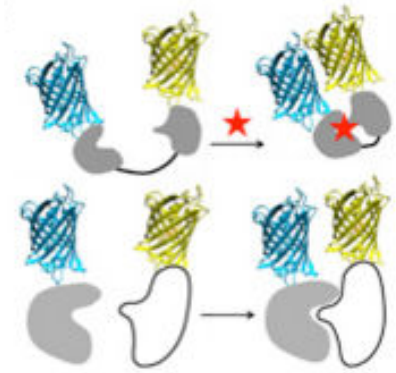


Figure 28 : représentation schématique du fonctionnement d'un biosenseur qui permet de détecter une interaction protéine-protéine, qui peut se produire lors d'un changement de conformation de ce biosenseur d'après (Merola, Fredj et al. 2014)

De nombreux travaux et revues proposent une large gamme de biosenseurs développés pour l'étude de paramètres biologiques (Palmer, Qin et al. 2011; Lindenburg and Merkx 2014). En collaboration avec Martin Pelosse dont l'objectif de travail de thèse a consisté à développer un biosenseur pour suivre l'activation de l'AMPK, nous avons également décrit dans une revue quelques biosenseurs adaptés à l'étude du métabolisme énergétique(Pelosse, Cottet-Rousselle et al. 2016) qui sont présentés dans le tableau 3.

Parameter	Biosensor name	Type	Fluorescent protein(s)	Reference(s)
Metabolite concentrations				
ATP	ATeam	FRET	mseCFP/cpVenus	Imamura et al. 2009
	GO-ATeam	FRET	mEGFP/mKOκ	Nakano et al. 2011
	QUEEN	sFP	cpEGFP	Yaginuma et al. 2014
ATP/ADP	Perceval	sFP	cpmVenus	Berg, Hung, et Yellen 2009
	PercevalHR	sFP	cpmVenus	Tantama et al. 2013
NADH/NAD+	Peredox	sFP	T-Sapphire	Hung et al. 2011
	Frex	sFP	cpYFP	Zhao et al. 2011
Glucose	FlipGlu	FRET	CFP/YFP	Fehr et al. 2003
	GBPcys	FRET	AcGFP1/mCherry	Veetil et al. 2010
	FLII12Pglu-700μδ6	FRET	CFP/Venus	Bermejo et al. 2010
Lactate	Laconic	FRET	mTFP-Venus	San Martín et al. 2013
Pyruvate	Pyronic	FRET	mTFP-Venus	San Martín et al. 2014b
Glutamate	iGluSnFR	sFP	cpGFP	Marvin et al. 2013
Ion concentrations				
Calcium	Cameleons	FRET	eCFP/eYFP; eBFP/eGFP; eCFP/cpVenus	Miyawaki et al. 1997; Nagai et al. 2004
	Pericams	sFP	cpeYFP	Nagai et al. 2001
	TN-XL	FRET	eCFP/cpCitrine174	Mank et al. 2006
	TN-XXL	FRET	Cerulean/Citrine	Mank et al. 2008
	GCaMP	sFP	cpeGFP	Tian et al. 2009
pH	ECFP, EYFP	sFP	ECFP, EYFP	Llopis et al. 1998
	pHluorin	sFP	GFP	Miesenböck et al. 1998
	mtAlpHi	sFP	GFP	Abad et al. 2004
	phRed	sFP	mKeima	Tantama et al. 2011
Electrical parameters				
Membrane potential	FlaSh	sFP	GFP	Siegel and Isacoff 1997
	hVoS2.0	FRET	GFP/dipicrylamine	Wang et al. 2010
	PROPS	sFP	proteorhodopsin	Kralj et al. 2011
	ArcLight	sFP	sepHluorin	Jin et al. 2012
	ASAP1	sFP	cpGFP	St-Pierre et al. 2014
	QuasAr2	sFP	archaerhodopsin 3	Hochbaum et al. 2014
	eFRET sensors	FRET	diff. GFPs/QuasAr2	Zou et al. 2014
	FlicR1	sFP	cpRFP (cpmApple)	Abdelfattah et al. 2016
Kinase activities				
AMPK	AMPKAR	FRET	eCFP/cpVenus	Tsou et al. 2011
	ABKAR	FRET	Cerulean3/cpVenus	Sample et al. 2015 Miyamoto et al. 2015b
	bimABKAR	FRET	Cerulean3 + YPet	Depry et al. 2015

Tableau 3 : Biosenseurs disponibles pour l'étude du métabolisme. Issu de Pelosse, 2016 #199]

Parmi ces biosenseurs, ATeam et AMPKAR seront testés au cours de ce présent travail de thèse.

ATeam a été développé par Imamura (Imamura, Nhat *et al*. 2009) pour visualiser les concentrations intracellulaire d'ATP et construit par insertion des protéines fluorescentes au niveau des extrémités N et C terminales de la sous-unité ε de l'ATPsynthase de Bacillus T. (fig.29 A). AMPKAR développé par Tsou et al., est activé en réponse à la phosphorylation du susbtrat de l'AMPK (fig 29B).

Ces biosenseurs nous ont été généreusement fourni dans le cadre de collaborations avec Imamura (Imamura, Nhat *et al*. 2009) (Tsou, Zheng et al. 2011).

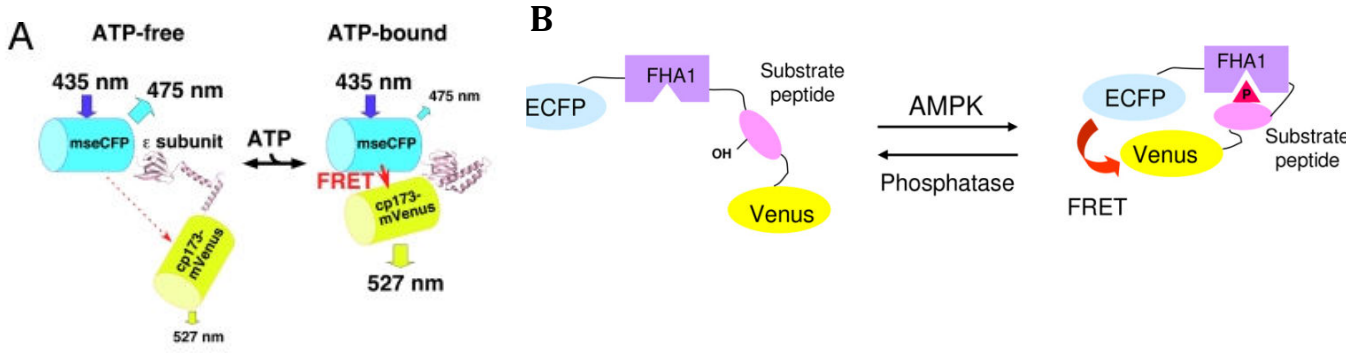


Figure 26 : Représentation schématique des constructions des biosenseurs ATeam (A) et AMPKAR (B) d'après (Imamura, Nhat et al. 2009). FHA1 : forkhead-associated domain1, site de liaison de la phosphothréonine.

4. Le traitement d'images

Le traitement des images a débuté dans les années 1970 pour répondre aux besoins des astronomes dans le but d'extraire des informations masquées dans le bruit de fond ou altérées par les défauts optiques des systèmes de mesure (bruit, distorsion, flou…)

Le traitement d'images, ou traitement d'un signal, a pour but d'améliorer la lisibilité des signaux et d'en faciliter leur interprétation. Ainsi, l'analyse d'images consiste à extraire des structures significatives du contenu de l'image de façon à en obtenir des mesures quantitatives.

3.1. Définition d'une image numérique

Comme en astronomie, les images obtenues par microscopie sont des images numériques, codées en 8 bits (2^8 = 256 niveaux de gris), 12 bits (2^{12}=4096 niveaux de gris) ou 16 bits (2^{16}=65 536 niveaux de gris). Une image numérique est une sorte de carte de pixels auxquels on peut attribuer des coordonnées X et Y ainsi qu'une valeur liée à leur luminosité, c'est-à-dire une valeur de niveau de gris. Ces valeurs de niveaux de gris peuvent être

représentées sous forme d'un histogramme de distribution, permettant de distinguer plus facilement les pixels correspondant au bruit de fond de ceux représentants les objets d'intérêt (fig.30).

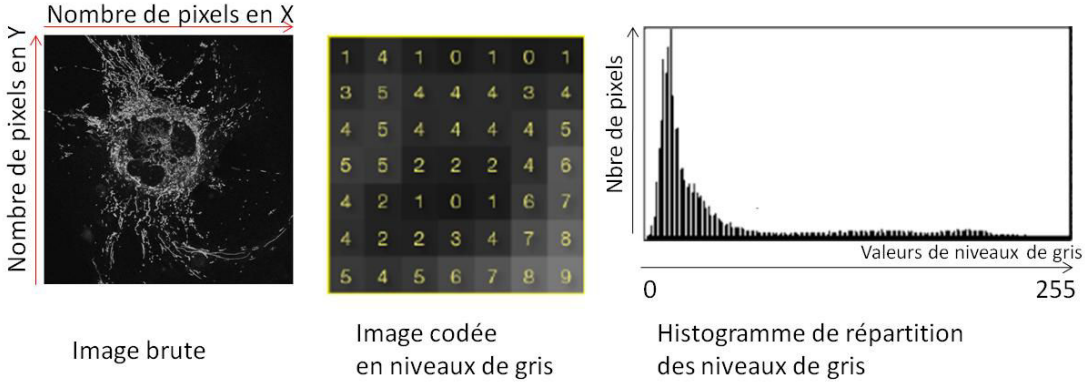


Figure 30 : Définition d'une image numérique

3.2. Définition et exemples de filtres de convolution

En mathématiques, la représentation sous forme de tableau de X colonnes et Y lignes définit une matrice. Il est alors possible d'effectuer des opérations entre plusieurs matrices (additionner, multiplier, etc…). Un produit de convolution est un opérateur mathématique permettant de multiplier des matrices entre elles. Dans le traitement d'images, il existe différentes matrices de taille plus petite (3x3 pixels par exemple) nommées « noyau de convolution » qui vont agir sur chacun des pixels de la matrice image. Appliquer un filtre de convolution consiste à multiplier chacun des pixels de la matrice image par le noyau : la valeur du pixel de la matrice image est multipliée par la valeur centrale du noyau, puis on additionne la valeur des produits des pixels adjacents (fig. 31).

100	100	100	100	100
100	100	100	100	100
100	100	**150**	100	100
100	100	100	100	100
100	100	100	100	100

*

0	-1	0
-1	5	-1
0	-1	0

=

100	100	100	100	100
100	100	50	100	100
100	50	**350**	50	100
100	100	50	100	100
100	100	100	100	100

Figure 31 : Exemple de convolution d'une matrice par un noyau 3x3

Dans cet exemple, tous les pixels ont une valeur de 100, sauf le pixel central à 150. La démonstration suivante est décrite pour le pixel central : l'application du noyau de

convolution au pixel central produit les valeurs suivantes : (150x5)+(-1x100)+(-1x100)+(-1x100)+(-1x100), les pixels des coins n'apparaissent pas puisque leur valeur est à 0.
Ce sont donc les valeurs contenues dans le noyau de convolution qui vont affecter l'image finale.
Il existe ainsi différentes sortes de noyaux de convolution, qu'on appelle également filtre de convolution, dont chacun aura un effet propre sur l'image à traiter, en fonction de ce que l'on souhaite corriger ou mettre en valeur pour une analyse plus approfondie.

3.3. Pourquoi et comment filtrer les images ?

En microscopie de fluorescence et confocale en particulier, les images obtenues en fluorescence ont un rapport signal sur bruit assez médiocre. En effet, la lumière obtenue est d'une intensité assez basse, nécessitant une optimisation du réglage du photomultiplicateur afin d'amplifier le signal. Ceci conduit à une contamination de l'image par différents types de bruit : le bruit poissonien lié à l'émission de photons, le bruit thermique gaussien lié à l'électronique du capteur et un bruit impulsionnel lié au parasitage des composants électroniques.
Différentes approches peuvent être mises en œuvre pour améliorer le rapport signal sur bruit, le moyen le plus simple étant d'augmenter le temps d'acquisition donc augmenter le nombre moyen de photons. Une autre approche consiste à enregistrer plusieurs images puis calculer une image moyenne dont la valeur d'intensité en un pixel donné sera obtenue en faisant la moyenne des intensités des pixels de toutes les images. Cependant ces approches peuvent induire une photo-dégradation de la molécule fluorescente puisque le temps d'exposition est augmenté.
L'alternative est donc d'utiliser des techniques de traitement ou de restauration d'images en utilisant différents filtres de convolution linéaire, voire en les combinant (fig.32).
Le tableau suivant regroupe les différents filtres les plus couramment utilisés et disponibles dans la plupart des logiciels de traitement d'images :

Filtre	Noyau	Rôle	Remarques
Passe-haut	$\begin{matrix} 0 & -1 & 0 \\ -1 & 5 & -1 \\ 0 & -1 & 0 \end{matrix}$	Améliore le contraste et les détails	Augmente le bruit granuleux dans l'image
Passe-bas	$\begin{matrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 4 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{matrix}$	Adoucit les détails	Réduit le bruit granuleux
Moyenne ou Mean	$\begin{matrix} 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \\ 1/9 & 1/9 & 1/9 \end{matrix}$	Remplace chaque pixel par la moyenne des valeurs des pixels adjacents	Aussi appelé « Smooth ». Comme le Gaussien, il peut induire un effet de flou
Median	$\begin{matrix} 12 & 22 & 18 \\ 15 & 35 & 28 \\ 24 & 12 & 17 \end{matrix}$	Les éléments de la matrice sont triés dans l'ordre croissant, puis la valeur originale du pixel est remplacée par la valeur médiane du noyau	Atténue les pixels isolés de valeur très différente de leurs voisins. Non-linéaire, il est efficace pour réduire l'effet « poivre et sel »
Gaussien	$\begin{matrix} 1/16 & 1/8 & 1/16 \\ 1/8 & 1/4 & 1/8 \\ 1/16 & 1/8 & 1/16 \end{matrix}$	Utilise la fonction gaussienne. Son effet est assez similaire au filtre moyenne, mais la moyenne est pondérée : les pixels du centre ont un effet plus important que ceux situés plus loin.	En général utilisé pour réduire le bruit, il altère la résolution spatiale et introduit un flou dans l'image, où les bords des structures et les détails fins ne seront pas préservés. Peut être alors combiné avec un Laplacien

Laplacien	$\begin{matrix} 0 & -1 & 0 \\ -1 & 4 & -1 \\ 0 & -1 & 0 \end{matrix}$ $\begin{matrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 8 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{matrix}$ $\begin{matrix} 1 & -2 & 1 \\ -2 & 4 & -2 \\ 1 & -2 & 1 \end{matrix}$	D'un point de vue mathématique, le Laplacien est une dérivée d'ordre 2, à 2 dimensions. Il existe 3 noyaux typiques.	Met en valeur des les détails qui ont une variation rapide de luminosité. Idéal pour mettre en évidence les contours, d'où son utilisation dans la reconnaissance des formes.
Minimum	Noyau 3x3	Remplace le pixel origine par la plus petite valeur des pixels voisins.	Correspond à une Erosion
Maximum	Noyau 3x3	Remplace le pixel origine par la plus haute valeur des pixels voisins.	Correspond à une Dilatation
Sobel	$\begin{matrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{matrix}$ $\begin{matrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{matrix}$	Utilise 2 noyaux, un pour l'axe horizontal et un autre pour l'axe vertical, combinés pour créer l'image finale	Comme Prewitt, Freeman et Kirsch, ce sont des filtres de gradient qui ont pour but de détecter avec la plus grande précision les contours.
Sharpen	$\begin{matrix} -1 & -1 & -1 \\ -1 & 12 & -1 \\ -1 & -1 & -1 \end{matrix}$		Accentue les pics d'intensité

Tableau 4. Exemples de filtres de convolution pour le traitement d'images

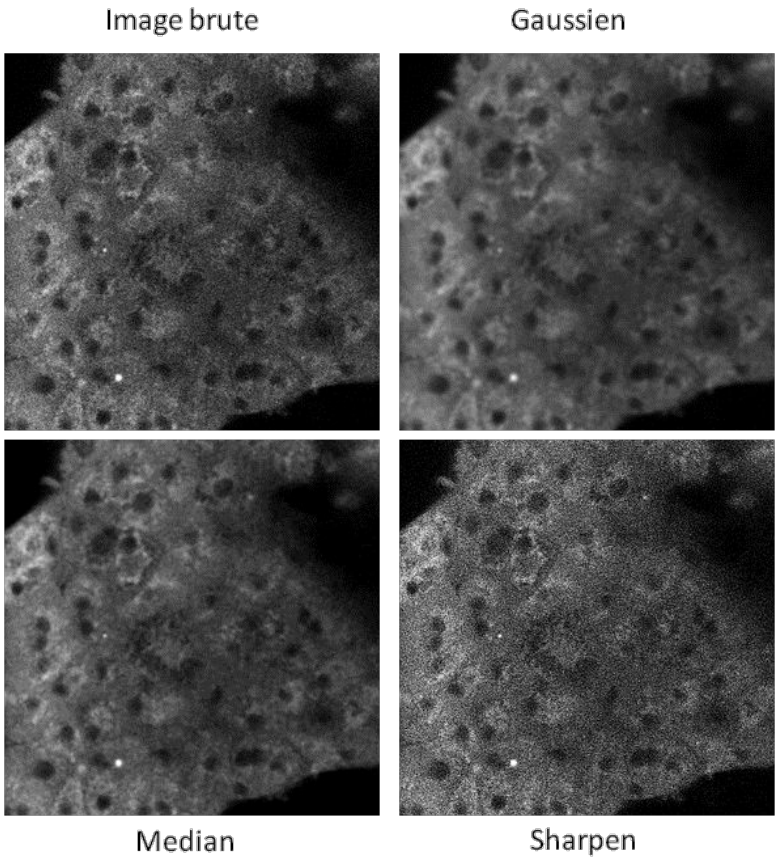


Figure 32. Exemples de traitement d'image par différents filtres de convolution, à partir d'une image brute d'autofluorescence de NADH de cellules endothéliales (images réalisées par l'auteur de ce manuscrit).

3.4 .Les étapes de l'analyse d'images

L'analyse d'images se définit comme une séquence d'opérations ayant pour but d'extraire les structures significatives d'une image numérique et d'en obtenir des mesures quantitatives et objectives. L'analyse d'images peut être précédée par une étape de traitement afin d'améliorer le rapport signal sur bruit, de restaurer le signal ou encore de contribuer à mettre en évidence les structures d'intérêt qui seront ensuite analysées voire quantifiées.
L'analyse d'images peut se décomposer en plusieurs étapes successives :

- La segmentation qui va déterminer les objets d'intérêt
- L'extraction des mesures de ces objets
- L'analyse des données.

3.4.1.La segmentation et extraction de masque binaire

La segmentation est une phase d'interprétation d'une image sous forme d'entités décrites en terme de régions et de contours. Elle porte sur l'élaboration de processus de détection.

La segmentation est de loin la phase la plus délicate de l'analyse d'images car elle doit permettre d'interpréter l'image aussi bien, voire mieux, que ne le ferait l'observateur. Cette étape conditionne la pertinence des mesures effectuées.

Il n'existe pas de méthode universelle de segmentation : à chaque type d'images correspond une approche spécifique.

Le rôle de la segmentation est de définir les zones ou objets d'intérêt dans une image, qui seront transformés en masque binaire. Le principe de segmentation repose sur un classement de pixels en 2 classes : ceux qui correspondent aux objets d'intérêt, et ceux qui englobe tout ce qui n'est pas considéré comme zone d'intérêt (pixels « fond »). Les pixels objets sont transformés en masques binaires, ou masque de segmentation, à partir desquels les mesures morphologiques et photométriques seront extraites. Dans un masque binaire, on considère que les pixels « fonds » ont comme valeur « 0 » et les pixels « objets » la valeur « 1 » (fig.33).

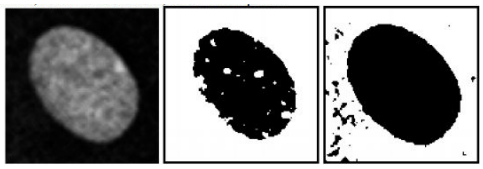


Figure 33. Exemples de segmentation d'image

3.4.2.Les transformations binaires

Les masques binaires obtenus à partir des segmentations décrites précédemment peuvent parfois contenir des imperfections (trous dans les structures, irrégularités dans les contours, éléments artéfactuels…). Ces masques doivent être corrigés avant d'être utilisés pour en extraire des mesures. Différents opérateurs morphologiques permettent de corriger ces anomalies en bouchant les trous, lissant les contours, séparant les objets, en les discriminant en fonction de leur taille etc… Les deux principaux opérateurs utilisés indépendamment ou en combinaison l'un avec l'autre sont l'érosion et la dilatation.

La transformation par morphologie mathématique vise à modifier la structure et la forme des objets de l'image, en modifiant la valeur d'un pixel de l'image en fonction de la valeur de ses voisins. Le principe de la morphologie mathématique consiste à comparer l'image à analyser avec un ensemble de géométrie connue appelé élément structurant.
L'élément structurant est un masque binaire composé de pixels blancs et de pixels noirs et est muni d'un point d'ancrage, aussi appelé « origine ». Un élément structurant est caractérisé par sa forme (de géométrie connue, telle qu'une croix, un carré, un cercle…) sa taille et son origine (fig.34).

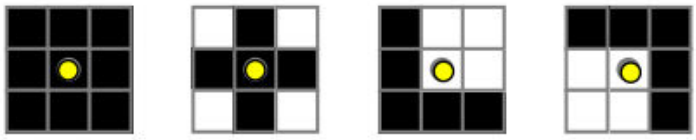


Figure 34 : Exemples d'éléments structurants

En fait, un élément structurant s'utilise comme une matrice de convolution, dont les valeurs « 0 » ou « 1 » sont disposées dans la matrice en fonction de la forme géométrique de l'élément structurant.

L'érosion

Pour chaque pixel de l'image binaire considéré individuellement, on regarde sa valeur et la valeur des pixels immédiatement voisins (c'est-à-dire ceux partageant une face avec le pixel considéré). L'élément structurant permet de définir ce voisinage pour chacun des pixels de l'image d'origine : les pixels voisins sont ceux ayant pour valeur « 1 » dans l'élément structurant. L'ensemble des pixels de l'image d'origine est alors balayé en appliquant l'élément structurant. Parmi ses valeurs, on recherche la plus petite. Puis, on remplace dans l'image résultat la valeur du pixel considéré par cette valeur minimum. La valeur d'un pixel après érosion est alors définie comme étant la valeur minimale de tous les pixels de son entourage. Pour une image binaire, si l'un des pixels voisins est à « 0 », la valeur de sortie du pixel est alors à « 0 ». Le résultat de ce traitement revient à transformer en « pixels fond » les pixels objets en contact direct avec des pixels du fond. L'érosion consiste donc à raboter les masques d'une couche de pixels (fig.35).

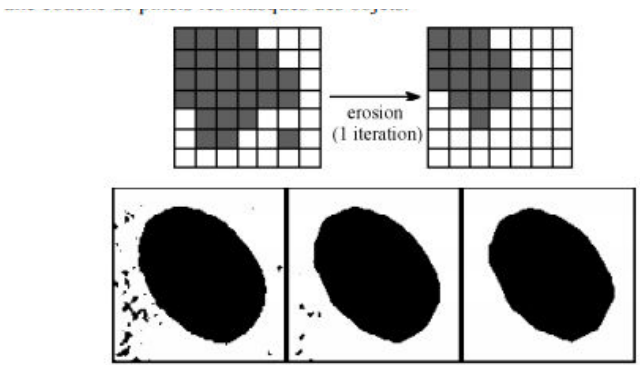


Figure 35 : Exemples d'érosion

La dilatation

Le principe est similaire à celui de l'érosion : la valeur du pixel considéré sera remplacée par la valeur maximale parmi les valeurs des pixels immédiatement voisins. Pour une image binaire, si l'un des pixels voisin est à « 1 », la valeur de sortie du pixel sera à « 1 ». Le résultat de ce traitement revient à transformer en « pixels objets » les pixels du fond en contact direct avec des pixels objets. La dilatation consiste donc à élargir les masques d'une couche de pixels. La dilatation permet d'éliminer des trous isolés dans un objet et dilate les bords des objets (fig.36).

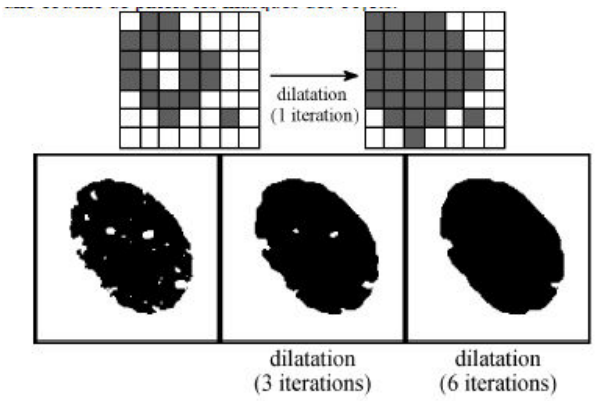


Figure 36 : Exemples de dilatation

Les opérations d'érosion et de dilatation peuvent être appliquées de façon répétitive, en plusieurs itérations si nécessaire. Ainsi, pour faire disparaître des structures dont le rayon est

inférieur ou égale à 3 pixels par exemple, une érosion de l'image à 3 itérations successives pourra être appliquée. De la même façon, une dilation à 3 itérations permettra de boucher des trous dont le rayon est inférieur ou égal à 3 pixels.

L'Ouverture et la Fermeture

L'ouverture consiste à appliquer de façon successive à l'image binaire une érosion puis une dilatation avec le même élément structurant. Cette opération permet d'adoucir les contours ou les bords en supprimant les détails, de gommer les petits artéfacts et ne conserver que le masque principal de la structure d'intérêt. C'est une sorte de filtrage morphologique.

La fermeture consiste à appliquer de façon successive à l'image binaire une dilatation puis une érosion avec le même élément structurant. La fermeture permet d'adoucir les bords des formes, de boucher les trous de petites tailles et les canaux étroits, de fusionner les objets proches les uns des autres. C'est l'opération « inverse » de l'ouverture.

Ces transformations sont des transformations d'aspect, mais ne préservent pas la connexité car elles peuvent fusionner des formes ou les scinder. Elles ne préservent pas les propriétés topologiques des formes.

La Squelettisation

La notion de squelette est apparue pour l'étude des objets minces. Le squelette conserve les propriétés topologiques de la forme qu'il représente. L'opération de squelettisation consiste à réduire l'image binaire d'un objet à son ossature tout en conservant les connectivités de l'image d'origine. Cette opération revient à faire une érosion ultime du contour de l'objet par un élément structurant en conservant les points de terminaison des segments du squelette.

La squelettisation permet de décrire chaque objet par un ensemble de lignes infiniment fines, correspondant à l'ossature de l'objet. Cela permet de diminuer le volume d'information à analyser.

Le squelette est généralement défini comme étant l'ensemble des lignes médianes, c'est-à-dire l'ensemble des points équidistants de deux points du bord. Typiquement, le squelette d'un cercle va alors être son centre, celui d'une ellipse son grand axe, ... Cependant, le squelette est très sensible au bruit (petite déformation du contour, présence d'un trou, ...). Le calcul du squelette en morphologie mathématique est obtenu par une transformation de voisinage telle que les opérations Erosion et Dilatation.

Opérations entre images

Les opérations booléennes consistent à mettre en correspondance point à point deux images binaires et à en obtenir l'intersection, l'union, la différence ou l'addition (c. souchier livre)

Add : Ajoute une constante à l'image ou la sélection. Avec une image 8-bits, un résultat supérieur à 0 aura la valeur 255. Avec une image 16 bits la valeur maximale sera 65 535.

Subtract : Soustrait une constante à l'image ou la sélection. Avec une image 8- bits ou 16-bits la valeur minimale du résultat sera 0. Pour une Image 8-bits le résultat sera compris entre 0 et 255, pour une image 16-bits il sera compris entre 0 et 65 535.

Divide : Divise l'image ou la sélection par la constante spécifiée. Excepté pour les images 32-bits, une division par 0 sera ignorée. Avec une image 32-bits, une division par 0 donnera soit NaN (Not a Number) ou Infini.

Min : Les pixels dont la valeur est plus petite que la constante spécifiée seront remplacés par cette constante.

Max : Les pixels dont la valeur est plus grande que la constante spécifiée seront remplacés par cette constante.

Image calculator : Pour soustraire le fond d'une image, faire ressortir des détails ou travailler les masques (images binaires) détaillé plus loin, les opérations arithmétiques entre images sont nécessaires.

Voici la liste des opérations arithmétiques de base : En blanc les pixels de valeur zero, en noir les pixels de valeur 255 (fig.37).

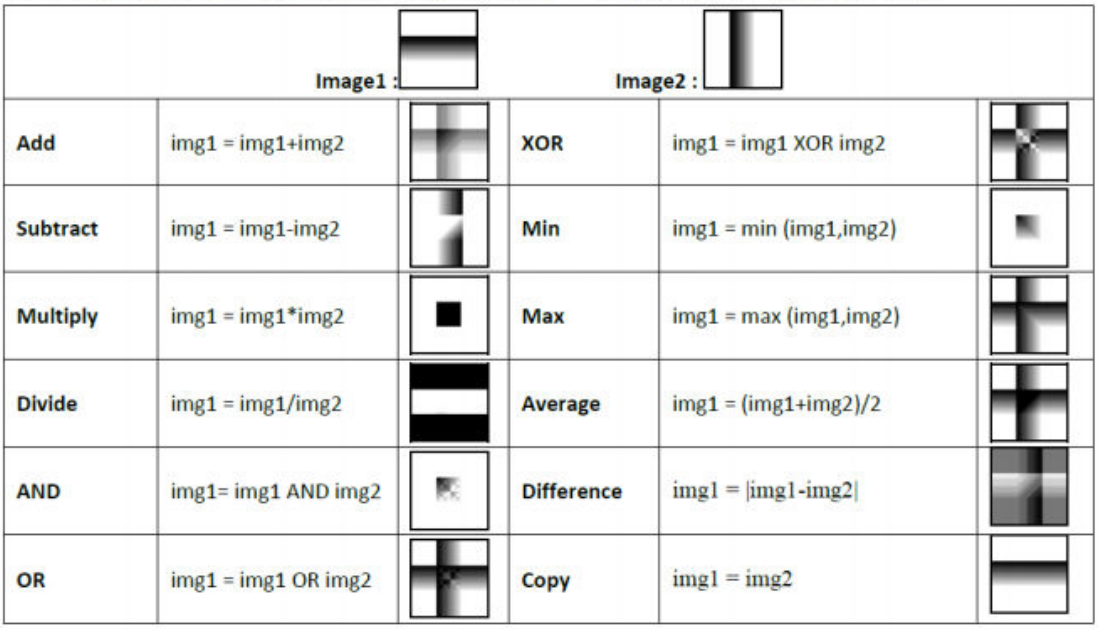


Figure 37 : Exemples de d'opération arithmétiques

Le Chapeau Haut-de-forme

Le chapeau haut-de-forme permet de retenir des éléments de l'image indépendamment des variations du fond qui sont des variations lentes. Cette transformation extrait les pics étroits (plus étroits que l'élément structurant) quelle que soit leur hauteur absolue. Elle permet par exemple d'extraire des lignes fines de niveau intense par rapport à leur voisinage.

L'élément structurant est un chapeau haut de forme qui s'enfonce sur l'image numérique et on ne retient que ce qui dépasse du chapeau. La transformation pour les zones claires se définit simplement comme la différence entre l'image numérique initiale et celle après son ouverture. Les zones sombres sont retenues par la procédure symétrique inverse : différence entre l'image d'origine et sa fermeture.

3.4.3. **L'extraction des mesures pour l'analyse de données**

Une fois traitées ou filtrées, les images peuvent être importées, ou non, dans un autre logiciel qui possède les fonctions spécifiques d'extraction de mesures. Puisque le bruit de fond, ou les objets négatifs ont été éliminés lors des précédentes étapes, le logiciel identifie aisément tout objet dont la valeur d'intensité de pixels diffère de « zéro » comme un objet d'intérêt. En fonction des besoins de l'utilisateur, des mesures quantitatives sont fournies (longueur,

surface, périmètre, volume, moyenne de fluorescence, etc…) et importées pour être analysées dans un format compatible avec Excel par exemple.

3.5. Traitement d'images adapté au réseau mitochondrial *(Filtrage par Chapeau Haut-de-forme ou Tophat)*

Au sein d'un même type cellulaire, les modifications de la morphologie des mitochondries dépendent de plusieurs aspects biologiques ou pathologiques, comme la division cellulaire, la réponse à un stress de type ischémie-reperfusion, le processus de mort programmée, ou dans des contextes pathologiques particuliers (désordres neurodégénératifs reconnus dans les maladies d'Alzheimer ou Parkinson)(Cho, Nakamura et al. 2009; Ziviani and Whitworth 2010). L'ensemble des connaissances de la morphologie des mitochondries provient d'études réalisées par microscopie électronique, représentant un instantané dans le temps et l'espace (Hom and Sheu 2009; Iglewski, Hill et al. 2010). Au cours de la dernière décennie, l'essor des techniques d'imagerie telles que la microscopie confocale (Mitra and Lippincott-Schwartz 2010), la microscopie multiphoton ou de super-resolution (Neumann, Buckers et al. 2010) utilisées avec les sondes, protéines ou biosenseurs fluorescents, a permis de réaliser des études dynamiques permettant l'exploration des fonctions mitochondriales dans des cellules vivantes, du suivi de leurs modifications morphologiques et des phénomènes impliqués dans le processus de fusion-fission autant que divers paramètres liés directement à leurs fonctions : potentiel membranaire (Dumas, Argaud et al. 2009; Leonard, Cameron et al. 2015),(Gerencser, Mookerjee et al. 2016), signalisation calcique ou homéostasie du magnésium (Yamanaka, Tabata et al. 2016), pH intra-mitochondrial, état redox et production de ROS, consommation d'oxygène, production d'ATP, ou encore transition de perméabilité au travers du PTP, et biogénèse mitochondriale, différenciation cellulaire (Li, Lamarche et al. 2014), les interactions avec le reticulum endoplasmique par des approches de mesure de col-localisation (Madreiter-Sokolowski *et al* 2016).

Le compartiment mitochondrial étant ainsi visualisé, la pertinence des résultats va fortement dépendre de la méthode d'analyse et de nombreuses études proposent des approches standards, automatisées adaptées au paramètre mitochondrial à étudier, et il est important de définir les bons critères d'investigation. Le procédé d'analyse d'images devient alors une étape critique pour l'interprétation des résultats (Mitra and Lippincott-Schwartz

2010) tout autant que le procédé de préparation de l'échantillon. Par exemple, une étape de fixation, paraissant optimiser l'immobilisation des cellules et permettant de réaliser des séries de coupes optiques en vue d'une reconstruction 3D, peut induire une déshydratation responsable d'une modification de la morphologie des mitochondries (Koopman, Visch et al. 2006).

Chevrollier *et al* (Chevrollier, Cassereau et al. 2012) ont mis au point une technique standardisée d'analyse de la dynamique mitochondriale, basée sur l'utilisation de micro-patterns, supports à forme fixe sur lesquels sont cultivées les cellules et permettant de leur donner une forme standard prédéfinie. Les mitochondries sont révélées par marquage au Mitotraker Green, et les images sont acquises à l'aide d'un microscope à épifluorescence équipé d'un objectif piezo permettant de réaliser des séries optiques le long de l'axe Z. Grâce à ce micro-pattern, les cellules à forme triangulaire ont été sélectionnées. En utilisant le module FilamentTracer du logiciel Imaris, les auteurs ont déterminé un squelette correspondant aux tubules du réseau mitochondrial en 3D. A l'aide d'algorithmes, différents paramètres de l'organisation du réseau mitochondrial ont pu être analysés : longueur, nombre de branches, nombre de tubules individuels, volume. Cette méthode d'analyse a permis de montrer que la mutation des protéines OPA1 et Mfn2 affecte la distribution des mitochondries (volume, organisation du réseau mitochondrial lié à celle des microtubules) de fibroblastes de patients atteints de la maladie de Charcot Marie Tooth (Chevrollier, Cassereau *et al*. 2012).

Buhlman *et al* (Buhlman, Damiano et al. 2014) se sont intéressés aux relations entre les protéines Parkin et Drp1 et leur rôle dans la fission mitochondriale. Ces auteurs se sont basés sur la méthode d'analyse présentée par Koopman *et al* (Koopman, Visch et al. 2005) qui ont étudiés le lien entre l'organisation du réseau mitochondrial et la déficience en complexe 1. Koopman *et al* (Koopman, Visch et al. 2006) décrivent leur méthode comme la plus quantitative pour l'analyse de la forme et du nombre de mitochondries. A partir d'un filtre de type chapeau haut-de-forme, ils utilisent les images binaires résultantes du seuillage pour déterminer le nombre de mitochondries par cellules, leur aspect ratio (défini par le rapport entre l'axe le plus grand et l'axe le plus petit d'une ellipse correspondant à une mitochondrie), et leur facteur de forme (perimètre^2/4π x surface). Ces données leur ont permis d'établir trois groupes de mitochondries classées en fonction de leur longueur et du degré de « branchements », c'est-à-dire si le degré de connectivité entre les branches du réseau mitochondrial. Cette méthode d'analyse a permis de montrer que la déficience en complexe 1 est responsable de modifications morphologiques du réseau mitochondrial des fibroblastes de patients atteints par cette déficience (Koopman, Visch et al. 2005). Lihavainen *et al*

(Lihavainen, Makela et al. 2012) ont également mis au point une méthode automatique d'analyse de la dynamique mitochondriale basée sur la méthode du chapeau haut-de-forme de Koopman mais avec une étape préliminaire de filtrage médian pour diminuer l'aspect bruité de l'image. La méthode Otsu est utilisée pour le seuillage après le filtre chapeau haut-de-forme permettant d'obtenir les masques binaires. A partir de ces masques ils ont déterminé plusieurs caractéristiques liées à la morphologie et à l'organisation du réseau mitochondrial : la longueur, l'épaisseur, la tortuosité, le nombre de branches, le nombre d'objets connectés et la surface. Lihavainen et al présentent leur méthode nommée Mytoe comme robuste et adaptée à différents types cellulaires d'une part, et indépendante de l'intensité de fluorescence liée au marquage des mitochondries d'autre part, puisque l'analyse des structures est indépendante du bruit et de la saturation éventuelle de l'image. Presque dix ans après la description de sa méthode, les collègues de Koopman, Nikolaisen *et al* (Nikolaisen, Nilsson et al. 2014) améliorent leur approche afin de l'adapter à des analyses d'images reconstituées en 3 dimensions. Un traitement des images par le processus de transformée de Fourier, basée sur des domaines de fréquence de l'image, remplace la méthode du chapeau haut-de-forme. Une représentation en iso-surface est créée et ne nécessite pas d'autre procédure de filtrage avant l'analyse de ces formes volumétriques. L'étape d'analyse repose sur une approche de squelettisation impliquant un seuillage et un traitement des objets (évitement des boucles par exemple). Cette approche permet de compléter les paramètres de morphologie qui peuvent être quantifiés en 2D ou en 3D : paramètres de forme (périmètre, surface, circularité ou sphéricité, comptage du nombre de branches, de leur longueur, diamètre, nombre d'extrémités etc…).

La plupart des approches d'analyse d'images concernant les mitochondries s'intéressent davantage à des paramètres morphologiques d'organisation du réseau mitochondrial, d'évaluer l'importance des phénomènes de fusion-fission, de fragmentation, etc…qui ont bien entendu un lien avec la fonction mitochondriale puisque tous ces paramètres permettent de mettre en évidence des phénotypes morphologiques liés à certaines pathologies.

OBJECTIFS

Dans ce contexte de différents aspects cliniques, le présent travail consiste à disséquer les conséquences cellulaires d'épisodes d'ischémie-reperfusion, en étudiant séparément l'effet de la carence en substrats et l'effet de la carence en oxygène. Cette approche sera réalisée sur différents types cellulaires en culture pour tenter d'approfondir nos connaissances sur le fonctionnement métabolique de ces différentes cellules, en lien avec leur nature, leur rôle dans l'organisme et leur implication dans divers contextes cliniques concernés par le phénomène d'ischémie-reperfusion.

Ce mémoire décrit de nouvelles approches méthodologiques permettant de suivre, sur cellules entières, le fonctionnement de la chaîne respiratoire, l'activité du PTP, et les variations de production/consommation d'ATP, de façon directe ou indirecte par mesure de l'activité de l'AMPK.

Ces approches innovantes sont basées sur l'utilisation de la microscopie confocale et le développement de méthode d'analyse d'images permettant de suivre en temps réel et de quantifier les variations de potentiel membranaire mitochondrial simultanément au suivi de l'autofluorescence du NADH. L'utilisation de biosenseurs permettra d'évaluer de façon directe ou indirecte les variations de concentration d'ATP au cours de différents stress étudiés : privation de substrats associée ou non à une privation d'oxygène.

Outre la validation de ces aspects méthodologiques, l'objectif de cette étude est de comparer les réponses et les métabolismes des différents types cellulaires étudiés qui peuvent aider à la compréhension des mécanismes impliqués dans certaines pathologies dans lesquelles le phénomène d'ischémie-reperfusion est présent, et permettre d'envisager des nouvelles stratégies thérapeutiques.

PARTIE EXPERIMENTALE

I. APPROCHE METHODOLOGIQUE

1. Choix du matériel biologique

Comme cela a été décrit dans le chapitre II, l'ischémie-reperfusion concerne différents aspects cliniques et différents organes, dont les atteintes les plus couramment décrites ou étudiées concernent les tissus cardiaque, cérébral, les organes transplantés et aussi depuis quelques années les tumeurs. Les modèles cellulaires utilisés pour la présente étude ont été sélectionnés parce que leur nature et leur fonction correspondent ou s'approchent de ces contextes cliniques :

- les cellules HMEC sont des cellules endothéliales de micro-vaisseaux humains. Elles représentent un modèle de choix pour appréhender les effets de l'hypoxie-reperfusion sur le tissu endothélial des micro-vaisseaux, en amont des tissus cardiaque et cérébral.

Des cultures primaires de cardiomyocytes et de cellules neuronales auraient été davantage appropriées. Cependant la sensibilité des cardiomyocytes à l'excitation par un laser UV ainsi que les difficultés techniques de mise en culture sur un support en verre approprié à la microscopie, à la fois pour les cardiomyocytes et les neurones primaires, n'ont pas permis de retenir ces types cellulaires comme modèles expérimentaux pour cette étude.

- les cellules INS-1 sont des insulinomes de rat, établis comme une lignée de cellules semblables aux cellules bêta du pancréas. A défaut d'obtenir des échantillons d'ilots humains (issus de patients donneurs d'organes), elles constituent un modèle cellulaire largement utilisé en diabétologie (Asfari, Janjic et al. 1992). Dans la présente étude, elles représentent le modèle de choix pour appréhender les effets des privation de substrats et d'oxygène subis par ce type de cellules lors de la transplantation d'îlots de Langherans utilisée dans l'approche thérapeutique du diabète de type I (Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2011)

- les hépatocytes primaires de rat représentent un modèle cellulaire de référence au sein de notre laboratoire pour la plupart de nos études sur la fonction mitochondriale ou le métabolisme. En effet, la glycogénogénèse, la glycogénolyse et la néoglucogenèse constituent leurs principales fonctions métaboliques. Facilement isolés et mis en culture, l'exploration de

leur réponse au stress d'hypoxie-anoxie puis reperfusion permet d'approfondir davantage nos connaissances sur leur fonction mitochondriale. De plus, ces expériences de privation d'oxygène se rapprochent du contexte clinique du foie ischémique.

- Enfin, une lignée de cellules humaines dérivées d'une tumeur de vessie , RT112, ont été choisies pour représenter un modèle de cellules cancéreuses. En effet, il a été décrit que les cellules cancéreuses ont un métabolisme qui diffère des cellules normales par un effet Warburg (voir chapitre I), et qu'elles se développeraient préférentiellement dans un milieu hypoxique. De plus, l'ischémie-reperfusion subie par les cellules cancéreuses lors de l'ablation chirurgicale des tumeurs peut influencer la récidive ou la progression du cancer traité. Dans ce contexte, l'étude de leur réponse métabolique à des privations de substrats et d'oxygène pourrait apporter des connaissances complémentaires sur la fonction mitochondriale permettant d'explorer des pistes thérapeutiques.

2. Stratégie expérimentale

Le présent travail a été réalisé par une approche méthodologique basée sur la microscopie confocale :

- Dans une première partie, l'utilisation de la sonde fluorescente TMRM et des propriétés d'auto-fluorescence du NADH sont exploitées pour étudier la fonction mitochondriale, en particulier l'ouverture du PTP.

Dans ce contexte, un programme d'analyse d'images a été spécifiquement développé pour quantifier les cinétiques des signaux de fluorescence au cours des expériences de privation en substrats et en oxygène.

- Dans une seconde partie, des biosenseurs fluorescents ont été testés pour évaluer les variations de concentration d'ATP ou d'activité de l'AMPK au cours des mêmes expériences.

Ainsi, le présent travail constitue un nouvel outil méthodologique pour suivre l'ensemble de la fonction mitochondriale par imagerie puisqu'on est capable de mesurer l'activité de la chaine respiratoire permettant la synthèse d'ATP, ainsi que le comportement du PTP lorsque les cellules sont soumises à un stress métabolique.

II. MATERIEL ET METHODES

1. Culture cellulaire

Toutes les lignées cellulaires sont maintenues en atmosphère contrôlée à 37°C et 5% CO_2. A l'exception des cultures primaires d'hépatocytes, un test de vérification de l'absence de mycoplasmes est réalisé à chaque étape de congélation/décongélation, par marquage de l'ADN au Hoechst 33258 après fixation au réactif de Carnoy (constitué d'un mélange d'acide acétique et de méthanol).

1.1. Conditions de culture

(remarque : les compositions des différents milieux sont disponibles sur les sites internet des fournisseurs)

Cellules HMEC-1 : Human Microvessels Endothelial Cells (Center for Desease Control and Prevention, USA).

Ces cellules sont cultivées en milieu MCBD 131 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) en présence de 10% de SVF (Hyclone laboratories Inc, Thermoscientific, USA) additionné de 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

RT112 : lignée tumorale de vessie humaine (Cell Lines Service)

Elles sont cultivées en présence de milieu RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) additionné de 10% SVF, 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine.

INS-1 : insulinome de rat, lignée de cellules bêta du pancréas

Elles sont cultivées en présence de milieu RPMI 1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) additionné de 10% SVF, 10mM Hepes, 1mM de pyruvate de sodium, 50mM de 2-bêta mercaptoéthanol, 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine (Asfari, Janjic et al. 1992).

Préparation d'hépatocytes isolés de rat

Les hépatocytes primaires sont obtenus à partir du foie de rats mâles de souche WISTAR, élevés dans l'animalerie du laboratoire dont les conditions sont conformes à la règlementation (article 2013-) sur l'expérimentation animale concernant les conditions d'hébergement, de bien-être et d'éthique. Les animaux sont mis à jeun 24 heures avant le prélèvement du foie, avec un accès libre à leur boisson.

L'isolement d'hépatocytes est réalisé selon la méthode décrite en 1969 par Berry et Friend (Berry *et al* 1969) modifiée par Groen *et al* en 1983. La préparation d'hépatocytes obtenus par cette technique est homogène, viable à 85% et les cellules parenchymateuses, vasculaires et de Kuppfer sont éliminées. Les étapes de cette technique sont décrites ci-après :

Après avoir été anesthésiés par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (128mg/kg), les rats subissent une laparotomie médiane. Un fil de soie est placé sous la veine cave inférieure, au-dessus de la veine rénale droite. Afin d'éviter la formation de thrombus, de l'héparine (500U.I) diluée dans du liquide de Krebs-Ringer (NaCl 119.8mM, KCl 4.8mM, $MgSO_4$ 2.46mM, KH_2PO_4 1.2mM, $NaHCO_3$ 24mM, pH 7.4, 37°C) est injectée dans la veine cave inférieure. Une perfusion antérograde du foie par le même liquide de Krebs-Ringer (débit de 25ml/min, thermostaté à 37°C et saturé par du carbogène 95% O_2/5% CO_2) est effectuée par cathétérisation de la veine porte. Les vaisseaux pelviens sont rapidement sectionnés afin d'ouvrir le circuit de perfusion et éviter une élévation de la pression hépatique. Cette étape permet également d'éliminer les hématies contenues dans le foie et d'éviter la formation de caillots. Après décoloration complète du foie, une thoracotomie est pratiquée et un autre fil de soie est placé autour de la veine cave sus-hépatique, entre le cœur et le diaphragme. L'oreillette droite est incisée et une canule est placée dans la veine cave inférieure sus-hépatique, remplaçant la cathetérisation de la veine porte, permettant alors la perfusion rétrograde du foie par la veine sus-hépatique. Les veines cave inférieure puis sus-hépatique sont ligaturées par serrage des fils de soie placés préalablement, permettant la perfusion optimale du foie et de le solidariser à la canule afin de l'extraire du corps de l'animal. Le foie est disséqué minutieusement, placé sur une potence et perfusé pendant 20 minutes avec du Krebs dépourvu de calcium afin d'altérer les jonctions calcium-dépendantes. Une seconde perfusion (15minutes, en circuit fermé à un débit de 35ml/min) est réalisée avec une solution de Krebs-Ringer supplémentée en $CaCl_2$ (1.3mM) et en collagénase de type IV (0.25mg/ml) afin de digérer le foie.

Au terme de cette digestion, les structures vasculaires, le diaphragme et le rein droit qui étaient encore présents sont éliminés. Le foie ainsi disséqué est placé dans un bécher et haché par coups de ciseaux de façon à détruire la capsule de Glisson et libérer les hépatocytes. Cette suspension est homogénéisée en présence de la solution de Krebs-calcium-collagénase et saturée en carbogène pendant environ 2 minutes. La suspension est ensuite filtrée puis centrifugée à 54g pendant 2 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les débris cellulaires et la solution de collagénase est éliminé et le culot d'hépatocytes est remis en suspension dans le liquide de Krebs-Ringer-calcium. A l'issue d'une seconde centrifugation, le culot d'hépatocytes est remis en suspension dans la même solution supplémentée en BSA 1%. Une dernière centrifugation permet d'obtenir des hépatocytes purifiés. La suspension finale d'hépatocytes est réalisée avec 15ml de Krebs-Ringer-calcium-BSA filtrée, puis saturée en carbogène pendant 2 minutes puis laissée au repos à 4°C pendant 1 heure avant la mise en culture.

La viabilité des hépatocytes obtenus est évaluée par coloration au bleu trypan et comptage cellulaire réalisé sur un automate (Luna,) puis les hépatocytes sont mis en culture dans un milieu composé de 75% DMEM 4.5g/l D-Glucose et 25% M199 (Gibco, Thermo Fisher Scientific) additionné de 10% SVF, 0.2mg/ml BSA, 10µg/ml d'insuline, 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine. Ce milieu sera cité « milieu I » dans le texte. Les cellules non adhérentes après 4 à 5 heures de culture sont éliminées par lavage, et le même milieu est renouvelé pendant 24 heures. Il est ensuite remplacé par un second milieu composé du milieu précédent contenant 1mg/ml de BSA, 1µM d'hydrocortisone et 10ng/ml d'EGF (milieu II dans le texte). Ces conditions de culture ont été mises au point par le Dr Christiane Chauvin de façon à optimiser le maintien des hépatocytes primaires en culture pour une durée supérieure à 48 heures.

1.2. Conditions expérimentales : milieux sans substrats

Sur la base de la composition fournie par le fabricant, les milieux sans substrats ont été préparés en conservant seulement les sels alors que le glucose, les acides aminés et les vitamines n'ont pas été ajoutés. Le tableau suivant présente la composition des milieux sans substrats utilisés pour chaque type cellulaire.

	MCDB131 (HMEC-1)	RPMI 1640 (INS-1, RT112)	KREBS (Hépatocytes)
NaCl (mM)	110.1	102.7	119.8
KCl (mM)	4	5.36	4.8
$MgSO_4$ (mM)	10	0.83	2.46
KH_2PO_4 (mM)			1.2
$NaHCO_3$ (mM)	14	23	24
Na_2HPO_4 (mM)	0.5	5.65	
$Ca(NO_3)_2$ (mM)		0.42	
$CaCl_2$ (mM)	1.6		1.3
Hepes (mM)		10	

Tableau 5 : Composition des milieux sans substrats pour chaque type cellulaire

2. Visualisation et quantification de l'ouverture du PTP par microscopie confocale

2.1. Mesure des variations de potentiel membranaire mitochondrial

Les cellules sont mises en culture à raison de $0.5.10^6$ cellules dans des boîtes de Pétri de 60mm de diamètre, dans lesquelles une lamelle de verre (0.17µm d'épaisseur et 42mm de diamètre ; Leica Microsystems) recouverte de laminine à la concentration de 5mg/ml (Sigma-Aldrich, France) afin de favoriser l'adhérence des cellules (uniquement pour les hépatocytes primaires) a été déposée. La durée de culture varie de 24 à 72 heures en fonction des conditions de culture des cellules et de leur vitesse de prolifération.

2.1.1. Marquage des cellules au TMRM et Mitotracker

Les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes simultanément avec 50nM de TMRM (TétraMethylRhodamineMethylester, Interchim) et 50nM de Mitotracker Green FM

(MTG, Interchim) dans leur milieu de culture. La lamelle est ensuite placée sur un support adapté à la chambre d'incubation du microscope (POC chamber, LaCom, Erbach, Germany), permettant de maintenir des conditions environnementales similaires aux conditions de culture des cellules : 37°C et 5% CO_2. Cette chambre d'incubation est également équipée d'un système de perfusion permettant de réaliser des changements de milieux sans perturber la température ni la concentration en CO_2. Les expériences de privation d'oxygène sont réalisées par injection d'azote pur dans la chambre, ajustée en fonction de la concentration d'oxygène finale souhaitée (3% ou 0.7%) régulée par un contrôleur à oxygène (O_2-CO_2-°C controler, Pecom, Erbach, Germany).

2.1.2. Acquisition des images

Le microscope confocal LEICA TCS SP2 AOBS (Leica microsystems, Heidelberg, Allemagne) est équipé d'un objectif x63oil/NA 1.4 et de trois lasers visibles et un laser ultra-violet. Ce laser UV (Enterprise II Coherent 351-364nm) permet d'exciter le NADH dont l'autofluorescence est recueillie entre 400 et 485 nm (en bleu sur les images), le laser 488nm permet d'exciter le MTG, dont la fluorescence révélant le compartiment mitochondrial est recueillie entre 500 et 530 nm (en vert sur les images) et le laser 543nm permet d'exciter le TMRM, dont la fluorescence associée au potentiel mitochondrial est recueillie entre 565 et 645 nm. La superposition des images des trois canaux de fluorescence montre que le signal NADH se superpose avec les mitochondries. L'ouverture du « pinhole » est identique pour les trois canaux de fluorescence, à 1.00 Airy. Les images sont acquises de façon séquentielle et un moyennage ligne par ligne de 8 itérations est appliqué de façon à améliorer le rapport signal/bruit.

2.1.3. Principe de la visualisation de l'ouverture du PTP

Un ionophore au calcium A23187 (Sigma-Aldrich), dont la concentration varie de 1 à 5µM selon les types cellulaires, est ajouté directement au milieu de culture des cellules préalablement installées sur le microscope dans la chambre d'incubation. Les images sont acquises toutes les 2 minutes pendant environ 20 à 30 minutes selon les types cellulaires.

A partir des observations obtenues, une partie du présent travail a été consacrée au développement d'un programme d'analyses d'images permettant d'obtenir des données quantitatives solides liées au phénomène de délocalisation ou dé-compartimentation du NADH hors de la mitochondrie lors de l'ouverture du PTP.

2.2. Analyse d'images et quantification de l'ouverture du PTP

La quantification par analyse d'images est une séquence d'opérations qui a pour but d'extraire des structures significatives du contenu de l'image et d'en obtenir des mesures quantitatives. Ces opérations se déroulent en 3 étapes : segmentation, extraction des mesures et analyse des données.

2.2.1. Etape de segmentation : réalisation de macro au moyen du logiciel ImageJ

Classiquement, la segmentation est réalisée par un seuillage simple permettant de sélectionner les objets d'intérêt de l'image à partir d'une valeur définie de niveaux de gris. Cependant, le marquage des mitochondries par des sondes telles que le MTG ou le TMRM révèle des structures filamentaires de fluorescence intense et la complexité de leur réseau induit une hétérogénéité de bruit de fond qui rend ce type de seuillage inadapté. L'alternative est d'utiliser une segmentation par « chapeau haut-de-forme » permettant de conserver les intensités élevées de niveau de gris tout en homogénéisant le bruit de fond.

De plus, l'autofluorescence du NADH n'est pas significativement plus élevée que les valeurs de bruit de fond, et aucune de ces méthodes de seuillage n'est adaptée.

Une stratégie de quantification à la fois des signaux du MTG, du TMRM et du NADH a donc été mise au point par la réalisation d'une séquence d'opérations sous forme d'un programme (ou macro) dans le logiciel Image J, dont l'intérêt est également d'attribuer une valeur « zéro » au bruit de fond de toutes les images, et ainsi de conserver les structures comme des objets d'intérêt quantifiables et de façon reproductible quel que soit l'opérateur.

Les étapes de cette approche sont les suivantes :

2.2.1.1. Détermination du compartiment mitochondrial à partir de l'image de Mitotracker

Les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes avec 50nM de Mitotracker Green FM et les acquisitions d'images ont été réalisées comme décrit précédemment (§2.1.1).

Une segmentation par la méthode du chapeau haut-de-forme est réalisée à partir de l'image des mitochondries révélées par marquage au Mitotracker Green et consiste à effectuer une opération arithmétique entre l'image d'origine et son « ouverture » (érosion puis dilatation).

2.2.1.2. Discrimination des signaux NADH à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment mitochondrial

Parallèlement à l'étape précédente, les images d'autofluorescence du NADH ont été acquises simultanément sur les mêmes cellules.
Le compartiment mitochondrial déterminé à l'étape précédente sera appliqué à l'image d'origine du NADH, de façon à discriminer les signaux NADH qui se trouvent à l'intérieur et à l'extérieur de ce compartiment mitochondrial.

2.2.1.3. Détermination du signal TMRM lié au potentiel membranaire mitochondrial

Les cellules sont incubées à 37°C pendant 30 minutes avec 50nM de TMRM et les acquisitions d'images ont été réalisées comme décrit précédemment (§2.1.1).

Une segmentation par la méthode du chapeau haut-de-forme est réalisée à partir de l'image des mitochondries révélées par marquage au TMRM, selon une méthode similaire à celle concernant les images de Mitotracker Green puisque lorsque les mitochondries sont polarisées, l'image de fluorescence du TMRM est identique à celle du Mitotracker Green.

2.2.2. Etape d'extraction des mesures au moyen du logiciel Volocity

Les images filtrées obtenues précédemment lors de l'étape de segmentation sont importées dans le logiciel Volocity (Improvision, France). Elles sont automatiquement classées en fonction de leur canal de fluorescence et organisées en séquence cinétique. La valeur « 0 » attribuée au fond de l'image par l'étape de segmentation permet une reconnaissance immédiate des objets d'intérêt par leur intensité de façon reproductible et indépendante de l'opérateur : il suffit d'attribuer le chiffre « 1 » à la valeur minimale et tout objet d'intérêt est alors reconnu. Le logiciel fournit ainsi pour chaque objet identifié : le nombre de pixels contenus dans les objets d'intérêt, les sommes et les moyennes d'intensité de fluorescence ainsi que les valeurs de surface des objets (en pixels ou en unité de surface μm^2).

2.2.3. Etape d'analyse des données dans le logiciel Excel

Les tableaux de valeurs obtenues lors de l'étape d'extraction de mesures sont édités sous un format texte puis importés dans le logiciel Excel. L'analyse des résultats peut alors être effectuée et rendue sous forme de graphes, histogrammes ou courbes d'intensité de fluorescence en fonction du temps par exemple.

3. Production d'adénovirus et infection des cellules

Les cDNA codant pour les constructions ATeam et AMPKAR ont été respectivement fournis par Hiromi Imamura (Japan Science and Technology Agency, Tokyo) et Peiling Tsou (Harvard Medical School), Boston). Les plasmides d'intérêt ont été préalablement clonés dans le vecteur pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific). Les adénovirus pour ATeam et AMPKAR ont été généreusement fabriqués et fournis par Dr. Etienne Lefai et Vanessa Euthine du laboratoire CARMEN, unité INSERM U1060 à Lyon selon les étapes décrites ci-après. Dans

ce manuscrit, les adénovirus ainsi fabriqués seront désignés sous les termes Ad-ATeam et Ad-AMPKAR.

3.1. Préparation des vecteurs

L'insert doit être linéarisé ou coupé en dehors de la cassette « promoteur CMV-Gène-polyA-β-Globine ». Le virusmid vmAdcDNA3 ou V4 est linéarisé par l'enzyme SwaI. Après inactivation des enzymes à la chaleur (65°C pendant 20 minutes), 600ng de pcDNA3+insert et 200ng de V4 sont mélangés dans 10µl d'eau. Après ajout de 100µl de bactéries compétentes Rec+ (BJ) puis 30 minutes d'incubation, un choc thermique est réalisé à 42°C pendant 45 secondes. Le mélange est refroidi 10 minutes sur la glace, étalé sur une boîte LB contenant 100mg/ml d'ampicilline puis incubé une nuit à 37°C.

3.2. Recombinaison

Après une nuit à 37°C, environ 5 colonies isolées sont récupérées et ré-étalées sur une boîte de Pétri et incubées de nouveau une nuit à 37°C. Les clones sont récupérés, dissous dans 100µl d'eau et incubés 10 minutes à 95°C. Après une centrifugation de 5 minutes à 10 000g à 4°C, une PCR est réalisée sur ces clones et sur V4 (contrôle négatif). Après dépôt sur gel d'agarose 0.8%, une bande de 700pb doit apparaître pour les clones positifs.
Une fois identifié, le clone positif est amplifié par la technique de maxiprep pour obtenir au moins 30µg de plasmide.

3.3. Transfection cellulaire au phosphate de calcium

Des cellules HEK293 sont préalablement cultivées dans des plaques de 10cm de façon à atteindre la confluence. Leur milieu sera remplacé par 10ml de DMEM à 5% SVF juste avant la transfection.
Le volume des plasmides à transfecter est ajusté à 250µl avec de l'eau. Un volume de 250µl de Calcium 4X (660mM $CaCl_2$, 5mM Hepes, pH 7) est ajouté. Après agitation au vortex, un volume de 500µl de Phosphate 2X (1.25ml Phosphate 400X, 50ml NaCl 10X, 25ml Hepes1M, pH7) est ajouté. Le mélange est de nouveau agité au vortex puis incubé 10 minutes avant d'être déposé délicatement goutte à goutte sous légère agitation aux cellules HEK293. Après une nuit d'incubation, le milieu des cellules est changé. L'infection des cellules est surveillée pendant plusieurs jours, et est optimale lorsqu'elles deviennent arrondies mais non lysées (5 à 10 jours).

3.4. Récupération des adénovirus

Lorsque la plupart des cellules sont rondes et en présence de quelques cellules lysées, le milieu est éliminé et les cellules sont récoltées par centrifugation à 1000g pendant 5 minutes. Le culot est resuspendu dans un mélange PBS-Glycérol 10%. Les cellules sont lysées par 3 cycles de congélation/décongélation (azote liquide/bain sec à 37°C) puis centrifugées pour éliminer les débris.

La suspension obtenue est utilisée pour infecter les plaques multi-puits et un western blot effectué 24 à 48 heures après l'infection confirmera la surexpression de l'adénovirus. L'adénovirus ainsi obtenu sera ensuite amplifié et titré.

Les valeurs de titration obtenues sont respectivement de $5{,}6.10^{10}$ ui/ml (unité d'infection) et $1{,}7.10^{10}$ ui/ml pour Ad-ATeam et Ad-AMPKAR.

4. Privation de substrats et d'oxygène : l'ischémie-reperfusion simulée.

4.1. Protocole établi pour l'analyse par imagerie des effets de ces carences sur la chaîne respiratoire et le PTP.

Après une incubation de 30 minutes à 37°C et 5% CO_2 dans le milieu de culture contenant 50nM de TMRM, les lamelles sur lesquelles les cellules ont été cultivées sont placées sur le support adapté à la chambre d'incubation sur la platine du microscope confocal comme décrit précédemment (§ 2.1.1).

Parallèlement, le milieu (complet ou sans substrats), utilisé pour l'étape de privation de substrats et d'oxygène (appelée de façon abusive « ischémie » dans l'ensemble du texte) est soumis à saturation pendant 20 minutes par injection d'azote dans un falcon étanche de 50ml de façon à supprimer l'oxygène présent. Les compositions des milieux sans substrats adaptés à chaque type cellulaire ont été décrites précédemment (§ 1.2).

La première acquisition d'images dans les canaux de fluorescence requis constitue la condition « basale » pour laquelle on considère que la sonde cationique TMRM a atteint l'équilibre de Nernst.
Sans ouvrir le couvercle de la chambre mais en utilisant un système d'aspiration-injection par seringues, les cellules sont lavées en remplaçant le milieu initial par 1.5ml de milieu sans substrats (ou complet si seule la privation d'oxygène est réalisée) saturé en azote, à son tour aspiré et remplacé par 2ml de ce même milieu. La valve d'entrée de l'azote est ouverte simultanément au niveau du contrôleur d'oxygène et la concentration souhaitée d'oxygène est ajustée soit à 3%, soit à 0.7% (concentration minimale affichée par la machine et considérée comme « 0% »). Après une calibration et une vérification des concentrations d'oxygène à l'aide d'un analyseur de gaz, 3 minutes sont nécessaires pour atteindre 3% en concentration d'oxygène.
Une séquence d'images est réalisée avec des intervalles de 10 minutes pendant 1 heure : cette séquence est nommée « ischémie ».
Au terme de cette séquence, la valve d'azote est fermée, permettant à l'oxygène d'atteindre à nouveau la concentration initiale de 20% (rétablie en moins de 5 minutes) et le milieu sans substrats est remplacé par du milieu complet, conservé au bain-marie à 37°C. Une séquence d'images est réalisée avec des intervalles de 10 minutes pendant 1 heure : cette séquence est nommée « reperfusion ».

Ces deux étapes de changement de milieu, en rinçant le TMRM extra-cellulaire, affectent les équilibres milieu extracellulaire/cytosol et cytosol/mitochondrie selon l'équilibre de Nernst pour la sonde TMRM. Cela se traduit par une diminution de son intensité de fluorescence. Afin de ne pas confondre cette diminution avec une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial, une nouvelle incubation avec 50nM de TMRM est à nouveau réalisée pendant 30 minutes, permettant de discriminer les mitochondries dépolarisées qui restent non fluorescentes, des mitochondries intactes pour lesquelles le niveau d'intensité de fluorescence du TMRM redevient comparable à la situation basale.
La condition « sham » consiste en une expérience « contrôle » pour laquelle les étapes de changements de milieux ont été réalisées, mais avec du milieu complet et sans privation d'oxygène.

4.2. Protocole établi pour l'analyse des effets de ces carences sur les variations d'ATP et d'activation de l'AMPK

4.2.1. Test de concentration des adénovirus

Les cellules ont été cultivées à raison de 1.10^6 cellules/puits dans des plaques de culture à 6 puits. Les cellules transfectées à des concentrations différentes d'adénovirus : de 25 à 150 m.o.i (**m**ultipiants **o**f **i**nfection, c'est-à-dire unité d'adénovirus par cellule sur la base de 10.10^6 u.i Ad pour 1.10^6 cellules) pendant 24 et 48 heures. Les cellules adhérentes sont détachées et récupérées dans des tubes en polypropylène de 5ml et analysées par cytométrie en flux (LSR Fortessa, BD Biosciences) afin de vérifier le niveau de fluorescence des protéines CFP et YFP codées par les adénovirus et ainsi déterminer la concentration optimale d'infection.

4.2.2. Visualisation des variations de fluorescence des biosenseurs ATeam et AMPKAR

Cette approche a été réalisée sur des hépatocytes primaires. Les autres types cellulaires seront expérimentés ultérieurement.

Les hépatocytes fraîchement isolés sont mis en culture en présence de milieu I (75% DMEM 4.5g/l D-Glucose et 25% M199 additionné de 10% SVF, 0.2mg/ml BSA, 10µg/ml d'insuline, 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine) à raison de $0.5.10^6$ cellules /BP60 sur des lamelles en verre. Ces lamelles ont été préalablement recouvertes de laminine à la concentration de 5µg/ml pendant 1 heure minimum à 37°C, puis lavées 3 fois par une solution de PBS. Après 24 heures d'incubation, le milieu I est remplacé par le milieu II (milieu I supplémenté avec 1mg/ml de BSA, 1µM d'hydrocortisone et 10ng/ml d'EGF) auquel ont été ajoutés 25moi d'adénovirus. Les cellules sont à nouveau incubées 24 heures à 37°C et 5% CO_2.

Les lamelles sont récupérées et placées sur le support adapté à la chambre d'incubation du microscope et les cellules sont soumises aux différentes conditions de stress décrites précédemment (phases d'ischémie puis reperfusion).

Le microscope confocal Leica TCS SP2 AOBS est équipé de détecteurs spectraux en amont des photomultiplicateurs, ce qui permet de déterminer la largeur de la bande d'émission de fluorescence que l'on souhaite recueillir.

Parmi les biosenseurs qui ont été décrits pour suivre le métabolisme, nous avons sélectionné les biosenseurs ATeam et AMPKAR. La.présence d'ATP ou l'activation d'AMPK (pour ATeam ou AMPKAR , respectivement) induisent une réaction de FRET durant laquelle la fluorescence émise par CFP fournit l'énergie nécessaire à l'excitation de YFP, dont la fluorescence augmente.

- ATeam 1.03 permet de mesurer des niveaux d'ATP à des concentrations de l'ordre du millimolaire. Le donneur est une protéine fluorescente dont les propriétés spectrales correspondent à CFP : mSECFPΔC11 (excitation 458nm et pic d'émission à 480nm) et cp173-mVenus constitue l'accepteur (excitation 488nm, pic d'émission à 525nm).
- GO-ATeam 1. Constitue le contrôle négatif de ATeam, dans le sens où aucun FRET ne peut se produire du fait d'une mutation des Arginine 122 et 126 en deux Lysine. Le couple donneur-accepteur est constitué de mKOκC11 (variant de GFP : pic max d'excitation à 470nm et pic d'émission à 510nm), et de cp173-mEGFP (excitation à 514nm et pic max d'émission 560nm).
- AMPKAR permet de mesurer l'activation de l'AMPK lors de sa phosphorylation. Le couple donneur-accepteur est constitué de eCFP C11 (excitation 458nm et pic d'émission à 480nm) et cpVenus (excitation 488nm, pic d'émission à 525nm).

Pour évaluer le phénomène de FRET, la longueur d'onde d'excitation utilisée sera celle du donneur uniquement, et les émissions seront sélectionnées selon une bande de 8nm de large déterminée autour du pic max d'émission de chaque fluorophore, à la fois pour le donneur (CFP) et pour l'accepteur (YFP).

Ainsi, la visualisation des variations de fluorescence d'ATeam ou d'AMPKAR se fera en deux phases :

1/ Le laser Argon est équipé d'un AOTF (Acoustico Optical Tunable Filter permettant de choisir des longueurs d'ondes spécifiques) permettant d'exciter la CFP à 458nm. Les émissions de fluorescence sont recueillies entre 475 et 486nm pour la CFP et entre 525 et 533nm pour YFP. Ces bandes fines de 8nm (ajustées grâce à l'AOBS et les détecteurs spectraux) permettent d'être le plus spécifique possible des pics maximums d'émission.

Des séquences d'acquisition d'images sont effectuées toutes les minutes durant l'heure d'ischémie puis l'heure de reperfusion.

2/ Une acquisition spectrale est réalisée par excitation à 458nm et le recueil de l'émission de fluorescence est effectuée par intervalles de 8nm entre 463 et 600nm, de façon à obtenir les spectres précis des fluorescences et permettant de s'assurer que les signaux mesurés sont bien spécifiques de CFP et YFP. Cette acquisition spectrale est réalisée en situation basale, en fin d'ischémie et en fin de reperfusion.

Pour chacune des deux approches une segmentation par seuillage est effectuée en utilisant le logiciel Image J puis les valeurs d'intensité de fluorescence sont extraites par le logiciel Volocity et analysées avec le logiciel Excel, sous forme de courbes brutes d'intensité de fluorescences au cours du temps, ou sous forme de ratio F_{YFP}/F_{CFP} , F étant l'intensité de fluorescence aux pics maxima d'émissions de CFP et YFP.

5. Détermination du contenu en nucléotides adényliques (ATP, ADP et AMP)

5 .1. Mise en culture et hypoxie

Les hépatocytes fraîchement isolés sont mis en culture en présence de milieu I (75% DMEM 4.5g/l D-Glucose et 25% M199 additionné de 10% SVF, 0.2mg/ml BSA, 10µg/ml d'insuline, 2mM de L-Glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100µg/ml de streptomycine) à raison de $0.5.10^6$ cellules par boîte de Pétri de 60mm. Après 24 heures de culture, le milieu I est remplacé par le milieu II (milieu I supplémenté avec 1mg/ml de BSA, 1µM d'hydrocortisone et 10ng/ml d'EGF) auquel ont été ajoutés – ou non (contrôles) - 25moi d'adénovirus. Les cellules sont à nouveau incubées 24 heures à 37°C et 5% CO_2. Les boîtes de Pétri ont été placées dans un système de « cloche à hypoxie » fabriquée par nos soins : les cellules cultivées dans les boîtes de Pétri sont disposées sur un support placé dans une cuvette dont le fond est rempli d'eau. Une cloche recouvrant les cellules est maintenue par un poids de 1kg pour éviter sa flottaison. Une fine tubulure reliée à une bouteille contenant un mélange de 95% N_2 et 5% CO_2 est introduite sous la cloche. Un manomètre permet de contrôler le

débit de gaz et le bullage du mélange 95% N_2 et 5% CO_2 permet d'obtenir une concentration en 0_2 de 0% (fig. 38 ; thèse de S. Lablanche 2012).

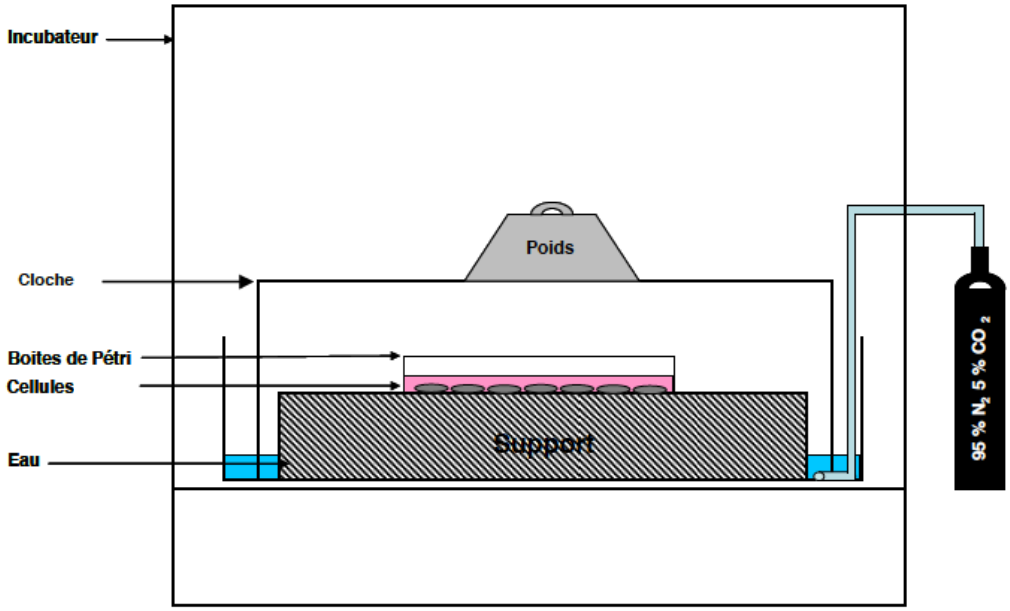


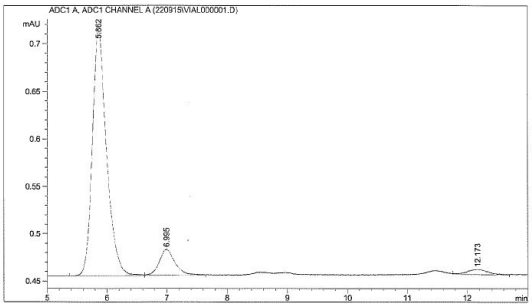
Figure 38 : Cloche à hypoxie

5.2. Récupération des cellules pour le dosage des nucléotides

Après chaque condition de stress (ischémie courte de 6 minutes, ischémie pendant 1 heure suivie ou non d'une reperfusion d'1 heure, en comparaison à la condition sham), les surnageants des cellules sont récupérés puis centrifugés à 1000rpm (convertir en g) pendant 5 minutes à 4°C. Les cellules adhérentes sont rincées par une solution de PBS puis lysées par une solution d'acide perchlorique 2.5% EDTA 6.25mM à 4°C, récupérées par grattage puis centrifugées à 12000g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est neutralisé par une solution de KOMO (KOH 2N/MOPS 0.3M). Après une rapide centrifugation (à l'aide d'une mini-centrifugeuse de paillasse dont la vitesse et le temps correspondent à un « pulse ») le pH du surnageant du précipité $KClO_4$ obtenu est ajusté à 7-7,5. Le surnageant est ensuite conservé à -80°C jusqu'à l'analyse par HPLC (Lamarche, Carcenac et al. 2013).

5.3. Mesures des concentrations en nucléotides par HPLC

Les nucléotides ATP, ADP et AMP des échantillons obtenus précédemment sont séparés sur une colonne C18 en phase inverse (Polaris 5 C18-A, Agilent S 250X4.6mm), éluée par une phase mobile tampon pyrophosphate à pH 5.75. Les nucléotides sont mesurés par un détecteur UV à 254nm (Merck L4200). Avant l'analyse des échantillons, une calibration est effectuée avec des solutions standards d'ATP (Roche, Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France), ADP (Sigma-Aldrich, St-Quentin Fallavier, France) et AMP (Acros Organics, Fisher Scientific) à 5µM, 15µM et 30µM. La figure suivante illustre un résultat obtenu sous forme de chromatogramme, à partir duquel le logiciel (Agilent 35900 E) effectue un calcul d'intégration permettant d'obtenir les concentrations d'ATP, ADP et AMP contenus dans l'échantillon analysé. A partir de ces données, les résultats seront exprimés sous forme de ratio ATP/ADP.



RetTime [min]	Type	Area [mAU*s]	Amt/Area	Amount [µM]	Grp	Name
5.862	BV	4.28536	3.71802	15.93305		ATP
6.995	VB	4.91190e-1	4.03604	1.98246		ADP
12.173	VB	1.25430e-1	3.14175	3.94070e-1		AMP
Totals :				18.30958		

Figure 39 : Exemple de chromatogramme et ses résultats

RESULTATS

1ère PARTIE

VISUALISATION ET QUANTIFICATION DE LA FONCTION MITOCHONDRIALE PAR MICROSCOPIE CONFOCALE : chaîne respiratoire et ouverture du PTP

1/ Principe de la visualisation de l'ouverture PTP : Réalisation du programme d'analyse d'images

La transition de perméabilité mitochondriale est attribuée au Pore de Transition de Perméabilité, le PTP. La régulation de ce PTP est caractérisée soit par son ouverture (induite par un excès de calcium, une dépolarisation mitochondriale, un stress oxydant), soit par l'inhibition de son ouverture par des agents pharmacologiques (Cyclosporine A ou CsA, roténone, metformine).

Nous avons développé une technique d'imagerie permettant de visualiser l'ouverture du PTP. Le principe de cette approche décrite par Dumas *et al* (Dumas, Argaud et al. 2009) (voir article en annexe) est le suivant : les mitochondries des cellules HMEC-1 ont été marquées avec 50nM de TMRM pendant 30 minutes à 37°C. Les cellules ont été placées sous le microscope et les images ont été acquises après excitation au laser UV pour le NADH et 543nm pour le TMRM. La molécule A23187 est un ionophore provoquant l'entrée de calcium dans la mitochondrie. Après ajout de 0,05 µM d'A23187, les images ont été acquises toutes les minutes pendant 10 minutes.

L'entrée de calcium dans les mitochondries induit une augmentation du signal NADH et une diminution de fluorescence du TMRM liée à une diminution du potentiel mitochondrial. La superposition des images des différents canaux montre une délocalisation du NADH par rapport au signal TMRM. Si l'on ajoute de la CsA (1µM final), inhibiteur de l'ouverture du PTP, on retrouve une situation similaire à la condition contrôle, c'est-à-dire une localisation du NADH dans les mitochondries. L'image de délocalisation du NADH par rapport au TMRM est donc bien représentative d'une visualisation de l'ouverture du PTP (Fig.40).

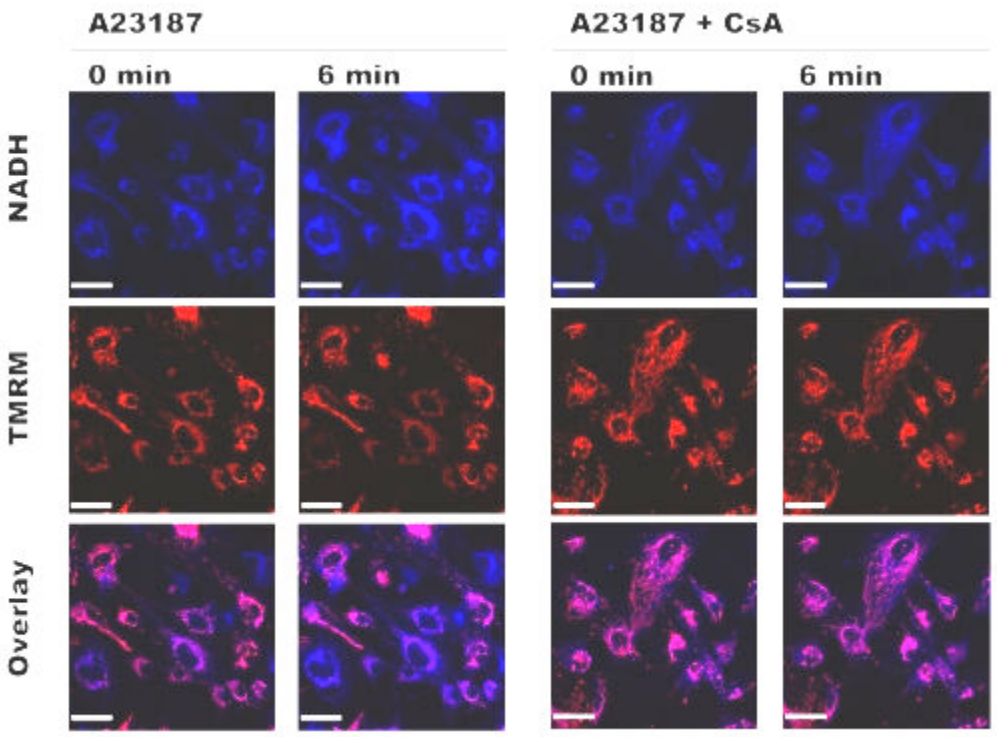


Figure 40 : Visualisation de l'ouverture du PTP induite par A23187 sur des cellules endothéliales dont les mitochondries ont été marquées au TMRM.

A partir de ces observations, j'ai construit un programme d'analyse d'images permettant de réaliser des mesures quantitatives des variations de fluorescence observées dans diverses situations induisant un effet soit sur l'ouverture du PTP, soit sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

1.1. Etape de segmentation par la méthode du Chapeau Haut-de-Forme ou Tophat dans le logiciel Image J

1.1.1. Détermination du compartiment mitochondrial à partir de l'image de Mitotracker

Avant de présenter les résultats obtenus par la méthode du chapeau haut-de-forme, une segmentation par seuillage classique a été testée sur une image de mitochondries marquées par le Mitotracker green (Fig. 41). Cet exemple illustre la difficulté d'effectuer un seuillage permettant de discriminer correctement et de façon reproductible les mitochondries par rapport au bruit de fond. En effet, soit l'on choisit d'éliminer des structures qui paraissent ne pas être des mitochondries en choisissant un seuil élevé (123) mais les mitochondries dont les

valeurs d'intensité seront inférieures à ce seuil seront éliminées (Fig. 41 A) ; soit la valeur de seuil choisie est diminuée (à 32) de façon à récupérer tous les éléments correspondants à des mitochondries, mais dans ce cas on retrouve des pixels dans les noyaux par exemple, qui correspondent à des objets qui ne sont pas des mitochondries (Fig. 42 B).

Une segmentation par la méthode du chapeau haut-de-forme est réalisée à partir de l'image des mitochondries révélées par marquage au Mitotracker Green.

Le principe de cette méthode de segmentation consiste à effectuer une opération arithmétique entre l'image d'origine et son ouverture (opération combinant successivement une érosion puis une dilatation).

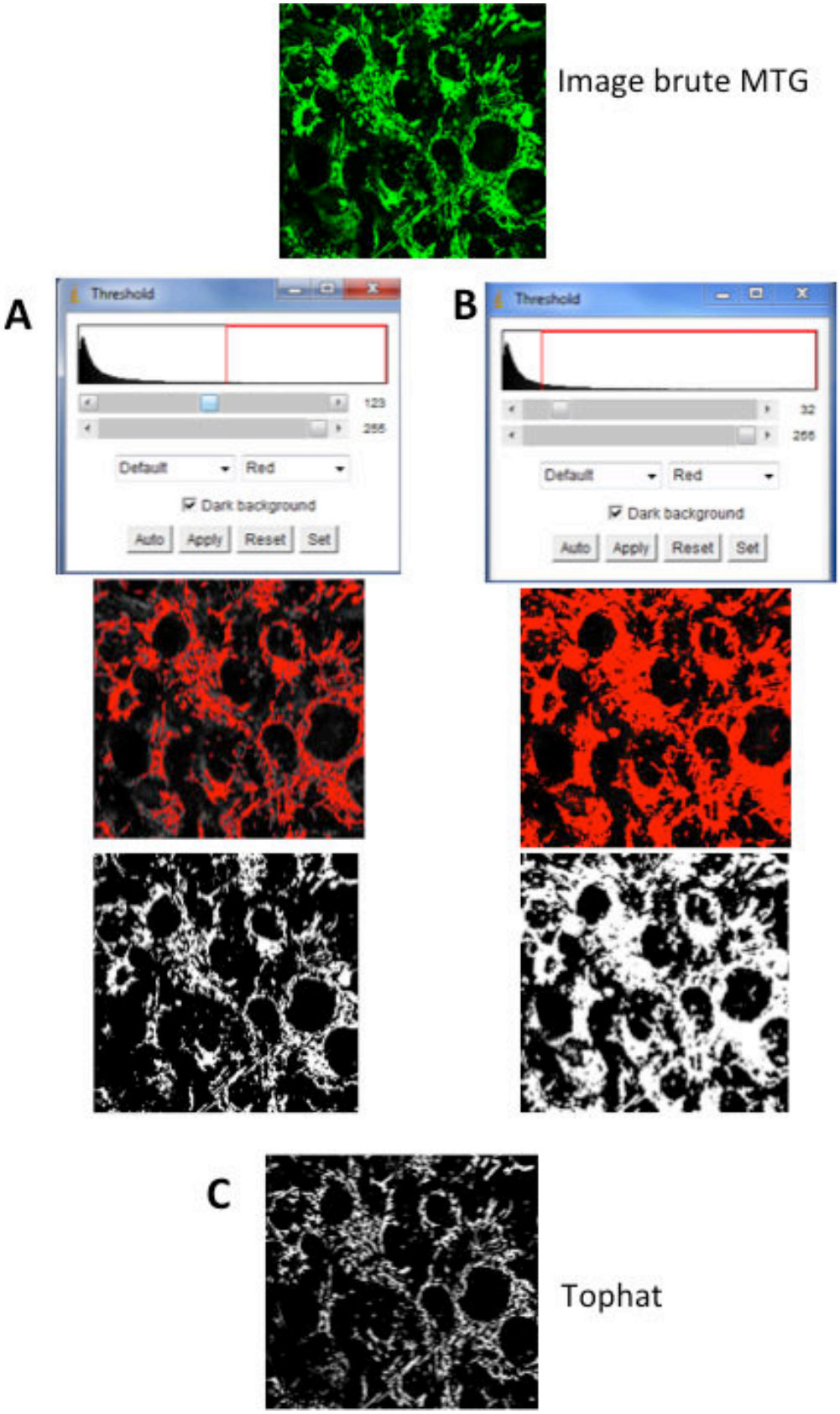


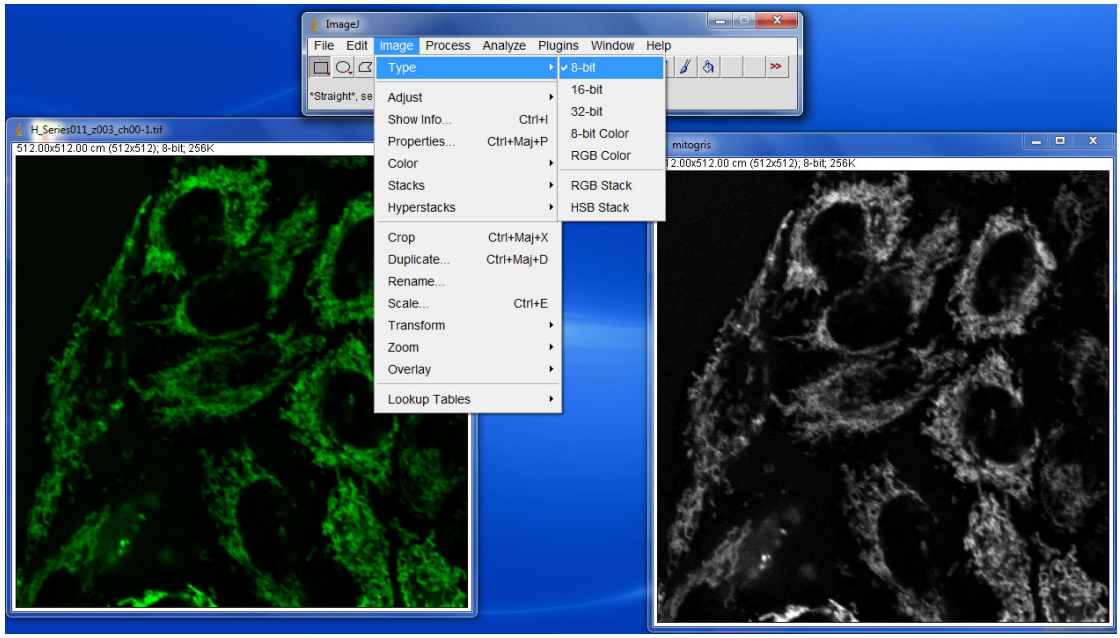
Figure 41 : Comparaison d'un seuillage classique et d'une segmentation par chapeau haut de forme à partir d'une même image de mitochondries marquées par Mitotracker Green : valeur élevée de seuil (A), valeur basse de seuil (B) comparées à la méthode du tophat (C).

La figure 41 C présente la même image segmentée par chapeau haut-de-forme par la macro suivante élaborée dans un langage de programmation de type Java. Cette macro effectue toutes les étapes décrites dans la partie expérimentale afin d'effectuer une segmentation par la méthode du chapeau haut-de-forme. Cette macro est écrite de façon à être appliquée à l'ensemble d'une séquence cinétique, et non pas image par image ; La figure 42 illustre étape par étape cette macro, et les correspondances entre la macro et la figure 42 sont indiquées en italique et en vert.

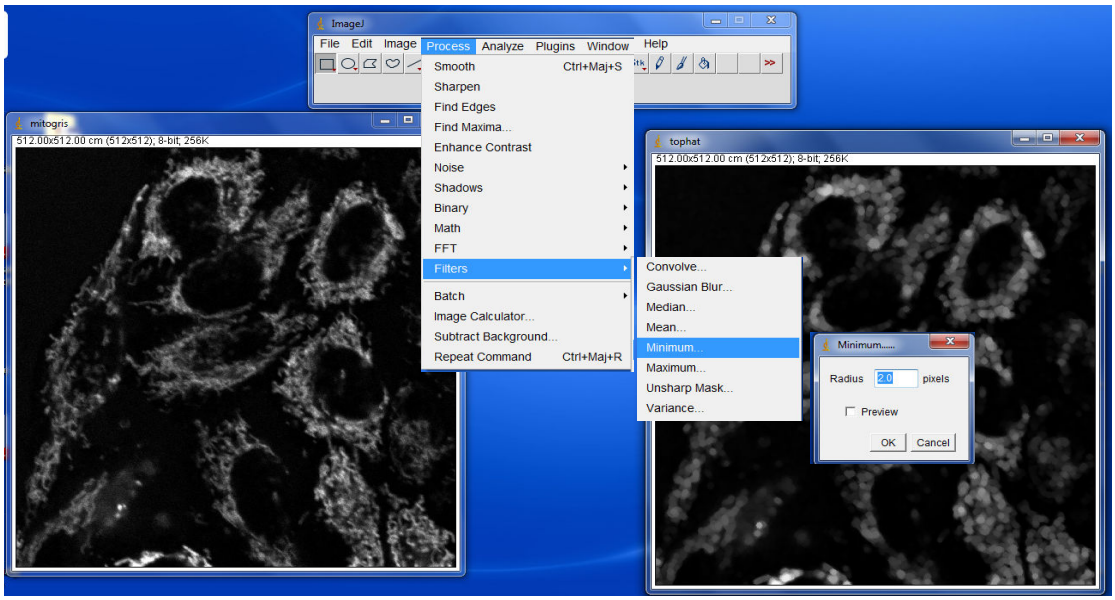
```
Dialog.create("open MTG");
Dialog.show;
run("Image Sequence...", "");
rename("mitogris");
run("8-bit");                                                    Fig42 A
run("Duplicate...", "title=tophat duplicate range=1-80");
run("Minimum...", "radius=2 stack");
run("Maximum...", "radius=2,5 stack");                           Fig42 B
imageCalculator("Subtract create stack", "mitogris","tophat");   Fig42 C
selectWindow("Result of mitogris");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(85, 255);                                           Fig42D
run("Threshold", "thresholded remaining black");
rename("mask");
imageCalculator("Subtract create stack", "mitogris","mask");     Fig42 E
selectWindow("Result of mitogris");                              Fig42F
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name=[mtg filtre] start=0 digits=80 use save]");
selectWindow("mitogris");
close();
selectWindow("tophat");close();
selectWindow("mask");close();
selectWindow("Result of mitogris");
close();
```

La figure 42 illustre étape par étape ce qu'Image J réalise à partir de cette macro :

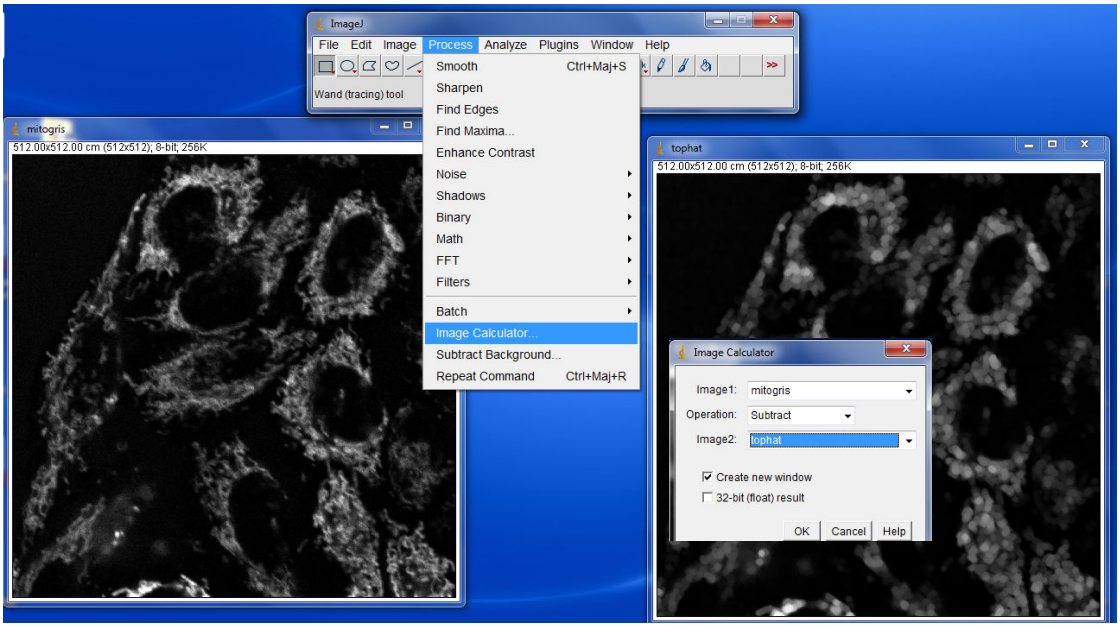
A



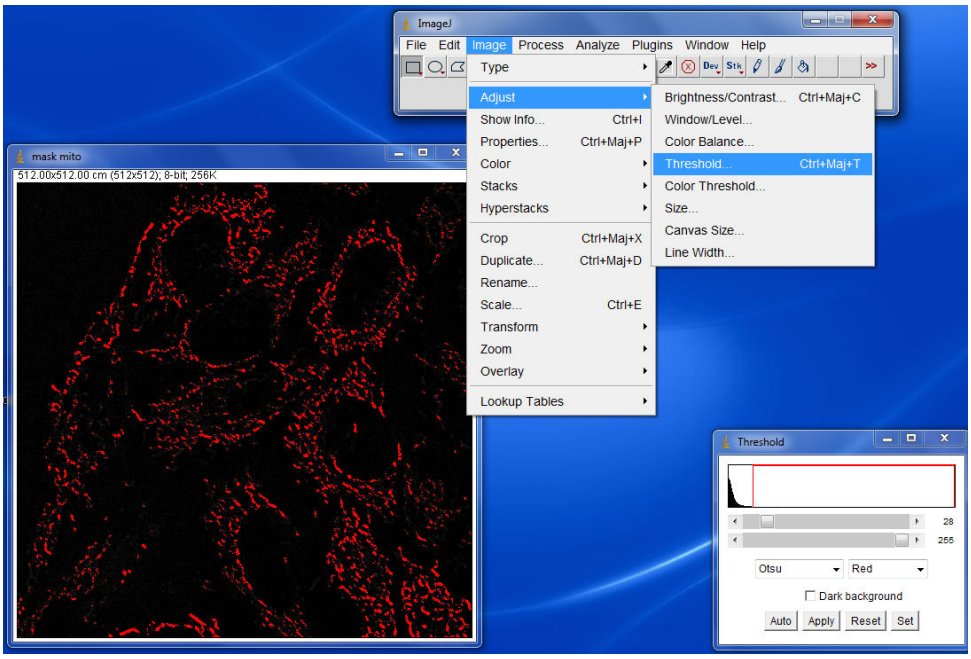
B



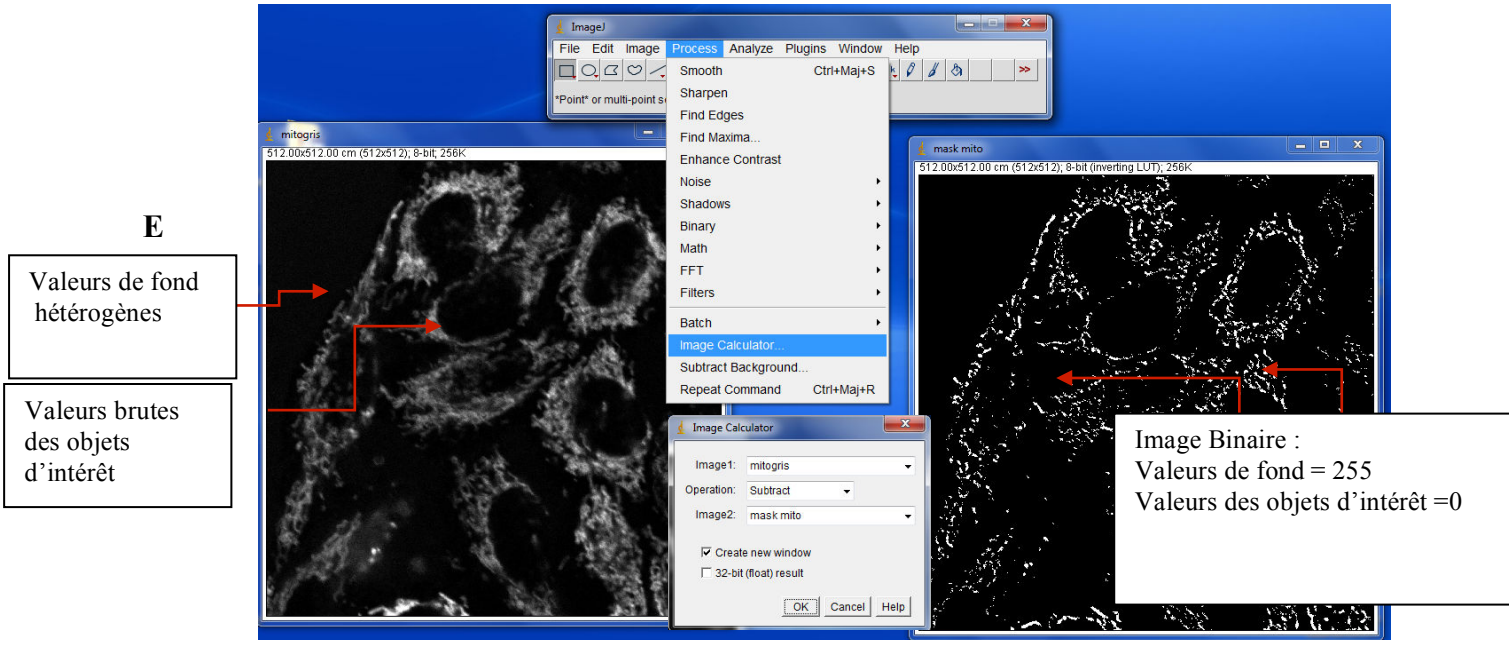
C



D



E



F

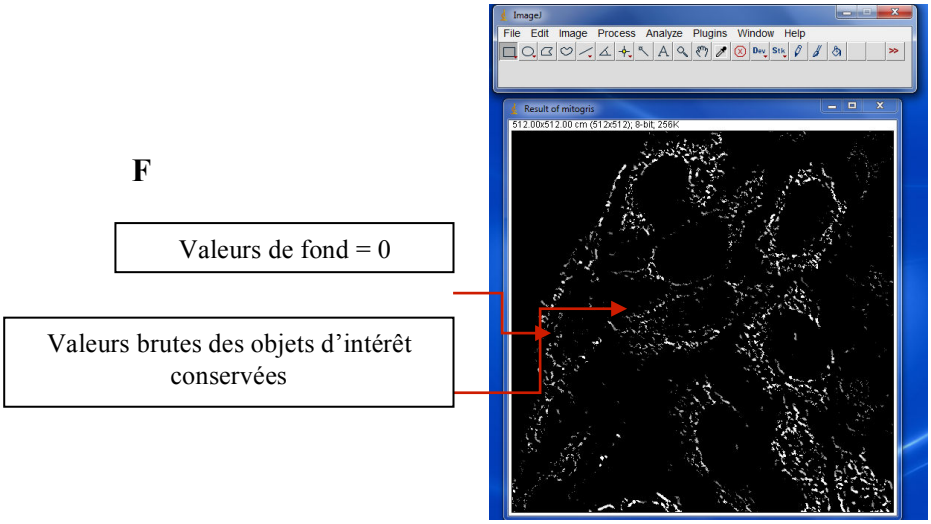


Figure 42 : illustration de la macro Image J pour la réalisation du tophat étape par étape

La figure 43 présente un exemple d'images obtenues avec cette macro. Afin d'améliorer la visualisation, les images de cette figure ont été volontairement réduites à une région d'intérêt qui a été agrandie.

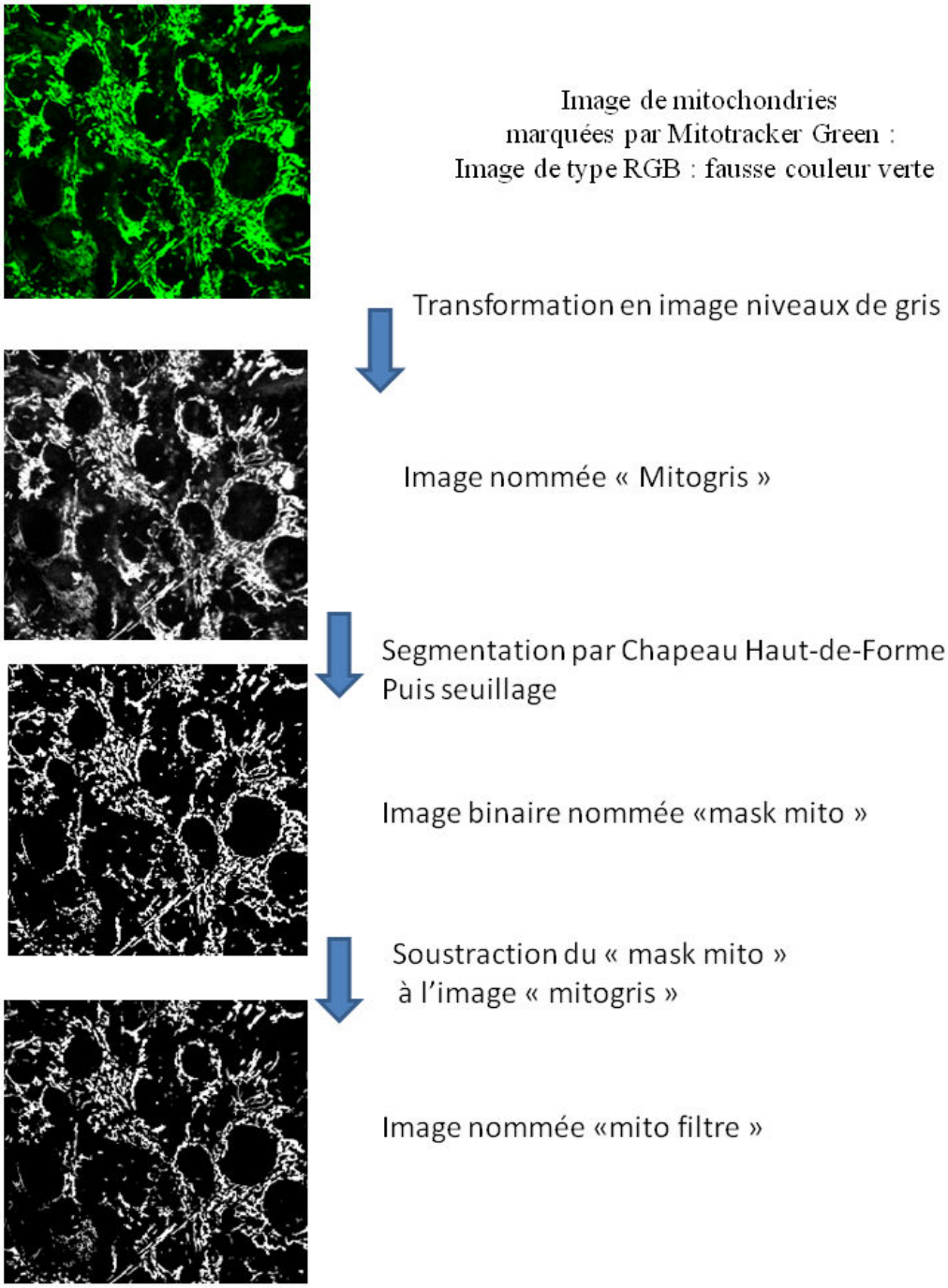


Figure 43 : Illustration des étapes de la macro permettant de déterminer le compartiment mitochondrial à partir d'une image de mitochondries marquées par Mitotracker Green.

Dans cette figure, grâce à la segmentation par la méthode du chapeau Haut-de-Forme, l'image finale nommée « mito filtre » a conservé les valeurs d'intensité des pixels correspondant aux mitochondries, alors que les valeurs du bruit de fond ont été corrigées pour obtenir une valeur «zéro ».

1.1.2. Discrimination des signaux NADH à l'intérieur et à l'extérieur du compartiment mitochondrial

Dans le logiciel Image J, l'image d'origine de l'autofluorescence du NADH est convertie en format 8bits noir et blanc et renommée « NADHgris » puis dupliquée.
Le signal du NADH étant proche du bruit de fond, le filtrage par chapeau haut-de forme n'est pas adapté. L'application d'un filtre « smooth » permet d'améliorer la qualité de cette image « NADHgris ».

Dans un premier temps, l'image « mask mito » précédemment obtenue est appliquée à l'image « NADHgris » par l'opération arithmétique « add » : on obtient une image filtrée du NADH contenu dans le compartiment mitochondrial.
Lors d'une deuxième étape, l'image « mask mito » est dilatée. De cette façon, les pixels correspondant au compartiment mitochondrial sont élargis d'une couche de pixels.
L'étape suivante consiste à réaliser une opération arithmétique de soustraction entre ce masque dilaté et le masque d'origine. Un nouveau masque nommé « mask out » permet alors de considérer les objets situés immédiatement autour des mitochondries.

Il suffit ensuite d'appliquer ce nouveau masque à l'image NADHgris pour obtenir le signal NADH qui se trouve à l'extérieur du compartiment mitochondrial.

La macro suivante a été élaborée dans un langage de programmation de type Java. Telle qu'elle est décrite ci-dessous, elle effectue toutes ces étapes décrites de façon à être appliquée à l'ensemble de la séquence cinétique, et non pas image par image. La première partie (texte en gris) reprend l'étape précédente permettant d'obtenir le masque du compartiment mitochondrial. Le texte en bleu correspond aux étapes permettant de discriminer le NADH à l'intérieur et à l'extérieur de ce compartiment mitochondrial.

```
Dialog.create("open mtg");
Dialog.show;
run("Image Sequence...", "");
run("8-bit");
run("Duplicate...", "title=Mitogris duplicate range=1-80");
run("Duplicate...", "title=tophat duplicate range=1-80");
run("Minimum...", "radius=2 stack");
run("Maximum...", "radius=2.5 stack");
imageCalculator("Subtract create stack", "Mitogris","tophat");
selectWindow("Result of Mitogris");
rename("mask mito");
setAutoThreshold("Default");
//run("Threshold...");
setThreshold(0, 63);
run("Convert to Mask");
imageCalculator("Subtract create stack", "Mitogris","mask mito");
selectWindow("Result of Mitogris");
rename("mito filtre");
```

Fig 42

```
selectWindow("mask mito");
run("Duplicate...", "title=mask mito dilate range=1-80");
selectWindow("mask mito dilate");
run("Invert");
run("Dilate");
run("Dilate");
run("Invert");
imageCalculator("Difference create stack "mask mito dilate","mask mito");
selectWindow("Result of mask mito dilate");
rename("mask hors mito");
```

Fig 44A

```
Dialog.create("open NADH");
Dialog.show;
run("Image Sequence...", "");
run("8-bit");
rename("nadhgris");
run("Smooth");
run("Duplicate...", "title=nadh In mito range=1-80");
imageCalculator("Subtract create stack", "nadh In mito","mask mito");
selectWindow("Result of nadh In mito");digits=80 use save]");
selectWindow("mask hors mito");
run("Invert");
run("Duplicate...", "title=mask hors mito invert range=1-80");
imageCalculator("Subtract create stack", "nadhgris","mask hors mito invert");
selectWindow("Result of nadhgris");
rename("NADH hors mito");
```

Fig 44B

```
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name=[ NADH hors mito] start=0 digits=80
use save]");
imageCalculator("Add create stack", "Result of nadh In mito.tif","NADH hors
mito.tif");
rename(" NADH total");
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name=[ NADH total] start=0 digits=80 use
save]");
```

Fig 44 C

La figure 44 illustre les différentes étapes de cette procédure, et citées en italique et en vert dans la macro précédente.

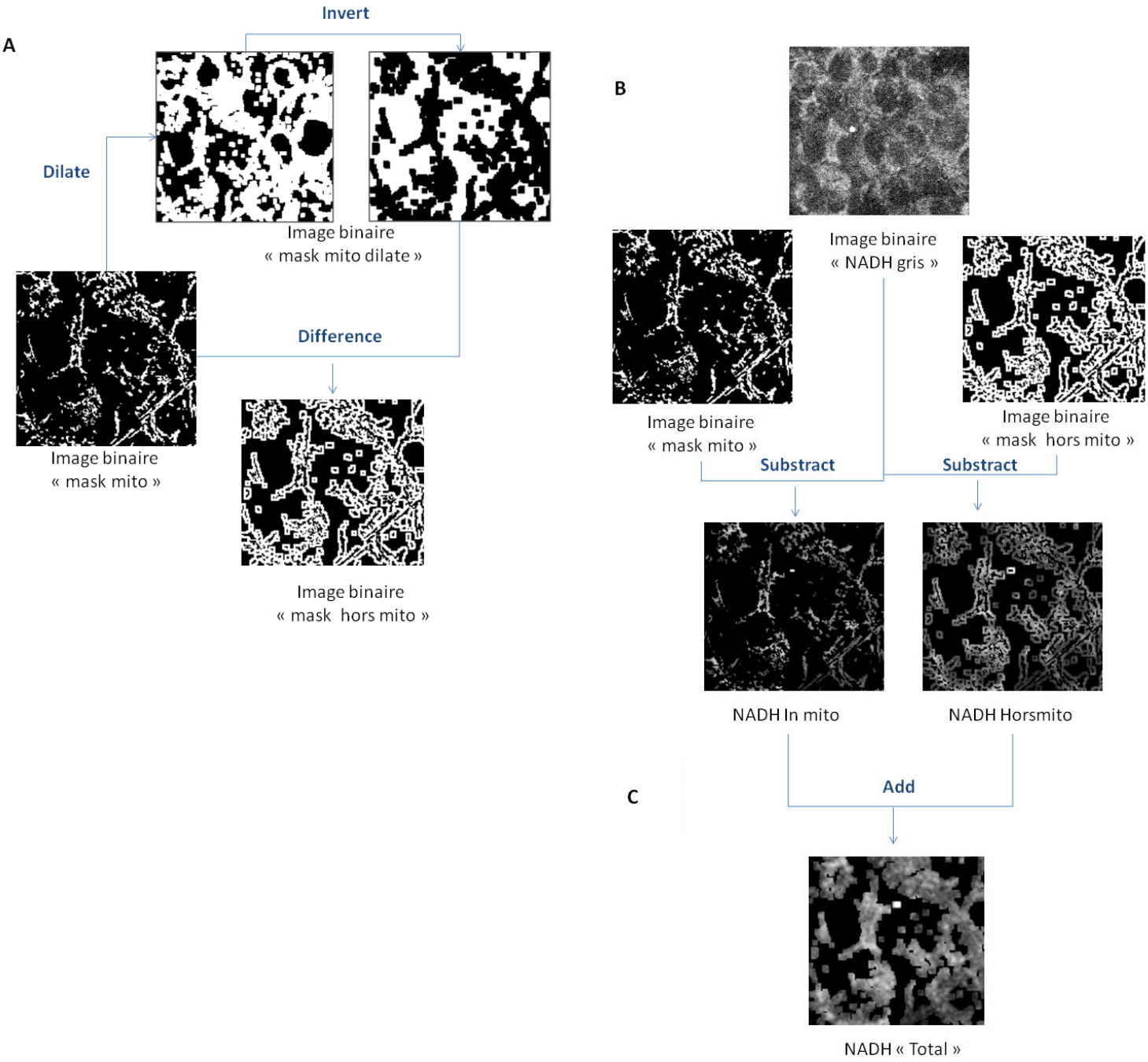


Figure 44 : Représentation des différentes étapes de la macro Image J permettant la discrimination du signal NADH à l'intérieur et en dehors-mais à proximité- du compartiment mitochondrial (« NADH total »).

(Le terme « NADH total » est exagéré, il faut plutôt comprendre « NADH en périphérie »)

1.1.3. Détermination du signal NADH de façon globale

Le paragraphe précédent décrit la macro permettant de quantifier le signal NADH de façon précise par rapport au compartiment mitochondrial. Pour évaluer ce signal de façon globale, il suffit alors d'effectuer l'opération arithmétique consistant à additionner les images obtenues « NADH In mito » et « NADH Hors mito » résultant à l'image « NADH Total ».
Cela implique d'avoir réalisé un marquage au Mitotracker Green, et de réaliser la quantification du NADH de façon complètement dépendante de celle du Mitotracker Green.
Cette approche est nécessaire pour quantifier l'intensité et la surface du signal NADH d'une part, mais surtout déterminante pour le suivi de la localisation de ce signal au cours du phénomène d'ouverture du PTP.

Une autre approche a été réalisée pour quantifier ce signal NADH de façon plus « basique », en appliquant un filtre « median » sur l'image NADH d'origine, puis en réalisant un seuillage classique.

```
Dialog.create("open NADH");
Dialog.show;
run("Image Sequence...", "");

run("8-bit");
//run("Brightness/Contrast...");
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
run("Apply LUT", "stack");
run("Median...", "radius=1 stack");
rename ("NADH gris");

run("Duplicate...", "title=mask duplicate range=1-80");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(65, 255);
run("Threshold", "thresholded remaining black");

imageCalculator("Subtract create stack", "NADH gris","mask");
selectWindow("Result of NADH gris");
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name=[Result of NADH gris] start=0 digits=80 use
save]");

selectWindow("NADH gris");close();
selectWindow("Result of NADH gris");close();
selectWindow("mask");close();
```

1.1.4. Détermination du signal TMRM lié au potentiel membranaire mitochondrial

Cette macro est exactement la même que celle du Mitotracker Green, puisque le TMRM est directement lié au compartiment mitochondrial. Cette étape va permettre de quantifier les variations d'intensité du signal de fluorescence directement liées aux variations de potentiel mitochondrial.

```
Dialog.create("open tmrm");
Dialog.show;
run("Image Sequence...", "");
rename("mitogris");
run("8-bit");
run("Duplicate...", "title=tophat duplicate range=1-80");
run("Minimum...", "radius=2 stack");
run("Maximum...", "radius=2.5 stack");
imageCalculator("Subtract create stack", "mitogris","tophat");
selectWindow("Result of mitogris");
setAutoThreshold();
//run("Threshold...");
setThreshold(40, 255);
run("Threshold", "thresholded remaining black");
rename("mask");
imageCalculator("Subtract create stack", "mitogris","mask");
selectWindow("Result of mitogris");
run("Image Sequence... ", "format=TIFF name=[tmrm filtre] start=0 digits=80 use
save]");
selectWindow("mitogris");
close();
selectWindow("tophat");close();
selectWindow("mask");close();
selectWindow("Result of mitogris");close();
```

1.2. Validation du modèle d'ouverture du PTP par ajout d'A23, ionophore au calcium sur les différents types cellulaires étudiés.

1.2.1. Cellules HMEC

L'expérience présentée ici est celle qui a permis d'élaborer la méthode d'analyse présentée aux paragraphes précédents.

Les cellules HMEC ont été marquées avec 50nM de Mitotracker Green pendant 30 minutes à 37°C puis placées sur le support de la chambre d'incubation du microscope confocal. Une première séquence d'images a été acquise dans les canaux correspondant au Mitotracker Green et au NADH, en réalisant 11 coupes optiques de 0.3µm d'intervalle, de façon à réaliser ultérieurement une reconstruction en 3D.

L'ionophore A23187 a été ajouté aux cellules à la concentration finale de 0.05 µM et les images ont été acquises toutes les 3 minutes pendant 6 minutes (Figure 45).

La figure 45 montre une cellule zoomée en 3D afin d'améliorer la répartition des signaux de fluorescence au niveau des mitochondries.

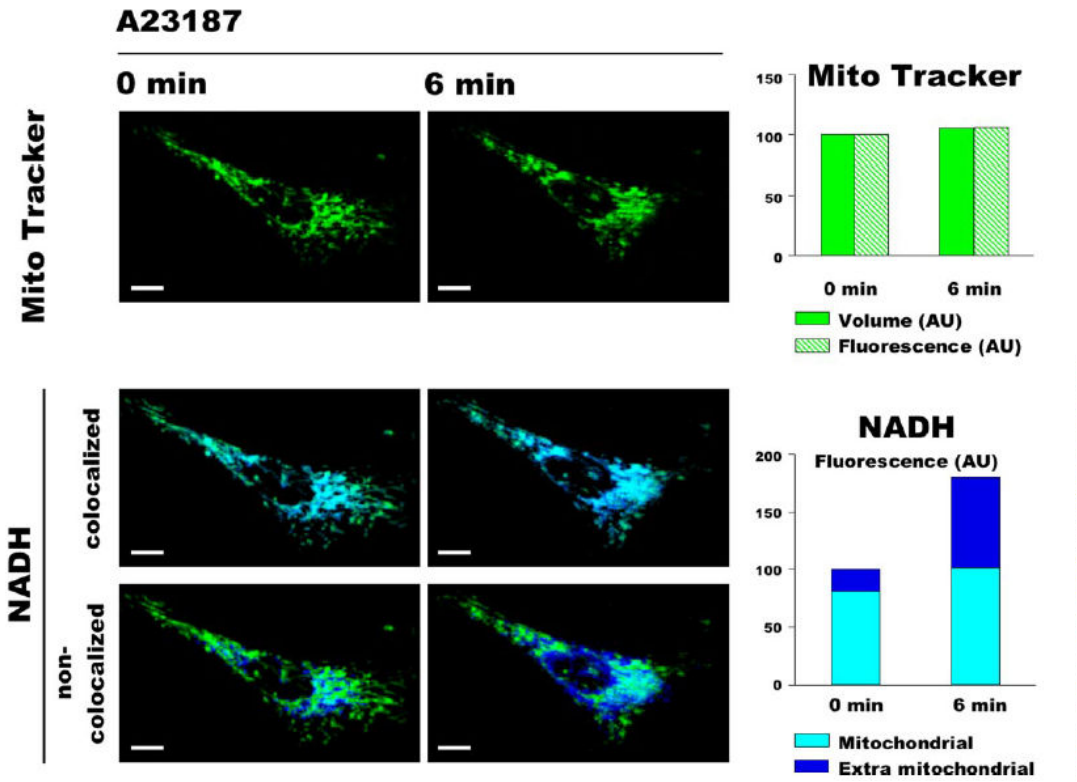


Figure 45 : Effet de l'A23187 sur les cellules HMEC : reconstitution 3D d'une celluleszoomée (issue de (Dumas, Argaud et al. 2009).

Le programme d'analyse d'images qui a été mis au point dans ce travail (§ 1.1.1. et 1.1.2) a donc apporté la preuve par la quantification que le signal NADH augmente à la fois en surface et en fluorescence hors du compartiment mitochondrial lors de l'ouverture du PTP induite par l'entrée de calcium dans les mitochondries provoqué par l'A23187. Par contre, les images de Mitotracker Green montrent que l'ouverture du PTP n'induit pas de modification de fluorescence ni de volume du compartiment mitochondrial. La méthode étant ainsi validée, les résultats présentés par la suite montreront uniquement les images et les quantifications des fluorescences du TMRM, du NADH et de superposition de ces deux signaux.

1.2.2 Hépatocytes primaires

L'ouverture du PTP des hépatocytes primaires fraîchement isolés a été évaluée dans les mêmes conditions. La figure suivante met en évidence l'augmentation de fluorescence du NADH qui se produit simultanément à la baisse de fluorescence du TMRM. Cependant, les hépatocytes fraîchement isolés ne sont pas très étalés et présentent un réseau mitochondrial très dense qui ne permet pas de distinguer clairement le compartiment mitochondrial. Néanmoins, l'ampleur de l'augmentation de surface du signal NADH suggère fortement que ce signal est dé-localisé par rapport à celui des mitochondries.

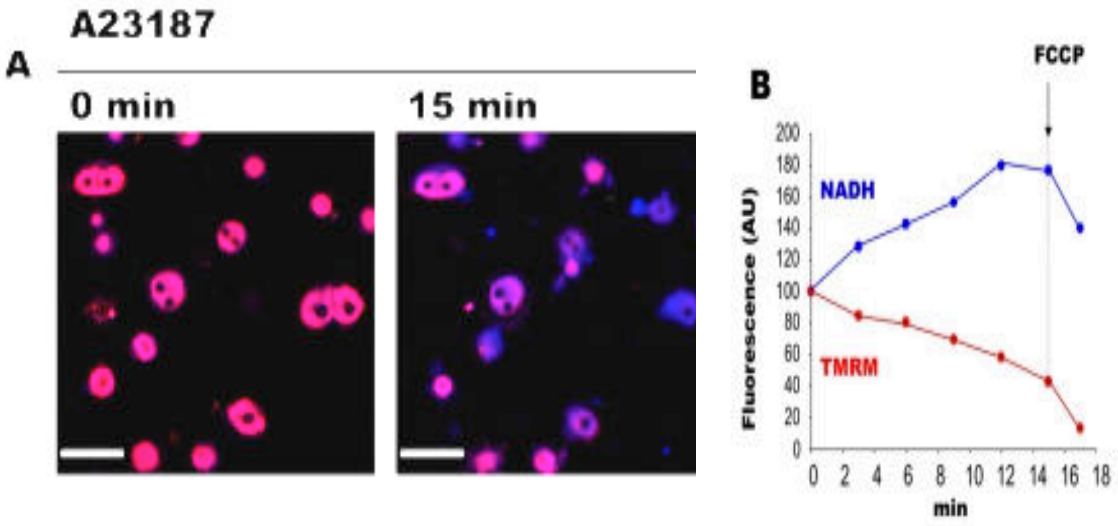


Figure 46 : Effet de l'A23187 sur les hépatocytes fraîchement isolés (issue de Dumas et al JBC 2009). La flèche « FCCP » indique l'ajout de ce découplant en fin d'expérience. Barre d'échelle 44µm.

1.2.3. Cellules RT112

Afin de vérifier la capacité d'ouverture du PTP des cellules RT112, la même méthode a été appliquée : les cellules ont été traitées avec 1µM d'A23187, en présence ou non de CsA. La figure 47 montre que dans cette lignée également l'entrée de calcium provoquée par le ionophore induit une augmentation rapide de la fluorescence du NADH. Cependant, contrairement à ce qui a été observé avec les HMEC ou les hépatocytes, la fluorescence du TMRM ne diminue pas. La présence de CsA empêche le phénomène d'augmentation du signal NADH, ce qui permet de confirmer que le PTP a bien été ouvert lors de ce stress, mais de façon transitoire et répétitive, phénomène appelé « flickering ».

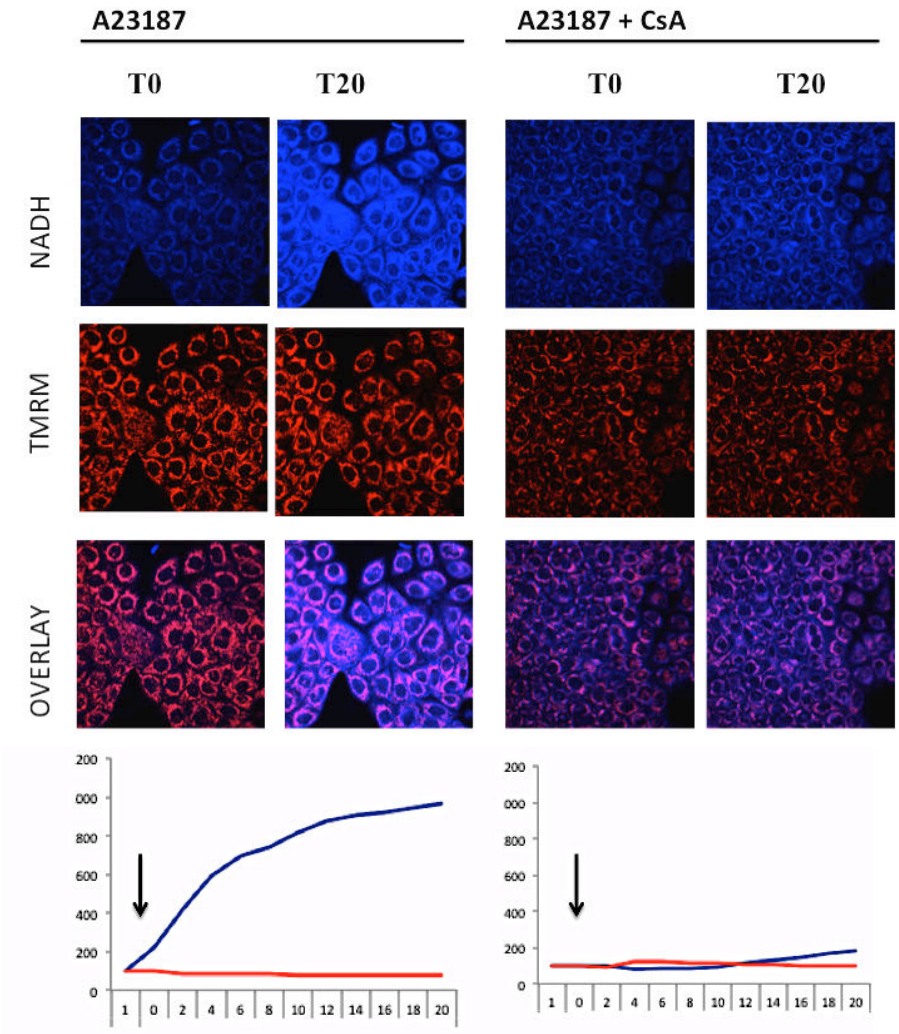


Figure 47 : Effet de l'A23187 sur les cellules RT112. L'ajout d'A23 est indiqué par la flèche. Les courbes rouge et bleue représentent les intensités de fluorescence du TMRM et du NADH respectivement, au cours du temps.

1.2.4. Cellules INS1

L'effet de l'A23 sur les INS1 a été évalué par Sandrine Lablanche au cours de ses propres travaux de doctorat. Les résultats obtenus montrent une augmentation de l'intensité de fluorescence du NADH, une diminution de fluorescence du TMRM et une augmentation du rapport de surface NADH/TMRM, qui sont caractéristiques de l'ouverture du PTP (Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2011).

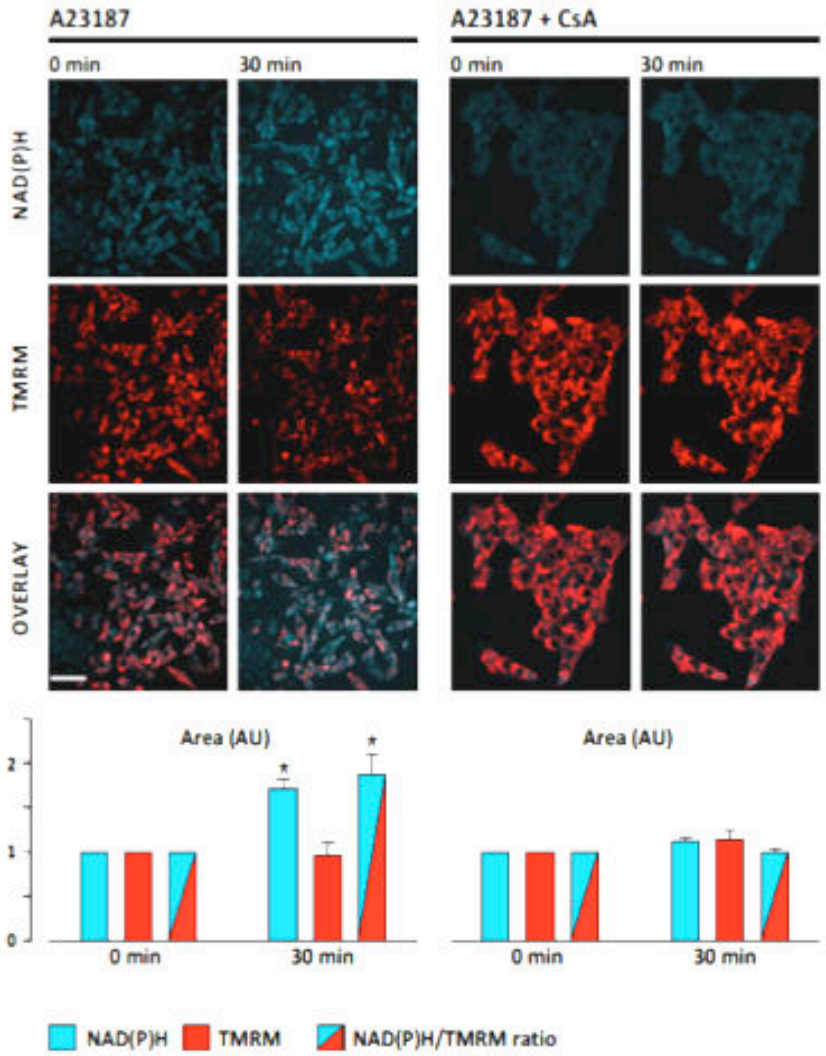


Figure 48 : Effet de l'A23187 sur les cellules INS1. Les graphes illustrent une quantification des surfaces des signaux de fluorescence du TMRM et du NADH ainsi qu'un ratio de ces surfaces.

RECAPITULATIF

- **<u>L'excès de calcium provoqué par l'A23 induit l'ouverture du PTP :</u>**

- **La délocalisation du NADH par rapport au TMRM est bien représentative de l'ouverture du PTP ;**
- **Cet effet est prévenu, ralentit par la présence de CsA dans tous les types cellulaires étudiés ;**
- **Dans ces conditions, le PTP des cellules RT112 n'est ouvert que de façon transitoire**

2/ Effets des inhibiteurs de la CRM

La roténone et l'oligomycine sont des inhibiteurs du complexe 1 et de l'ATP synthase, respectivement. Dans les mêmes conditions de marquage au TMRM et d'observation au microscope confocal que celles décrites précédemment, les différents types de cellules ont été traités soit avec 2,5µM de roténone, 6µg/ml d'oligomycine, soit les deux simultanément, pendant 30 minutes à 37°C, directement dans la chambre d'incubation du microscope, afin d'observer et quantifier leur effet sur les mêmes cellules de façon cinétique. Les résultats présentés dans cette partie sont le fruit de diverses expériences qui ont été réalisées au cours de différents projets auxquels j'ai participé, et pour lesquels l'analyse de l'effet de certains inhibiteurs de la CRM a été nécessaire pour aider à la compréhension des résultats observés (effets de diverses drogues par exemple : (Lamarche, Carcenac et al. 2013)). De ce fait, certains des résultats présentés dans ce travail ont permis d'alimenter notre réflexion sur le métabolisme des différents types cellulaires présentés. Ces expériences n'ont pas été réalisées -ou bien ne l'ont pas été dans exactement les mêmes conditions- pour tous les types cellulaires.

2.1. Cellules HMEC

La figure 49 montre que l'inhibition du complexe 1 de la chaîne respiratoire en présence de roténone provoque une augmentation du signal de fluorescence du NADH, sans délocalisation par rapport au compartiment mitochondrial. Cet effet correspond à une accumulation du NADH dans les mitochondries, puisqu'il n'est plus utilisé comme substrat du complexe 1. Parallèlement, l'intensité de fluorescence du TMRM n'est pas modifiée, ce qui indique que le potentiel mitochondrial n'est pas affecté par cette inhibition par la roténone.

L'ajout d'oligomycine, par contre, induit une augmentation de la fluorescence du TMRM, liée à l'hyperpolarisation des mitochondries due à l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire mitochondrial, puisque ces protons ne sont pas utilisés par l'ATP synthase ainsi inhibée. Le signal du NADH n'est pas modifié.

Si les deux inhibiteurs sont ajoutés simultanément, le NADH s'accumule dans les mitochondries et son autofluorescence augmente, alors que la fluorescence du TMRM

diminue drastiquement. Cette expérience met en évidence qu'en présence de roténone seule, l'ATPsynthase tourne en sens inverse, de façon à réutiliser l'ATP glycolytique afin de maintenir le potentiel membranaire mitochondrial, ce qui n'est plus possible lorsque l'oligomycine inhibe cette ATPsynthase.

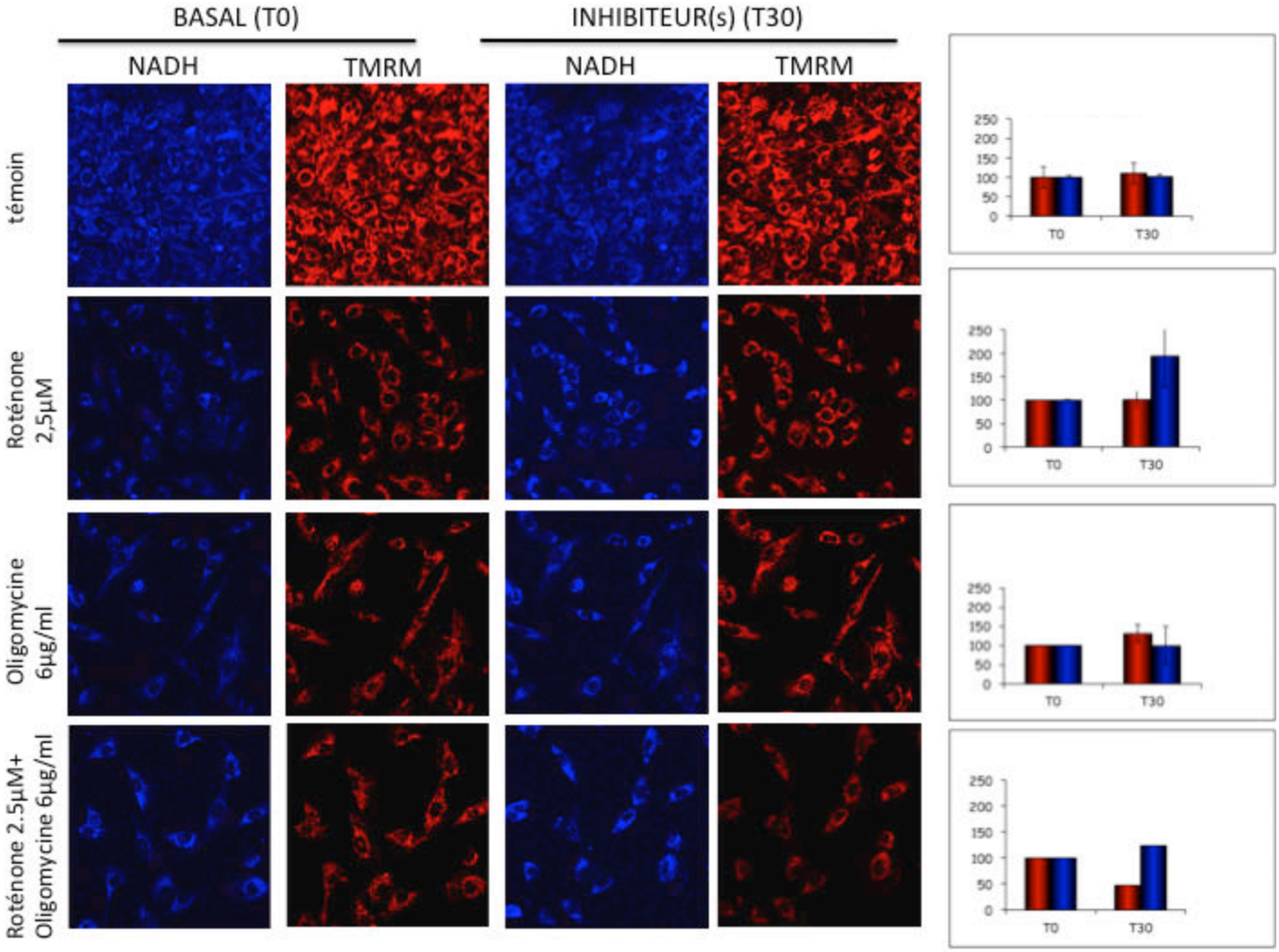


Figure 49 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de cellules HMEC. La fluorescence du TMRM (en rouge) est directement liée aux variations de potentiel mitochondrial et celle du NADH est un reflet du potentiel redox (en bleu).

2.2. Hépatocytes isolés

Hépatocytes fraîchement isolés

Cette expérience a également été réalisée sur des hépatocytes fraîchement isolés en présence de milieu Krebs-Calcium additionné de Lactate Pyruvate et Octanoate (noté LPO) apportant des substrats aux complexes 1 et II.

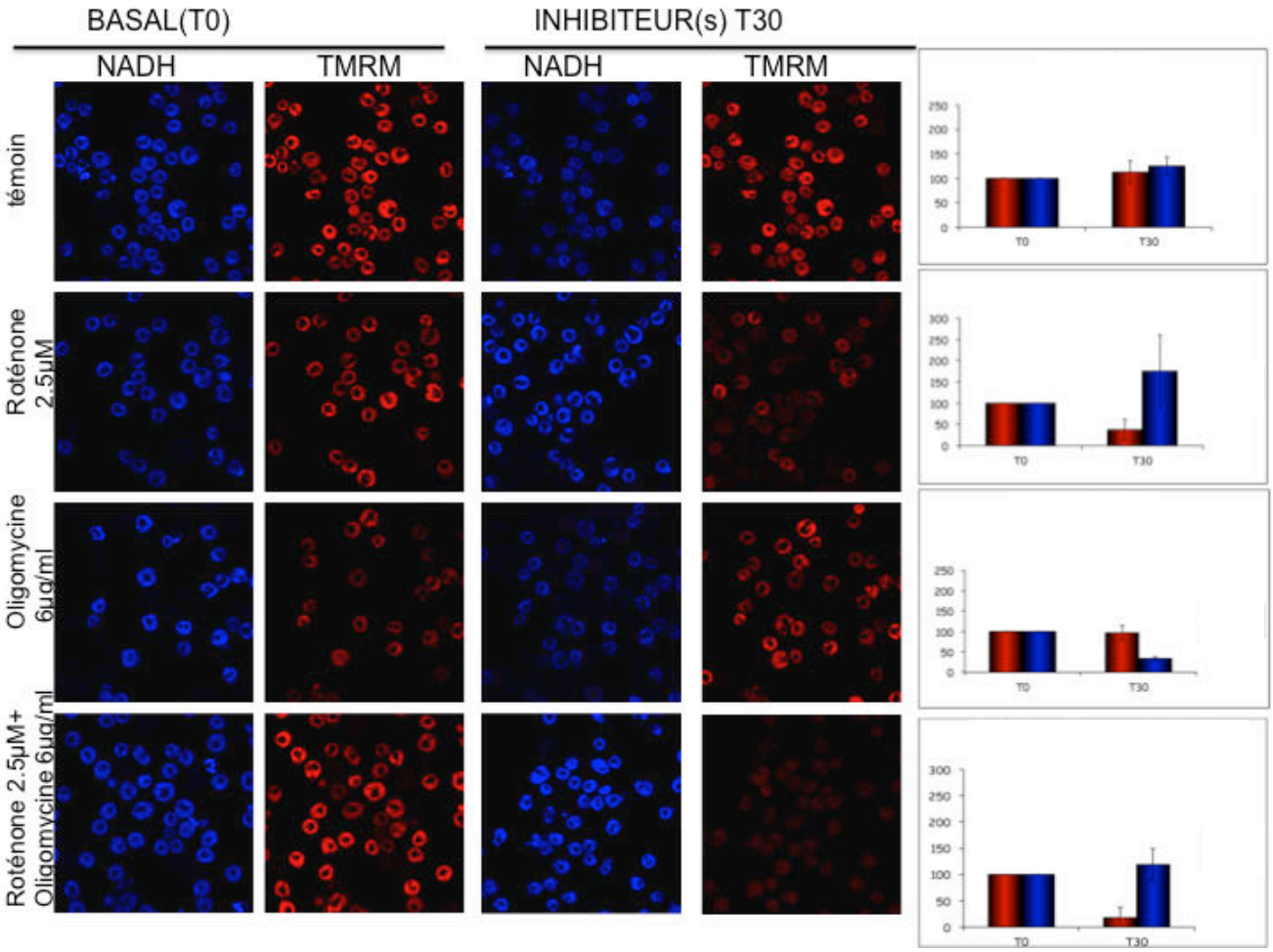


Figure 50 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de hépatocytes fraîchement isolés et incubés en présence de LPO. La fluorescence du TMRM (en rouge) est directement liée aux variations de potentiel mitochondrial et celle du NADH est un reflet du potentiel redox (en bleu).

- La roténone provoque une accumulation de NADH en présence de LPO accompagné d'une dépolarisation.
- L'oligomycine n'induit pas d'effet significatif sur la fluorescence du TMRM alors que le signal NADH est fortement diminué.
- L'utilisation simultanée des deux inhibiteurs en LPO : une accumulation du NADH et une dépolarisation.

La même expérience a également été réalisée sur des hépatocytes fraîchement isolés en présence de milieu Krebs-Calcium additionné de Lactate et Pyruvate (noté LP) apportant des substrats préférentiellement au complexe 1 (fig.51).

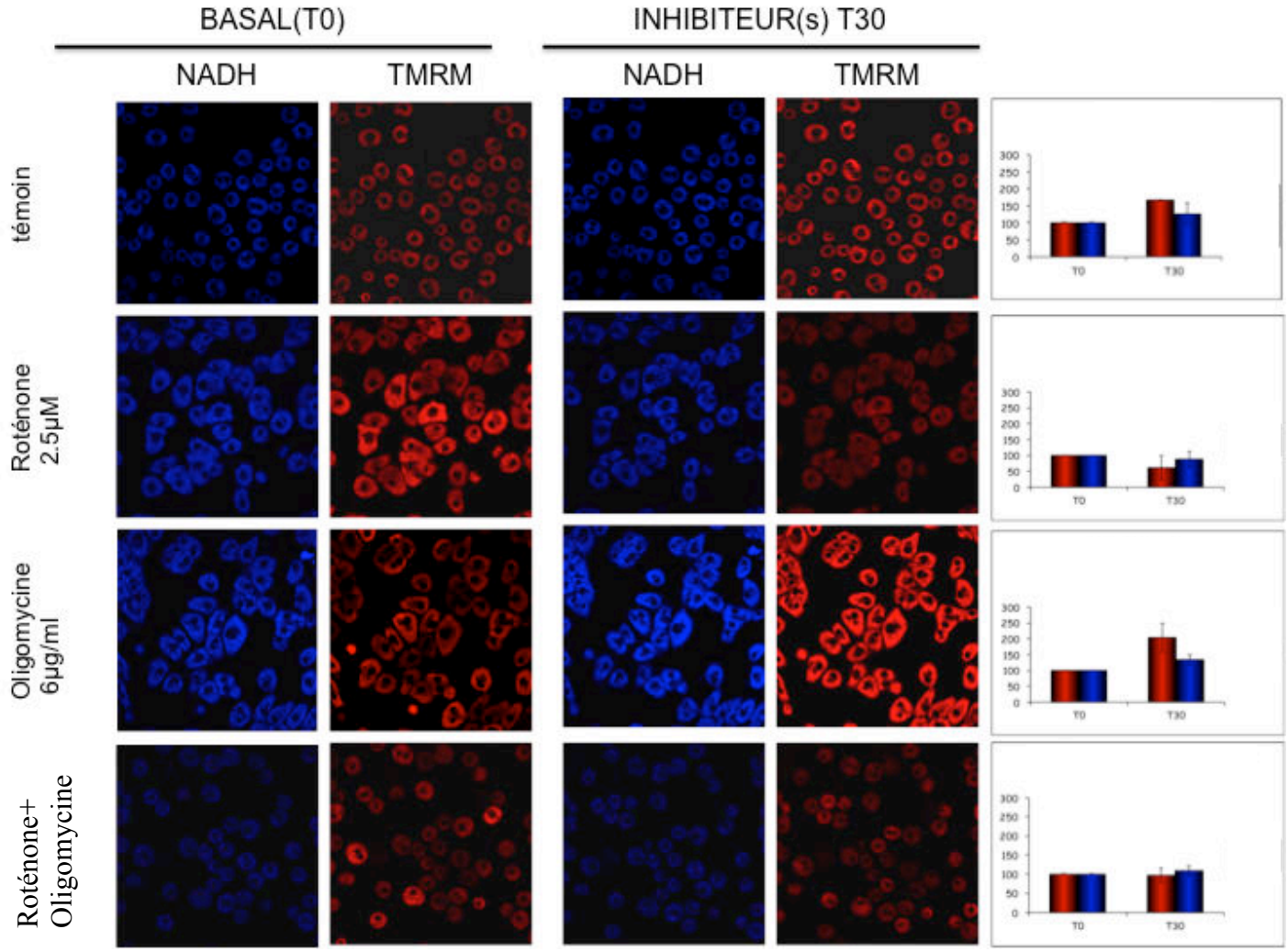


Figure 51 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de hépatocytes fraîchement isolés et incubés en présence de

Lactate Pyruvate. La fluorescence du TMRM (en rouge) est directement liée aux variations de potentiel mitochondrial et celle du NADH est un reflet du potentiel redox (en bleu).

- La roténone n'induit pas de modification visible du signal de NADH en présence de LP , mais induit une dépolarisation se traduisant par une baisse de fluorescence du TMRM.
- L'oligomycine induit une hyperpolarisation se traduisant par l'augmentation de la fluorescence du TMRM. Parallèlement, le signal NADH montre une tendance vers une accumulation révélée par une augmentation de fluorescence.
- L'utilisation simultanée des deux inhibiteurs induit une réponse différente par rapport à la présence de LPO ou en comparaison aux cellules HMEC : les faibles variations de réponses observées des signaux TMRM et NADH ne traduisent pas d'effet majeur.

Hépatocytes isolés cultivés 24h en milieu complet

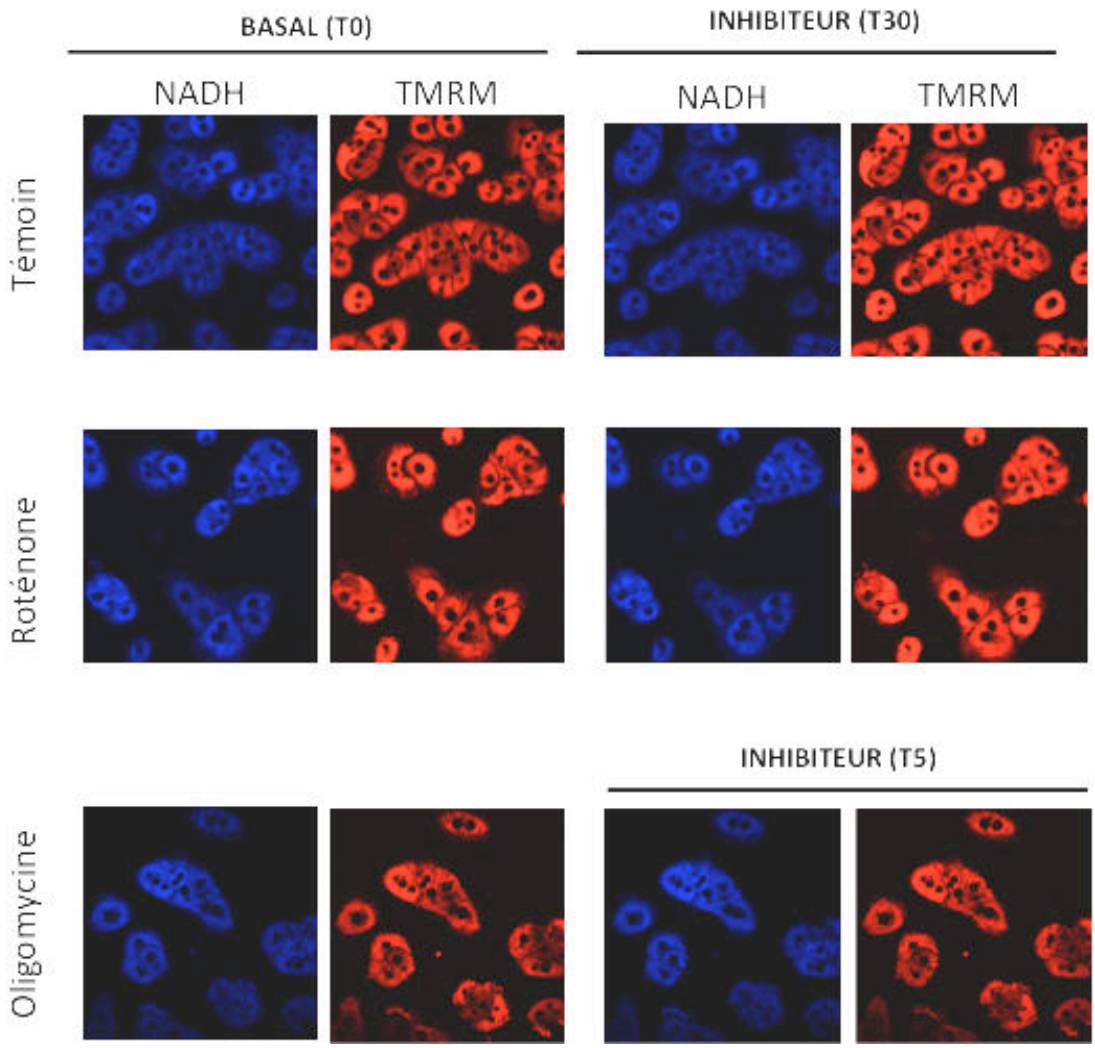


Figure 52 : Effets de la roténone et de l'oligomycine sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de hépatocytes isolés cultivés 24 en milieu complet

- La roténone n'induit pas de modification visible de l'intensité des signaux TMRM et de NADH après 30 minutes.
- L'oligomycine n'induit pas une hyperpolarisation visible qui se traduirait par l'augmentation de la fluorescence du TMRM. Parallèlement, le signal NADH ne montre pas de modification de signal. Dans cette expérience, les cellules n'ont été

incubées que pendant une courte durée (5 minutes) en présence de l'inhibiteur, ce qui explique l'absence d'effet visible.

- L'utilisation simultanée des deux inhibiteurs n'a pas été réalisée dans cette expérience.

Ces trois expériences réalisées dans des conditions d'incubation différentes révèlent que la méthodologie de visualisation des signaux de fluorescence du TMRM et du NADH est adaptée pour évaluer les effets de l'inhibition de la chaîne respiratoire. En comparaison à l'ouverture du PTP, cette inhibition ne met pas en évidence de phénomène de délocalisation ou de décompartimentation du signal NADH par rapport à celui du TMRM. De plus, chaque type d'inhibition induit un effet particulier, soit en provoquant une accumulation du NADH (en cas d'inhibition du complexe I), soit une hyperpolarisation (en cas d'inhibition de l'ATPsynthase). Il est important de noter que ces effets sont fortement dépendants des substrats présents dans les milieux d'incubation : l'effet de la roténone est bien plus prononcé en milieu LPO qu'en milieu LP. A l'issue de ces expériences, nous avons constaté que les hépatocytes incubés en LPO avaient tendance à s'arrondir et se décoller de leur support plus rapidement que ceux incubés en LP (résultats non montrés), indiquant des signes de souffrance cellulaire voire de mortalité. Après isolation des hépatocytes, la présence de milieu Krebs-LPO ne semble pas être favorable au développement des cellules. L'effet des inhibiteurs sur leur CRM sera donc davantage prononcé puisque leur métabolisme semble déjà être affecté.

En revanche, les cellules incubées en Krebs-LP adhèrent davantage à leur support et ont tendance à s'étaler après 1 heure de mise en culture, ce qui indique un statut métabolique plus favorable. Dans ces conditions, en comparaison aux cellules HMEC, sous l'effet de la roténone, les hépatocytes cultivés en milieu complet (contenant, entre autre, du glucose (voir composition dans la partie expérimentale) semblent faire fonctionner également leur ATPsynthase en sens inverse et réutiliser l'ATP pour maintenir leur potentiel membranaire. En effet, il faut de l'ATP extra-mitochondrial pour faire tourner l'ATP-synthase à l'envers, c'est-à-dire de l'ATP glycolytique, nécessitant, par définition, la présence de glucose, ce qui est le cas dans cet exemple. L'oligomycine provoque une hyperpolarisation se traduisant par une augmentation du potentiel de membrane. L'inhibition de la CRM en milieu LP induit une accumulation du NADH faible en présence de roténone, mais significativement élevée en présence d'oligomycine.

2.3. Cellules INS1

Pour ce type cellulaire, seul l'effet de la roténone a été testé (fig. 53). Comme pour les autres types cellulaires, les cellules INS1 ont été préalablement marquées avec 50nM de TMRM puis placées dans la chambre d'incubation du microscope confocal. Après acquisition d'une image basale, la roténone a été ajoutée à une concentration de 1µM final pendant 30 minutes.

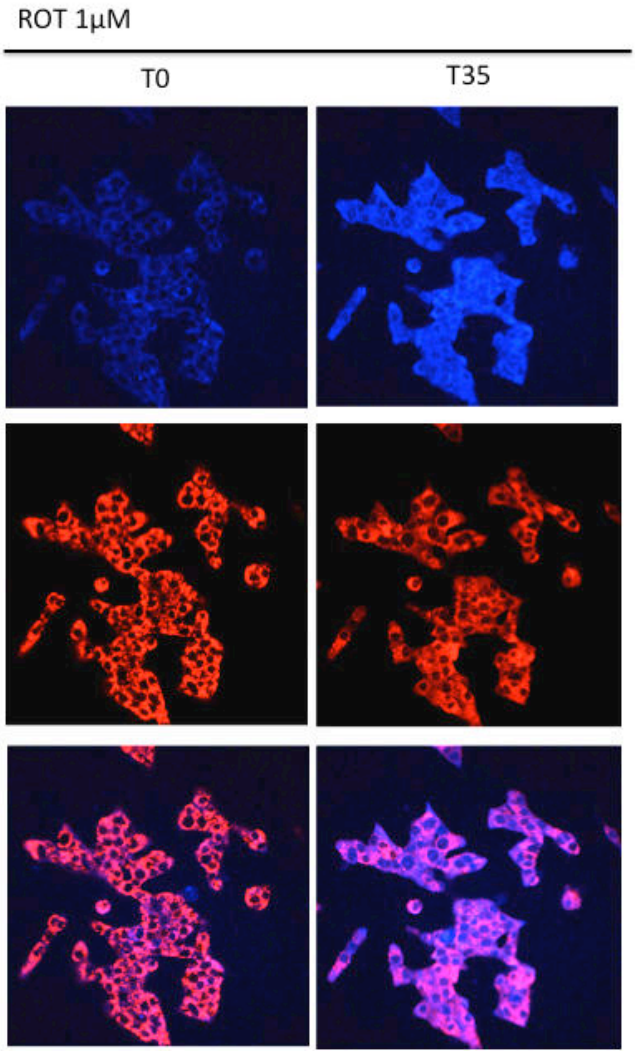


Figure 53 : Effets de la roténone sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de cellules INS1.

La roténone induit une accumulation de NADH révélée par une forte augmentation du signal de fluorescence du NADH, avec un « bavement », une fuite dans le compartiment nucléaire. Le potentiel membranaire mitochondrial révélé par le TMRM est affecté : le signal

de fluorescence du TMRM montre une légère baisse d'intensité avec une distribution presque ponctuée. Si le potentiel membranaire mitochondrial est maintenu, on observe une délocalisation du NADH par rapport aux mitochondries. Sachant que la roténone inhibe le PTP dans les cellules INS1, cette image est déconcertante mais trouve son explication plus loin (voir discussion).

RECAPITULATIF

Ces résultats obtenus dans les différents types cellulaires et dans des milieux d'incubation différents mettent en évidence qu'une augmentation du signal NADH et une diminution de la fluorescence du TMRM peuvent traduire un effet d'inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, les réponses aux inhibiteurs sont variables non seulement en fonction du type cellulaire mais également selon le type de substrat utilisé.

- **Effet de l'inhibition de la chaîne respiratoire par la roténone :**
- **Augmentation du signal NADH traduisant son accumulation dans les mitochondries**
- **Diminution du signal TMRM traduisant une baisse de potentiel mitochondrial. Cet effet est plus ou moins prononcé en fonction des types cellulaires et des substrats présents.**

- **Effet de l'inhibition l'oxydation phosphorylante par l'oligomycine :**
- **aucune variation significative du signal NADH excepté pour les hépatocytes frais en présence de LPO où ce signal est fortement diminué ;**
- **Augmentation du signal TMRM traduisant une hyperpolarisation du potentiel mitochondrial, liée à une accumulation de protons dans l'espace intermembranaire. Cet effet est plus ou moins prononcé en fonction des types cellulaires et des substrats présents.**

- **A l'exception des cellules INS1, l'inhibition de la CRM n'induit pas de délocalisation du NADH par rapport au compartiment mitochondrial.**

3/ Effet de découplant sur la chaîne respiratoire

Les découplants sont des composés chimiques qui empêchent la transmission de l'énergie entre les réactions d'oxydoréductions et de phosphorylation de l'ATP : ils diminuent le gradient de protons, favorisent l'hydrolyse de l'ATP par le complexe F0-F1, activent les oxydations cellulaires, l'utilisation du NADH et de l'oxygène. Ils sont souvent désignés sous le terme protonophores, translocateurs de protons et définis comme des ionophores qui déplacent les protons au travers de la membrane lipidique.
Parmi les différents découplants existants, nous avons testé l'effet soit du FCCP (carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone), soit du CCCP (carbonyl cyanide-m-chlorophenyl hydrazone), sur nos différents types cellulaires. Selon la même méthodologie, les cellules ont préalablement été marquées au TMRM puis traitées par le découplant directement dans la chambre d'incubation du microscope.

3.1. HMEC

Une expérience de cinétique de l'effet du CCCP sur le potentiel membranaire mitochondrial a été effectuée de façon à analyser les variations rapides de fluorescence du TMRM lors de ce phénomène de découplage. Les cellules HMEC ont préalablement été incubées avec du TMRM à une concentration volontairement élevée (500nM) puis 100µM de CCCP ont été injectés par un système de perfusion. Une image a été acquise avant ajout de CCCP, puis toutes les 20 secondes pendant environ 10 minutes dès l'ajout du découplant.

Comme le montre la figure 54, dès les vingt premières secondes, le CCCP agit sur le potentiel membranaire en induisant une augmentation forte de la fluorescence du TMRM. Ce phénomène est immédiatement suivi par une diminution brusque de fluorescence qui se poursuit progressivement jusqu'à atteindre un niveau minimum à environ cinq minutes. Après dix minutes, le signal de fluorescence est quasiment inexistant.

Cette expérience montre que l'effet translocateur de protons exercé par le découplant induit dans un premier temps un relargage de la sonde en réponse à la forte perturbation de l'équilibre de Nernst liée à l'effet du découplant sur le gradient de protons, donc sur le

potentiel mitochondrial. L'effet maximum est atteint dès cinq minutes de présence du découplant.

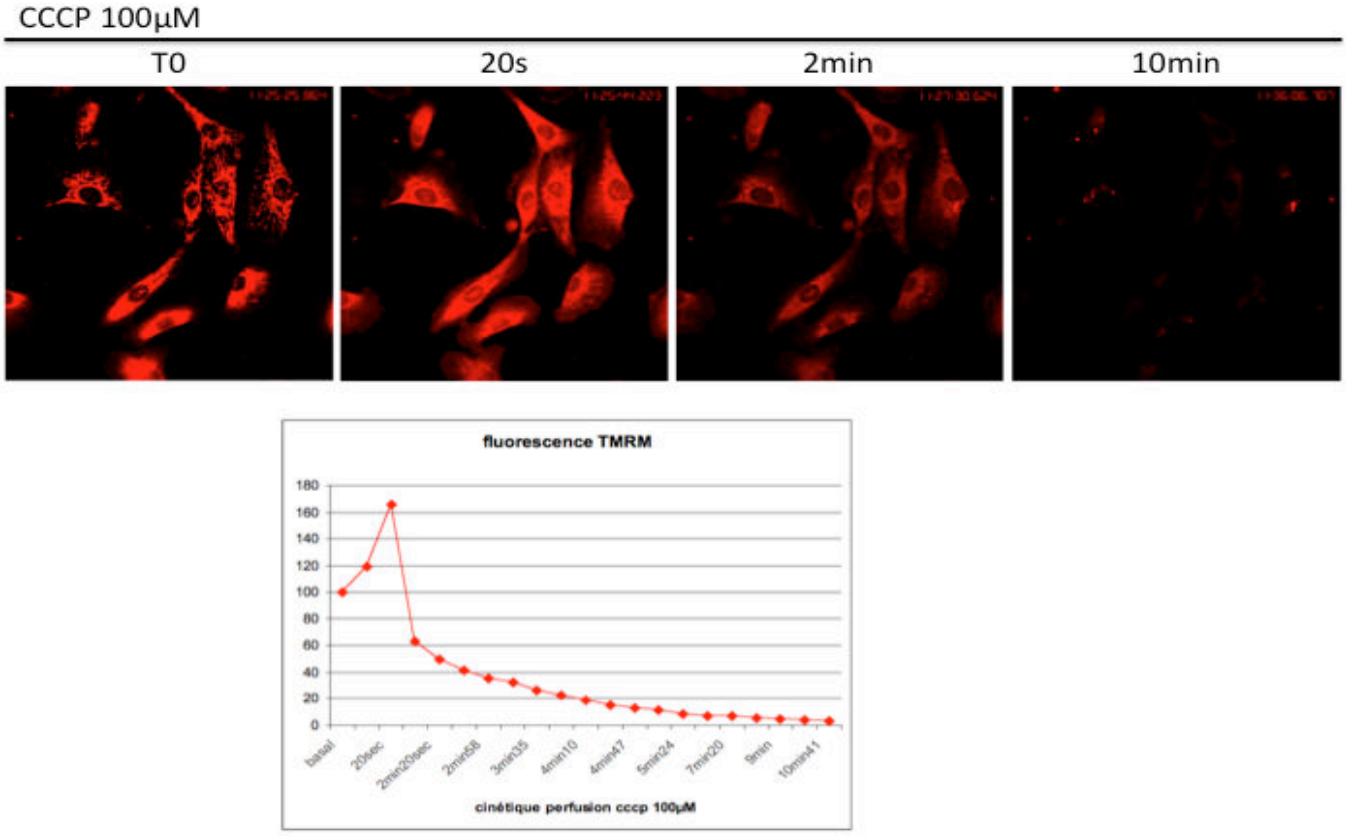


Figure 54 : Cinétique de l'effet du CCCP 100µM sur le potentiel membranaire mitochondrial de cellules HMEC

Ce phénomène se produit de la même façon lorsqu'une forte concentration de sonde est utilisée. Cette expérience justifie la raison pour laquelle il faut utiliser des concentrations de TMRM de l'ordre de 10 à 50nM.

La figure 55 présente l'effet du FCCP sur les cellules HMEC :
dès cinq minutes, la fuite de protons provoque une extinction des signaux de fluorescence du TMRM et du NADH, traduisant à la fois une perte de potentiel membranaire et une activation de l'utilisation du NADH qui a été totalement consommé jusqu'à l'arrêt de la chaîne respiratoire.

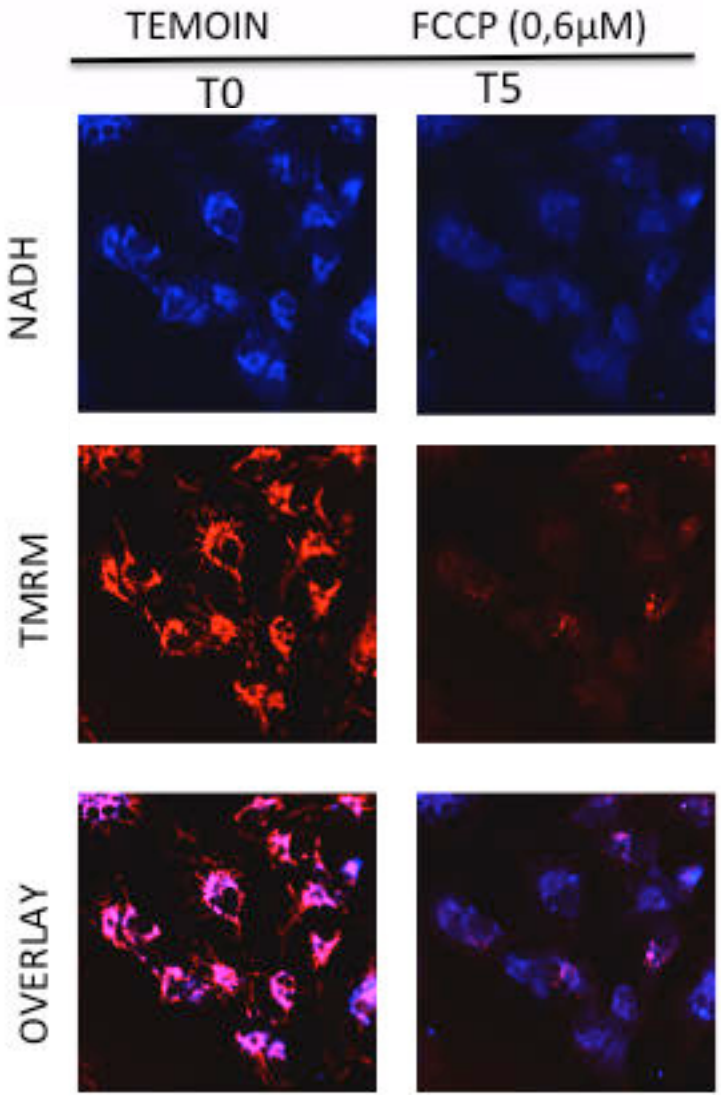


Figure 55 : Effets du FCCP sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH de cellules HMEC

3.2. Hépatocytes

Les hépatocytes isolés cultivés pendant 24h en milieu complet ont été préalablement marqués avec 50nM de TMRM puis placés dans la chambre d'incubation du microscope.

Les images témoins ont été acquises à T0, puis après 30 minutes. Le CCCP à la concentration de 200µM a été ajouté directement sur les cellules, et les images ont été acquises immédiatement après ajout du découplant puis après dix minutes.

La figure 56 révèle une légère augmentation du signal TMRM en situation témoin, liée au temps nécessaire à la sonde pour se stabiliser dans les mitochondries des hépatocytes selon l'équilibre de Nernst. Immédiatement après l'ajout du CCCP, le signal NADH est complètement aboli et celui du TMRM est fortement diminué mais persiste faiblement après 10 minutes. Contrairement aux cellules HMEC, les hépatocytes parviennent probablement à utiliser la réversibilité de l'ATPase pour hydrolyser de l'ATP en ADP et conserver un potentiel mitochondrial minimum mais sans doute insuffisant pour empêcher l'inhibition de la chaîne respiratoire.

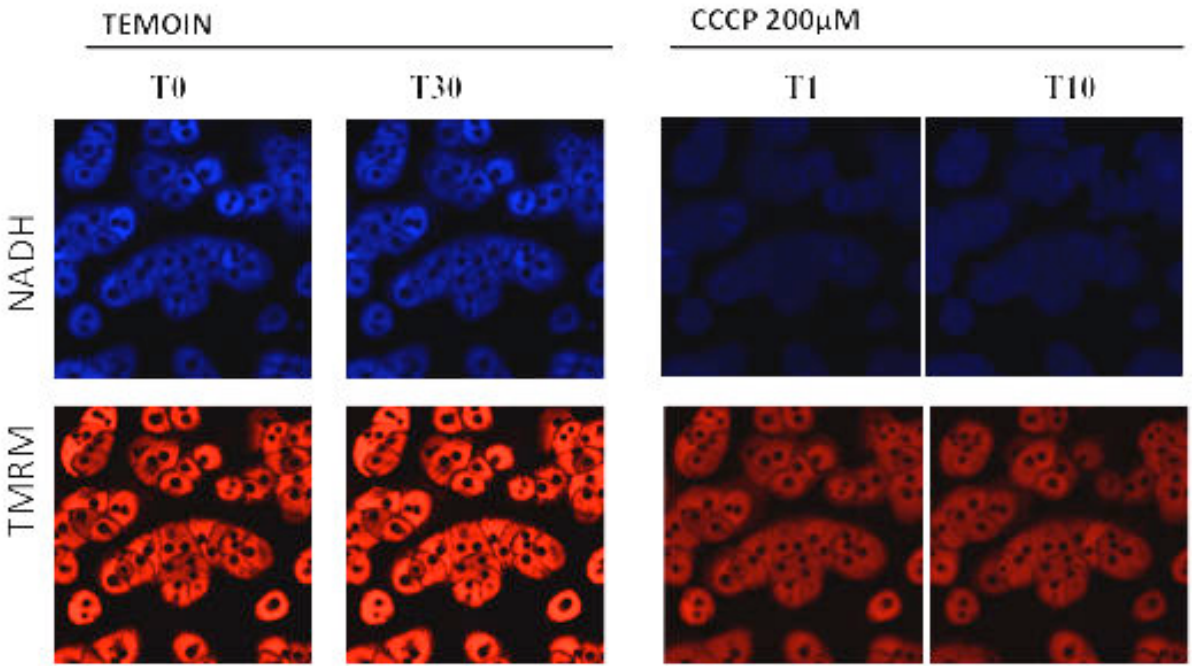


Figure 56 : Effets du CCCP sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH des hépatocytes isolés cultivés 24 en milieu complet

3.3 INS1

Préalablement marquées au TMRM, les cellules INS1 ont été exposées à 50µM de CCCP, directement dans la chambre d'incubation du microscope.

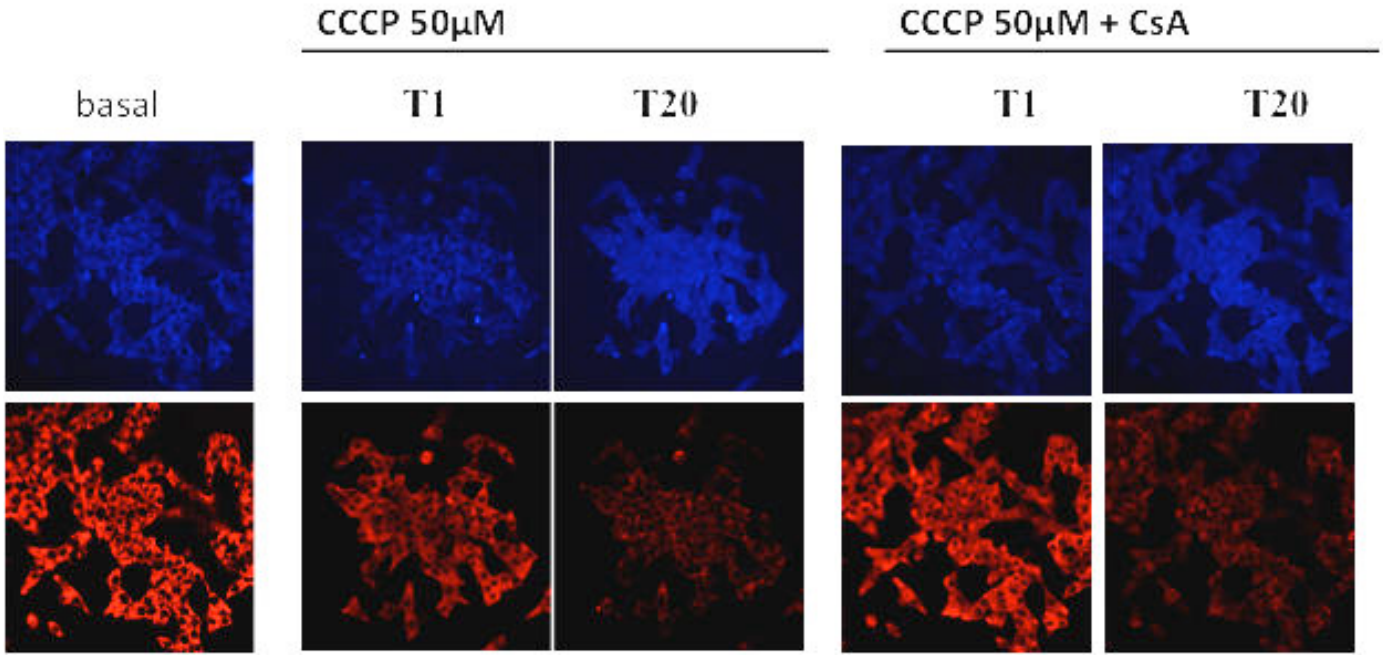


Figure 57 : Effets du CCCP sur le potentiel membranaire mitochondrial et le NADH des cellules INS1

Dès la première minute après l'ajout de CCCP, le potentiel membranaire est affecté et le signal de fluorescence du TMRM se décompartimente et diminue pour atteindre un niveau minimum après 20 minutes. Si le signal NADH semble diminuer légèrement à la première minute, il augmente significativement après 20 minutes de présence du découplant.
Parallèlement, les cellules INS1 ont été préalablement incubées en présence de CsA 1µM en même temps que le TMRM. Aucun effet protecteur de la CsA sur l'effet du découplant n'a pu être mis en évidence : la fluorescence du TMRM s'éteint alors que celle du NADH augmente fortement.

Cette expérience met en évidence un métabolisme particulier des cellules INS1 (voir discussion), qui agit de façon très différente à la présence d'un découplant en comparaison des autres types cellulaires étudiés. Les images observées de l'effet du CCCP sur les INS1

ressemblent curieusement à celles obtenues en présence d'A23187 (fig 48) et représentatives de l'ouverture du PTP. L'absence de prévention de l'effet du CCCP par la CsA prouve que le découplage observé n'a pas de lien avec le fonctionnement du PTP.

4/ Effets de stress énergétique sur le PTP : Effets de la carence en substrats énergétiques et en O2 sur les différentes lignées

Pour chacune des lignées, les figures suivantes présentent les images de superposition des canaux de fluorescence du TMRM et du NADH obtenues dans les différentes conditions de carences effectuées. Bien que les acquisitions d'images aient été effectuées par intervales de 10 minutes, seules les images de fin d'ischémie, fin de reperfusion et fin de recharge sont présentées. Les graphes correspondent à la quantification de chacune des images tout au long de la cinétique d'acquisition de l'expérience correspondant aux images. Du fait du nombre de cellules différents d'une expérience à l'autre, des potentielles dérives de focus lors des changements de milieux (liés à la difficulté de la technique) et d'une intensité de réponse au stress plus ou moins forte (mais similaire), le moyennage de toutes les expériences induit des écart-types élevés ne permettant pas d'être systématiquement présentés pour tous les types cellulaires étudiés. Néanmoins les figures sont représentatives de chaque expérience réalisée 3 fois.

3/1/ HMEC

Les cellules HMEC ont été préalablement marquées avec 50nM de TMRM puis les lamelles ont été placées dans la chambre d'incubation du microscope. Après une première acquisition d'une image nommée « basal », le milieu a été remplacé soit par du milieu complet en maintenant une concentration d'oxygène à 21% (condition « sham »), soit par du milieu sans substrat en abaissant la concentration d'oxygène à 3%.

Afin de vérifier si l'effet induit par cette ischémie-reperfusion simulée implique le PTP, des cellules HMEC ont été pré-incubées avec 1µM de CsA en même temps que le TMRM, puis la même expérience a été réalisée.

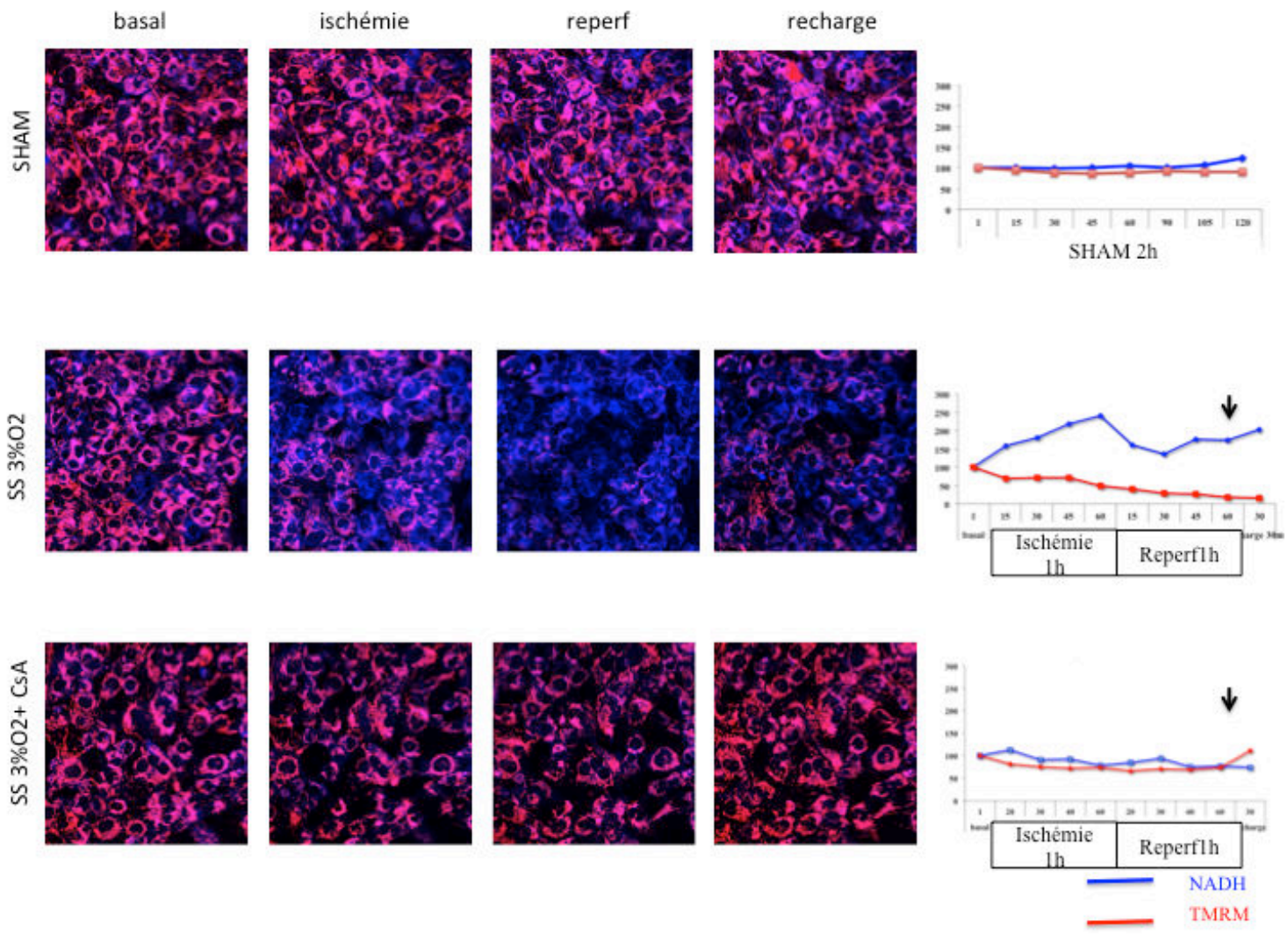


Figure 58. Carences en substrat et oxygène de cellules HMEC.

Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences.

SHAM

Dans la condition « sham », pour laquelle les changements de milieux ont été effectués sans carence ni en substrat ni en oxygène, la fluorescence du NADH n'est pas modifiée pendant les deux heures de l'expérience. L'intensité de fluorescence du TMRM montre une tendance à la diminution, qui résulte de la modification de l'équilibre de la sonde entre les compartiments mitochondrial et extra-mitochondrial conformément à la loi de Nernst. Cette propriété justifie la nécessité d'incuber à nouveau les cellules avec la même concentration de TMRM en fin d'expérience, afin de distinguer les mitochondries qui auront réellement été

dépolarisées et qui auront définitivement perdu leur fluorescence, de celles qui resteront intactes et qui recouvreront leur fluorescence initiale. Comme les images de superposition du NADH et du TMRM le montrent, les mitochondries des cellules HMEC ne sont pas affectées par les changements successifs de milieu lors de l'expérience « sham ».

Carences en substrat et en oxygène

Lorsque les cellules subissent une période d'une heure de carence en substrat cumulée à une hypoxie à 3% d'oxygène, le signal NADH augmente lors de l'hypoxie parallèlement à une diminution du signal TMRM, qui se poursuit lors de la reperfusion.
La fluorescence du NADH se rétablit à un niveau comparable à l'état basal, mais reste hors du compartiment mitochondrial. Après la recharge en TMRM, les mitochondries restent dépolarisées et le NADH reste délocalisé.

Carences en substrat et en oxygène en présence de CsA

Si la même expérience est reproduite après une incubation préliminaire des cellules avec de la CsA, on retrouve une situation comparable à la condition « sham » : les fluorescences du NADH et du TMRM ne sont pas modifiées au cours des épisodes de carences puis de reperfusion.

Ce résultat apporte la preuve que les carences en substrat et oxygène provoquent une ouverture du PTP pendant la période d'hypoxie, induisant une dépolarisation définitive des mitochondries des cellules HMEC lors de la reperfusion.

Ces résultats sont issus des travaux effectués par le Pr. Laurent Argaud dans le contexte de son HDR, et sont à l'origine de notre réflexion sur les effets de l'hypoxie et de décortiquer séparément les effets de la privation totale ou partielle d'oxygène, combinée à une privation de substrats. Malheureusement, la lignée de cellules HMEC ayant dérivé, il n'a pas été possible de réaliser ces expériences complémentaires sur ces mêmes cellules.

Pour les expériences décrites ci-après, les conditions expérimentales sont décrites de la façon suivante :

Après une première acquisition d'une image nommée « basal », le milieu a été remplacé par :

- soit par du milieu complet :
    - en maintenant une concentration d'oxygène à 21% : condition « sham » ;
    - en abaissant la concentration d'oxygène à 3% : condition « MC3%O2 » ;
    - en abaissant la concentration d'oxygène à 0% : condition « MC0%O2 » ;

- soit par du milieu sans substrat :
    - en maintenant une concentration d'oxygène à 21% : condition « SS21%O2 » ;
    - en abaissant la concentration d'oxygène à 3% : condition « SS3%O2 » ;
    - en abaissant la concentration d'oxygène à 0% : condition « SS0%O2 » .

3/2/ RT112

Les cellules RT112 ont été préalablement marquées avec 50nM de TMRM puis les lamelles ont été placées dans la chambre d'incubation du microscope. La figure 59 présente les images obtenues et leur graphe de quantification.

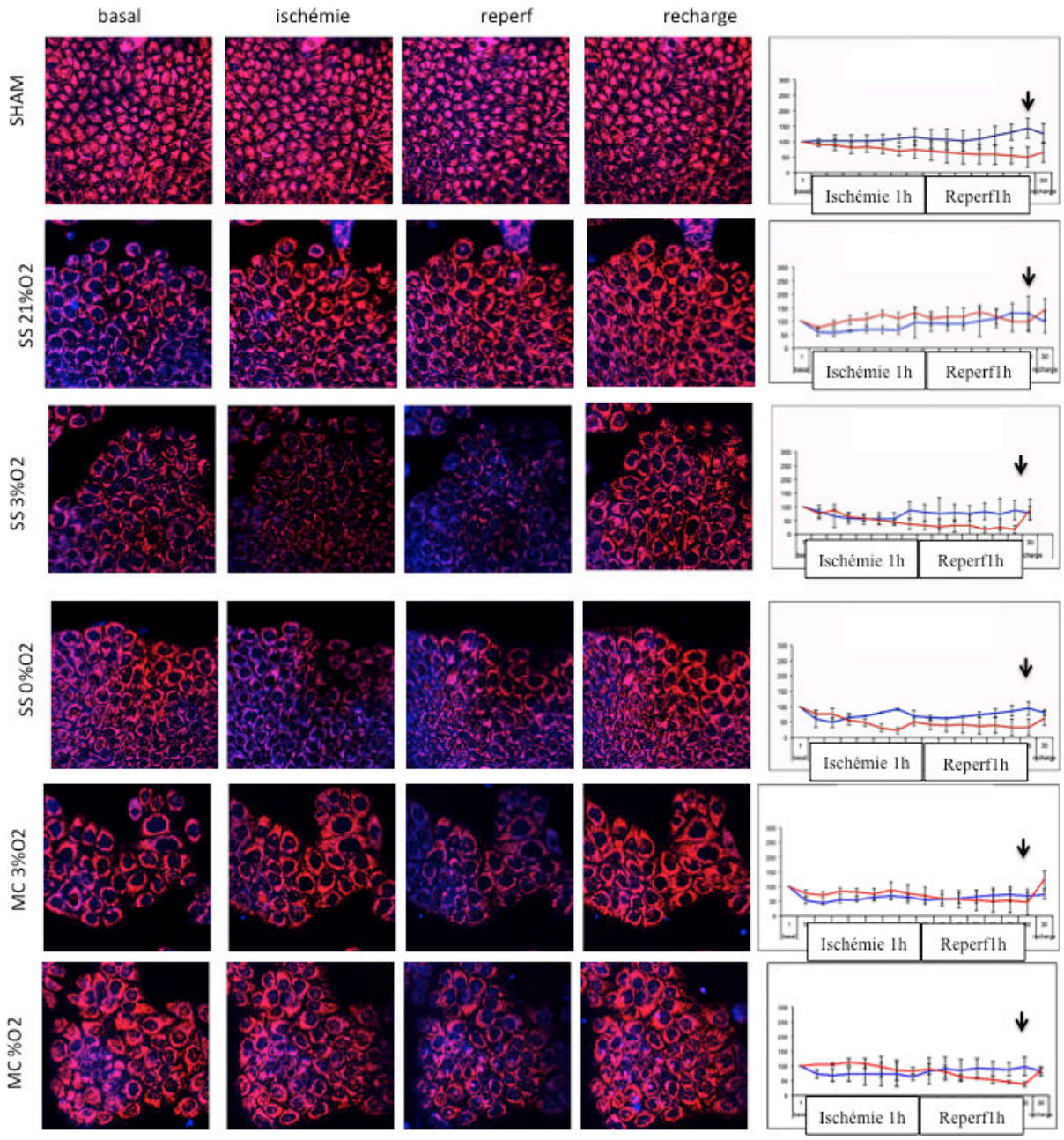


Figure 59. Carences en substrat et oxygène de cellules RT112.

Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences.

SHAM

Comme pour les cellules HMEC, dans la condition « sham », pour laquelle les changements de milieux ont été effectués sans carence ni en substrat ni en oxygène, la fluorescence du NADH n'est pas modifiée pendant les deux heures de l'expérience. Comme les images de superposition du NADH et du TMRM le montrent, les mitochondries des

cellules RT112 ne sont pas affectées par les changements successifs de milieu lors de l'expérience « sham ».

Carences en substrat (notés SS dans la figure)

Effet de la privation de substrat (SS 21% O_2)

Lors de la période d'ischémie, le milieu a été remplacé par du milieu RPMI sans substrat, mais la concentration en oxygène a été maintenue à 21%. Durant cette période, aucun effet n'est observé sur la fluorescence du TMRM et une légère baisse de NADH traduit une consommation des substrats endogènes. Lors de la reperfusion, le signal du NADH augmente sans que celle du TMRM ne soit modifiée. Ces observations montrent que la chaîne respiratoire des cellules RT112 fonctionne normalement et qu'elles ne sont donc pas sensibles à la privation de substrats.

Carences en substrat et en oxygène (notés SS 3% ou SS 0% O_2)

Effet de l'hypoxie (SS 3% O_2)

Dans cette expérience, pendant l'heure d'ischémie, le milieu a été remplacé comme précédemment par du milieu RPMI sans substrat, et la concentration d'oxygène a été abaissée à 3%. Contrairement à l'expérience précédente, la carence en oxygène cumulée à celle de substrat induit une baisse des deux signaux, traduisant une faible consommation de NADH. Dès le début de la reperfusion, le signal NADH augmente rapidement pour retrouver un niveau proche de l'état basal. Par contre, la fluorescence du TMRM reste faible durant la reperfusion, mais est restaurée après la recharge, traduisant que les mitochondries ne sont pas dépolarisées. Cette réponse suggère que contrairement à l'expérience précédente, la carence en oxygène ne permet pas à l'ATP synthase de fonctionner. En effet, il n'y a pas suffisamment d'oxygène pour faire tourner la chaîne respiratoire, et pas de substrats pour permettre de fabriquer de l'ATP glycolytique.

Effet de l'anoxie (SS 0% O_2)

Dans cette expérience, pendant l'heure d'ischémie, le milieu a été remplacé comme précédemment par du milieu RPMI sans substrat préalablement gazé avec de l'azote, et la concentration d'oxygène a été abaissée à 0%. On observe une courte diminution de la

fluorescence du NADH en début d'ischémie mais qui tend à être restaurée rapidement puis maintenue pendant la reperfusion. La fluorescence du TMRM tend à diminuer légèrement au cours de cette expérience, mais le potentiel est rétabli après la recharge.

Ces résultats montrent que, lors de la privation de substrats des cellules RT112:
- en présence d'oxygène : les cellules consomment leurs substrats endogènes ;
- en hypoxie ou anoxie : peu ou pas de consommation de substrats suggérant une inhibition de la chaîne respiratoire.
Aucune ouverture du PTP n'a été observée.

Carences en oxygène (notés MC 3% ou MC 0% O_2)

Lors de la période notée « ischémie », la concentration d'oxygène a été abaissée soit à 3% soit à 0% au sein de la chambre d'incubation, et les changements de milieux ont été réalisés avec du milieu complet.

Effet de l'hypoxie (MC 3% O_2)

Dès le début de la privation d'oxygène, la fluorescence du NADH tend à diminuer pour atteindre environ 68,14 ±23% en fin d'hypoxie et 66,75 ±20% en fin de reperfusion par rapport à l'état initial établit à 100%.

La fluorescence du TMRM diminue progressivement et régulièrement surtout pendant la période de reperfusion où le signal a presque disparu. L'intensité de fluorescence est cependant rétablie lors de la recharge.

Ces résultats suggèrent que les RT112 consomment le NADH disponible avant que la chaîne respiratoire ne soit inhibée pendant la période de reperfusion. La présence de substrats permettrait à l'ATPsynthase de tourner à l'envers permettant le maintien du potentiel mitochondrial.

Ces épisodes de stress n'engendrent pas d'ouverture du PTP car le NADH n'augmente pas et n'est pas délocalisé par rapport au compartiment mitochondrial.

Effet de l'anoxie (MC 0% O_2)

Lors de la période de la privation totale d'oxygène, la fluorescence du NADH tend à diminuer comme montré dans la figure 59. Cependant, la moyenne des 3 expériences réalisées indique une baisse d'environ 30% par rapport à l'état basal en fin d'anoxie, mais le signal

NADH récupère progressivement son niveau initial puisque sa moyenne de fluorescence relative à la valeur basale est d'environ 97% en fin de reperfusion.

La fluorescence du TMRM reste stable durant la période d'anoxie, puis diminue légèrement lors de la reperfusion. Après une recharge de TMRM, la présence d'une fluorescence dont l'intensité moyenne atteint environ 84% de la valeur initiale montre que les mitochondries ne sont pas dépolarisées. L'absence d'oxygène ne permet pas de consommer le NADH mais la présence de substrats permet le fonctionnement inverse de l'ATPsynthase.

Ces résultats montrent que la privation d'oxygène partielle ou totale dépend de la présence ou non de susbtrats, permettant ou non le fonctionnement inverse de l'ATPsynthase .

Aucune ouverture du PTP n'a été observée.

3/3/ Hépatocytes

Les hépatocytes isolés ont été cultivés pendant 48h en milieu complet, puis ont été préalablement marquées avec 50nM de TMRM puis les lamelles ont été placées dans la chambre d'incubation du microscope. Les mêmes conditions expérimentales de privation de substrats et d'oxygène ont été réalisées (fig.60).

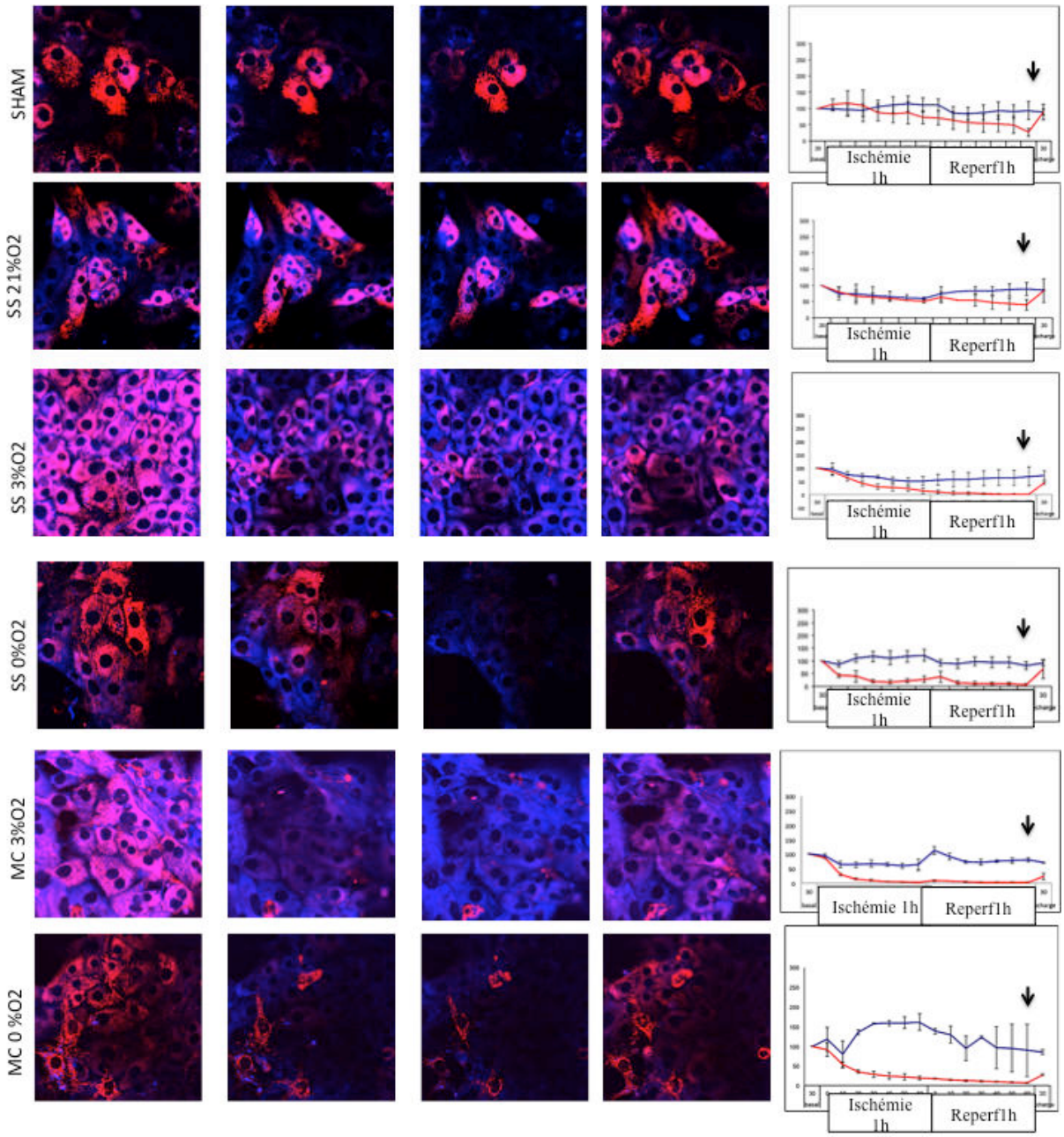


Figure 60. Carences en substrat et oxygène sur des hépatocytes de 48h

Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences.

Afin de pouvoir mettre en parallèle les résultats des deux parties de ce travail, les mêmes conditions de culture des hépatocytes primaires ont été réalisées, à savoir 24 heures dans le milieu I puis 24h dans le milieu II (voir matériel et méthodes). Les hépatocytes utilisés dans l'expérience présentée sont donc déjà organisés en amas bien étalés. Il est à noter qu'ils ne sont pas dans le même état métabolique à 48h par rapport à des hépatocytes fraîchement isolés. Cela se traduit par un marquage hétérogène du TMRM même après le temps d'incubation nécessaire pour atteindre l'équilibre de Nernst, reflétant l'hétérogénéité du niveau énergétique des mitochondries des différentes cellules.

SHAM

De façon attendue, les changements de milieux équivalents aux périodes de carence et de reperfusion ne créent pas de modification des signaux NADH ou TMRM. Une légère fuite du TMRM est observée mais liée aux changements de milieux, les mitochondries retrouvant une intensité de fluorescence après la recharge similaire à celle de l'état basal.

Carences en substrat (SS 21% O_2)

Lors de la période d'ischémie, le milieu a été remplacé par du milieu KREBS-Ringer-Calcium, mais la concentration en oxygène a été maintenue à 21%. Durant cette expérience, aucun effet différent de la condition sham n'est observé au niveau des signaux NADH ou TMRM. La privation ne substrat en présence d'oxygène n'a pas d'impact sur la chaîne respiratoire des hépatocytes.

Carences en substrat et en oxygène

Effet de l'hypoxie (SS 3% O_2)

Lorsque les hépatocytes subissent une carence de substrats associée à une privation partielle d'oxygène, le potentiel membranaire diminue dès le début de l'hypoxie et la fluorescence du TMRM atteint progressivement un niveau minimum détectable. Cette baisse de fluorescence se poursuit tout au long de la reperfusion. Après vingt minutes de recharge de TMRM, le marquage fluorescent de quelques mitochondries a tendance à augmenter légèrement la fluorescence du TMRM mais sans atteindre le niveau équivalent à l'état basal.

Parallèlement, le signal d'autofluorescence du NADH ne montre pas de variation significative tout au long de l'expérience, même si une légère tendance à la diminution peut être observable durant la période d'hypoxie.

Ces observations sont comparables à celles obtenues lors des expériences d'inhibition totale de la chaîne respiratoire des hépatocytes isolés en présence de Krebs-LPO en présence de roténone associée à l'oligomycine (fig 50).
Ces résultats suggèrent qu'une hypoxie d'une durée d'une heure serait suffisante pour induire une inhibition totale de la chaîne respiratoire des hépatocytes, et que cette inhibition ne serait pas réversible lorsqu'on reperfuse les cellules avec du milieu complet.

Effet de l'anoxie (SS 0% O_2)

Dans cette expérience, pendant l'heure d'ischémie, le milieu a été remplacé comme précédemment par du milieu KREBS-Ringer-Calcium préalablement gazé avec de l'azote, et la concentration d'oxygène a été abaissée à 0%. Le signal NADH augmente progressivement durant la période d'anoxie, et le TMRM diminue fortement. Lors de la reperfusion, le NADH atteint à nouveau un niveau comparable à l'état basal, et le TMRM continue à décroître. Après la période de recharge, la fluorescence du TMRM est de nouveau visible dans les mitochondries dont le potentiel était le plus élevé à l'état basal. Cependant, le niveau d'intensité de fluorescence reste inférieur à celui de l'état basal.
Au sein des hépatocytes, la quantité de mitochondries et l'organisation de leur réseau sont tels qu'il est impossible de visualiser précisément la localisation des signaux au sein des différents compartiments.
L'augmentation (même faible) du signal NADH durant l'anoxie associée à une diminution de fluorescence du TMRM peut correspondre soit à une effet inhibiteur comparable à celui de la roténone (fig 50 en Krebs LPO), soit à une faible ouverture du PTP. Une expérience en présence de CsA permettra de valider l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Carences en oxygène

Effet de l'hypoxie (MC 3% O_2)

Pendant la période d'hypoxie à une concentration d'oxygène de 3%, le milieu complet a été remplacé par du milieu sans substrats. Dès les premières minutes de stress, la fluorescence du TMRM diminue drastiquement car le potentiel membranaire s'effondre, accompagné d'une légère baisse du signal NADH. A partir de dix minutes d'hypoxie, le potentiel est complètement aboli, et le niveau de NADH reste stable. Lorsque les apports en oxygène et en substrats sont rétablis, le signal NADH augmente subitement dès les premières minutes de reperfusion puis retrouve son niveau basal, tandis que le potentiel membranaire reste complètement au niveau minimum détectable.

Malgré la présence de substrats, l'hypoxie induit une inhibition de la chaîne respiratoire comparable à celle observée après traitement par la combinaison roténone et oligomycine précédemment observée avec les hépatocytes frais en Krebs-LPO (fig 50).

Dans cette situation de stress hypoxique en présence de substrats, la privation partielle d'oxygène est plus délétère que la privation de substrats.

Afin de vérifier si la courte augmentation de NADH observée pendant les dix premières minutes de reperfusion correspond à une éventuelle ouverture du PTP, cette expérience sera renouvelée en présence de CsA (voir ci-après).

Effet de l'anoxie (MC 0% O_2)

Dans cette expérience, pendant l'heure d'ischémie, le milieu a été remplacé comme précédemment par du milieu II complet préalablement gazé avec de l'azote, et la concentration d'oxygène a été abaissée à 0%. Dès le début de l'ischémie et durant toute cette période d'anoxie, le signal NADH augmente d'environ 50% par rapport à l'état basal, et la fluorescence du TMRM diminue parallèlement. Il est intéressant de constater sur l'image que ce sont les mitochondries dont le potentiel initial était le plus faible à l'état basal qui subissent cette dépolarisation. Malgré son augmentation, le niveau d'autofluorescence du NADH reste faible sur les images, et ne permet pas de visualiser son éventuelle délocalisation par rapport au compartiment mitochondrial, qui traduirait une ouverture du PTP. Une expérience similaire en présence de CsA permettrait de vérifier cette hypothèse.

Lors de la reperfusion, l'intensité du signal NADH diminue pour atteindre un niveau similaire à l'état basal, alors que la fluorescence du TMRM reste faible, et peu rechargée après l'incubation finale de TMRM.

Ces résultats montrent que :

- L'hypoxie (3%O2) induit une diminution du potentiel mitochondrial qui n'est pas rétablie lors de la reperfusion ; une tendance à la baisse du signal NADH qui se poursuit à la reperfusion en l'absence de substrats, mais qui ré-augmente brutalement au début de la reperfusion en présence de substrats ;

- L'anoxie (0% O2) induit également une rapide et forte diminution du potentiel mitochondrial qui n'est pas rétablie lors de la reperfusion ; une augmentation du NADH plus importante en présence de substrats avec un retour au niveau basal lors de la reperfusion.

L'hypoxie semble induire plutôt un effet inhibiteur de la chaîne respiratoire, alors que l'effet de l'anoxie semble comparable à celui d'une ouverture du PTP.

Des expériences similaires en présence de CsA permettraient de vérifier ces hypothèses.

Vérification de l'hypothèse d'ouverture du PTP

Carences en Oxygène en présence ou non de CsA

La CsA étant l'inhibiteur de référence de l'ouverture du PTP, les cellules ont été pré-incubées avec 1µM de CsA en même temps que le TMRM. Les expériences d'hypoxie et d'anoxie en présence de substrats ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. La figure 61 présente les résultats obtenus en présence de CsA, en comparaison des résultats précédents qui ont été repris dans la figure.

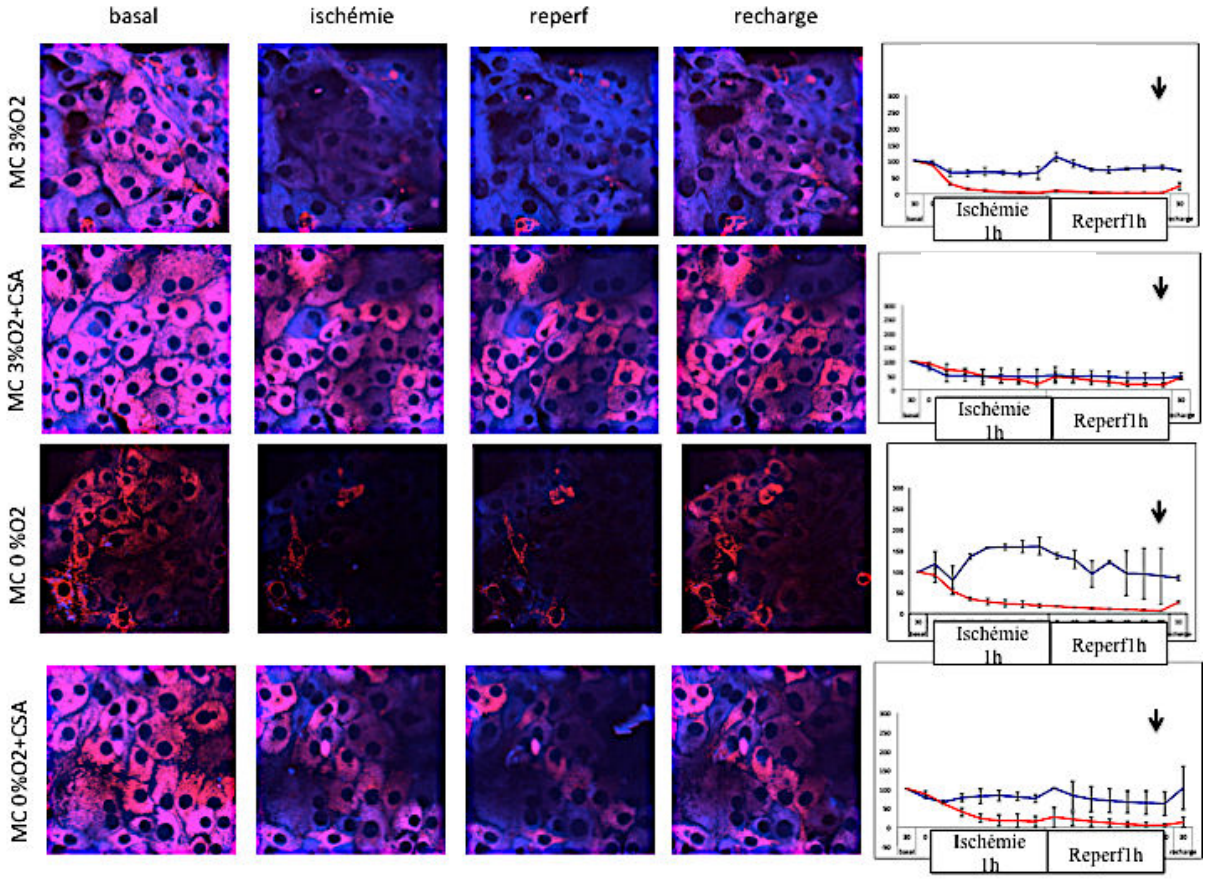


Figure 61. Carences en oxygène sur des hépatocytes de 48h en présence ou non de CsA 1µM. Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences.

Effet de l'hypoxie (MC 3% O_2+ CsA)

En présence de CsA, la fluorescence du TMRM diminue progressivement pendant la période d'hypoxie, mais de façon beaucoup plus lente que dans l'expérience réalisée sans CsA. Parallèlement, le signal du NADH diminue plus fortement en présence de CsA qu'en son absence.

Lors de la reperfusion, la faible augmentation de NADH observée précédemment au début de la reperfusion ne se produit pas en présence de CsA. La fluorescence du TMRM montre une légère augmentation en début de reperfusion mais redescend à un niveau très faible.

Comme la présence de CsA a empêché l'augmentation de NADH en début de reperfusion, l'hypothèse d'une ouverture du PTP peut être confirmée. Parallèlement, si la CsA a ralenti la diminution du potentiel membranaire durant l'hypoxie, elle ne l'a pas empêchée et a plutôt contribué à accélérer la baisse du NADH. Cet effet ressemble à l'inhibition du complexe I observé pour des hépatocytes frais en Krebs-LP (fig 51), ce qui n'a cependant pas été reproduit pour des hépatocytes cultivés 24h en milieu complet (fig 52).

L'hypoxie en présence de substrats induit une inhibition de la chaîne respiratoire suivie d'une ouverture rapide et transitoire du PTP en début de reperfusion inhibée par la CsA.

Effet de l'anoxie (MC 0% O_2+ CsA)

En présence de CsA, dès le début de l'anoxie le potentiel membranaire révélé par la fluorescence du TMRM diminue progressivement pour atteindre le niveau minimum détectable durant toute la durée de l'expérience. Parallèlement, la CsA empêche l'augmentation de NADH observée précédemment, ce qui confirme que l'effet observé correspond bien une ouverture du PTP.

Lors de la reperfusion, le potentiel membranaire n'est pas rétabli, et le niveau de NADH reste stable.

L'anoxie en présence de substrats est compatible avec une ouverture du PTP, mais qui n'est pas prévenue par la CsA puisqu'il n'y a pas de repolarisation lors de la recharge. Si la chaîne respiratoire est également inhibée ou découplée, la CsA permet d'empêcher l'ouverture du PTP (visible sur le signal NADH), mais pas de restaurer le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Carences en Substrats et Oxygène en présence ou non de CsA

Les cellules ont été pré-incubées avec 1µM de CsA en même temps que le TMRM. Les expériences d'hypoxie et d'anoxie en absence de substrats ont été réalisées dans les mêmes conditions que précédemment. La figure 62 présente les résultats obtenus en présence de CsA, en comparaison des résultats précédents qui ont été repris dans la figure.

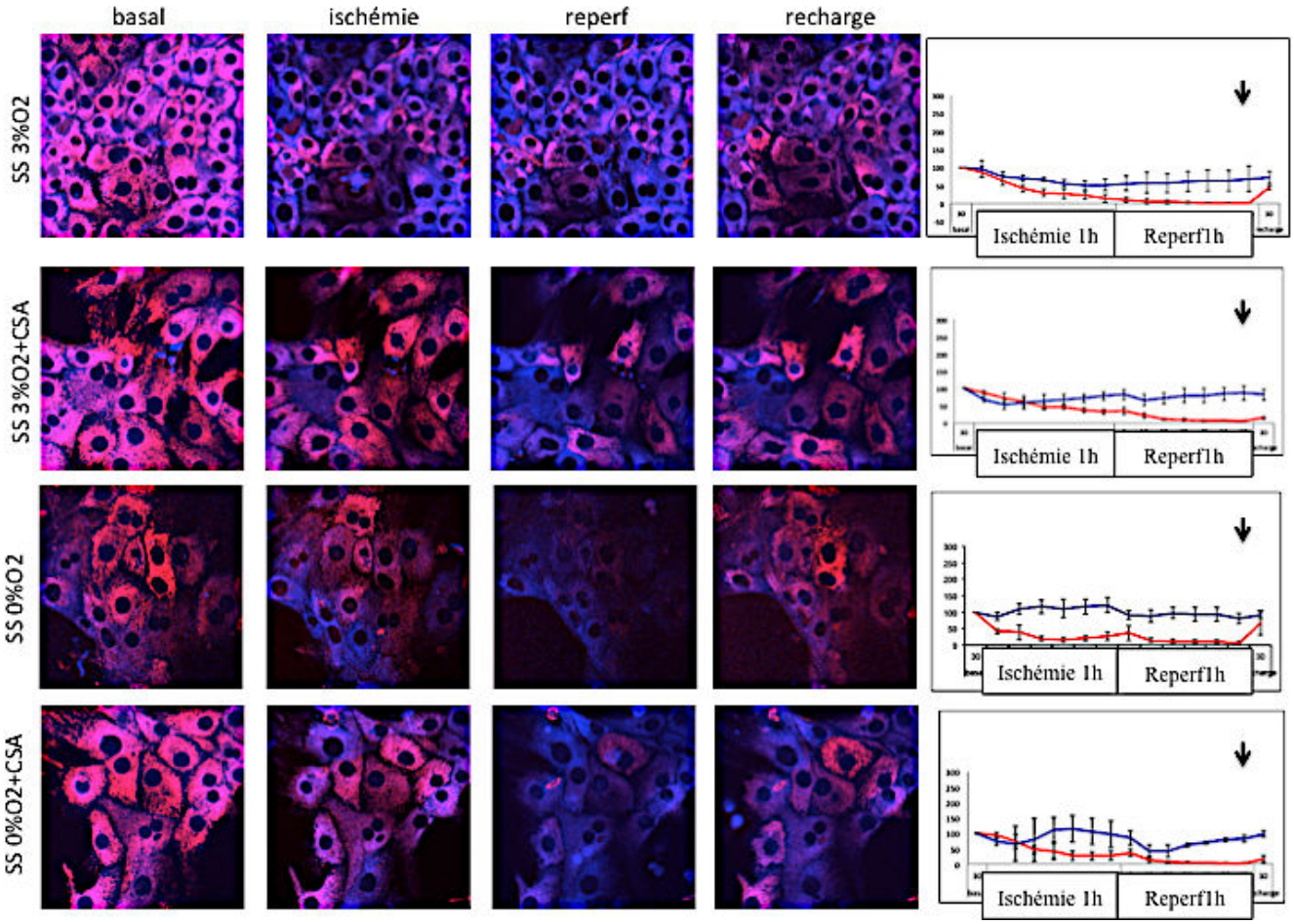


Figure 62. Carences en oxygène sur des hépatocytes de 48h en présence ou non de CsA 1µM. Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences.

Effet de l'hypoxie (SS 3% O_2+ CsA)

Comme décrit précédemment, l'hypoxie combinée à une privation de substrats provoque un effet inhibiteur de la chaîne respiratoire. La présence de CsA ralentit la diminution de fluorescence liée à la diminution de potentiel durant la période d'hypoxie. Pendant cette même phase, la CsA accentue la diminution du signal NADH pendant les 10 premières minutes d'hypoxie, qui retourne ensuite à un niveau basal. Lors de la reperfusion, la CsA ne permet pas de rétablir un potentiel membranaire et la fluorescence du TMRM reste au niveau le plus bas.

Cette expérience confirme qu'en hypoxie sans substrats, il n'y a aucune intervention du PTP et que l'effet observé est celui d'une inhibition de la chaîne respiratoire.

Effet de l'anoxie (SS 0% O_2+ CsA)

L'expérience d'anoxie en absence de substrats décrite précédemment montrait une légère augmentation du signal NADH durant la phase d'anoxie, associée à une diminution de potentiel, pouvant suggérer une faible ouverture du PTP.

La pré-incubation des cellules avec la CsA ne permet pas d'empêcher l'augmentation de NADH observée lors de la phase d'anoxie. Les profils de réponse à ce type de stress sont similaires durant cette phase. Lors de la reperfusion, la présence de CsA induit une diminution rapide pendant les 20 premières minutes, avant un retour à l'état basal.

Ces résultats montrent que l'anoxie en absence de substrats n'implique pas le PTP et que l'effet observé correspond davantage à une accumulation de NADH due à une inhibition du complexe I pendant l'anoxie.

3/4/INS1

Les méthodologies expérimentales et d'analyse d'images mises au point au début de ce travail ont permis d'aborder l'aspect fondamental du mécanisme d'ouverture du PTP dans un contexte clinique comme la diabétologie et qui a fait l'objet du sujet de thèse du Dr Sandrine Lablanche. L'objectif de son travail était de tenter d'élucider les mécanismes cellulaires mise en jeu dans le cadre de la transplantation d'ilots de Langerhans dans le

traitement du diabète de type I. En effet, lors de l'isolement des ilots, ceux-ci peuvent être exposés à des phases d'ischémie et ne sont pas systématiquement conservés dans des milieux contenant des substrats avant d'être transplantés. Notre approche est donc tout à fait adaptée à ce contexte. Les premières expériences ont été réalisées sur les cellules INS1, insulinomes de rat dont la nature est proche des cellules bêta du pancréas. Les résultats obtenus et présentés ci-après ont été publiés (Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2015) et ont été reproduits sur des biopsies d'ilots humains dont les résultats sont en attente de publication (non présentés dans ce manuscrit).

Comme pour l'ensemble de toutes nos expériences, les cellules INS1 ont été préalablement marquées avec 10nM de TMRM puis les lamelles ont été placées dans la chambre d'incubation du microscope. Les mêmes conditions expérimentales de privation de substrats et d'oxygène ont été réalisées.

Carences en oxygène

La figure 63 présente les résultats obtenus lorsque les INS1 ont subi un stress hypoxique ou anoxique en présence de substrats dans leur milieu.

Effet de l'hypoxie (MC 3% O_2)

Durant la phase d'hypoxie, aucun effet n'est observé ni sur le signal TMRM ni sur celui du NADH. Lors des premières minutes de la phase de reperfusion, une légère diminution du signal NADH est observé par rapport à la condition sham, mais de façon non significative par rapport à l'état basal.

L'hypoxie en présence de substrats n'induit pas d'effet sur l'ouverture du PTP des cellules INS1.

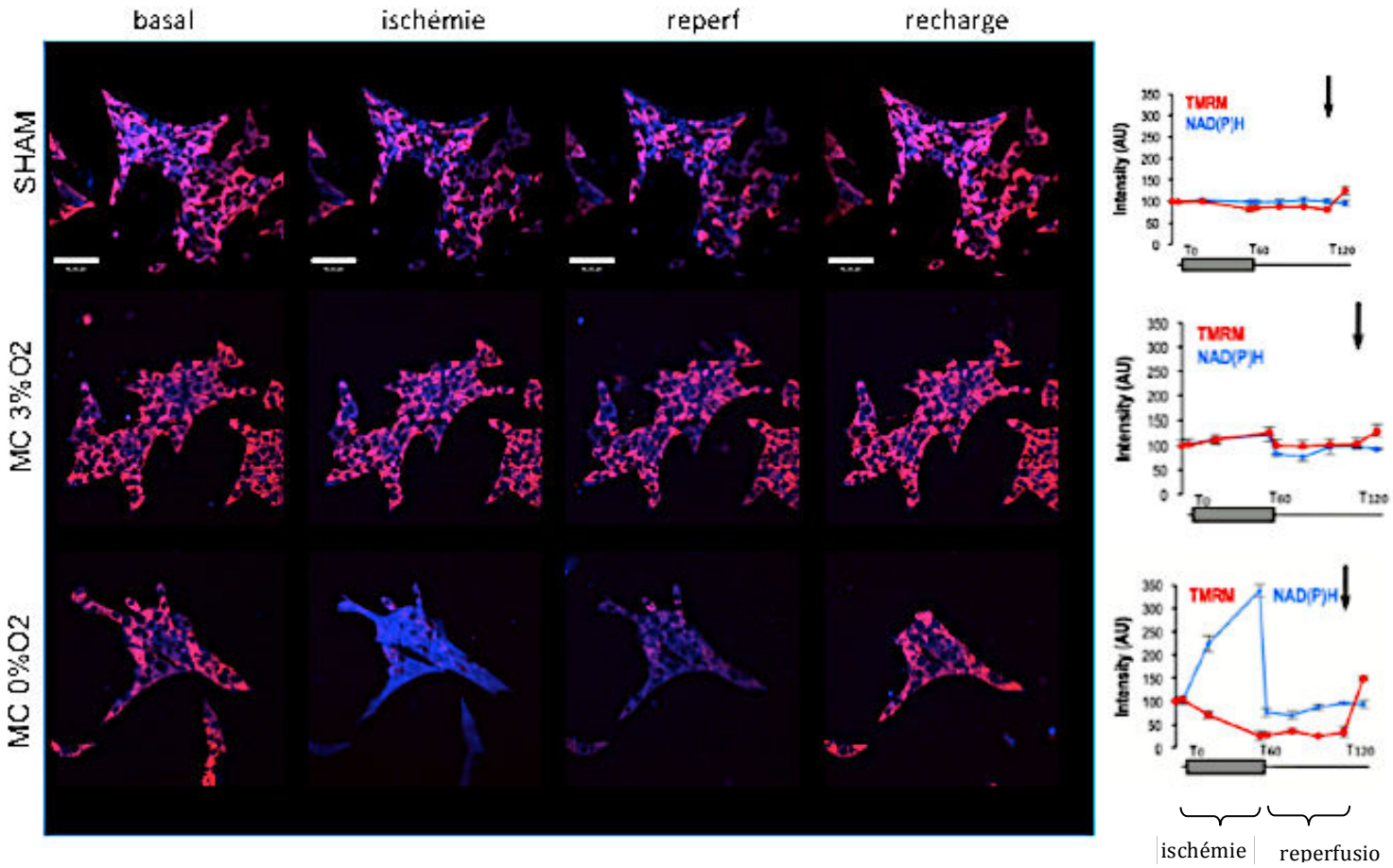


Figure 63. Carences en oxygène de cellules INS1. Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences. Barre d'échelle 44µm.

Effet de l'anoxie (MC 0% O_2)

Lorsque l'oxygène est complètement supprimé du milieu, le signal NADH augmente très fortement et très rapidement, simultanément à une diminution du signal TMRM lié à une diminution du potentiel membranaire. Cet effet est réversible : le niveau de fluorescence du NADH est rétablit au niveau basal immédiatement au début de la reperfusion, et celui du TMRM, stable pendant la reperfusion, atteint un niveau supérieur à l'état basal après la recharge post-reperfusion, apportant la preuve que les mitochondries ne sont pas dépolarisées.

Ces résultats sont comparables à ceux observés lors de l'inhibition de la chaîne respiratoire des cellules INS1 par la roténone (fig.50), et suggèrent donc que l'effet observé n'est pas lié à l'ouverture du PTP.

Carences en substrat (SS 21% O2)

Dès les premières minutes de la privation de substrats et malgré la présence d'oxygène, le signal du NADH diminue fortement alors que celui du TMRM est stable, indiquant que le potentiel membranaire est maintenu. Il semble que les cellules INS1 consomment et utilisent toute la réserve de NADH possible pour maintenir le fonctionnement de leur chaîne respiratoire et maintenir leur potentiel mitochondrial. Cependant, dès le début de la reperfusion, l'apport soudain de substrats induit un stress tel que le signal NADH augmente très fortement et rapidement, associé à une diminution de fluorescence du TMRM. Même après une recharge de TMRM dans le milieu, les mitochondries restent dépolarisées. De plus, le signal NADH est délocalisé par rapport au compartiment mitochondrial.

La carence en substrat malgré la présence d'oxygène semble provoquer une ouverture du PTP. Cette hypothèse sera vérifiée en présence de CsA.

Carences en substrat et en oxygène

Effet de l'hypoxie (SS 3% O_2)

En plus d'être privées de substrats, lorsque les INS1 sont également privées partiellement d'oxygène, le profil de réponse à ce stress est semblable à celui observé lors de la privation seule de substrats. Le stress subit par ce manque de substrats semble l'emporter sur celui induit par le manque d'oxygène.

La carence en substrat et en oxygène semble provoquer une ouverture du PTP. Cette hypothèse sera vérifiée en présence de CsA.

Effet de l'anoxie (SS 0% O_2)

Dans cette expérience, la concentration d'oxygène est abaissée à une concentration proche de 0%, dans un milieu dépourvu de substrats.

De façon surprenante par rapport aux deux situations précédentes, l'anoxie n'a pas d'effet sur le NADH et ne diminue que faiblement le potentiel membranaire. Lors de la reperfusion, le signal NADH augmente faiblement et la recharge en TMRM révèle le maintien de la polarisation des mitochondries.

Ces résultats suggèrent que le manque de substrats est délétère pour les cellules INS1 mais que cet effet nécessite un minimum de présence d'oxygène. L'hypothèse qui en découle est qu'il suffit d'un mimimum d'oxygène présent pour induire un stress oxydant qui se produit dès la phase d'hypoxie et qui serait à l'origine du déclenchement de l'ouverture du PTP au moment de la reperfusion. En absence totale d'oxygène, ce phénomène ne peut avoir lieu, d'où l'absence d'effet observé. Cette hypothèse a été validée sur des expériences similaires effectuées ave un marquage au MitoSOX, dont la fluorescence augmente en présence de superoxide (Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2015).

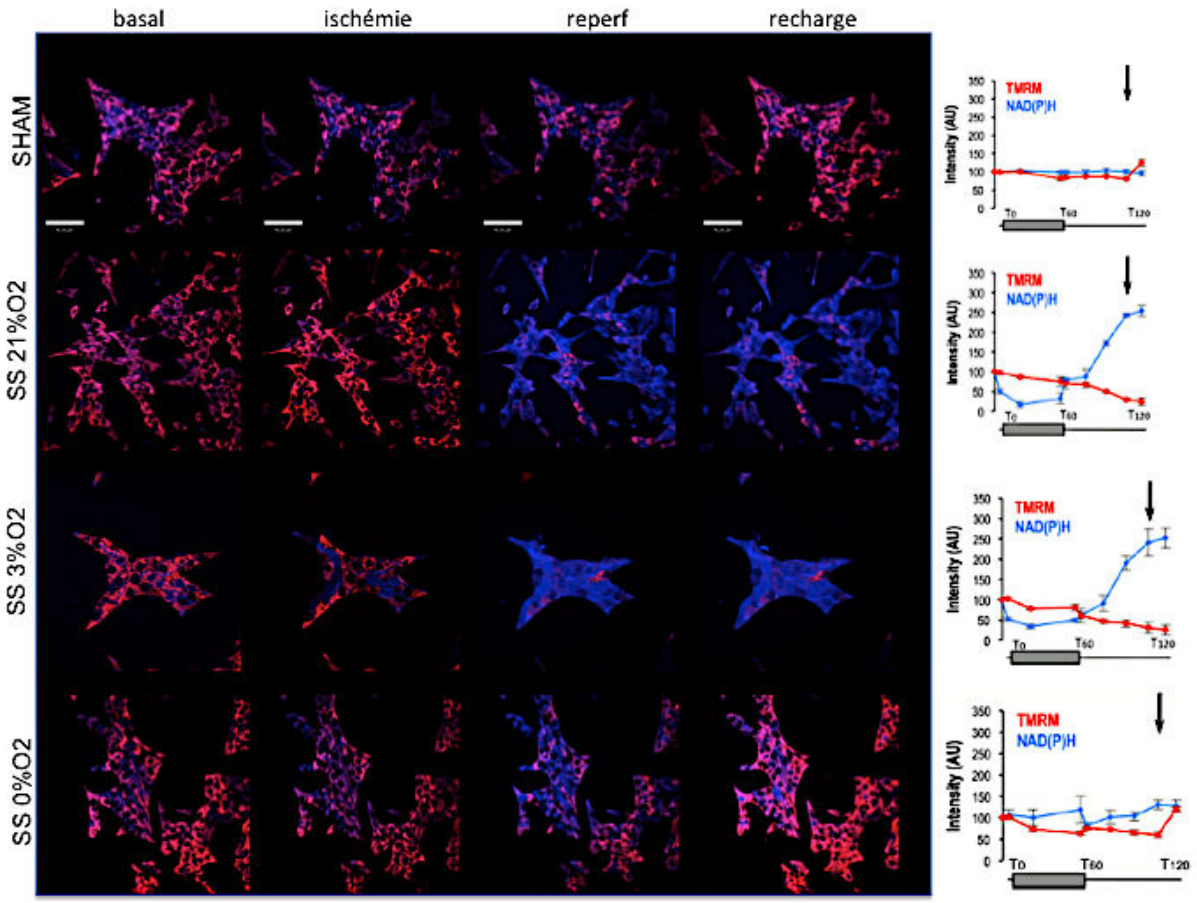


Figure 64. Carences en substrats et en oxygène de cellules INS1. Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences. Barre d'échelle 44µm.

Carences en Substrats et Oxygène en présence ou non de CsA

Afin de vérifier l'implication du PTP dans les effets observés précédemment, les cellules ont été pré-incubées avec 1µM de CsA en même temps que le TMRM. Les expériences d'hypoxie en absence de substrats ont été réalisées dans les mêmes conditions. La figure 65 présente les résultats obtenus en présence de CsA, en comparaison des résultats précédents qui ont été repris dans la figure.

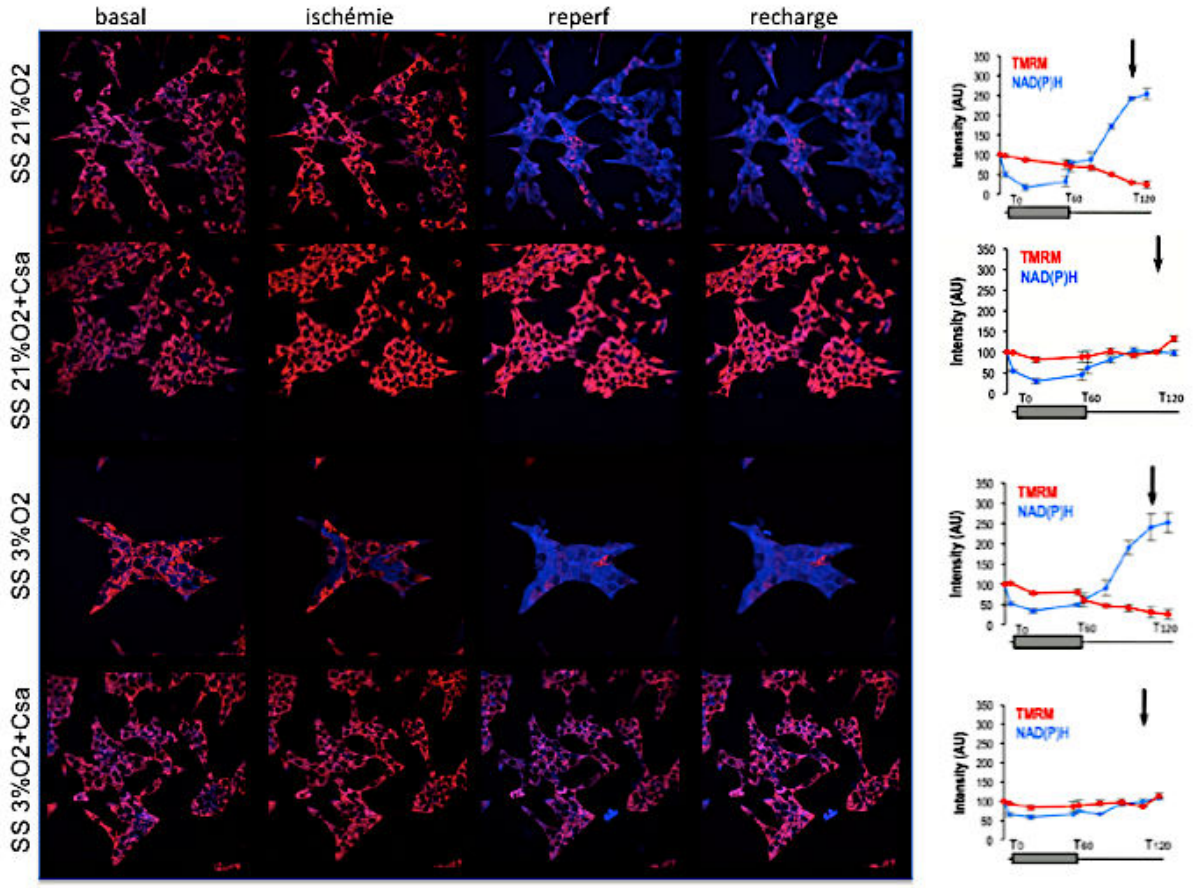


Figure 65. Carences en substrats et en oxygène de cellules INS1 en présence ou non de CsA Les images montrent la superposition de l'autofluorescence du NADH en bleu et le marquage au TMRM relatif au potentiel membranaire mitochondrial. Les graphes représentent la quantification des intensités de fluorescence en fonction du temps. La flèche indique la recharge de TMRM. Les images et les graphes sont représentatifs de 3 expériences. Barre d'échelle 44µm.

Carence en substrats (SS21% + CsA)

Alors que l'on retrouve une baisse du signal NADH pendant la phase d'hypoxie, liée à la consommation du reste d'énergie disponible, la présence de CsA empêche totalement l'augmentation de signal NADH qui se produisait à la reperfusion. De plus, le potentiel de mitochondrial est complètement maintenu tout au long des deux phases d'hypoxie puis de reperfusion.

Ces résultats confirment que la privation de substrats malgré la présence d'oxygène à une concentration de 21% induit une ouverture du PTP, qui est prévenue en présence de CsA.

Carences en Substrats et Oxygène

De la même manière, dans une situation de privation de substrats associée à une privation partielle d'oxygène, le profil de réponse des signaux NADH et TMRM est similiare à la condition sham, c'est-à-dire que l'effet observé en hypoxie sans substrats est complètement prévenu par la CsA.

Ces résultats confirment que la privation de substrats malgré la présence d'oxygène à une concentration de 3% induit une ouverture du PTP, qui est prévenue en présence de CsA.

Ces résultats montrent que, sur des cellules INS1

- la privation de substrat en présence de 21% d'oxygène induit une ouverture du PTP à la reperfusion prévenue par la CsA ;

-l'hypoxie en présence de substrats n'induit pas d'ouverture du PTP ;

- l'hypoxie cumulée à la privation de substrats induit une ouverture du PTP à la reperfusion prévenue par la CsA ;

- l'anoxie en présence de substrats induit plutôt une inhibition de la chaîne respiratoire pendant la période ischémique ;

-l'anoxie sans substrats n'induit pas d'effet majeur.

Les INS1 sont donc plus sensibles à la privation de substrats qu'à la privation d'oxygène. La présence d'oxygène est responsable d'un stress oxydant à l'origine de l'ouverture du PTP.

CONCLUSION BILAN DE LA 1ERE PARTIE

La méthode d'analyse d'images développée dans ce travail a permis de disséquer les réponses au stress d'ischémie-reperfusion selon les différentes conditions de stress mais également selon les types cellulaires étudiés.

Afin de dresser un bilan permettant de comparer ces différentes situations, les résultats sont classés ci-après sous forme de tableaux séparés en fonction du type de carences :

- le tableau 6 récapitule les résultats obtenus en carences en oxygène et milieu complet ;
- le tableau 7 récapitule les résultats obtenus en carences en oxygène en milieu sans substrats ;

Dans ces tableaux, les effets observés sont décrits séparément entre la phase d'ischémie et celle de reperfusion :

Carences en oxygène :

	MILIEU COMPLET			**MILIEU COMPLET**		
	ISCHEMIE Fi O2 variable			**REPERFUSION** Fi O2 21%		
oxygène	**21%**	**3%**	**0%**	**Post 21%**	**Post 3%**	**Post 0%**
HMEC-1	sham	/	/	sham	/	/
RT112	sham	CRM inhibée	**X**	sham	CRM inhibée	**X**
Hépatocytes	sham	CRM inhibée	**PTP Ouvert ?**	sham	**PTP ouvert**	NADH et Δψ rétablis
INS1	sham	**X**	CRM inhibée	sham	**X**	NADH et Δψ rétablis

Tableau 6 : Récapitulatif des effets des carences en Oxygène

Pour les cellules HMEC-1, ces expériences n'ont pas être réalisées. Pour les cellules RT112, si une légère baisse de NADH a parfois été constatée, dans toutes les situations les mitochondries se repolarisent en fin d'expérience, donc ces résultats ne permettent pas d'affirmer un effet sur le PTP. Pour les hépatocytes, si la CsA a permis de confirmer un effet

sur le PTP lors de la reperfusion après une privation d'oxygène à 3%, cela n'a pas été démontré lors de la privation totale à 0%.

Carences en substrats et oxygène :

	MILIEU SANS SUBSTRATS			**MILIEU COMPLET**		
	ISCHEMIE Fi O2 variable			**REPERFUSION** Fi O2 21%		
oxygène	**21%**	**3%**	**0%**	**Post 21%**	**Post 3%**	**Post 0%**
HMEC-1	/	**PTP ouvert**	/	/	NADH rétabli Δψ bas	/
RT112	**X**	CRM inhibée	**X**	**X**	CRM inhibée	**X**
Hépatocytes	X	CRM inhibée	**PTP Ouvert ?**	X	**PTP ouvert**	CRM inhibée
INS1	NADH bas	NADH bas	X	**PTP ouvert**	**PTP ouvert**	X

Tableau 7 : Récapitulatif des effets des carences en substrats et Oxygène

Les expériences en présence de CsA ont permis de révéler un effet sur le PTP pour les cellules HMEC-1 lors de l'ischémie à 3% d'oxygène, et pour les INS1 lors de la reperfusion, à 21% et 3% d'oxygène, mais pas en anoxie à 0%, et lors de la reperfusion pour les hépatocytes après une hypoxie à 3%.

L'analyse de ces tableaux permet de mettre en évidence que les réponses au stress d'ischémie-reperfusion dépendent des types cellulaires étudiés et font intervenir différents types de modification de la fonction mitochondriale :

- soit par inhibition de la chaîne respiratoire
- soit par ouverture du PTP.

Dans le cas de la lignée cancéreuse RT112, aucune ouverture du PTP n'a pu être observée quel que soit le stress subit. La privation partielle d'oxygène (Fi O2 3%) induit une inhibition

de leur chaîne respiratoire dès la phase d'hypoxie, indépendamment de la présence ou non de substrats.
Les cellules RT112 ne semblent pas sensibles à l'anoxie, puisqu'aucun effet n'a été mis en évidence même en absence de substrats.

Les cellules INS1 sont les seules pour lesquelles le stress d'ischémie-reperfusion induit une ouverture du PTP lors de la reperfusion. En effet, cette ouverture du PTP se produit plutôt lors de la phase d'hypoxie (pour les HMEC) ou d'anoxie (pour les hépatocytes).

Ces résultats suggèrent qu'il n'y a pas de réponse métabolique unique et universelle mais que chaque type cellulaire s'adapte en fonction de son propre métabolisme.

A partir de cette observation, nous faisons l'hypothèse que l'effet métabolique induit par l'ischémie-reperfusion dépend du métabolisme propre des cellules, et en particulier de leur capacité à générer et utiliser leurs propres réserves énergétiques.
Ainsi, cette hypothèse expliquerait pourquoi les INS1 en particulier ne supportent pas d'être privées de substrats puisqu'elles n'ont pas de réserve endogène.

2ème PARTIE

Visualisation des effets de stress énergétiques sur la concentration d'ATP

Visualisation des effets de stress énergétiques sur la concentration d'ATP

L'objectif de cette partie est de tenter développer une approche méthodologique permettant de visualiser et quantifier les variations de concentration d'ATP au cours de modifications métaboliques induites par un stress de type ischémie-reperfusion.
Cette méthodologie repose sur la mesure de FRET grâce à la présence d'un couple de protéines fluorescentes dont l'une constitue le donneur, et l'autre l'accepteur d'énergie lorsque le phénomène de FRET se produit.

1. Validation de l'utilisation des Biosenseurs ATeam et AMPKAR sur la lignée INS1

D'un point de vue métabolique, les cellules INS1 sont des lignées qui possèdent intrinsèquement beaucoup d'ATP. De plus, les résultats obtenus précédemment ont montré que les réponses au stress d'ischémie-reperfusion sont les plus importantes avec ce type cellulaire. Dans un premier temps, nous avons donc choisi les cellules INS1 pour effectuer les premiers tests de validation des biosenseurs AMPKAR, ATEAM et son contrôle négatif GO-ATeam-1 (obtenu à partir d'une mutation de GO-ATEAM au niveau des Arginine 122 et 126 en deux Lysine, et ne produisant pas de FRET). Ces tests consistent à évaluer l'efficacité de transfection, puis l'effet de l'inhibition de l'ATPsynthase par l'oligomycine, et l'activation de l'AMPK par l'AICAR.

1.1. ATeam et GO-ATeam-1

La figure 66 montre des cellules INS1 transfectées avec ATeam en utilisant une méthode classique de transfection à la lipofectamine. L'image de lumière transmise montre un tapis de cellules saines et bien étalées et permet d'avoir une estimation du nombre de cellules dans le champ. Les images de fluorescence correspondent à l'expression des protéines CFP et YFP par les cellules qui ont effectivement été transfectées avec le Biosenseur ATeam contenant ces protéines.

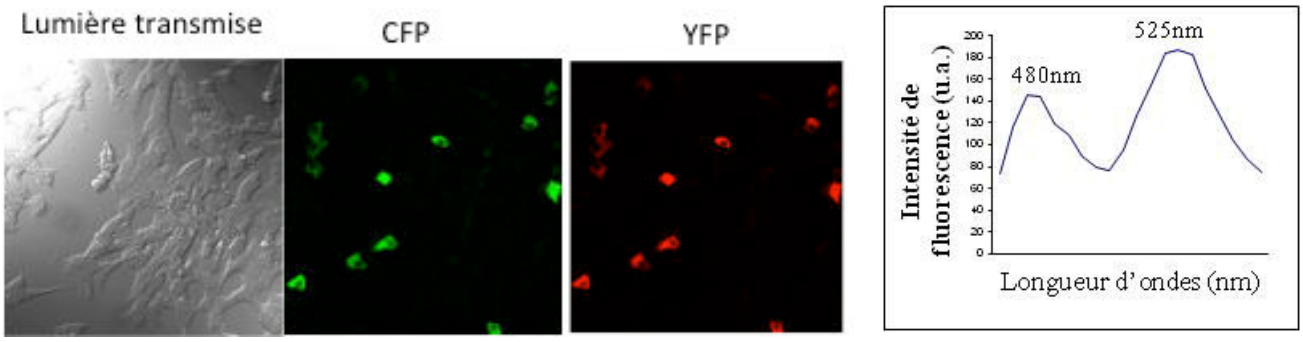


Figure 66 : Cellules INS1 transfectées avec ATeam par lipofectamine observées en lumière transmise et en fluorescence. La couleur verte et le premier pic correspondent à la fluorescence de la CFP (excitation à 458nm et maximum d'émission à 480nm). La couleur rouge et le second pic correspondent à celle de YFP (excitation à 488nm et maximum d'émission à 525nm). Spectre obtenu par acquisition spectrale arpès excitation à 458 nm et émissions recueillies de 465 à 700 nm.

Le biosenseur ATeam a été mis au point pour visualiser l'ATP présent dans les cellules, et que l'efficacité de FRET est liée à la concentration d'ATP : moins il y a d'ATP, moins le FRET se produit et vice-versa.

Ces images sont représentatives de plusieurs tests de transfection ayant donné des résultats similaires.

Les résultats obtenus montrent un faible rendement de transfection : si le comptage précis n'a pas été réalisé, il est évident sur les images que peu de cellules sont fluorescentes par rapport au nombre total de cellules présentes. Peu de cellules ont donc intégré le biosenseur ATeam.

Le spectre présenté a été obtenu à partir de l'image totale afin d'avoir une représentation globale de la fluorescence. Le spectre présenté montre deux pics distincts correspondant à l'émission de la CFP avec un maximum à 480 nm et à YFP avec un pic maximum à 525 nm.

La fluorescence observée est donc bien spécifique de l'expression des protéines fluorescentes contenues dans le biosenseur ATeam.

La présence d'une émission de fluorescence de YFP après excitation de la CFP révèle bien la présence d'un phénomène de FRET, mais dont l'efficacité est assez faible puisque le pic CFP est encore assez important, et le ratio YFP/CFP est de 1,3.

Afin de valider le fonctionnement de ce biosenseur ATeam, un test d'inhibition de l'ATPsynthase a été réalisé. Après transfection, les cellules ont été placées dans la chambre d'incubation du microscope puis mises en présence de 6 µg/ml d'oligomycine. Les images ont été acquises toutes les dix minutes pendant 30 minutes après ajout de l'inhibiteur. La figure 64 présente les résultats obtenus. Là encore, les quelques cellules fluorescentes présentes traduisent un très faible rendement de transfection puisqu'une seule cellule exprime les protéines fluorescentes.

Toutefois, le suivi des spectres de fluorescence et du ratio YFP/CFP valide la réponse d'ATeam à l'inhibition de l'ATPsynthase par l'oligomycine : l'allure du spectre évolue vers une diminution très nette de la fluorescence de l'accepteur, donc une diminution de FRET, confirmée par une diminution des valeurs des ratios YFP/CFP de 1,611 à T0 à 1,18 après 30 minutes de présence d'oligomycine (fig. 67).

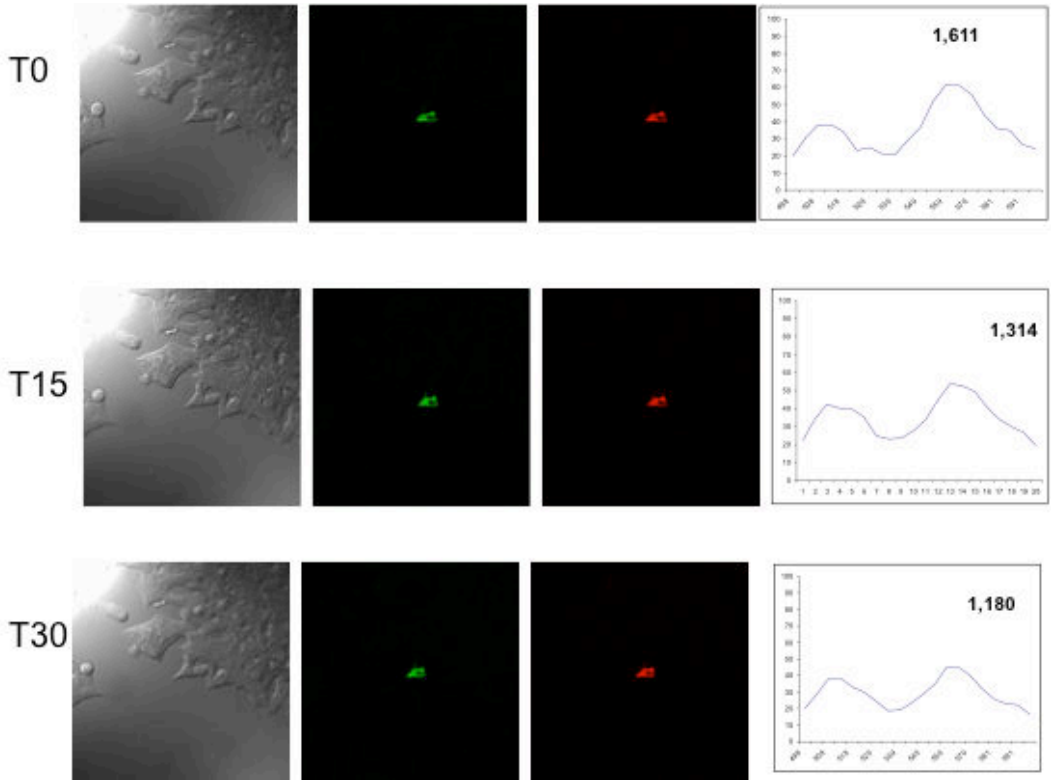


Figure 67 : Test de réponse du biosenseur ATeam à l'oligomycine des cellules INS1 transfectées avec ATeam par lipofectamine. La fluorescence de la CFP (en vert et premier pic, à 480nm) est obtenue par excitation à 458nm, et celle de YFP (en rouge, second pic à 525nm) est obtenue par FRET (excitation à 458nm et maximum d'émission à 525nm). Spectre obtenu par acquisition spectrale après excitation à 458 nm et émissions recueillies de 465 à 700 nm. Les valeurs correspondent au ratio de fluorescence aux pics de YFP/CFP.

La même expérience a été réalisée avec le biosenseur GO-ATeam-1, considéré comme le contrôle négatif de ATeam dans le sens où avec GO-ATeam-1, aucun FRET ne peut se produire, du fait de la mutation des arginine 126 et 122 de GO-ATeam en lysines.

La figure 68 montre d'une part un rendement de transfection meilleur qu'avec ATeam, puisque le nombre de cellules fluorescentes obtenues est nettement plus important.

D'autre part, le spectre et le ratio acepteur/donneur en situation basale (T0) révèle qu'il n'y a effectivement pas de FRET puisque le pic de fluorescence correspondant à l'accepteur est très faible par rapport à celui du donneur, avec un ratio de 0,689.

Après ajout d'oligomycine, il n'y a pas de modification de la réponse du biosenseur : pas d'évolution de l'allure du spectre ni des valeurs de ratio, et ce, pendant 50 minutes.

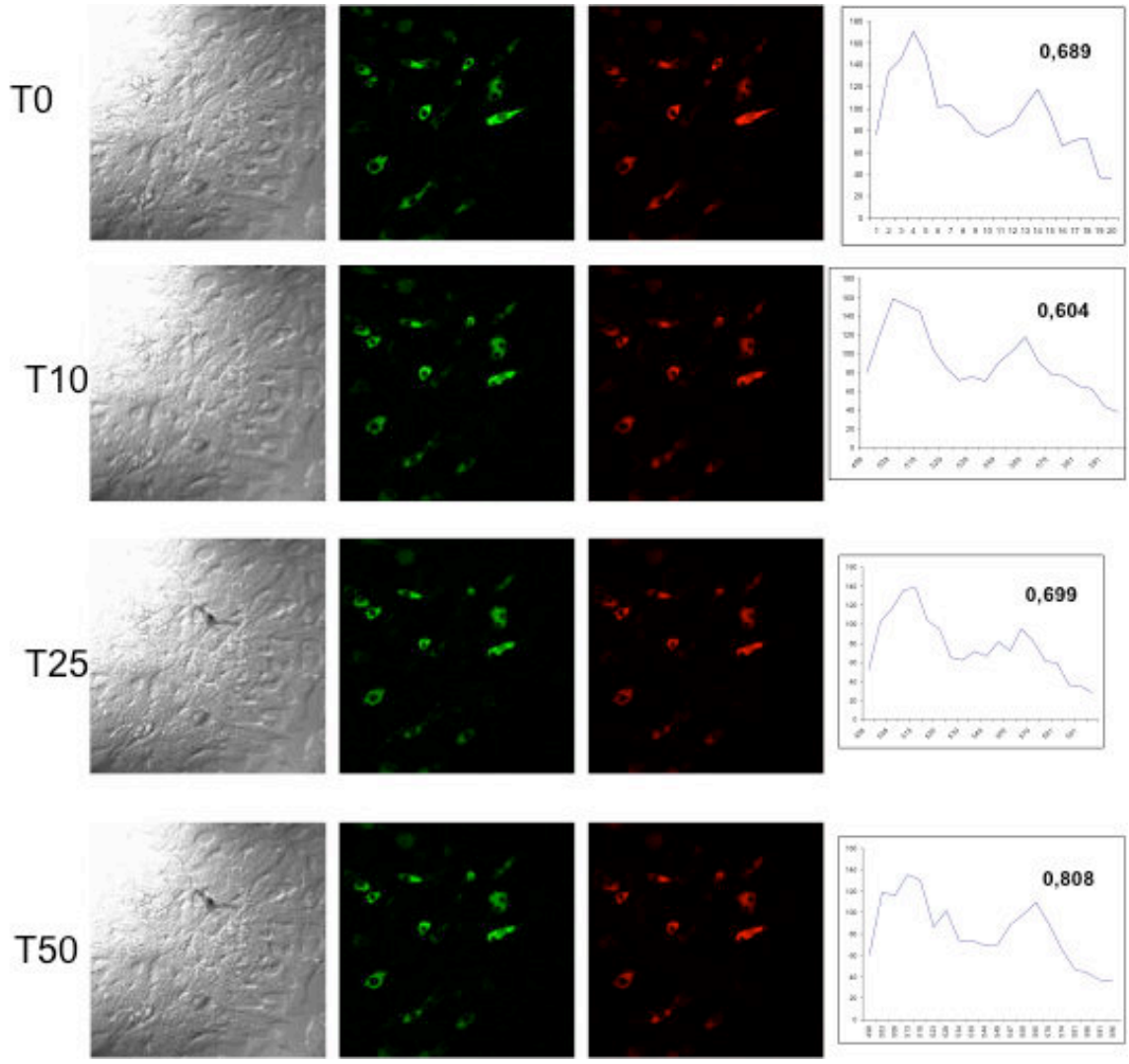


Figure 68 : Test de réponse du biosenseur GO-ATeam-1 (contrôle négatif de ATeam) à l'oligomycine des cellules INS1 transfectées La fluorescence de la CFP (en vert et premier pic, à 480nm) est obtenue par excitation à 458nm, et celle de YFP (en rouge, second pic à 525nm) est obtenue par FRET (excitation à 458nm et maximum d'émission à 525nm).

Spectre obtenu par acquisition spectrale après excitation à 458 nm et émissions recueillies de 465 à 700 nm. Les valeurs correspondent au ratio de fluorescence aux pics de YFP/CFP.

Bien que le rendement de transfection par la lipofectamine soit très faible avec les cellules INS1, ces premiers résultats valident le fonctionnement et donc l'utilisation du biosenseur ATeam pour visualiser et évaluer les variations de concentration cellulaire de l'ATP.

1.2. AMPKAR

Afin de valider le fonctionnement du biosenseur AMPKAR avec des cellules vivantes, des tests préliminaires ont également été effectués en collaboration avec Dr M. Pelosse lors de son travail de thèse sur des cellules HeLa.

Le biosenseur AMPKAR a été développé pour évaluer l'activation de l'AMPKinase au sein de cellules vivantes par FRET. Le principe de fonctionnement de ce biosenseur repose sur la présence d'un substrat de l'MAPK qui, lorsqu'il est phosphorylé, induit un changement de conformation qui permet de produire du FRET entre le donneur et l'accepteur.

La figure 69 présente le résultat des tests préliminaires effectués en utilisant l'AICAR, activateur de référence de l'AMPK et l'oligomycine, qui va induire une activation de l'AMPK lors de l'inhibition de l'ATPsynthase (par diminution du rapport ATP/AMP).

Les cellules HeLa ont été transfectées par AMPKAR grâce à la lipofectamine puis observées par microscopie confocale.

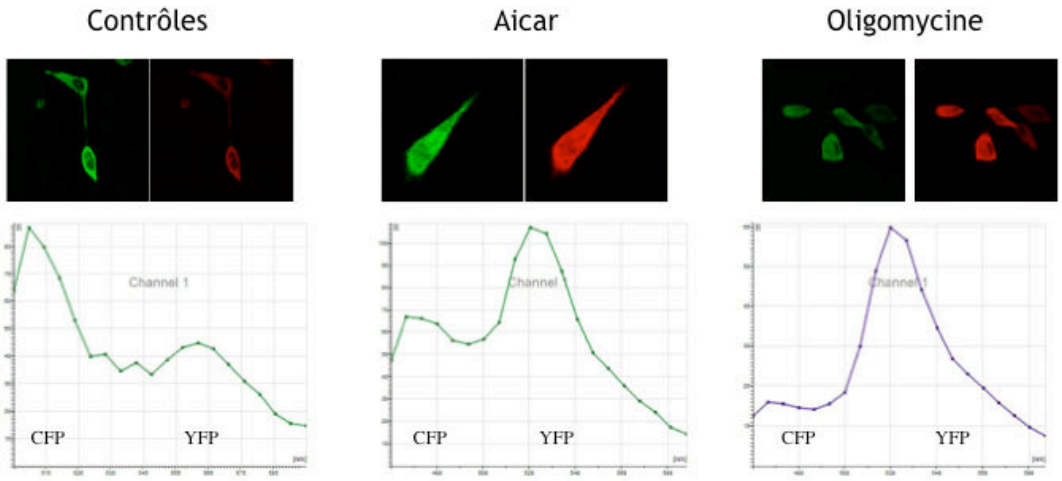


Figure 69 : Transfection à la lipofectamine des cellules HeLa avec AMPKAR et réponses à l'activation par AICAR ou à l'oligomycine. La couleur verte correspond à la fluorescence de

la CFP ; la couleur rouge celle de YFP, après excitation à 458nm et acquisition spectrale de 465 nm à 700 nm pour les émissions de fluorescence.

Comme pour ATeam, le rendement de transfection est faible.
Pour les cellules contrôles, l'intensité de fluorescence du donneur (CFP) est bien plus importante que celle de l'accepteur (YFP). Le spectre de fluorescence correspondant confirme la présence des deux pics correspondants à chacune des protéines fluorescentes, mais sans phénomène de FRET, puisque la fluorescence de l'accepteur est à peine perceptible.
Lors de l'activation induite par AICAR, l'AMPK est activée et le changement de conformation du biosenseur induit bien un phénomène de FRET nettement visualisable par une forte augmentation du signal de l'accepteur, confirmée par l'analyse du spectre : l'inversion de la courbe est en faveur d'une diminution de la fluorescence de CFP au profit d'YFP.
Lors d'une diminution de concentration d'ATP induite par inhibition de l'ATPsynthase par l'oligomycine, le phénomène de FRET observé est encore plus marqué : le pic correspondant à la CFP a presque disparu alors que celui de YFP a très fortement augmenté.

Bien que le rendement de transfection soit également très faible avec les cellules HeLa, ces premiers résultats valident le fonctionnement et donc l'utilisation du biosenseur AMPKAR pour visualiser et évaluer l'activation de l'AMPK mise en évidence soit par activation par AICAR, soit par inhibition de l'ATPsynthase par l'oligomycine.

Pour ATeam comme pour AMPKAR, le faible rendement de transfection oblige l'expérimentateur à sélectionner les cellules qui émettent le plus de fluorescence. Cependant, comme ces biosenseurs sont fortement liés à l'état énergétique des cellules, ce choix risque d'induire un biais expérimental dans le sens où les cellules exprimant cette fluorescence et du FRET ont déjà un état énergétique différent de l'ensemble de la population cellulaire non fluorescente. Toutefois, les expériences réalisées soit avec inhibiteurs de l'ATPsynthase soit avec les activateurs de l'AMPK peuvent être considérés comme des contrôles valides.

Grâce à une collaboration avec le laboratoire CARMEN à Lyon, les plasmides contenant les biosenseurs ont été intégrés dans des adénovirus afin d'optimiser le rendement de cellules ayant intégré dans leur génome ces biosenseurs.

2. Optimisation par adénovirus

Avant de réaliser les expériences de stress énergétiques, des tests préliminaires de validation ont dû être effectués afin de valider l'utilisation d'adénovirus pour l'expression des sondes ATeam et AMPKAR dans nos modèles cellulaires. L'objectif était de :

- trouver la bonne concentration d'adénovirus à utiliser
- vérifier l'efficacité de l'infection en mesurant l'émission de fluorescence des protéines contenues dans les biosenseurs
- vérifier la réponse des biosenseurs aux tests d'inhibition de l'ATPsynthase ou d'activation de l'AMPK ;

Dans la suite du texte, les adénovirus contenant ATeam et AMPKAR seront désignés par Ad-ATeam, Ad-GO-ATeam et Ad-AMPKAR.

2.1 Tests de concentrations et d'efficacité d'infection d'adénovirus par cytométrie en flux

Les cellules RT112 ont été ensemencées à raison de 50 000 cellules / puits dans des plaques 24 puits. Après 24h d'incubation à 37°C et 5% CO2, les cellules ont été infectées avec différentes concentrations d'adénovirus : de 10 à 100 m.o.i (multipliants of infection = unité d'adénovirus par cellule) ajoutés dans le milieu de culture, puis à nouveau placées dans l'incubateur dédié.

Après 24h et 48h, les cellules ont été collectées après trypsination puis analysées par cytométrie en flux : à partir de la région d'intérêt correspondant à une population homogène de cellules, les moyennes de fluorescence ont été mesurées dans les canaux appropriés à l'émission de chacune des protéines fluorescentes exprimées :

- <u>pour Ad-ATeam et Ad-AMPKAR</u> : ces protéines ont les mêmes propriétés de fluorescence que CFP et YFP. Il est à noter que la longueur d'onde d'excitation utilisée (488nm car le

cytomètre utilisé ne possède pas le laser approprié pour l'excitation de CFP) est supérieure au pic maximum d'excitation de la CFP (458nm) mais est incluse dans le spectre d'excitation. De ce fait, l'intensité de fluorescence mesurée dans le canal CFP est plus faible, donc sous-estimée. De plus, cette longueur d'onde d'excitation correspond davantage au pic maximum d'excitation de YFP (fig 70). Avec les filtres d'émission disponibles sur notre cytomètre, il n'est pas possible de recueillir l'émission spécifique de CFP : avec le filtre 525/50, les émissions de fluorescence recueillies sont à la fois celle de CFP et celle de YFP. Par contre, avec le filtre 575/26, seule YFP est détectée, mais pas à son maximum d'intensité.

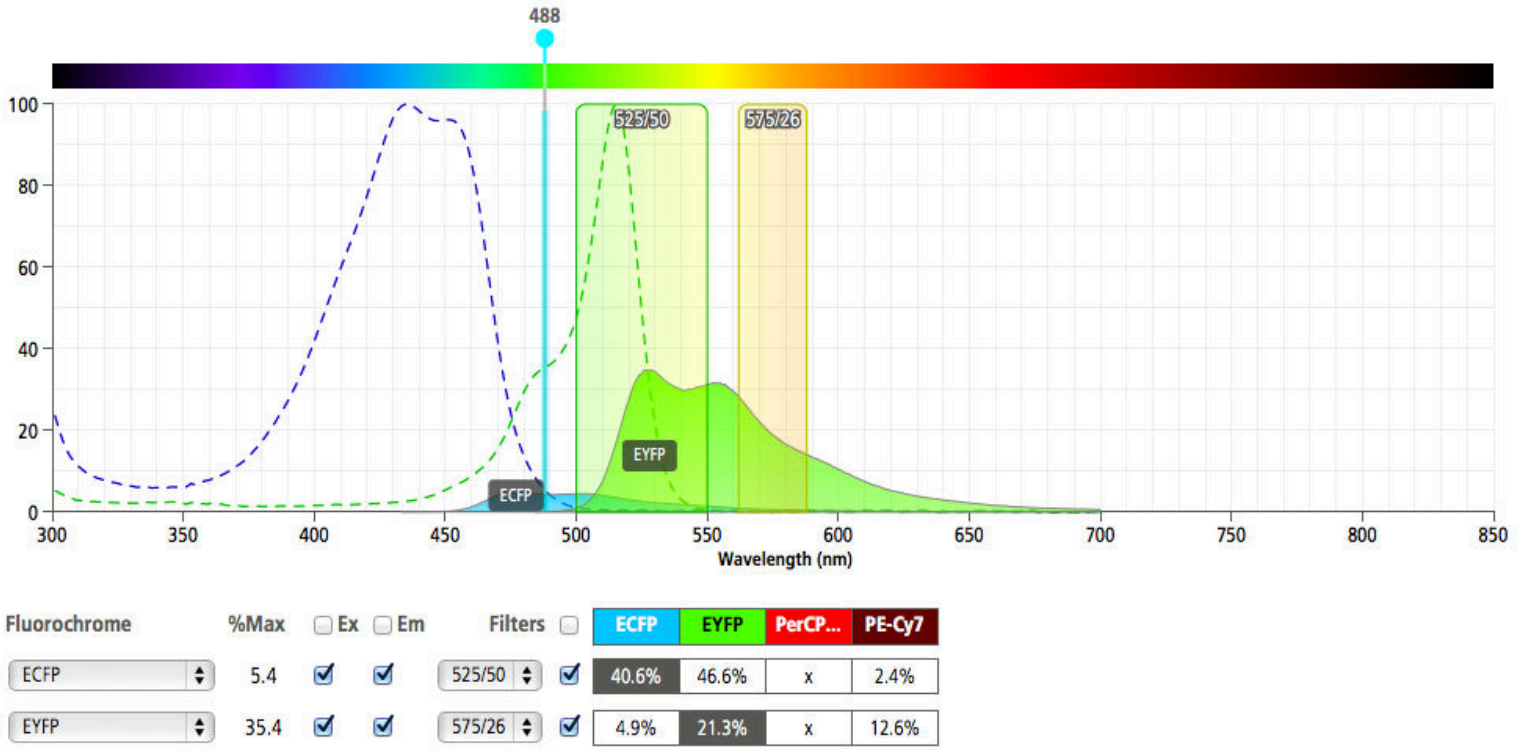


Figure 70. Représentation des spectres d'excitation et émission de fluorescence des protéines ECFP et EYFP associée à la représentation des performances obtenues avec la configuration du cytomètre utilisé pour Ad-ATeam et Ad- AMPKAR : excitation à 488nm et des filtres d'émission BP 525/50 pour CFP et 575/26 pour YFP (issu du « spectrum viewer » de https://www.bdbiosciences.com)

Puisque c'est l'énergie libérée par l'émission de fluorescence de CFP qui permet l'excitation de YFP, la fluorescence émise dans le canal YFP (575/26) doit correspondre donc à la présence de FRET. Autrement dit, plus l'intensité de fluorescence recueillie dans le canal YFP est élevée, plus il y a de FRET. Cependant, puisque la longueur d'onde utilisée à 488nm

permet également d'exciter directement YFP indépendamment de la présence de FRET, cette approche est discutable : un compromis est établi en recueillant de façon biparamétrique la fluorescence dans les deux canaux : 525/50 (CFP+YFP) et 575/26 (YFP). De ce fait, cette estimation du pourcentage de cellules positives est sans doute légèrement biaisée du fait que c'est principalement la fluorescence de l'accepteur qui est mesurée. Puisqu'il n'est pas possible de recueillir spécifiquement la fluorescence du donneur, un calcul ratiométrique accepteur/donneur n'est donc pas réalisable pour Ad-ATeam ni Ad-AMPKAR.

- pour Ad-GO-ATeam-1 : cette même configuration du cytomètre convient puisque les protéines fluorescentes constituant GO-ATeam-1 émettent respectivement dans le vert pour le donneur et l'orange pour l'accepteur, avec une excitation à 488nm. Puisqu'il n'y a pas de FRET avec ce biosenseur, il n'y a donc qu'une faible fluorescence de l'accepteur.

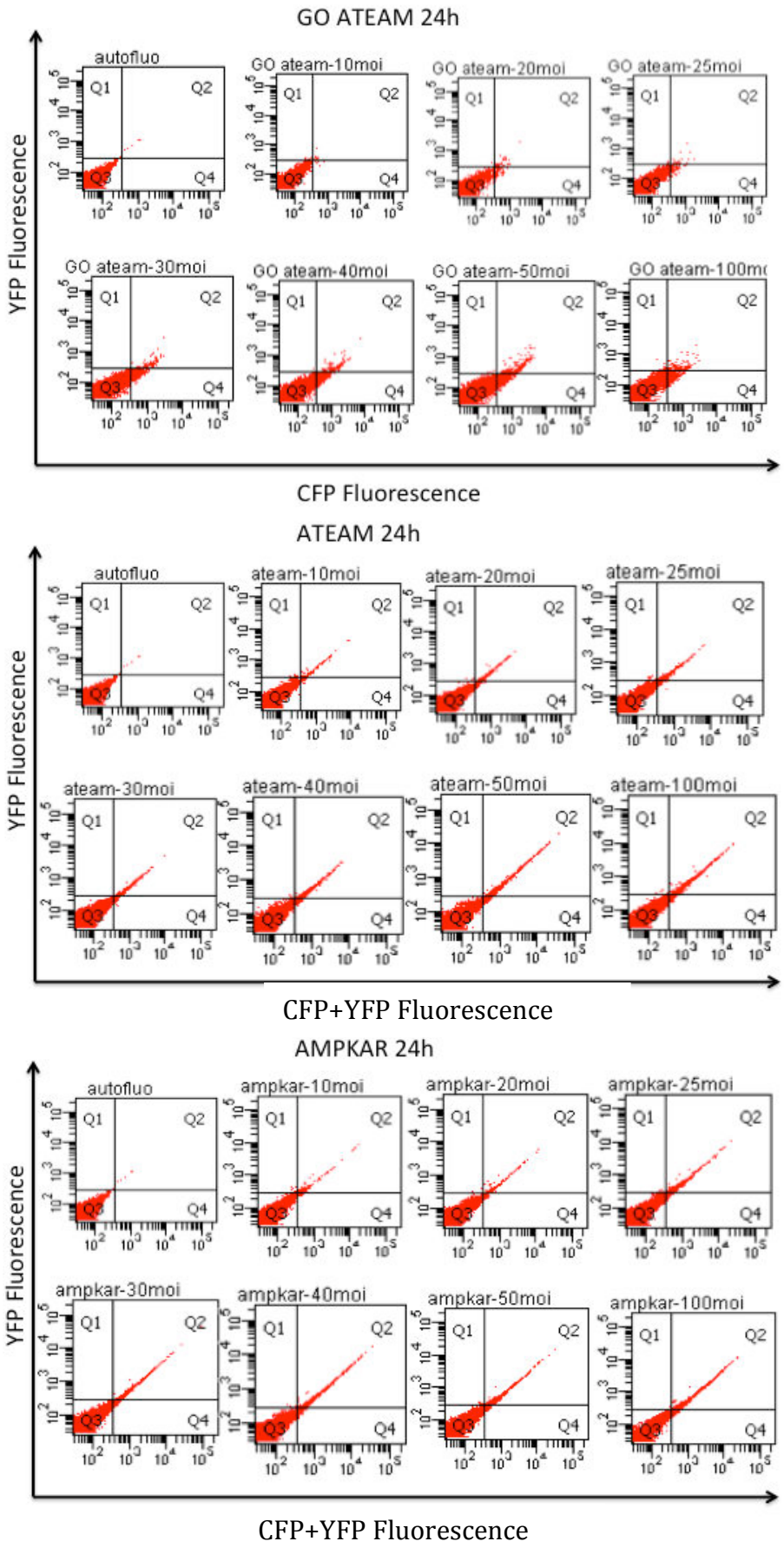


Figure 71 : Test doses d'adénovirus contenant GO-ATeam-1 , ATeam et AMPKAR par CMF après 24h d'infection

La figure 71 présente une analyse biparamétrique de cytométrie en flux des fluorescences après 24 heures d'incubation, correspondant à l'émission de chacune des protéines fluorescentes contenues dans les biosenseurs : YFP sur l'axe vertical (obtenue avec le filtre 575/26) et CFP+YFP (obtenues avec le filtre 525/50) sur l'axe horizontal. Le quadrant Q3 correspond aux cellules non fluorescentes, à partir desquelles le seuil de positivité est fixé. Le quadrant Q1 correspond à la fluorescence de YFP, le quadrant Q4 à celle de YFP+CFP, et le quadrant Q2 à la présence des 2 fluorescences simultanément, donc à la présence de FRET.

Après 24 heures d'infection, cette analyse valide l'absence de FRET avec l'adénovirus Ad-GO-ATeam-1, puisqu'il n'y a pas d'émission de fluorescence dans le canal 575/26 (correspondant à la fluorescence orange de l'accepteur) significativement supérieure à l'autofluorescence dans aucune des conditions testées. De plus, si une faible fluorescence apparaît dans le canal 525/50 (correspondant à la fluorescence verte du donneur) pour les concentrations de 30 à 50 moi, elle n'apparaît pas dans le canal 575/26 ce qui signifie qu'il n'y a pas de FRET.

Pour la condition Ad-ATeam, une double fluorescence est constatée dans le quadrant Q2 dès la concentration de 10 m.o.i, et qui augmente progressivement avec les doses croissantes d'adénovirus, avec une intensité qui semble équivalente pour les concentrations 50 et 100 m.o.i.

L'infection pendant 24 heures avec l'adénovirus contenant AMPKAR révèle une double fluorescence également dès 10 m.o.i, et qui augmente progressivement avec les doses croissantes d'adénovirus, avec une intensité qui semble équivalente pour les concentrations dès 30 m.o.i. et jusqu'à 100 m.o.i.

La même analyse a été réalisée après 48h d'incubation, et la figure 72 en présente l'analyse biparamétrique :

- les résultats obtenus pour Ad-GO-ATeam montrent une faible augmentation de l'intensité de fluorescence dans les deux canaux, par rapport aux résultats obtenus à 24h.
- pour Ad-ATeam comme pour Ad-AMPKAR, l'intensité de fluorescence a nettement augmenté par rapport aux résultats obtenus à 24h, de façon proportionnelle à la concentration d'adénovirus.

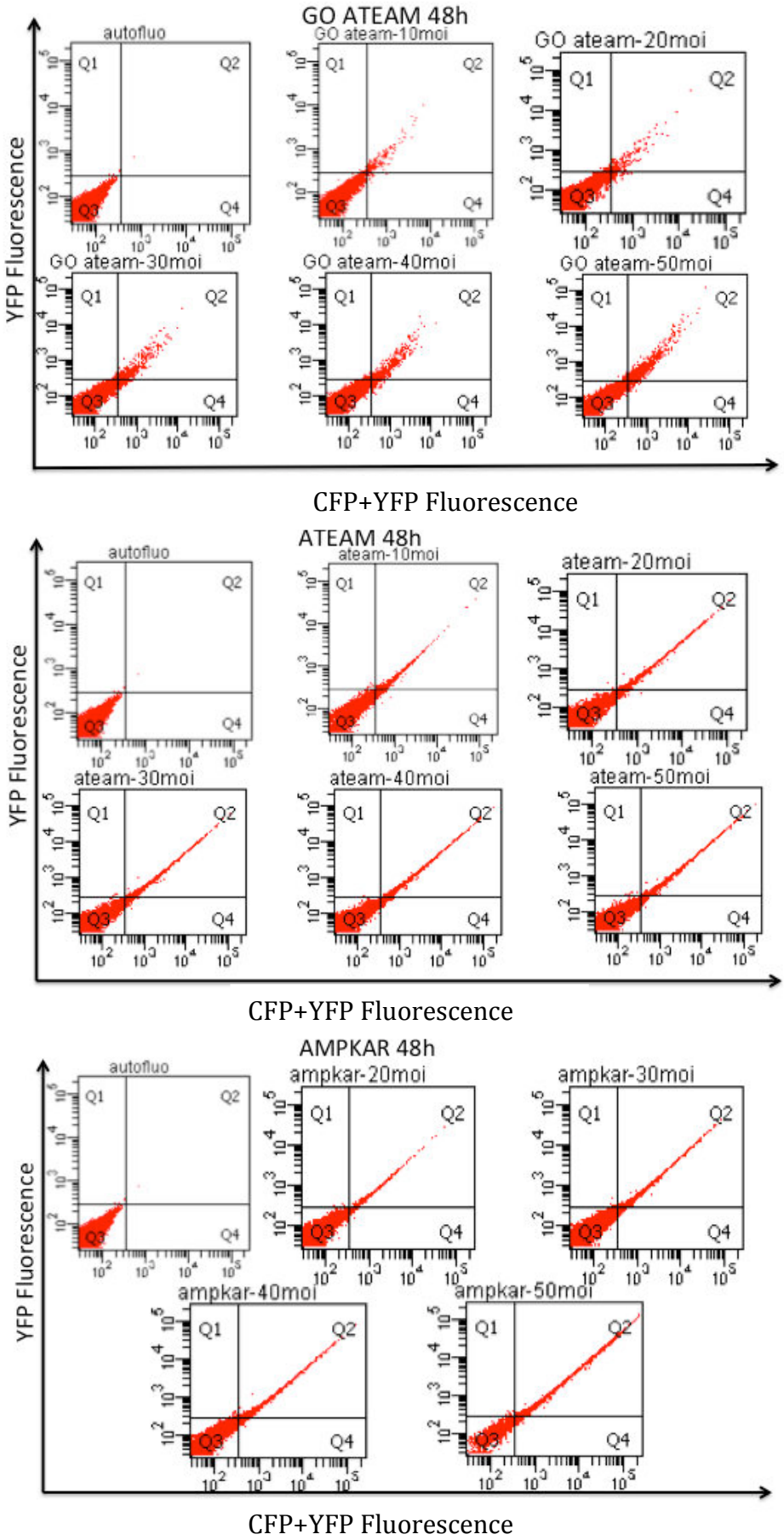


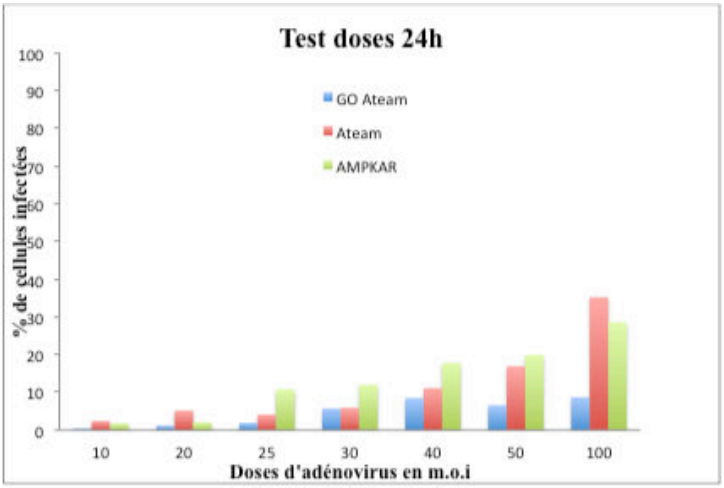
Figure 72 : Test doses d'adénovirus contenant GO-ATeam-1, ATeam et AMPKAR par CMF après 48h d'infection.

L'analyse de ces graphes permet également de quantifier le pourcentage de cellules infectées, ainsi que l'évaluation de la présence de FRET :

2.2 Détermination du pourcentage de cellules infectées

Des cellules « contrôles » non infectées ont été utilisées pour déterminer le seuil de positivité de la fluorescence, se distinguant de l'autofluorescence (quadrant Q3). Ainsi, le pourcentage de cellules positives correspond à la proportion de cellules exprimant les protéines fluorescentes, c'est-à-dire les cellules infectées par les adénovirus contenant les biosenseurs GO-ATeam-1, ATeam et AMPKAR.

La figure 73 présente les pourcentages de cellules infectées par les adénovirus contenant les biosenseurs respectifs incubés aux différentes doses :



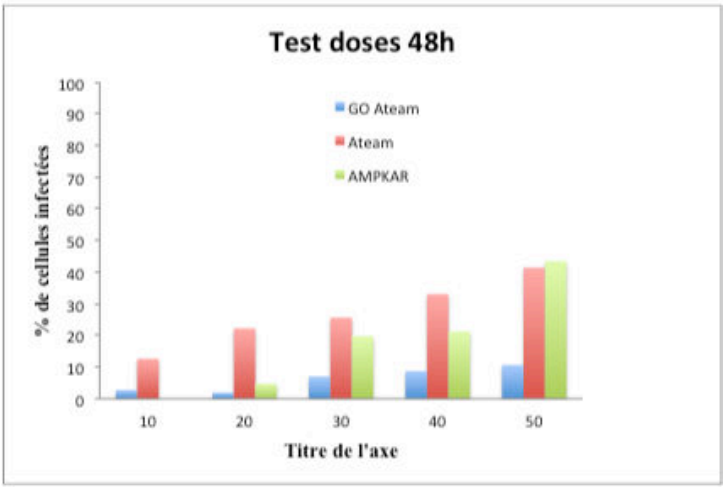


Figure 73 : Test doses d'adénovirus contenant Ateam, GO-ATeam-1 et AMPKAR par CMF à 24 et 48h : détermination du pourcentage de cellules infectées (quadrants Q2+Q4)

- Après 24h d'infection, peu de cellules sont infectées par Ad-GO-ATEAM. Il faut une concentration minimum de 40moi pour avoir au moins 10% de cellules infectées avec Ad-ATeam ou Ad-AMPKAR alors qu'on atteint 50% de cellules infectées avec la concentration maximum de 100 m.o.i.
Cependant, une observation rapide au microscope a montré qu'à cette dose élevée, les cellules s'arrondissent et meurent (résultats non montrés).

- Après 48h d'infection, le pourcentage de cellules positives n'a pas augmenté avec GO-ATeam-1 et ne dépasse pas les 10% à partir de 30 m.o.i. On obtient environ 30% de cellules infectées dès 20m.o.i. pour ATeam et à partir de 30 m.o.i. pour AMPKAR.
- Comme à 24h, même à la concentration maximum testée de 100 m.o.i., le pourcentage maximum de cellules positives obtenu ne dépasse pas 50%. Là encore, à cette concentration les cellules meurent.

Un test de viabilité aurait été nécessaire pour compléter ces données.

Ces résultats montrent que l'infection des cellules par adénovirus améliore nettement le rendement de cellules fluorescentes par rapport à la technique de transfection par la lipofectamine.

2.3 Evaluation de la présence de FRET

L'analyse des graphes précédents permet également d'extraire des données représentatives de la présence de FRET : à partir de ces graphes, le FRET a été évalué sur la base des moyennes de fluorescence recueillie sur les deux canaux de fluorescences : canal du donneur à 525/50nm et de l'accepteur à 575/26.
La figure 74 présente les résultats de ces mesures pour les temps 24h comparés à 48h d'infection par les adénovirus à des concentrations croissantes.

Après 24 heures d'infection :

- Pour Ad-GO-ATeam-1, les valeurs de fluorescence obtenues dans le canal de l'accepteur sont très faibles ce qui valide l'absence de FRET avec ce biosenseur.
- Pour Ad-ATeam comme pour Ad-AMPKAR, les intensités de fluorescence mesurées dans les deux canaux de fluorescence confirment la présence de FRET puisque c'est essentiellement la fluorescence de l'accepteur YFP qui est détectée. Ces valeurs d'intensités sont assez faibles, et ne varie pas de façon importante en fonction de la concentration.

Après 48 heures d'infection :

- pour Ad-GO-ATeam-1, les valeurs de fluorescence obtenues sont plus élevées qu'à 24h, surtout à la concentration de 50 m.o.i., mais restent cinq à sept fois plus faibles qu'avec Ad-ATeam et Ad-AMPKAR. Ces résultats valident l'absence de FRET avec l'utilisation de ce biosenseur.
- Pour Ad-ATeam et Ad-AMPKAR, les intensités mesurées sont supérieures par rapport au temps 24h et augmentent fortement en fonction de la concentration d'adénovirus : elles doublent entre 10 et 20 m.o.i. pour Ad-ATeam, et entre 20 et 30 m.o.i. pour Ad-AMPKAR.

Pour Ad-ATeam, la valeur maximale d'intensité observée est atteinte à 20m.o.i. puisque les valeurs obtenues à 30, 40 et 50 m.o.i. restent du même ordre.

Pour Ad-AMPKAR, la valeur maximale d'intensité est observée à 30 m.o.i. et les valeurs obtenues à 30, 40 et 50 m.o.i. restent du même ordre.

Aux doses les plus élevées d'adénovirus, l'intégrité des cellules est atteinte et le signal de FRET observé risque d'être biaisé par une modification de l'état énergétique des cellules (probablement responsable de l'augmentation de fluorescence observée).

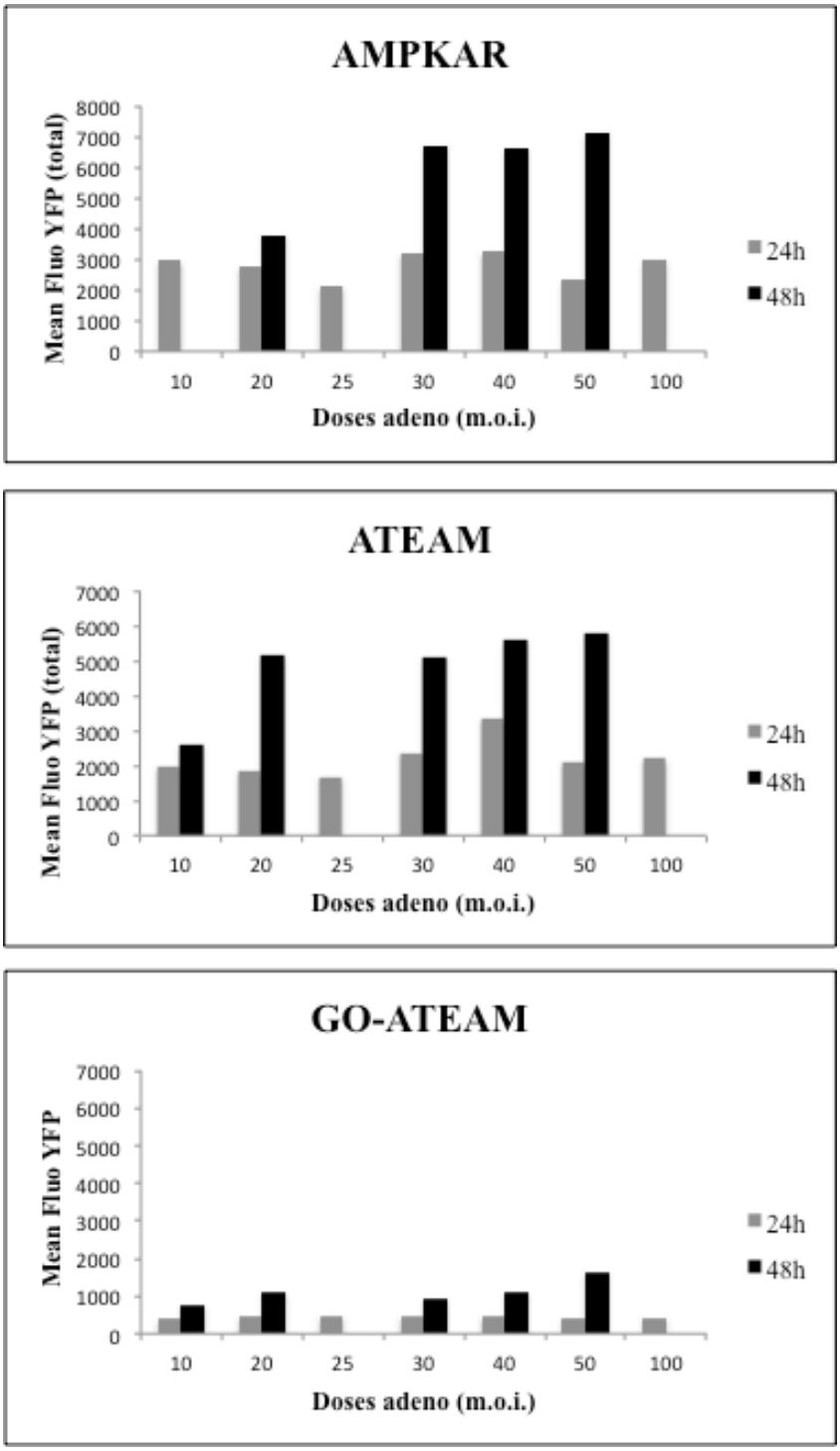


Figure 74 : Test doses d'adénovirus par CMF à 24 et 48h : évaluation du FRET par les moyennes de fluorescence observées dans les canaux YFP+CFP ou quadrant Q4 (filtre 525/50nm) et YFP seule ou quadrant Q2 (filtres 575/26nm) pour ATeam et AMPKAR. Pour GO-ATeam-1, la mesure du canal YFP seule correspond au FRET. La concentration de 10 m.o.i. n'a pas été testée à 48h pour AMPKAR. Les concentrations de 25 et 100 m.o.i. n'ont pas été testées à 48h.

A partir de ces résultats, une concentration de 25 m.o.i et une durée d'infection de 48 heures constituent la condition expérimentale retenue qui sera également appliquée pour les expériences d'imagerie.

3.Validation de l'utilisation des Biosenseurs ATEAM et AMPKAR sur les cellules primaires (hépatocytes) : réponses à l'oligomycine et au CCCP

L'avantage de l'utilisation des adénovirus est que leur efficacité ne dépend pas du type cellulaire. Ainsi, ils sont capables d'infecter des cellules primaires avec un très bon rendement. A partir de ces informations, nous avons choisi de réaliser nos approches expérimentales directement sur les hépatocytes isolés.

Ces hépatocytes ont été mis en culture pendant une nuit après isolation puis infectés par les adénovirus contenant les biosenseurs Ad-ATeam et Ad-AMPKAR pendant 48 heures à la concentration de 25 m.o.i.

Comme pour les expériences précédentes, des tests de validation ont été basés sur une inhibition de l'ATPsynthase par l'oligomycine suivie d'un découplage par le CCCP.

3.1 .Ad-ATeam

Après 48heures d'infection par Ad-ATeam à 25 m.o.i. , les hépatocytes cultivés sur une lamelle de verre ont été placés dans la chambre d'incubation du microscope.

Sham : expérience contrôle

Dans un premier temps, une expérience contrôle a été réalisée simplement en effectuant des changements de milieu (en utilisant du milieu II complet) toutes les 20 minutes pendant 40 minutes (ce test est nommé « sham oligo » ou « sham cccp »).

La figure 75 montre les images acquises après excitation à 458nm et recueil des émissions de fluorescence par bande de 8nm autour des pics maximum de chacune des protéines fluorescentes : de 472 à 480nm pour CFP et de 526 à 534nm pour YFP. Les images ont été acquises toutes les minutes pendant 40 minutes.

A chaque changement de milieu, une acquisition spectrale est réalisée afin d'obtenir un spectre des signaux de fluorescence observés. La quantification des intensités de fluorescence et les spectres ont été réalisés sur l'ensemble des cellules du champ observé.

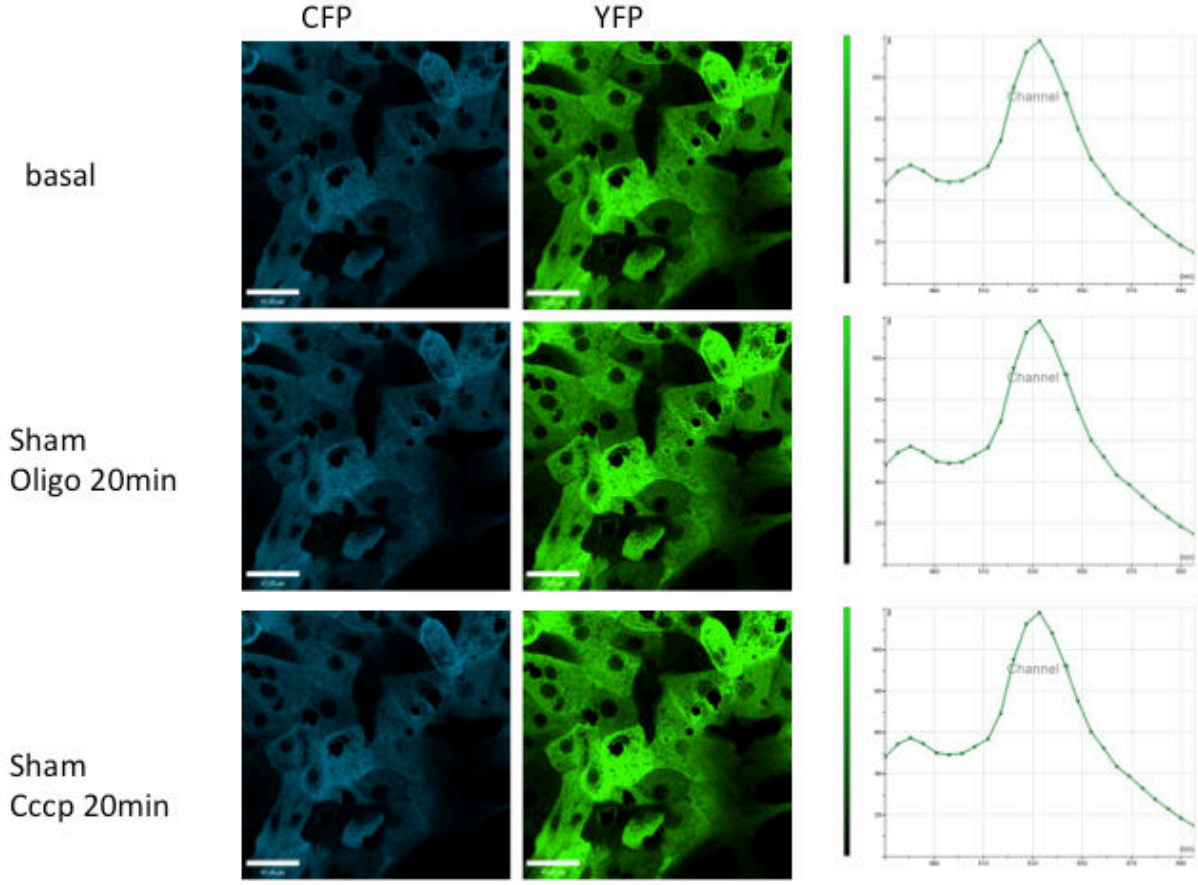


Figure 75 : Suivi des fluorescences CFP (en bleu et premier pic) et YFP (en vert et second pic) et du spectre de FRET pendant 40 minutes (sham) des hépatocytes infectés 48h avec Ad-ATeam à 25 m.o.i. Excitation à 458nm et acquisition spectrale de 465 à 700nm. Barre d'échelle : 44µm

Les images obtenues montrent que l'efficacité d'infection par l'adénovirus est effectivement importante puisque la quasi totalité des cellules présentes dans le champ d'observation sont fluorescentes, ce qui révèle qu'elles expriment les protéines fluorescentes du biosenseur, donc qu'elles ont intégré l'adénovirus.

Le spectre de fluorescence mesuré révèle bien les pics spécifiques attendus : celui de CFP et celui de YFP. L'allure du spectre est représentative d'un phénomène de FRET, puisque le pic CFP est très faible, l'émission de fluorescence ayant fourni l'énergie nécessaire à l'émission de YFP.

Au cours de cette expérience « sham », la présence de FRET n'est pas surprenante puisque les hépatocytes ayant un métabolisme très actif etpossèdent une forte concentration d'ATP, ainsi révélée par Ad-ATeam. Le changement de milieu n'induit pas d'effet sur la concentration d'ATP : les signaux de fluorescence restent stables (fig 76).

Dans les mêmes conditions expérimentales d'infection (25m.o.i. d'Ad-ATEAM), après l'acquisition d'une image basale, le milieu des cellules a été remplacé par du milieu complet additionné de 6 µg/ml d'oligomycine, puis 50 µM de CCCP. Les images ont été acquises toutes les minutes pendant 40 minutes, avec une acquisition spectrale après 20 minutes d'oligomycine puis après 20 minutes de CCCP (fig.76). Là encore, le spectre correspondant à l'image « basal » est un spectre de FRET ce qui indique déjà une forte concentration d'ATP.

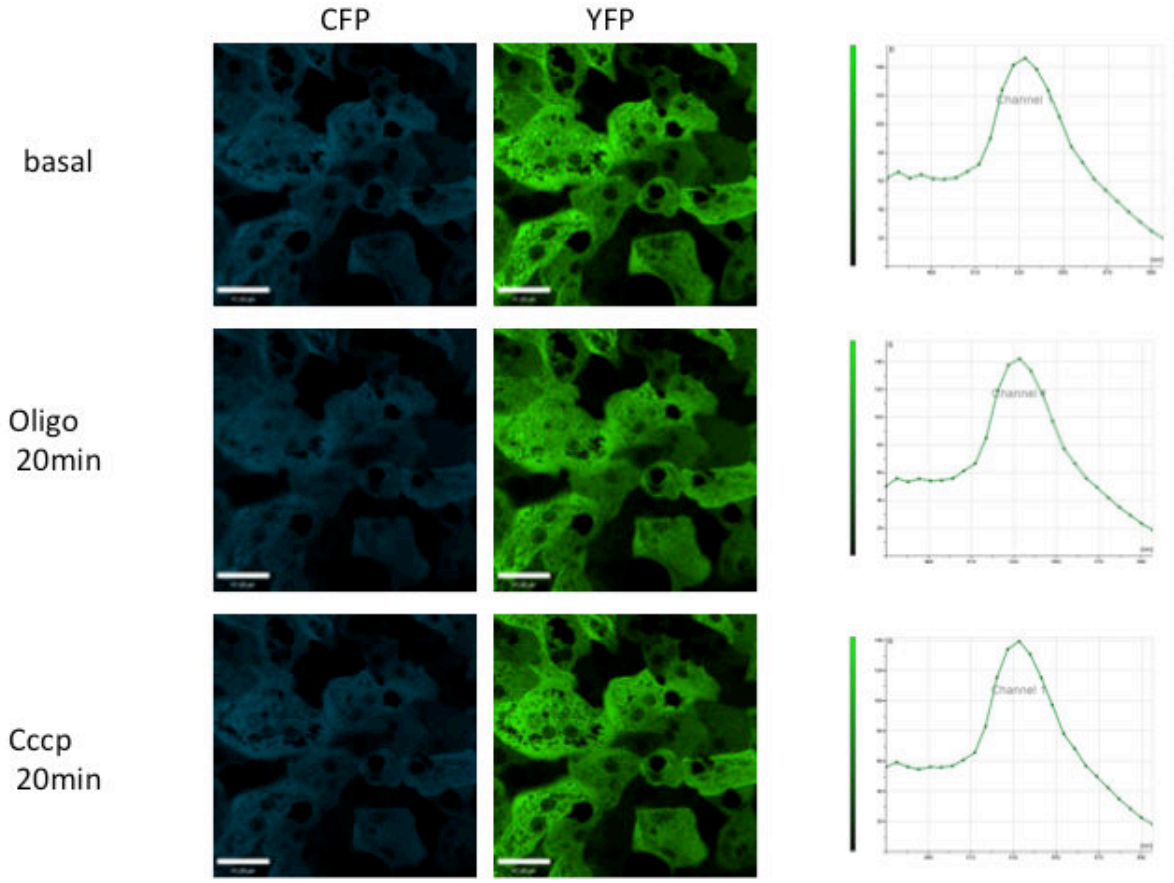


Figure 76 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes après 48h d'infection avec Ad-ATeam à 25 m.o.i. Excitation à 458nm et acquisition spectrale de 465 à 700nm.Barre d'échelle : 44µm. Les images présentées sont représentatives de trois expériences.

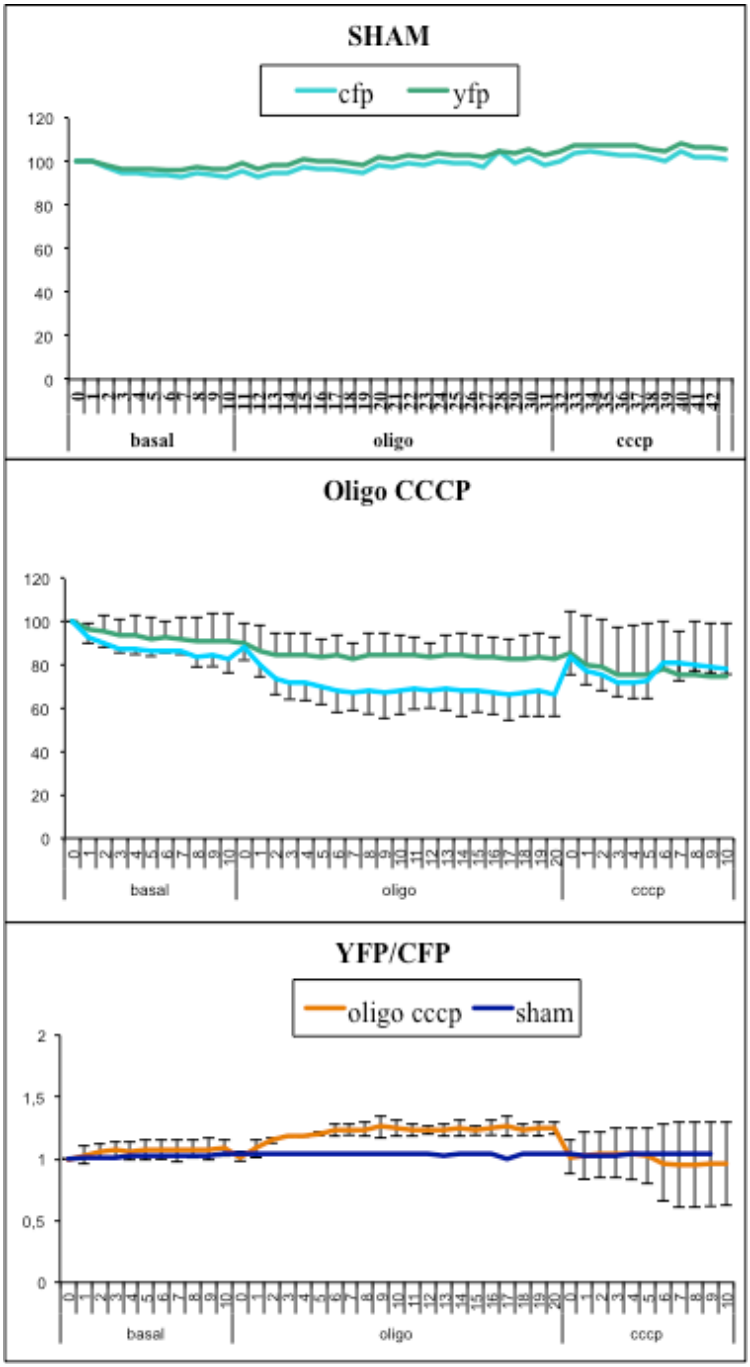


Figure 77 : Graphes de quantification des fluorescences CFP et YFP et du ratio YFP/CFP sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes infectés 48h avec Ad-ATeam à 25 m.o.i.

Les intensités des signaux de fluorescence étant élevées, la quantification des images a été réalisée par un seuillage classique et sur la globalité du champ d'observation.

Effet de l'oligomycine

Les courbes de cinétique des fluorescences révèlent une diminution du signal CFP de l'ordre de 25% environ dès les premières minutes après ajout d'oligomycine, alors que le signal YFP reste stable (fig.74). D'un point de vue ratiométrique, cela se traduit par une augmentation du ratio YFP/CFP indiquant, en théorie, une augmentation du FRET liée à une augmentation d'ATP. En théorie également, s'il y augmentation de FRET, la diminution de fluorescence de CFP devrait s'accompagner d'une augmentation de celle d'YFP par transfert d'énergie. L'absence d'augmentation de fluorescence d'YFP suggère qu'on se trouve probablement dans une situation limitant l'efficacité de FRET.

Avec une variabilité des trois expériences assez faible, la différence des valeurs de ratio est également de l'ordre de 25% : d'une valeur de 1 en situation basale, la valeur moyenne la plus élevée est de 1,25 observée après 15 minutes d'oligomycine.

L'oligomycine inhibe l'ATPsynthase, donc inhibe la production d'ATP au niveau mitochondrial. Ces résultats sont donc contradictoires avec la théorie : l'inhibition de production d'ATP par l'oligomycine devrait induire une diminution du FRET, donc une diminution du ratio YFP/CFP. Cependant, la localisation intracellulaire de la fluorescence d'ATeam n'est pas décrite au niveau du compartiment mitochondrial, mais à l'ensemble du cytosol. Il est donc très probable que la cellule compense ce blocage de la chaîne respiratoire mitochondriale par l'oligomycine en fabriquant davantage d'ATP par la glycolyse. Le pic d'augmentation du FRET correspondrait à cette génération d'ATP glycolytique. L'expérience de privation de substrats présentée plus loin (§ 4.2 p204) devrait confirmer cette hypothèse.

Effet du CCCP

Le CCCP a été ajouté après les 20 minutes d'oligomycine. En théorie, le découplage induit un redémarrage de la consommation d'oxygène mais continue de bloquer la synthèse d'ATP.

Les courbes de cinétique des fluorescences observées dans la figure 74 montrent que le signal CFP ré-augmente pour atteindre environ 80% de son niveau basal, et que le signal YFP diminue parallèlement d'environ 20% dès les premières minutes après ajout de CCCP.

D'un point de vue ratiométrique, le ratio YFP/CFP diminue brusquement dès l'ajout de CCCP puis cette diminution se poursuit très légèrement.
Cette diminution de FRET révèle une diminution de production d'ATP, ce qui est cohérent avec l'effet connu du découplage sur la chaîne respiratoire.

Par ailleurs, la disparité des résultats obtenus lors des trois expériences effectuées, révélée par des écart-types élevés des ratios YFP/CFP lors de l'ajout du CCCP, ne permet pas de conclure avec certitude sur la réponse du biosenseur au découplage.

Bien qu'une variation de FRET soit effectivement observée au cours de ces tests d'inhibition et de découplage, il est délicat de faire un lien entre les variations mesurées et la concentration réelle d'ATP : 25% de variation de FRET correspondent-ils à 25% de variation de concentration d'ATP ? (voir Imamura el al. 2009, Fig 3)

Ces résultats ne permettent pas de valider la spécificité de la réponse du biosenseur Ad-ATeam aux variations d'ATP liée à un stress d'inhibition de l'ATP-synthase suivi d'un découplage dans nos conditions expérimentales.

3.2.Ad-AMPKAR

Comme pour Ad-ATeam, après 48heures d'infection par Ad-AMPKAR à 25 m.o.i, les hépatocytes cultivés sur une lamelle de verre ont été placés dans la chambre d'incubation du microscope.

Les conditions expérimentales et d'acquisition des images sont similaires à celles réalisées avec Ad-ATeam : excitation à 458nm et recueil des émissions de fluorescence par bande de 8nm autour des pics maximum de chacune des protéines fluorescentes et acquisitions toutes les minutes pendant 40 minutes. Une acquisition spectrale est réalisée à chaque changement de milieu. La quantification des intensités de fluorescence et les spectres ont été réalisés sur l'ensemble des cellules du champ observé.

Comme pour Ad-ATeam, les images obtenues montrent que la quasi-totalité des cellules présentes dans le champ d'observation expriment les protéines fluorescentes du biosenseur, le

rendement d'infection par l'adénovirus est important ce qui révèle qu'elles ont intégré l'adénovirus.
Le spectre de fluorescence mesuré révèle bien les pics spécifiques attendus : celui de CFP et celui de YFP.
A la différence d'Ad-ATeam exprimé de façon diffuse dans l'ensemble de la cellule, la distribution intracellulaire des protéines fluorescentes est compartimentée avec une localisation préférentielle au niveau du noyau et parfois membranaire.

Sham : expérience contrôle

Dans un premier temps, une expérience contrôle a été réalisée simplement en effectuant des changements de milieu (en utilisant du milieu II complet) toutes les 20 minutes pendant 40 minutes (« sham oligo » ou « sham cccp » dans la figure 78).

L'allure des spectres est représentative d'un phénomène de FRET, puisque le pic CFP est très faible, l'émission de fluorescence ayant fourni l'énergie nécessaire à l'émission de YFP. L'image basale montre une intensité de fluorescence de CFP plus faible que celle de YFP, ce qui se retrouve au niveau du spectre. Avec le biosenseur AMPKAR, c'est la phosphorylation du substrat de l'AMPK qui induit le changement de conformation du biosenseur permettant de faire du FRET. Autrement dit, il y a du FRET lorsque l'AMPK est activée. Cependant, en situation basale, il est étonnant que l'AMPK soit déjà activée. L'infection par l'adénovirus est probablement un stress métabolique suffisant pour activer l'AMPK.
Après chaque séquence de vingt minutes correspondant aux changements de milieux, une légère augmentation de l'intensité de fluorescence peut être constatée à la fois pour CFP et pour YFP, sans modification de l'allure des spectres respectifs.

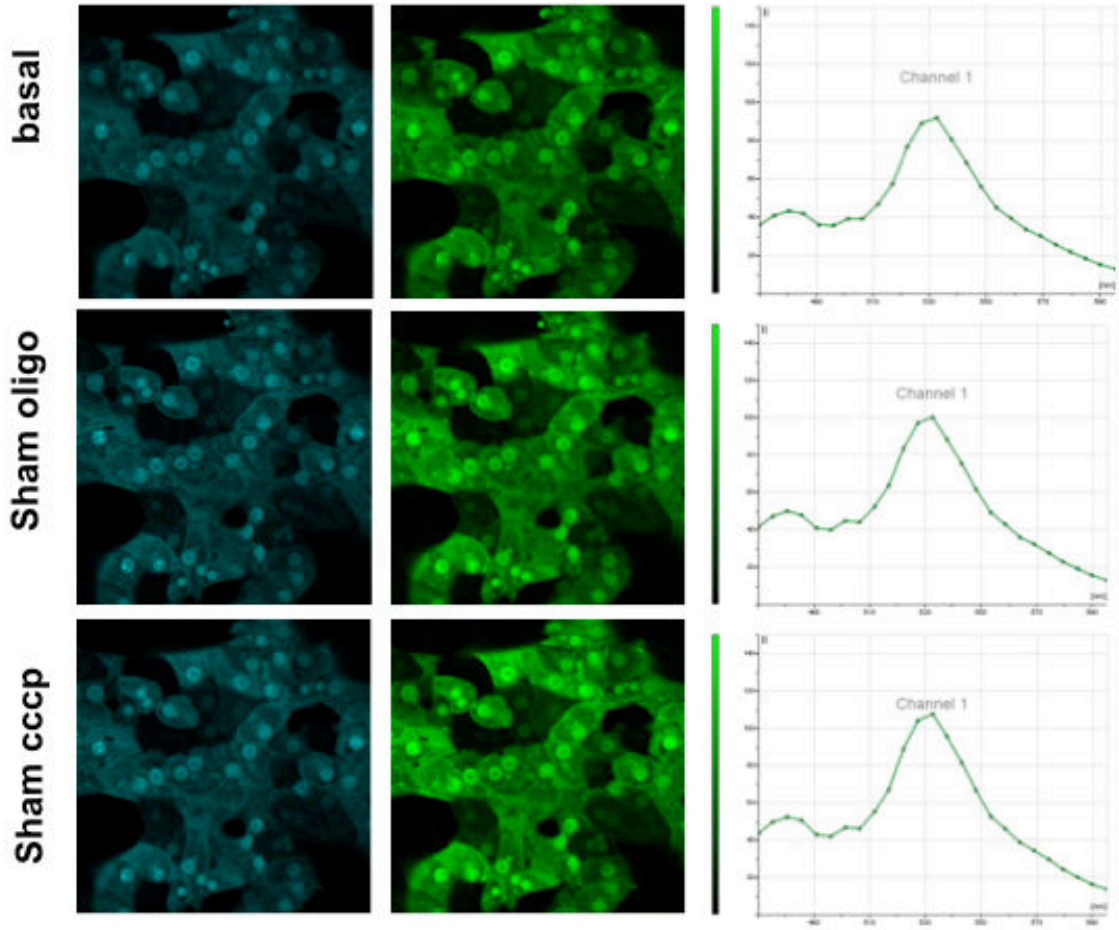


Figure 78 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET lors de l'expérience sham pendant 40 minutes sur des hépatocytes infectés 48h avec Ad-AMPKAR à 25 m.o.i. Barre d'échelle : 44µm

Effet de l'oligomycine

La figure 79 présente les images basales, après vingt minutes d'oligomycine puis après vingt minutes de CCCP avec leur spectre respectif. Là encore, dès l'image basale on se trouve en présence de FRET. Les modifications des signaux de fluorescence ne sont pas décelables par l'observateur sur les images ni les spectres. L'analyse des images est faite par quantification des intensités de fluorescence à chaque intervalle de temps pendant toute la durée de l'expérience permettant également d'obtenir le ratio YFP/CFP (Fig 80).

Ces graphes de quantification du suivi des intensités de fluorescence présentés dans la figure 80 révèlent une légère augmentation des signaux CFP et YFP, de façon un peu plus importante pour CFP que pour YFP. Cette augmentation est d'environ 20% pour la condition sham, et supérieure à 50% pour l'expérience en présence d'oligomycine. En ce qui concerne YFP, elle est équivalente pour les deux expériences.

Effet du CCCP

Immédiatement après ajout du CCCP, le signal du CFP décroît dès les premières minutes puis reste stable après avoir retrouvé un niveau équivalent à la situation basale. Le signal YFP n'est pas modifié, il reste au même niveau et stable jusqu'à la fin de la cinétique. Cela se traduit par une ré-augmentation du ratio YFP/CFP qui retrouve des valeurs équivalentes à la situation contrôle (sham).

Si les augmentations de signal observées dans les premières minutes après le premier changement de milieu (à la fois pour les conditions « sham » et « oligo ») correspondaient à un artéfact lié à une modification de focus due au changement de milieu, l'augmentation de l'intensité de fluorescence serait d'une part du même ordre pour les deux signaux d'une part pour les deux expériences, et d'autre part elle se produirait aussi lors du second changement de milieu (équivalent à l'ajout du CCCP). De plus, cette augmentation du signal CFP est ponctuelle et décroît progressivement dès deux à 3 minutes après le changement de milieu, alors que le signal YFP reste stable jusqu'à la fin de la cinétique.

Cette augmentation du signal CFP se traduit par une diminution du ratio YFP/CFP révélant une diminution du FRET, donc une diminution de l'activation de l'AMPK.

Or, en théorie, la présence de FRET avec le biosenseur Ad-AMPKAR est liée à un état d'activation de l'AMPK. L'inhibition de l'ATPsynthase par l'oligomycine entraîne une augmentation du rapport AMP/ATP et donc une activation de l'AMPK.

Comme pour Ad-ATeam, la localisation de l'expression de la fluorescence d'AMPKAR n'est pas exclusivement mitochondriale, mais plutôt cytoplasmique et majoritairement nucléaire en ce qui concerne les hépatocytes. L'hypothèse de la production d'ATP glycolytique est difficilement vérifiable applicable pour Ad-AMPKAR : même si l'inhibition de l'ATPsynthase par l'oligomycine au niveau mitochondrial serait compensée par un pic de production d'ATP glycolytique, cela ne se produit pas au niveau du noyau. Un contre-marquage du compartiment mitochondrial permettrait de faire une analyse plus fine au niveau des variations de signal au niveau mitochondrial.

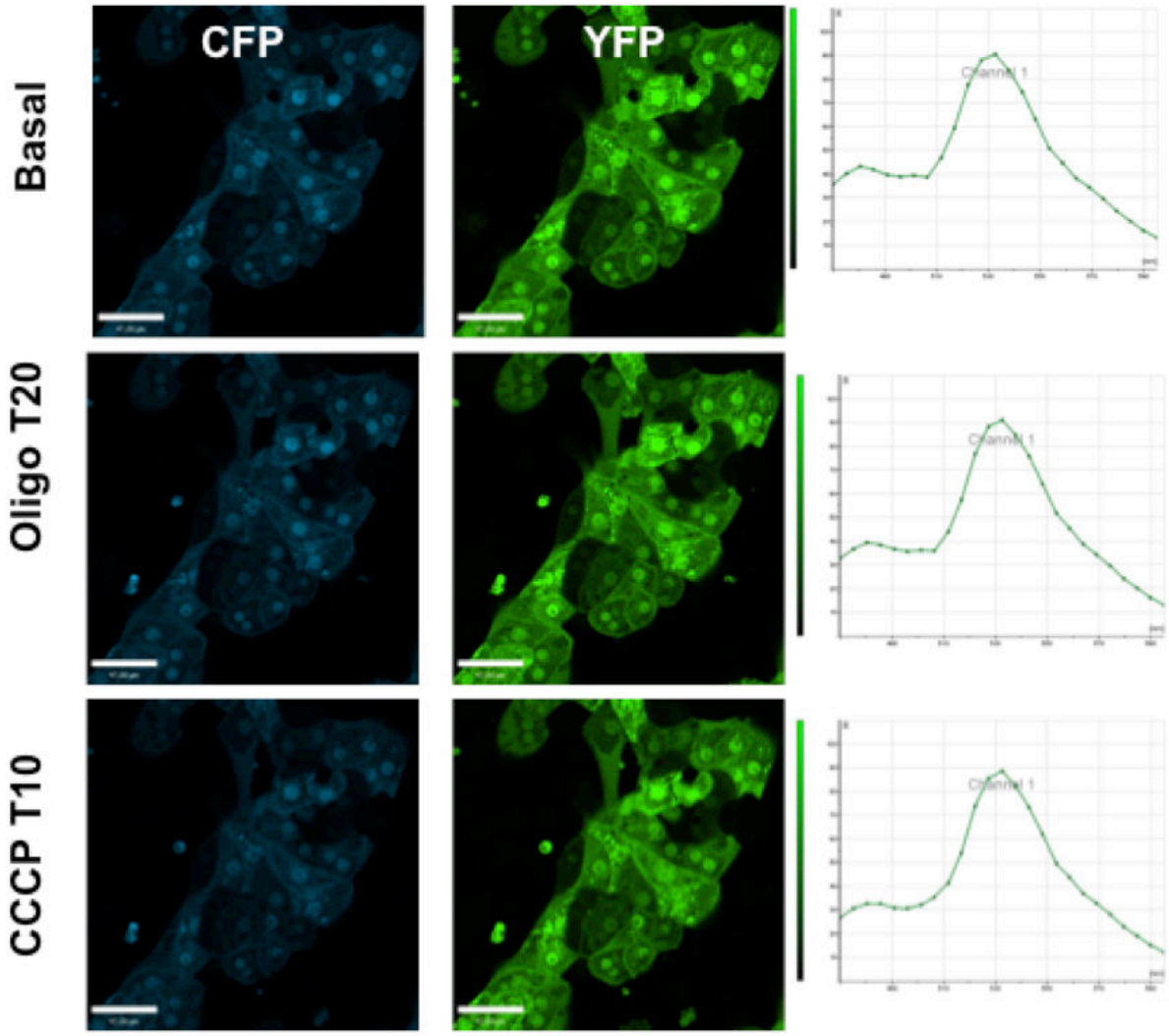


Figure 79: Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes infectés 48h avec Ad-AMPKAR à 25 m.o.i. Barre d'échelle : 44µm

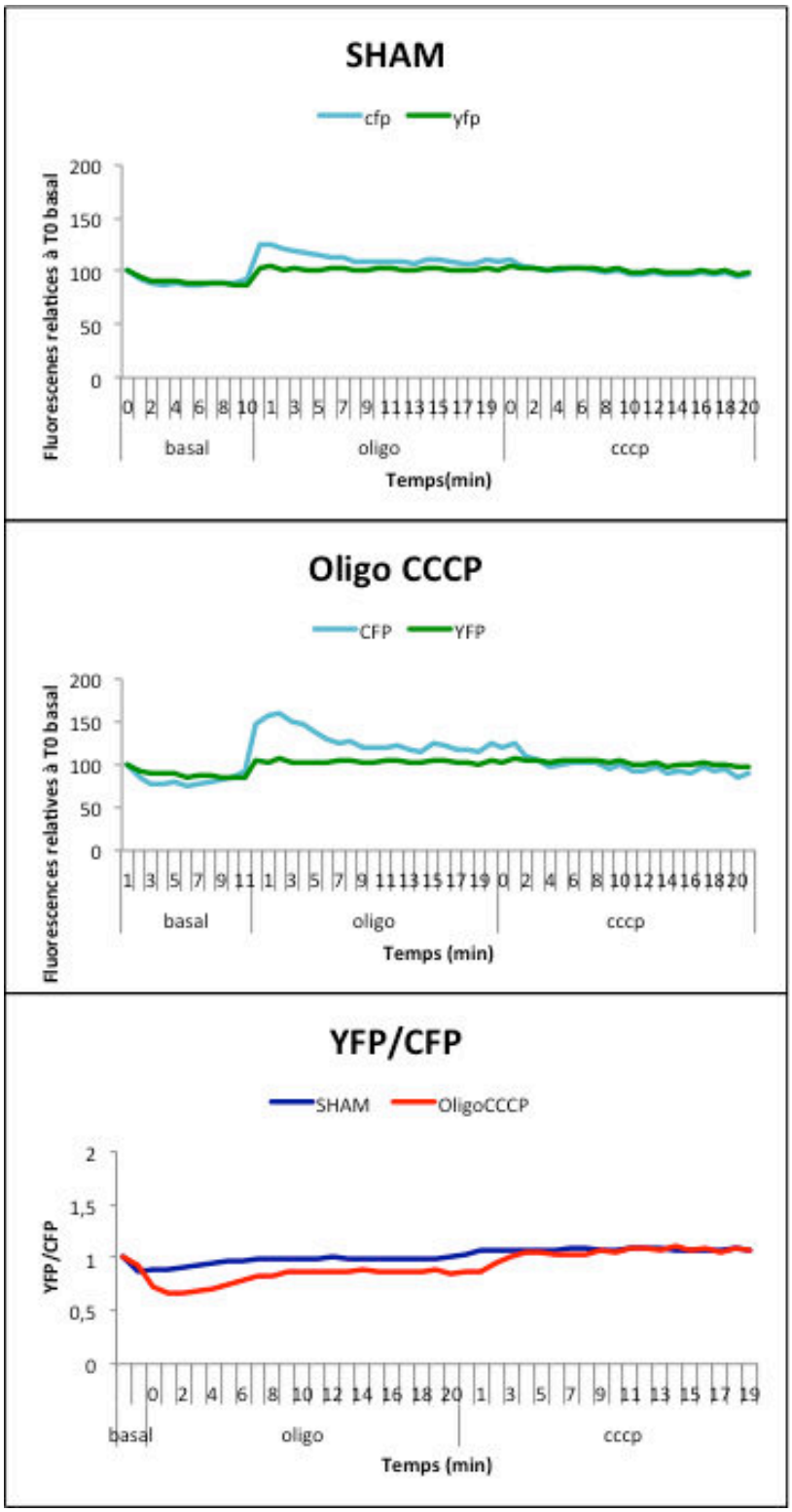


Figure 80 : Graphes de quantification des fluorescences CFP et YFP et du ratio YFP/CFP sous l'effet de 6µg/ml d'oligomycine pendant 20 minutes puis 50µM de CCCP pendant 20 minutes sur des hépatocytes infectés 48h avec Ad-AMPKAR à 25 m.o.i.

Ces résultats ne permettent pas de valider la spécificité de la réponse du biosenseur Ad-AMPKAR aux variations d'ATP liée à un stress d'inhibition de l'ATPsynthase suivi d'un découplage dans nos conditions expérimentales.

Après avoir réalisé les expériences précédentes de validation de l'utilisation des biosenseurs Ad-ATeam et Ad-AMPKAR, l'objectif suivant est d'évaluer l'utilisation de ces biosenseurs dans un contexte davantage physiologique de stress énergétique. Des expériences de privation de substrats et d'oxygène similaires à la 1ère partie de ce travail ont été réalisées sur des cellules infectées par les biosenseurs Ad-ATeam et Ad-AMPKAR.

4. Visualisation des effets de la carence en substrats énergétiques et en oxygène par Ad-ATeam

A partir des mises au point réalisées précédemment (§ 2. tests doses et tests de concentration), les expériences de privation de substrats en situation d'hypoxie ou d'anoxie ont été réalisées sur les cellules RT112 et sur les hépatocytes isolés et cultivés 48h.

4.1. **RT112**

Les cellules RT112 ont été cultivées sur des lamelles de verre puis infectées avec 25 m.o.i. d'Ad-ATeam pendant 48 heures. Les lamelles sont ensuite placées dans la chambre d'incubation du microscope. La procédure expérimentale de privation de substrats et d'oxygène est décrite dans la partie expérimentale (§4 p. 103). Les images ont été acquises toutes les dix minutes et une acquisition spectrale est réalisée à chaque changement de milieu.

Expérience « sham » (fig. 81)

Sur l'image basale, la totalité des cellules observées est fluorescente, ce qui valide l'efficacité de l'infection par l'adénovirus par rapport à la transfection par la lipofectamine. Cependant, il est important de constater que l'aspect des cellules n'est pas habituel : elles sont fortement regroupées en amas et peu nombreuses, ce qui montre qu'elles sont probablement en souffrance, ce qui peut induire un biais dans l'interprétation des résultats. La présence de fluorescence à la fois de CFP et d'YFP confirme la présence de l'adénovirus contenant le biosenseur dans les cellules. L'analyse spectrale révèle un pic correspondant à CFP très faible, et un pic correspondant à YFP plus élevé résultant à un ratio YFP/CFP de 2,31 traduisant déjà la présence de FRET lié à la présence d'ATP.

Le milieu a été remplacé par du milieu complet pendant une heure (« sham 60' »), puis la même opération est renouvelée pour une durée supplémentaire d'une heure (« sham 120' »).

En comparaison à l'image basale, les intensités de fluorescence de CFP et YFP sont plus élevées après une heure. A la fin de l'expérience (« sham 120 »), la fluorescence de YFP semble avoir légèrement diminué.

Ces variations d'intensité de fluorescence se traduisent par une variation des ratios YFP/CFP au cours du temps, alors qu'il n'y a pas eu de stress majeur dans cette expérience contrôle qui pourrait expliquer de telles variations de concentration d'ATP.

Les cellules semblent être en souffrance dès le début de l'expérience. Leur forme est plutôt arrondie, ce qui est souvent observé pour des cellules dont le processus de mort programmée est déclenché. Ces cellules sont alors moins adhérentes s'arrondissent et se rétractent. L'interprétation des variations d'intensité de fluorescence observées dans les deux canaux serait davantage en faveur de modification du focus au cours de l'expérience plutôt qu'une réelle variation de FRET.

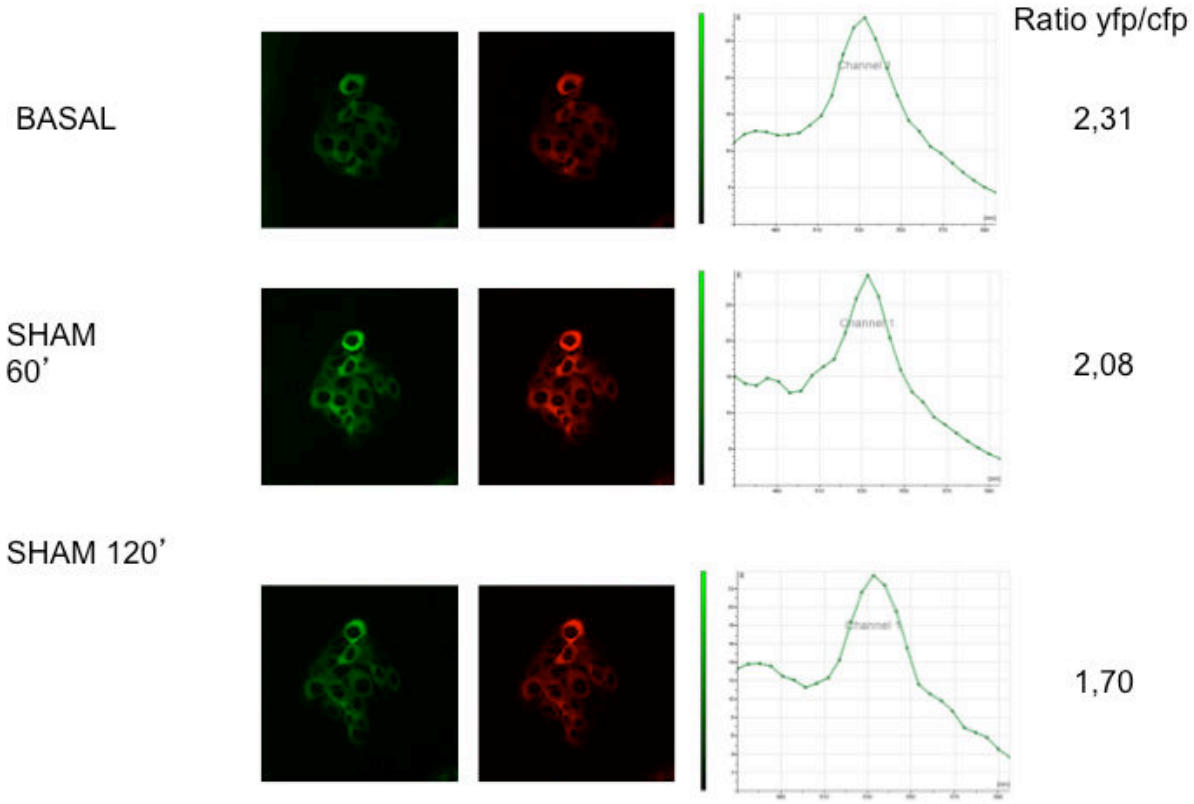


Figure 81 : Suivi des fluorescences CFP (fausse couleur verte) et YFP (fausse couleur rouge) et du FRET pendant 2h heures (=sham ischémie-reperfusion) de cellules RT112 infectées 48h par Ad-ATeam à 25 m.o.i. Barre d'échelle : 44µm

Expérience SS 3%O2» (fig. 82)

Comme pour l'expérience contrôle (« sham »), le phénomène de FRET est déjà présent en situation basale avec un ratio YFP/CFP de 1,83, révélant la présence d'ATP.

Le milieu complet a été remplacé par du milieu sans substrats et la concentration d'oxygène a été abaissée à 3% pendant une heure. Les images ont été acquises toutes les dix minutes et une acquisition spectrale a été réalisée à chaque changement de milieu (en fin d'ischémie et en fin de reperfusion). Les images présentées dans la figure 82 correspondent à 1 heure d'hypoxie puis 1 heure de reperfusion.

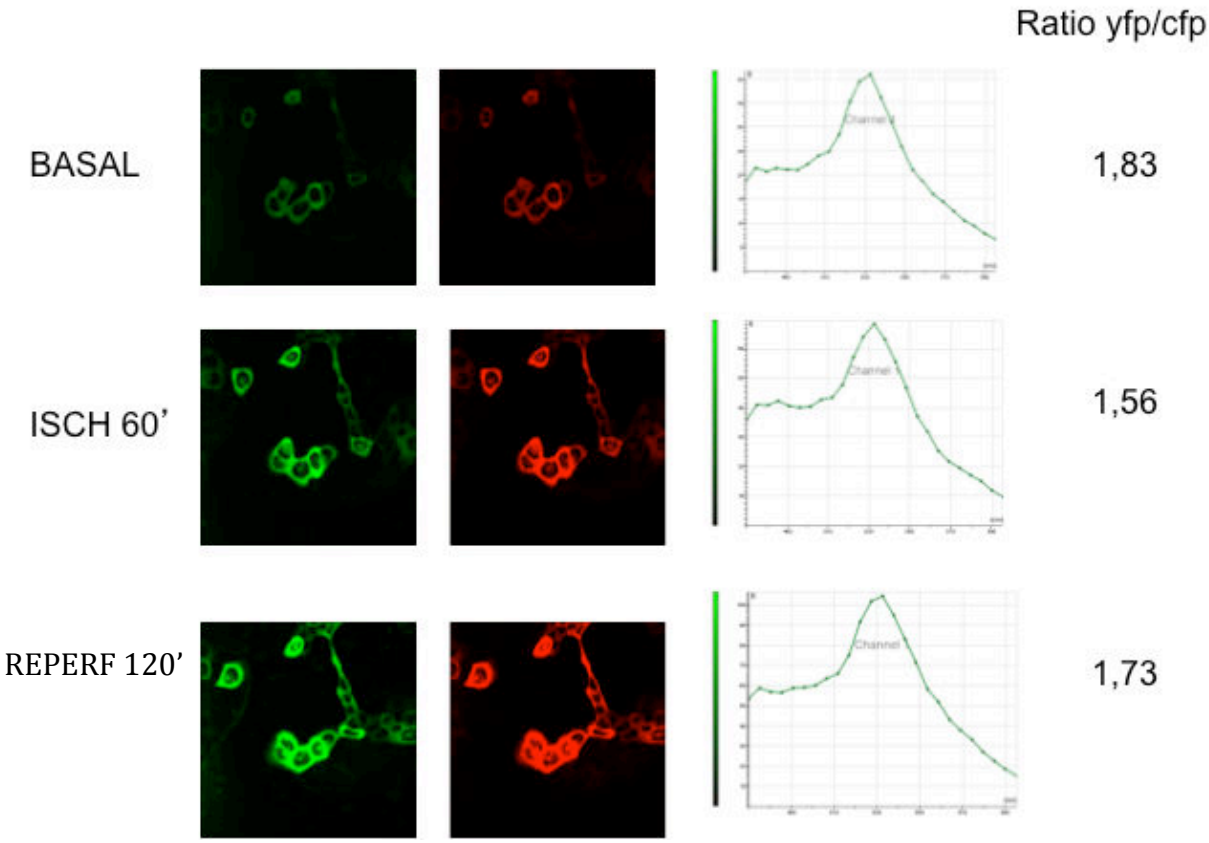
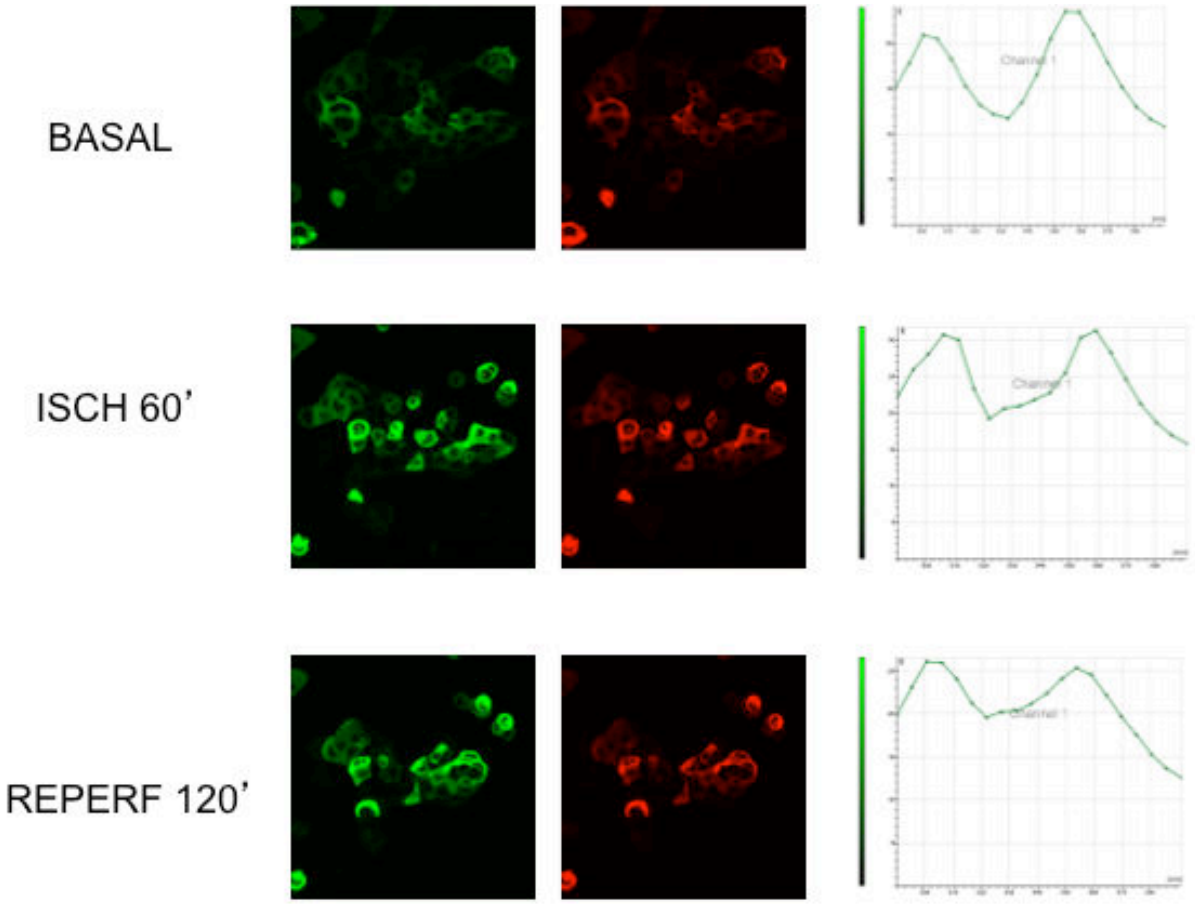


Figure 82 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET après 60 minutes d'ischémie (FiO2 3% en milieu sans substrat) puis 1 heure de reperfusion de cellules RT112 infectées 48h par Ad-ATeam à 25 m.o.i. Barre d'échelle : 44µm

Une augmentation des intensités de fluorescence est nettement observable à la fois pour le donneur et pour l'accepteur, au point d'atteindre une saturation des signaux à la fin de l'expérience. Une diminution du ratio YFP/CFP est constatée après une heure d'ischémie, puis la valeur de ce ratio augmente à nouveau après une heure de reperfusion.

L'interprétation de ces résultats est délicate : une telle augmentation de fluorescence ne peut être attribuée à des variations de focus, mais ressemble à un phénomène de photo-activation des sondes fluorescentes (liée à l'excitation par le laser), ce qui n'est pas décrit dans la littérature concernant ATeam. Ce phénomène est davantage important dans l'expérience d'ischémie-reperfusion que dans l'expérience sham. Certains biosenseurs sont sensibles aux variations de l'environnement comme le pH, l'osmolarité ou l'oxydation des sondes. Le pH du milieu sans substrats a été vérifié et est équivalent à celui du milieu complet. Le changement de concentration en oxygène a très probablement une influence sur le biosenseur ATeam dans ce type cellulaire.

La même expérience a été réalisée dans les mêmes conditions avec Ad-GO-ATeam-1, contrôle négatif de ATeam. L'allure des spectres obtenus confirme l'absence de FRET, dont valide également que les spectres observés précédemment avec Ad-ATeam correspondent à du FRET. Les figures 83 et 84 permettent de comparer les variations des ratios Accepteur/Donneur de façon relative au temps basal. Dans ce type cellulaire, cette courbe montre que dans nos conditions expérimentales, le biosenseur Ad-ATeam ne permet pas d'obtenir des résultats spécifiques des variations d'ATP au cours de ce type de stress, puisque les variations observées sont similaires à celles obtenues avec le contrôle négatif.



- **Figure 83** : Suivi des fluorescences de mKOκC11 (variant de GFP : pic max d'excitation à 470nm et pic d'émission à 510nm), et de cp173-mEGFP (excitation à 514nm et pic max d'émission 560nm) et du FRET après 60 minutes d'ischémie (FiO2 3% en milieu sans substrat) puis 1 heure de reperfusion de cellules RT112 infectées 48h par Ad-GO-ATeam-1 25 m.o.i. Barre d'échelle : 44µm

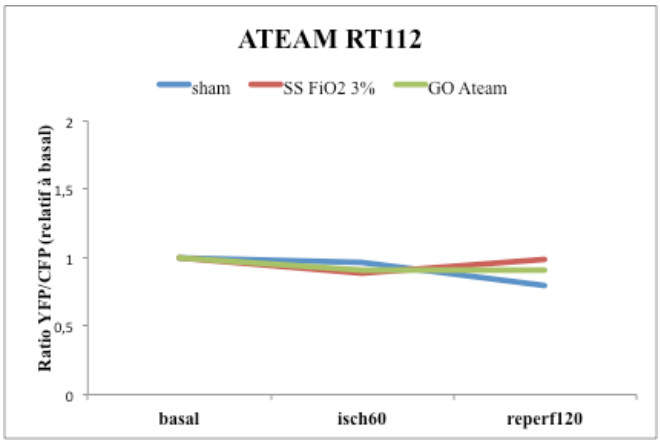


Figure 84 : Ratios Accepteur/Donneur au cours de l'expérience d'ischémie-reperfusion obtenus pour Ad-ATeam et comparés à Ad-GO-ATeam-1. Les ratios sont exprimés en fonction du ratio basal.

4.2. **Hépatocytes infectés pendant 48h**

Les hépatocytes isolés ont été cultivés sur des lamelles de verre puis infectées avec 25 m.o.i. d'ATEAM pendant 48 heures. Les lamelles sont ensuite placées dans la chambre d'incubation du microscope. La procédure expérimentale de privation de substrats et d'oxygène est décrite dans la partie expérimentale (§4 p103). Les images ont été acquises toutes les minutes pendant les dix premières minutes après le premier changement de milieu, puis toutes les dix minutes. Une acquisition spectrale est réalisée avant chaque changement de milieu, c'est-à-dire après l'image basale, en fin d'ischémie et en fin de reperfusion.

Expérience contrôle « sham »

La figure 85 présente les images correspondant aux temps basal, une heure et deux heures après les changements de milieu, remplacé par du milieu complet identique pour cette expérience « sham ».

L'image basale et son spectre correspondant montre déjà un spectre de FRET qui révèle la présence d'ATP, avec une localisation de la fluorescence dans l'ensemble du cytosol. Après une heure équivalente à l'ischémie, l'allure du spectre n'est pas modifiée. Une augmentation de l'intensité de fluorescence peut être observée pour les signaux du donneur et de l'accepteur, sans qu'il y ait modification de l'allure du spectre ou de la valeur de leur ratio.

Expérience SS 0% O_2

La figure 86 présente les images aux temps basal, une heure après l'anoxie et privation de substrats, une heure après la reperfusion, ainsi que les spectres associés. La présence d'ATP dans les hépatocytes est révélée par la présence de FRET dès l'image basale. Le suivi de la fluorescence minute par minute a permis de réaliser une courbe des ratios YFP/CFP au cours de toute la cinétique. Cette quantification permet de mettre en évidence une légère diminution du ratio YFP/CFP d'environ 6 à 7% à la cinquième minute d'anoxie de façon reproductible dans quatre expériences différentes. Ce ratio augmente de nouveau dès le début de la reperfusion et jusqu'à 20% en fin d'expérience.

La diminution du FRET lors de l'anoxie sans substrats confirme l'hypothèse émise lors de l'expérience d'inhibition par l'oligomycine : puisqu'il n'y a pas de substrats, en absence d'oxygène les cellules sont incapables de produire de l'ATP glycolytique pour compenser le blocage de la chaîne respiratoire, donc la production globale d'ATP diminue. L'augmentation

du FRET lors reperfusion en est une preuve supplémentaire puisque le fait d'apporter à nouveau des substrats et de l'oxygène induit une augmentation de concentration d'ATP encore plus importante.

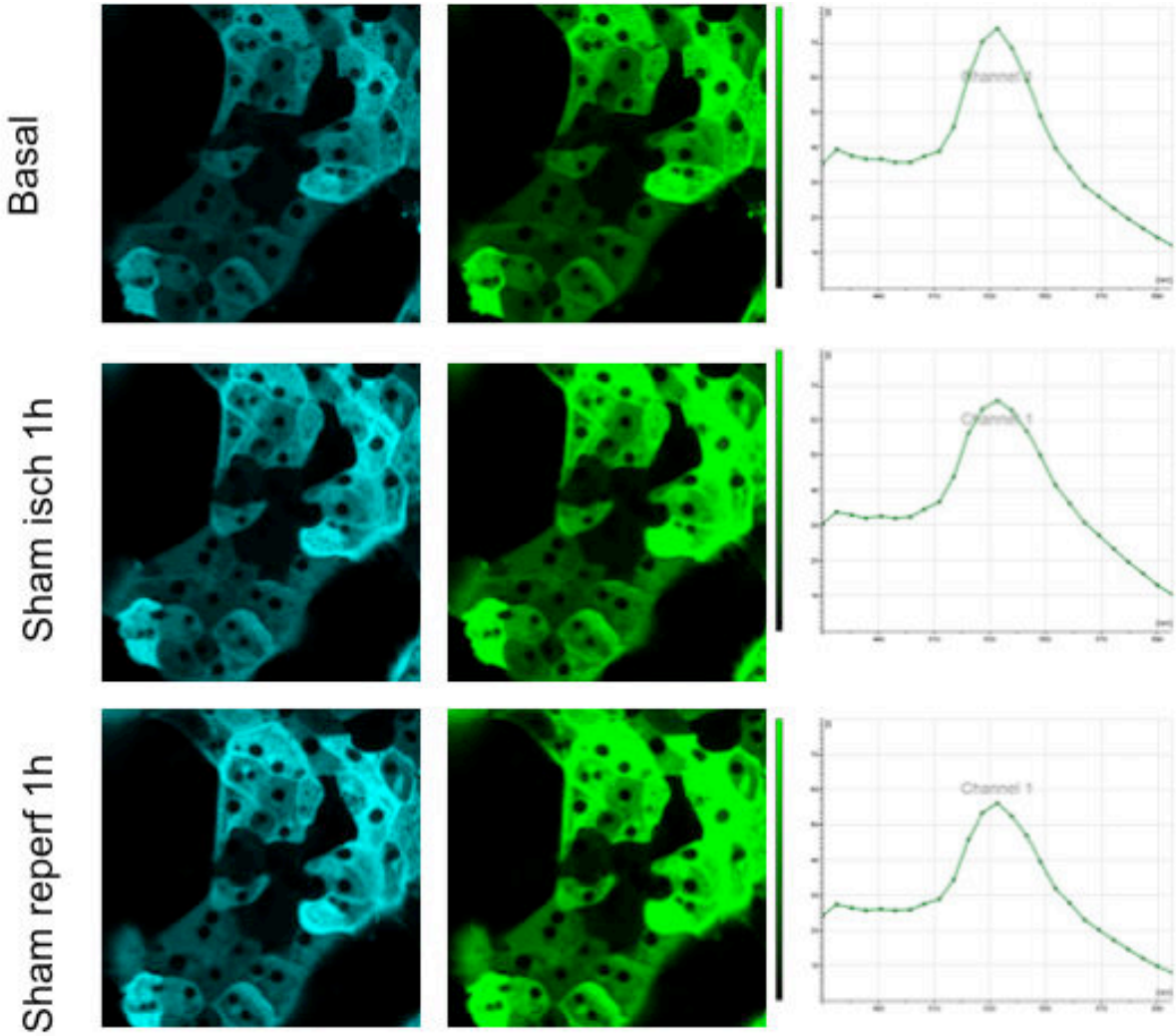


Figure 85 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 2h heures (=sham ischémie-reperfusion) des hépatocytes primaires infectées par Ad-ATeam à 25 m.o.i. pendant 48h. Barre d'échelle :44µm

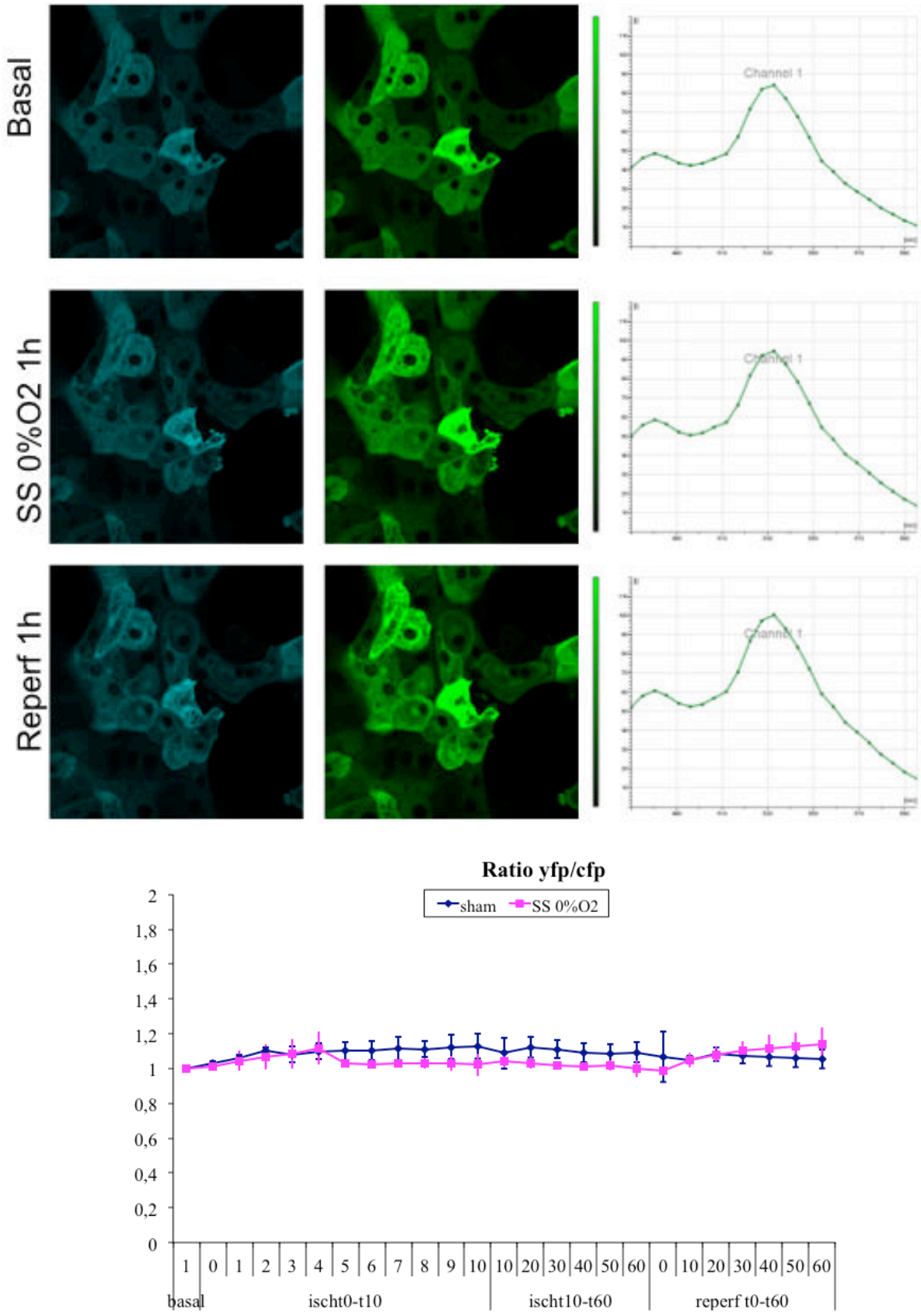


Figure 86 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 1 heure d'ischémie (SS O_2 0%) puis 1h de reperfusion des hépatocytes primaires infectées par Ad-ATeam 25 m.o.i. pendant 48h. Barre d'échelle : 44µm

5. Evaluation du rapport ATP/ADP par HPLC

Afin de vérifier si l'infection par l'adénovirus contenant le biosenseur ATeam peut influencer l'état énergétique des cellules et biaiser les résultats, le contenu en nucléotides adényliques a été déterminé par HPLC, dans des conditions expérimentales similaires à celles des expériences d'imagerie, sur des cellules infectées ou non.

5.1. Effets des inhibiteurs de la CRM

Les hépatocytes isolés infectés ou non par Ad-ATeam 25m.o.i. ont été cultivés pendant 48h dans des boîtes de pétri puis incubés en présence de 6µg/ml d'oligomycine pendant vingt minutes, suivies ou non d'une incubation avec 50µM de CCCP pendant vingt minutes. Pour la condition contrôle (sham), le geste de changement de milieux a été effectué chaque vingt minutes. Les incubations sont réalisées dans un incubateur contrôlé en température (37°C) et CO_2 (5%). Les cellules et leur surnageant ont ensuite été récupérées puis lysées à l'acide perchlorique-EDTA, neutralisées par une solution de KOMO puis analysées par HPLC (voir partie expérimentale §5).

La figure 87 présente les résultats exprimés en rapport ATP/ADP. L'oligomycine provoque une très forte baisse du ratio ATP/ADP. L'addition de CCCP après le traitement par l'oligomycine induit également une baisse de ce ratio.

Les résultats obtenus après infection des cellules par Ad-ATeam sont similaires à ceux obtenus avec les cellules non infectées : l'infection par l'adénovirus n'induit pas de biais expérimental ou de stress cellulaire qui pourraient influencer les dosages de nucléotides. Ces résultats suggèrent que l'infection par l'adénovirus contenant ATeam n'induit pas de modification de l'état énergétique des cellules infectées.

Toutefois, ces résultats sont contradictoires avec les quantifications obtenues lors des expériences d'imagerie précédentes : alors que les expériences d'imagerie montraient une augmentation du ratio de FRET d'environ 25%, interprété comme une production d'ATP glycolytique par les cellules, le présent dosage des nucléotides indique une baisse du ratio ATP/ADP d'environ 80%. Bien que les deux approches sont réalisées avec des cellules vivantes, l'expérience d'imagerie est réalisée sur un champ donné et dont les changements de milieu ont permis de supprimer les cellules mortes éventuellement présentes dans le surnageant. Les cellules observées peuvent donc être considérées comme sélectionnées parmi les moins stressées. Sur la base de ces observations, il est difficile de valider

l'utilisation du biosenseur Ad-ATeam comme outil de quantification de la présence d'ATP au sein de la cellule.

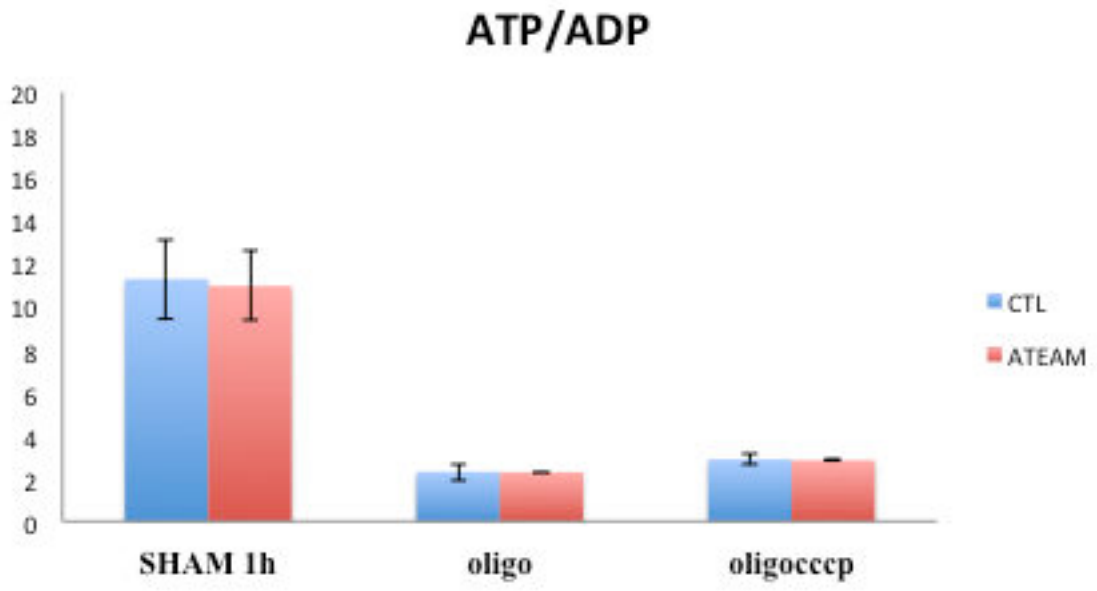


Figure 87 : Effets des inhibiteurs de la CRM sur le rapport ATP/ADP mesuré par HPLC (moyennes de 3 expériences réalisées en duplicas). Les histogrammes en bleu correspondent aux cellules non infectées (contrôles). Les histogrammes en rouge correspondent aux cellules infectées par Ad-Ateam. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.

5.2. Effets de la carence en substrats énergétiques et en oxygène par dosage ATP/ADP

Les hépatocytes isolés infectés ou non par ATEAM 25m.o.i. ont été cultivés pendant 48h dans des boîtes de pétri puis les expériences d'anoxie et de privation de substrats ont été réalisées à l'aide d'une cloche à hypoxie placée dans l'incubateur (voir matériel et méthodes §5.1.).

Les cellules et leur surnageant ont été récoltées après 6 minutes puis 1 heure d'ischémie (c'est-à-dire SS 0% O_2), puis 1 heure de reperfusion. Pour les cellules contrôles (« sham »), les milieux ont été changés et remplacés par du milieu complet aux mêmes intervalles de temps. La figure 88 présente les résultats des dosages des nucléotides adényliques représentés sous forme de ratio ATP/ADP.

Lors de l'expérience « sham », aucune différence de ratio ATP/ADP n'apparaît au cours de cette expérience contrôle. Les différences observées entre les cellules contrôles et les cellules infectées ne sont pas significatives.

Après 6 minutes d'anoxie en milieu sans substrats, le ratio ATP/ADP est abaissé d'environ 20 à 30% par rapport aux valeurs de référence obtenue lors de la condition « sham »pour les celles normales et pour les cellules infectées.

Après 1 heure d'ischémie puis 1 heure de reperfusion, le ratio ATP/ADP est comparables aux valeurs obtenues dans la condition « sham ».

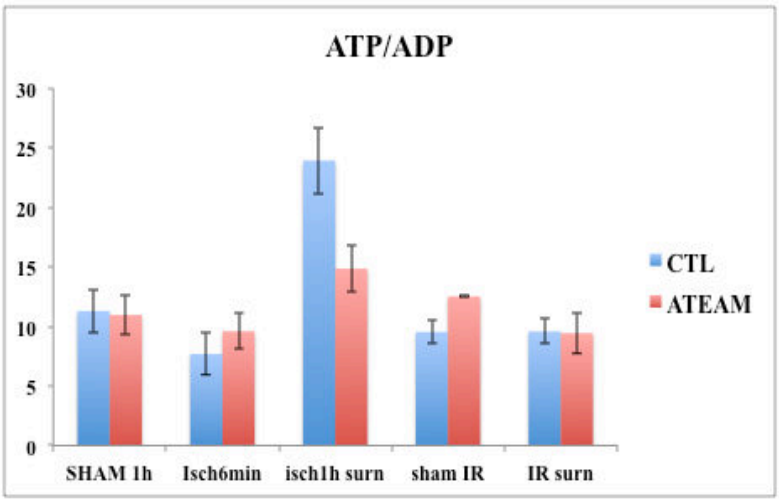


Figure 88 : Effets de la carence en substrats énergétiques et en oxygène par dosage ATP/ADP (moyennes de 3 expériences réalisées en duplicas). Les histogrammes en bleu correspondent aux cellules non infectées (contrôles). Les histogrammes en rouge correspondent aux cellules infectées par Ad-Ateam. Les barres d'erreurs correspondent aux écart-types.(Isch=ischémie. Surn=surnageants+cellules)

Ces résultats suggèrent que l'infection par l'adénovirus contenant Ad-ATeam n'induit pas de modification de l'état énergétique des cellules infectées d'une part, et que les variations éventuelles de concentration d'ATP sont probablement trop faibles pour être détectées.

6. Visualisation des effets de la carence en substrats énergétiques et en oxygène par AMPKAR sur les hépatocytes de 48h

Les hépatocytes isolés ont été cultivés sur des lamelles de verre puis infectées avec 25 m.o.i. d'Ad-AMPKAR pendant 48 heures. Les lamelles sont ensuite placées dans la chambre d'incubation du microscope. La procédure expérimentale de privation de substrats et d'oxygène est décrite dans la partie expérimentale (§4 p103). Les images ont été acquises toutes les minutes pendant les dix premières minutes après le premier changement de milieu, puis toutes les dix minutes. Une acquisition spectrale est réalisée avant chaque changement de milieu, c'est-à-dire après l'image basale, en fin d'ischémie et en fin de reperfusion.

Expérience contrôle « sham »

La figure 89 présente les images correspondant aux temps basal, une heure et deux heures après les changements de milieu, remplacé par du milieu complet identique pour cette expérience « sham ».

L'image basale et son spectre correspondant montre un spectre de FRET mais avec des intensités de fluorescence assez faibles dans les deux canaux. Ce FRET révèle déjà une activation de l'AMPK, visible particulièrement au niveau nucléaire et membranaire. Une augmentation de l'intensité de fluorescence peut être observée pour les signaux du donneur et de l'accepteur, déjà durant l'ischémie et se poursuivant pendant la reperfusion. Cela se traduit par une augmentation légère et régulière du ratio tout au long de la cinétique de l'expérience (fig.91). Sans induire de stress particulier au cours de cette expérience, l'augmentation de fluorescence observée n'est sans doute pas spécifique d'une activation d'AMPK .

Expérience SS 0% O2

Les images et les spectres correspondant à l'expérience de privation de substrats et d'oxygène sont présentés dans la figure 90. Dès la première image, on retrouve un spectre de FRET indiquant une activation de l'AMPK.

Grâce à la courbe de quantification des fluorescences respectives de CFP et YFP ratio de FRET YFP/CFP (fig.91), deux pics d'augmentation du ratio YFP/CFP sont observables dans les cinq premières minutes de l'ischémie, puis à nouveau dans les cinq premières minutes de la reperfusion. Entre ces pics, le ratio diminue à nouveau. Ces pics correspondent bien à une

augmentation de la fluorescence de YFP parallèle à une baisse de celle de CFP, ce qui correspond bien à un phénomène de FRET.

Ce phénomène n'est pas observé dans l'expérience contrôle (« sham »), suggérant qu'il y a une activation de l'AMPK en début d'ischémie et en début de reperfusion.

De plus, le pic d'activation d'AMPK à l'ischémie est observé dans le même intervalle de temps que la baisse d'ATP révélée lors de l'expérience similaire avec Ad-ATeam.

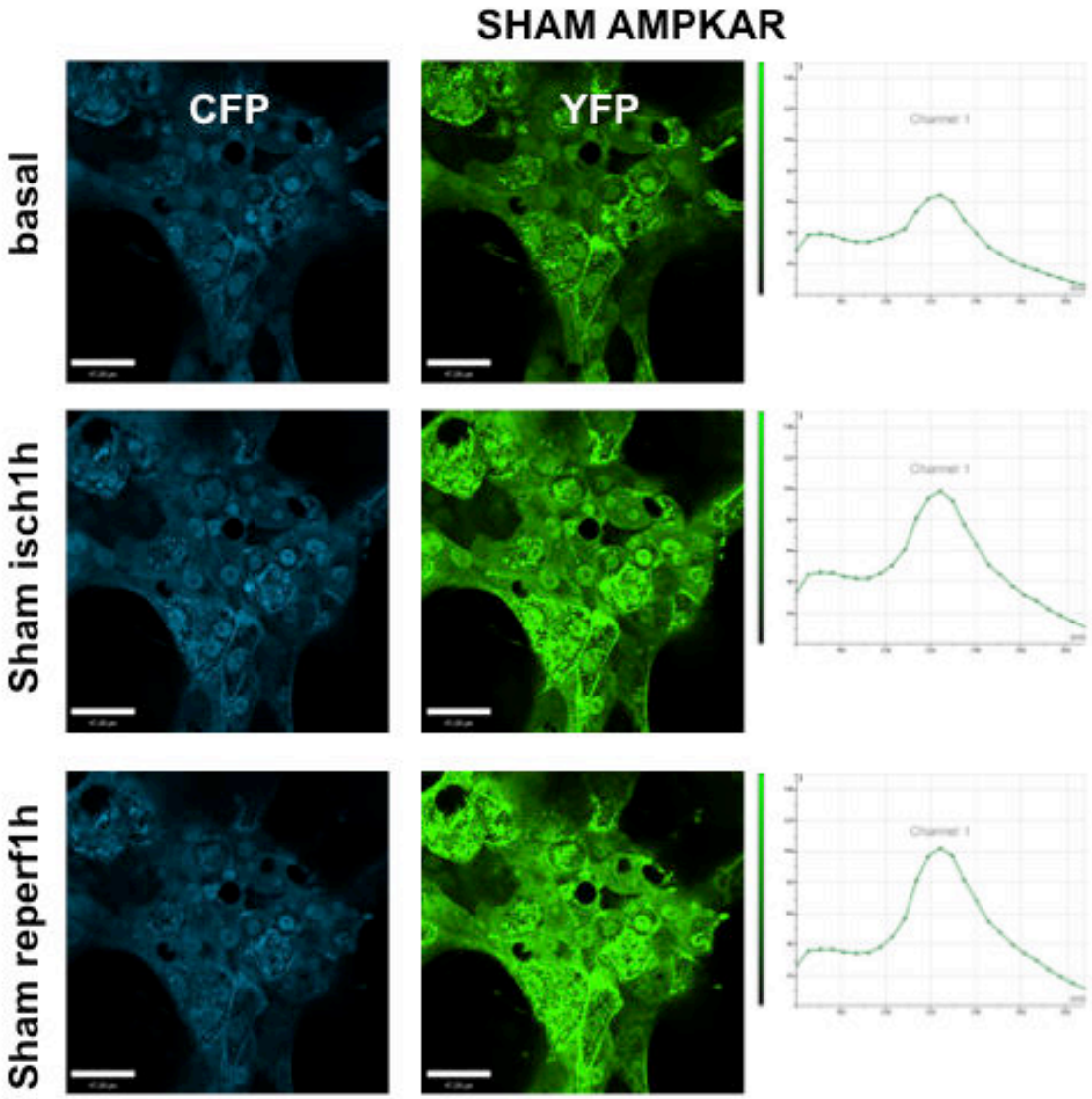


Figure 89 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET pendant 2h heures (=sham ischémie-reperfusion) des hépatocytes primaires infectés 48h par Ad-AMPKAR à 25 m.o.i. Barre d'échelle : 44µm

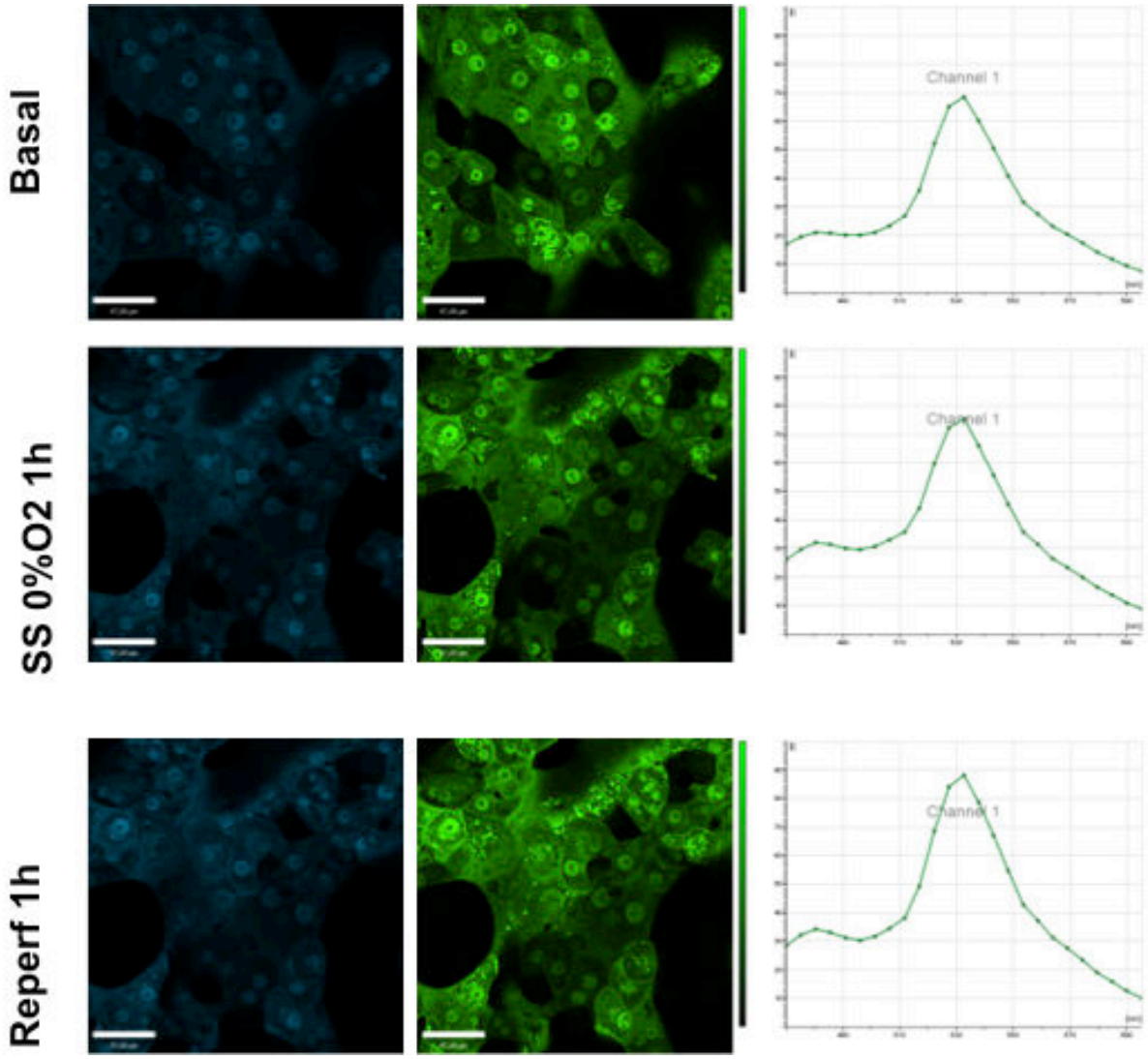


Figure 90 : Suivi des fluorescences CFP et YFP et du FRET après 60 minutes d'ischémie (SS 0%O_2) puis 1 heure de reperfusion des hépatocytes primaires infectés par Ad-AMPKAR à 25 m.o.i. pendant 48h. Barre d'échelle : 44µm

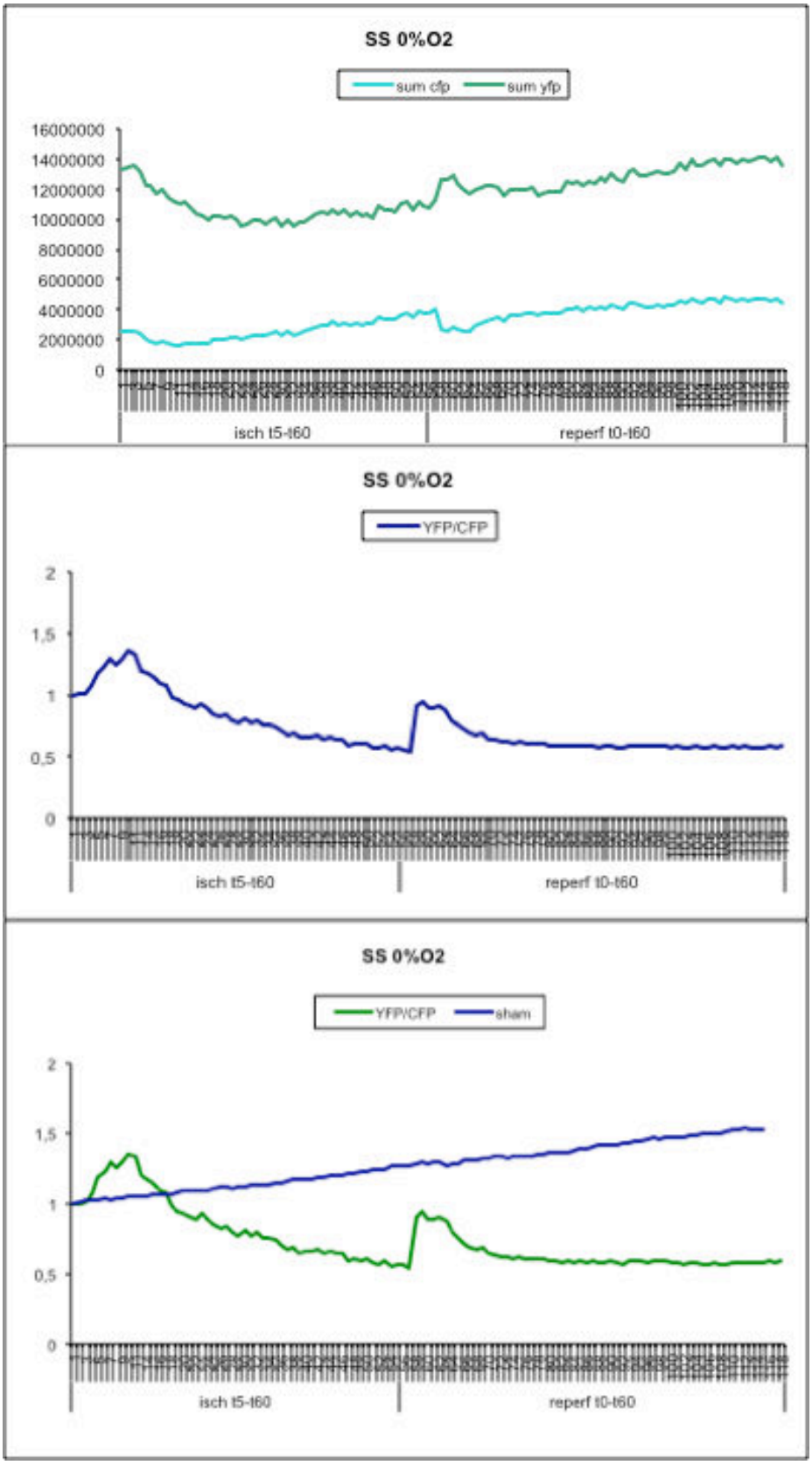


Figure 91 : Graphes de quantification des fluorescences CFP et YFP et du ratio YFP/CFP pendant 1 heure d'ischémie (SSO2 0%) puis 1h de reperfusion, comparés aux contrôles (sham) des hépatocytes primaires infectés par Ad-AMPKAR à 25 m.o.i. pendant 48h.

CONCLUSION BILAN DE LA 2ème PARTIE

L'approche méthodologique présentée dans cette partie consiste à visualiser et quantifier les variations de concentration d'ATP au cours de différents stress métaboliques.
Ces variations sont évaluées soit de manière directe grâce au biosenseur ATeam développé pour mesurer des concentrations d'ATP dans la cellule de l'ordre du millimolaire, soit de manière indirecte en utilisant le biosenseur AMPKAR dont la réponse dépend de l'état d'activation de la protéine AMPK, donc du rapport AMP/ATP.

Comme pour la 1ère partie de ce travail, la quantification des images apporte réellement des informations complémentaires aux images. En effet, c'est cette quantification précise effectuée sur toute la cinétique des expériences qui permet de révéler des variations de fluorescence que l'œil de l'observateur ne peut déceler.

Les résultats obtenus dans ce travail avec les biosenseurs ATeam et AMPKAR, intégrés ou non dans des adénoviru,s doivent être considérés comme des résultats préliminaires qui doivent permettre de poursuivre des expériences d'optimisation sur la base du bilan suivant :

1/ Les conditions optimales de transfection classique par lipofectamine n'ont pas été obtenues. L'intégration des biosenseurs dans des adénovirus a permis d'améliorer le rendement de cellules fluorescentes ayant intégré les biosenseurs.

2/ Si une meilleure efficacité d'infection est observée après 48h, les tests de concentrations d'adénovirus devraient être effectués pour chaque type cellulaire et adaptée en fonction de chaque biosenseur. La concentration de 25m.o.i a été retenue pour tous les biosenseurs testés : ATEAM, GO-ATeam-1 et AMPKAR. Bien que cette concentration n'a pas été testée à 48h, elle apparaissait comme un compromis entre 20 et 30m.o.i pour l'ensemble de ces biosenseurs.
Cependant, les résultats obtenus dans les diverses expériences révèlent que cette concentration est probablement un peu biaisant l'efficacité de FRET pour ATeam (d'où un effet peut-être sous-estimé de l'oligomycine), et que l'AMPK est déjà activée dans des cellules contrôles, suggérant que l'infection par l'adénovirus serait déjà en soi un stress métabolique (constaté nettement pour les cellules RT112).

3/ Les tests d'inhibition à l'oligomycine et au découplage par CCCP effectués sur les hépatocytes ont permis de valider l'utilisation de ces biosenseurs pour évaluer les variations d'ATP et ont permis de confirmer l'hypothèse de production d'ATP glycolytique par les cellules lorsque l'ATP mitochondrial n'est plus disponible.
Cependant, le nombre d'expériences avec AMPKAR doit être amplifié pour confirmer la reproductibilité des résultats.

4/ Les expériences de privations d'oxygène et de substrats réalisées avec ATEAM ont révélé une baisse d'ATP lors de la période de privation, ce qui valide l'hypothèse précédente en confirmant qu'en absence de substrats et d'oxygène, la cellule est incapable de produire de l'ATP à partir de la glycolyse puisque celle-ci, par définition, ne peut pas fonctionner sans glucose. La même observation a été faite avec AMPKAR mais là encore le nombre d'expérience doit être amplifié pour confirmer la reproductibilité des résultats.

A partir de ces observations, plusieurs pistes de travaux complémentaires peuvent être suggérées :
1/ reproduire les tests de doses d'adénovirus et ajuster la bonne concentration en fonction du type cellulaire et du type de biosenseur
2/ effectuer parallèlement des tests de viabilité pour certifier l'absence de l'impact de l'infection sur l'intégrité cellulaire
3/ évaluer par Western Blot l'activité de la protéine AMPK sur des cellules infectées par l'adénovirus en comparaison de cellules saines afin de certifier l'absence d'activation de l'AMPK induite par l'infection.

En conclusion, de nombreux tests de validation doivent être effectués avant de valider l'utilisation des biosenseurs ATeam et AMPKAR comme des outils adaptés à la visualisation et à la quantification des variations de consommation d'ATP au cours d'un stress métaboliques. Dans l'état actuel des données disponibles, ces outils ne sont pas utilisables « clé-en-main » contrairement à ce à quoi on aurait pu s'attendre.

DISCUSSION

DISCUSSION GENERALE

L'ensemble des réactions cataboliques et anaboliques constitue le métabolisme d'un organisme vivant. Le premier principe de la thermodynamique stipule que l'énergie reste constante, ce qui implique qu'au cours de toute réaction physique ou chimique, l'énergie est convertie d'une forme en une autre. La bioénergétique s'appuie sur ces principes de thermodynamique puisqu'elle concerne les transformations d'énergie par les êtres vivants.
A l'échelle de la cellule, on peut considérer qu'il y a trois types de forces qui régissent l'équilibre thermodynamique :

- le potentiel redox : NAD(P)H/NAD(P) et $FADH_2$/FAD
- le potentiel membranaire mitochondrial : $\Delta\Psi$ et ΔpH
- le potentiel phosphate : [ATP]/[ADP]x[Pi]

Un flux continu d'électrons entre les métabolites et le dioxygène fournit l'énergie nécessaire à la vie au travers des réactions d'oxydo-réduction. Ce flux d'électrons se produit principalement au sein de la mitochondrie où se produit également une transition de perméabilité au travers du PTP. Cet organite est donc au cœur de la bioénergétique puisque son rôle consiste à récupérer l'énergie fournie par la dégradation des nutriments pour produire de l'ATP.

Il existe de nombreuses méthodes et outils pour mesurer les différents paramètres de la fonction mitochondriale (voir introduction et (Dedkova and Blatter 2012) .
L'objectif de ce travail était de développer une méthodologie basée sur l'imagerie et adaptée à l'étude du métabolisme de cellules vivantes en évaluant les paramètres suivants (fig. 92) :

- l'autofluorescence de NADH
- le potentiel membranaire mitochondrial $\Delta\Psi$ par l'utilisation du TMRM
- d'évaluer la transition de perméabilité mitochondriale en visualisant l'ouverture du PTP
- de visualiser la présence d'ATP et de visualiser ses variations de concentration intracellulaire grâce aux biosenseurs

Les autres paramètres déterminant le fonctionnement de la chaîne respiratoire n'ont pas tous été exploités :

- le FAD génère également une autofluorescence, mais dans la même gamme spectrale que le Mitotracker Green, donc ce paramètre n'a pas été utilisé.

- Le ΔpH n'a pas été mesuré
- L'ADP et le phosphate inorganique Pi par manque de sonde fluorescente disponible
- L'AMP se présente plutôt comme un senseur précoce qui anticipe les modifications mais qui n'a pas réellement de rôle métabolique.
- La production de ROS n'a pas été abordée dans ce travail.

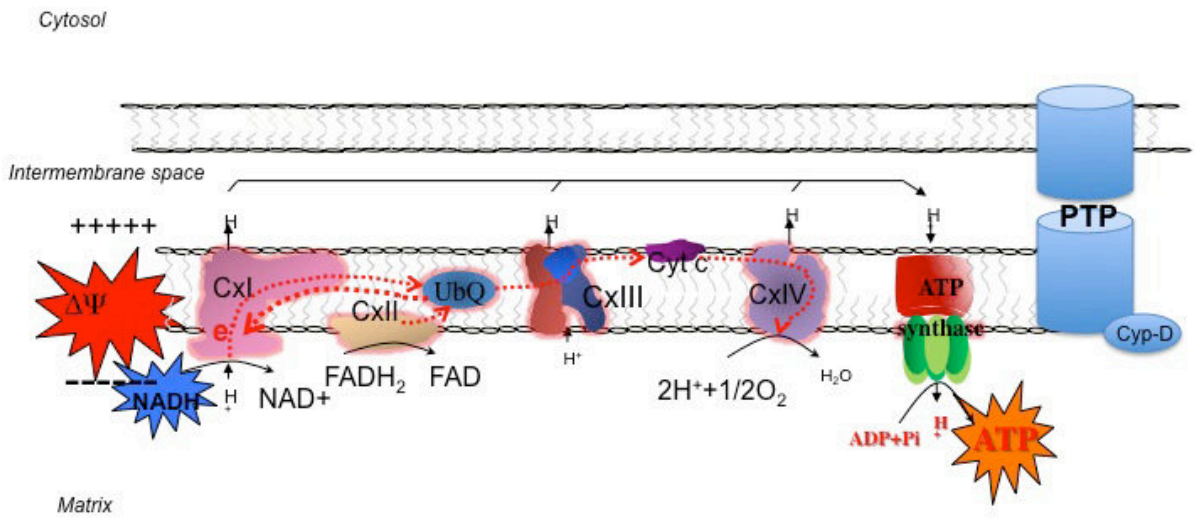


Figure 92 : représentation schématique des paramètres visualisés par imagerie dans la présente méthodologie (mis en évidence par les étoiles colorées)

L'approche méthodologique mise au point a été appliquée à l'étude des effets d'un stress métabolique de type ischémie-reperfusion, en s'intéressant aux conséquences de la privation de substrats associée ou non à une privation partielle (hypoxie) ou totale (anoxie) d'oxygène sur l'état énergétique de différents types cellulaires.

Les résultats issus de ces travaux sont discutés en reprenant l'organisation des différentes parties.

1/ L'approche d'analyse d'images par la méthode du chapeau haut-de-forme

Les données de la littérature basée sur l'utilisation de l'imagerie de la mitochondrie se développent depuis une dizaine d'années environ et sont actuellement de plus en plus exploitées.). L'équipe de Koopman (Koopman, Visch et al. 2005) a développé une approche de l'étude du réseau mitochondrial par analyse d'images, et stipule que la méthode du

chapeau haut-de-forme est la mieux adaptée. Bien qu'ayant récemment évolué vers une méthodologie basée sur un filtrage par la Transformée de Fourier, impliquant pourtant des notions mathématiques plus complexes, la plupart des auteurs se sont inspirés des travaux de 2005 en utilisant le chapeau-haut-de-forme.

Cette méthode de filtrage permet la reconnaissance du compartiment ou du réseau mitochondrial. L'extraction des mesures qui s'en suit dépend principalement des paramètres que l'on souhaite étudier. Il existe un lien entre les facteurs bioénergétiques et la dynamique mitochondriale, de nombreux travaux concernent davantage l'étude de cette dynamique mitochondriale au travers de l'exploration des phénomènes de fusion/fission, avec des approches d'analyse d'images qui sont plus ou moins détaillées, basée sur des méthodes de seuillage conventionnelles ou des filtres de type Laplacien ou encore des déconvolutions et des options spécifiques disponibles dans certains.

La morphologie et le comportement dynamique des mitochondries varient selon les types cellulaires puisque les protéines qui régulent cette dynamique sont spécifiques du type cellulaire. Ils ont également mis en évidence que l'activité de fusion/fission peut être modifiée par une altération de la quantité d'ATP et des cascades de signalisation. Dans plusieurs types cellulaires, une dépolarisation mitochondriale et un faible taux d'ATP associés à une production élevée de ROS sont suffisants pour initier la fission. La présence de sérum permettant d'augmenter la concentration d'ATP glycolytique accroît la probabilité de fusion. Ils concluent pour que le potentiel membranaire mitochondrial, l'ATP glycolytique et mitochondrial des cellules endothéliales sont nécessaires au maintien de la balance entre fusion et fission du réseau mitochondrial, ce qui permet d'affirmer que ces cellules endothéliales sont de type glycolytique. En revanche, les cellules HUVEC conservent leur organisation filamenteuse de leur réseau mitochondrial alors que leur glycolyse est inhibée, montrant que la réponse à un même stress métabolique est variable d'un type cellulaire à un autre.

L'ensemble de ces données de la littérature confortent notre approche d'analyse par chapeau-haut-de-forme pour l'analyse du compartiment mitochondrial.

De plus, parallèlement au travail présenté dans ce manuscrit, j'ai pu également associer cette méthode de reconnaissance du compartiment mitochondrial à un programme d'extraction de mesures liées à l'organisation du réseau mitochondrial par une approche de quantification de paramètres liés au « squelette » de ce réseau. Certains résultats obtenus ont été validés par des publications (Li, Lamarche et al. 2014) et cette approche est actuellement approfondie et utilisée dans divers projets en cours de réalisation (thèse de C. Desbourdes, projet Cadmidia).

Toutefois, si notre approche méthodologique est adaptée à l'étude de la fonction mitochondriale, le programme tel que je l'ai développé mériterait d'évoluer vers une version améliorée qui permettrait de gagner en temps d'efficacité et d'analyse. Pour cela, la découverte du logiciel Icy pourrait apporter cette amélioration. Ce logiciel a été développé par l'Unité d'Analyse Quantitative d'Image de l'Insitut Pasteur, (http://www.bioimageanalysis.org/) « open source », téléchargeable et gratuit. Icy fonctionne sur la base de régions d'intérêt déterminées à partir de la segmentation, qui sont ré-appliquées à l'image d'origine pour en extraire les structures d'intérêt et leurs mesures quantitatives. L'étape des « masques binaires » d'ImageJ ne sont pas nécessaires dans le protocole Icy. On retrouve les mêmes fonctions, avec un lien vers ImageJ qui est intégré dans Icy. Dans le langage Icy, une « macro » est la même chose qu'un « protocole ». D'ores et déjà, j'ai tenté d'établir un protocole dans Icy équivalent au programme que j'ai développé dans ImageJ à partir de macros. La figure 93 présente l'exemple de protocole tel qu'il est établit dans Icy pour l'analyse du TMRM. L'avantage de ce logiciel, une fois le protocole établit, repose simplement sur la sélection de la séquence à analyser, un « clic » sur le bouton « run » et on obtient directement un tableau de valeurs en format Excel. Le protocole pour l'analyse du NADH est également prêt. Il me reste à bâtir un protocole global regroupant ces 2 paramètres. Il sera ensuite intéressant de comparer les résultats obtenus par ces deux méthodes : ImageJ+Volocity, et Icy.

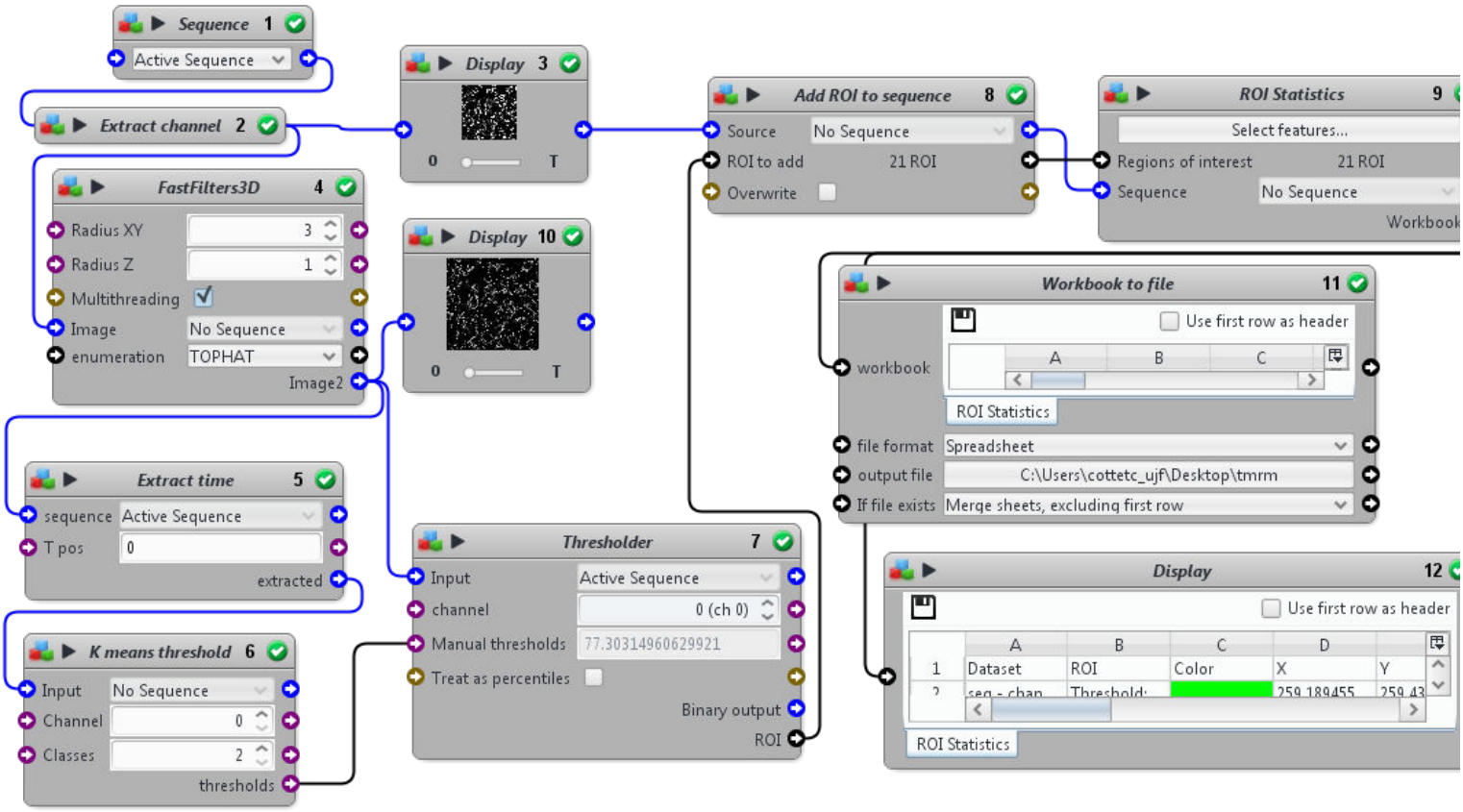


Figure 93 : Organisation du protocole Icy pour la quantification du signal TMRM

2/ Visualisation et quantification de la fonction mitochondriale

Notre méthode basée sur le suivi des variations de fluorescence du TMRM parallèlement à celle de l'autofluorescence du NADH constitue un outil unique pour mesurer simultanément l'état redox cellulaire et l'ouverture du PTP. En effet, la fluorescence du TMRM est spécifiquement liée aux variations de $\Delta\Psi$, alors que l'autofluorescence du NADH reflète la quantité de NADH au sein de la mitochondrie et l'intensité de ce signal dépend de l'état d'oxydo-réduction liée au fonctionnement de la chaîne respiratoire. L'analyse des variations de ces deux signaux de fluorescence et de la localisation du signal NADH par rapport au compartiment mitochondrial permet de statuer sur le phénomène d'ouverture transitoire ou définitive du PTP (Dumas, Argaud et al. 2009; Lamarche, Carcenac et al. 2013) .

Par définition, la transition de perméabilité mitochondriale correspond à une augmentation soudaine de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux ions et solutés de plus de 1.5kDa, causée, entre autre, par un excès de calcium. L'ouverture du PTP provoque une dissipation du potentiel membranaire, une modification de l'équilibre ionique et une fuite de métabolites. Au niveau de mitochondries isolées, l'ouverture du PTP induit un gonflement mitochondrial dû à un déséquilibre osmotique. Notre approche d'analyse d'images a

également permis de confirmer l'absence de gonflement mitochondrial lors de l'ouverture du PTP de cellules entières. En effet, dans une cellule entière, il n'existe pas de gradient osmotique entre la matrice, l'espace intermembranaire et le cytosol contrairement à ce qui est observé lorsque les mitochondries sont isolées (Fontaine et Bernardi 2016).

Dans un premier temps, notre approche a été appliquée à l'étude du fonctionnement de la chaîne respiratoire de différents types cellulaires sous l'effet soit d'inhibiteurs de celle-ci, soit de découplants. Les résultats obtenus permettent de comprendre qu'il n'y a pas de réponse universelle à l'inhibition de la chaîne respiratoire de type « accumulation de NADH et baisse de potentiel ». En effet, si la réponse à l'inhibition du complexe I par la roténone se traduit bien par une accumulation de NADH au sein des mitochondries, la variation de potentiel membranaire dépend, elle, du type cellulaire, des substrats présents et de la capacité des cellules à utiliser de l'ATP glycolytique permettant un fonctionnement reverse de l'ATP-synthase qui contribuera au maintien de ce potentiel. L'inhibition de l'ATP-synthase par l'oligomycine n'inuit pas de variation majeure du signal NADH mais une hyperpolarisation liée à l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, se traduisant par une augmentation de l'intensité de fluorescence du TMRM. Là encore, l'importance de cette augmentation est spécifique de chaque type cellulaire.
De la même manière, des effets différents des découplants de type CCCP ou son analogue FCCP ont été observés en fonction des types cellulaires. En empêchant la transmission d'énergie entre les réactions d'oxydo-réductions et la phosphorylation de l'ADP, le découplage provoque une baisse du gradient de protons, activent l'utilisation du NADH et de l'oxygène et favorise l'hydrolyse de l'ATP. En théorie, la visualisation de ces évènements se traduit par une forte et rapide baisse du signal NADH, ainsi qu'un effondrement de la fluorescence du TMRM donc du potentiel membranaire mitochondrial. Si les résultats obtenus avec les cellules HMEC et les hépatocytes sont en accord avec cette théorie, le découplage des cellules INS1 par le CCCP provoque une augmentation du signal NADH associée à une chute du potentiel membranaire. La robustesse de notre méthode permet ainsi de suggérer que les cellules INS1 ont un métabolisme propre et fondamentalement différent des autres types cellulaires étudiés. Notre interprétation repose sur le métabolisme du pyruvate qui est particulier pour la cellule β puisqu'il stimule la sécrétion d'insuline (Ishihara, Wang et al. 1999). Les cellules β expriment de très faibles taux de lactate déshydrogénase (LDH), enzyme catalysant la conversion du pyruvate en (Ishihara, Wang *et al*. 1999). Dans ses travaux de thèse, J. Papien (2009) affirme par contre que le pyruvate n'est pas un facteur

glycolytique déterminant pour la sécrétion d'insuline, bien qu'il constitue un substrat important du cycle de Krebs et de la production d'ATP. Le NADH, issu également de la glycolyse et transporté dans la mitochondrie par les navettes glycérol-phosphate et malate-aspartate, pourrait alors être impliqué dans ce métabolisme mitochondrial mis en jeu dans la sécrétion d'insuline (Eto, Tsubamoto et al. 1999).

Les cellules INS1 sont dépourvues de monocarboxylate, transporteur du pyruvate et du lactate vers l'extérieur de la cellule. En réponse au découplage induit par le CCCP au niveau de la chaîne respiratoire, le NADH mitochondrial est d'abord consommé (d'où la faible diminution de signal observée dans les premières minutes) puis l'ATP étant hydrolysé et le potentiel membranaire effondré, la chaîne respiratoire s'arrête. Sans potentiel membranaire mitochondrial, le pyruvate n'entre pas dans la matrice mitochondriale et n'alimente pas le cycle de Krebs qui se bloque également. Il n'y a pas non plus de conversion du pyruvate en oxaloacétate par la pyruvate carboxylase, ce qui ne permet pas à la navette malate-aspartate de fonctionner pour faire entrer le NADH au sein de la mitochondrie, ce d'autant que la navette est électrogénique. Au niveau du cytosol, le pyruvate n'est pas convertit en lactate, donc le NADH issu de la glycolyse s'accumule, d'où une augmentation de signal paraissant « dé-localisé » des mitochondries, comme observé lors de l'ouverture du PTP. L'expérience en présence de CsA a permis de vérifier cet effet propre du découplant sur les cellules INS1 indépendamment du fonctionnement du PTP (Fig.94).

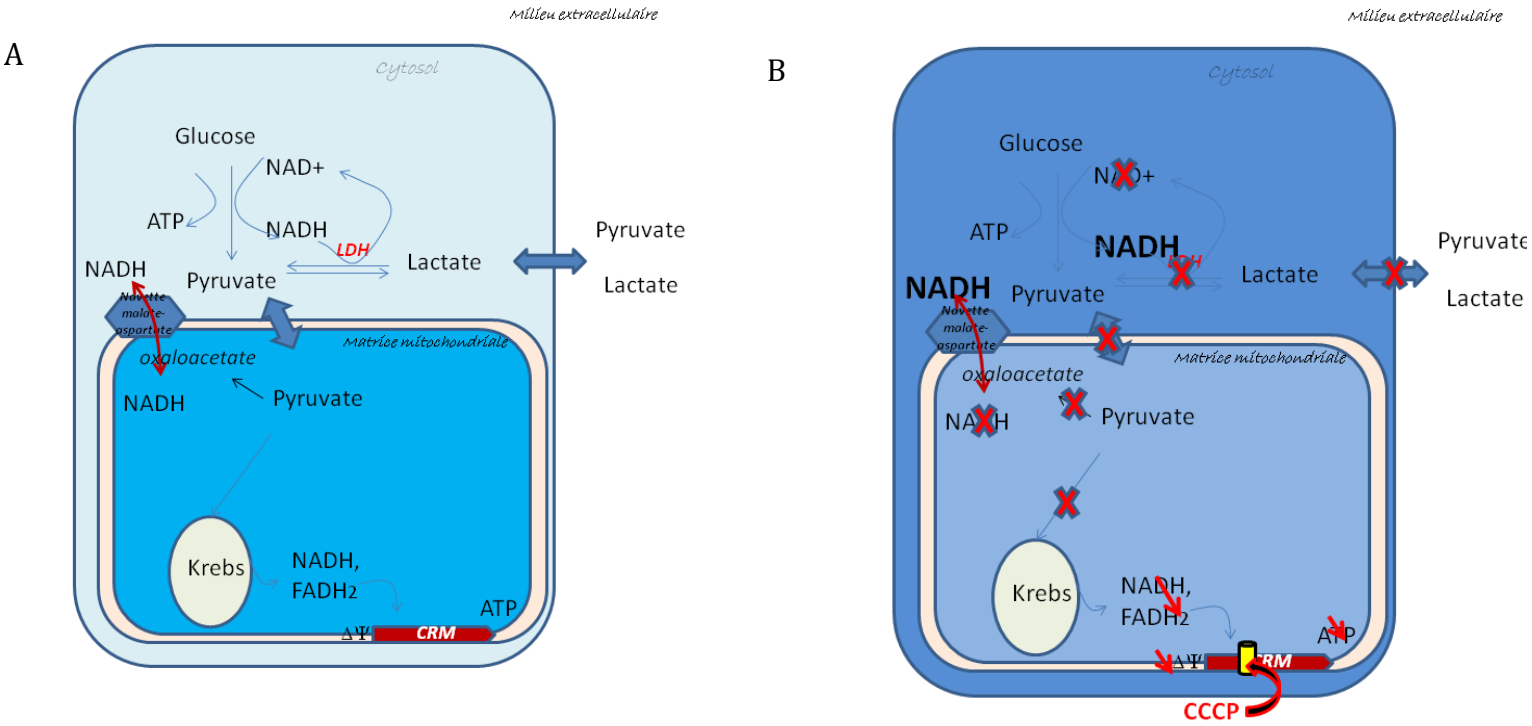


Figure 94 : représentation schématique du métabolisme des cellules INS1 sous l'effet du CCCP (B) par rapport à un métabolisme cellulaire classique (A).

Dans un second temps, nous avons appliqué la même approche à des expériences de stress métaboliques qui se rapprochent de situations physiopathologiques liées à l'ischémie-reperfusion. Les différents types cellulaires étudiés ont été soumis à des privations partielles ou totales d'oxygène, associées ou non à des privations de substrats. L'ensemble des résultats obtenus montre que les réponses cellulaires à ce type de stress font intervenir différents types de modifications de la fonction mitochondriale soit au niveau de la chaîne respiratoire, soit au niveau du PTP. De plus, nos résultats suggèrent qu'il existe un lien entre le métabolisme propre à chaque type cellulaire et leur réponse à ce type de stress, et que cela dépend de leur fonction. En effet, nous suggérons que l'adaptation au manque d'oxygène et/ou de substrats dépend de la capacité d'un type cellulaire à générer et utiliser ses propres réserves énergétiques. De plus, notre approche a permis de décortiquer séparément les effets du manque d'oxygène de ceux du manque de substrats. Les résultats obtenus ont mis en évidence que l'absence de substrats s'avère davantage délétère que la privation d'oxygène pour les cellules INS1 dont le PTP s'ouvre lors de la reperfusion après une heure de privation de substrats en présence de 21% d'oxygène. En présence de substrats, la privation partielle d'oxygène n'a pas d'effet alors que l'anoxie inhibe la chaîne respiratoire. La sécrétion

d'insuline par les cellules β dépend de la concentration d'ATP, elle-même dépendante de la disponibilité en glucose. De part leur fonction, les cellules β n'ont pas de réserve endogène de glycogène, ce qui leur permet de réagir aux variations de glycémie. Cette absence de glycogène est responsable de la sensibilité de ce type cellulaire à l'absence de substrats (Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2015). De plus, du fait du faible taux de LDH et de l'absence de monocarboxylate, la privation d'oxygène induit une accumulation de NAD(P)H au niveau du cytosol de façon comparable à l'effet du découplant décrit précédemment.

A l'inverse, la privation de substrats associée ou non à une privation d'oxygène induit une ouverture du PTP. Puisque les cellules INS1 n'ont pas de réserve de glycogène, elles n'ont aucun moyen d'utiliser de l'énergie provenant de la glycolyse, qu'elle soit aérobie ou anaérobie. L'ouverture du PTP pourrait être liée à l'inhibition du complexe I lors de la phase d'ischémie induisant un stress oxydant à l'origine du déclenchement des mécanismes de mort cellulaire.(Loor, Kondapalli et al. 2011); (Robin, Guzy et al. 2007) (Clarke, Khaliulin et al. 2008; Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2015)

Parmi les types cellulaires ayant un métabolisme particulier, les RT112 semblent s'adapter à la privation de substrats et d'oxygène. En effet, les résultats obtenus dans ce travail révèlent que seul le stress d'hypoxie sans substrats induit un effet de type inhibition de la chaîne respiratoire. Les cellules RT112 résistent à l'hypoxie et l'anoxie lorsqu'elles sont en présence de substrats. Aucune de nos conditions expérimentales n'a provoqué d'ouverture du PTP. Le lien entre l'ouverture du PTP et le stress oxydant est maintenant clairement établi. Cependant, s'il a longtemps été suggéré que ce stress oxydant se produit lors de la reperfusion, la production de ROS peut également être une cause de cette ouverture.

Alors que le stress oxydant peut déclencher le processus de mort cellulaire de cellules normales (notamment par l'ouverture définitive du PTP), les cellules cancéreuses sont capables d'exploiter une situation oxydante à leur avantage. En effet, les cellules tumorales possèdent des propriétés anti-apoptotiques et anti-oxydantes qui participent à leur survie. De ce fait, elles sont beaucoup plus résistantes aux effets de l'ischémie-reperfusion que des cellules normales (Ozaki and Todo 2007). Leur métabolisme décrit selon l'effet Warburg, est effectivement adapté à l'hypoxie. Dans nos expériences, le manque d'oxygène en présence de substrats n'apparaît pas comme un stress majeur sur la fonction mitochondriale. Ayant un métabolisme glycolytique, les RT112 utilisent l'ATP fourni par la glycolyse anaérobie pour maintenir leur métabolisme. Lorsque les substrats sont supprimés et que les cellules sont soumises à un environnement hypoxique, cette glycolyse anaérobie n'est plus suffisante pour éviter une inhibition de la chaîne respiratoire et le peu d'oxygène présent favorise alors la

production de ROS au niveau de cette chaîne. Les propriétés anti-oxydantes de ces cellules cancéreuses semblent suffisantes pour empêcher l'ouverture du PTP à la fois lors de l'hypoxie et lors de la reperfusion.
En effet, même en absence de substrats, l'anoxie n'induit pas d'effet sur les paramètres mitochondriaux observés : l'absence d'oxygène ne permet pas de production de ROS. Dans cette situation, les cellules cancéreuses sont probablement dans un état métabolique comparable à un état de quiescence similaire à celui des cellules cancéreuses situées au centre des tumeurs. En effet, au sein des tumeurs, les cellules « centrales » ne sont pas vascularisées, n'ont donc pas accès aux ressources nutritives et en oxygène disponibles pour les cellules de la périphérie des tumeurs.

Parmi les types cellulaires choisis pour notre étude, les hépatocytes primaires se présentaient comme un modèle de choix pour l'étude du métabolisme cellulaire du fait de leurs nombreuses fonctions dont la glycogénogénèse et glycogénolyse en réponse à l'insuline et au glucagon, la néoglucogénèse à partir des lipides, entre autres traitement de substances toxiques (comme l'alcool) etc…Après isolation à partir du foie de rats, nous pouvons aisément explorer ces diverses voies métaboliques en utilisant des milieux de culture dans lesquels il est possible de varier la composition en différents substrats.
Dans nos conditions expérimentales, la privation de substrats en présence d'oxygène n'a aucun effet sur la chaîne respiratoire : les hépatocytes utilisent leur capacité à générer leurs propres substrats endogènes pour maintenir un niveau d'énergie suffisant pour leur fonction mitochondriale. Cependant, cette même privation de substrat en condition hypoxique ou anoxique induit une inhibition de la chaîne respiratoire se traduisant par une baisse du potentiel membranaire avec un niveau de NADH maintenu. Cet effet est similaire à celui d'un découplant ou d'un inhibiteur : le NADH provient de la glycolyse grâce aux substrats endogènes et entre dans la mitochondrie. L'inhibition de la chaîne respiratoire induit une accumulation de NADH suffisante pour stopper le cycle de Krebs, qui ne fournit donc plus d'ATP (au niveau de la succinyl-CoA ligase) qui aurait pu permettre un fonctionnement reverse de l'ATPsynthase, d'où l'effondrement du potentiel mitochondrial.
En revanche, en présence de substrats, un environnement appauvrit en oxygène induit un stress suffisant pour provoquer une inhibition de la chaîne respiratoire en hypoxie et une ouverture du PTP en anoxie, couplée à un effet découplant : si la CsA empêche l'augmentation du NADH, elle ne parvient pas à rétablir le potentiel membranaire complètement aboli par cet effet inhibiteur.

A l'inverse des cellules INS1, les hépatocytes ne parviennent pas à se protéger des effets de l'appauvrissement de leur environnement en oxygène.
Au-delà de l'aspect « étude du métabolisme » qui nous a intéressé dans ce travail, les effets de l'ischémie-reperfusion des hépatocyes suscitent de plus en plus d'intérêt en cancérologie, notamment lors d'actes chirurgicaux d'ablation du foie durant lesquels l'ischémie-reperfusion des hépatocytes stimulerait l'invasion et la migration de métastates, à l'origine notamment de tumeurs colorectales (van der Bilt, Kranenburg et al. 2005; Man, Ng et al. 2007) (Ozaki and Todo 2007). Le stress oxydant induit par l'ischémie-reperfusion serait responsable d'un signal de transduction dépendant de l'état redox et induisant soit un processus apoptotique via NFκB, soit un processus de prolifération. Devenues tumorales, les cellules mettent en place leurs propriétés anti-oxydantes et anti-apoptotiques pour survivre et proliférer.

Les cellules HMEC-1 sont des cellules endothéliales de micro-vaisseaux humains immortalisées par le virus V40, modification génétique qui permet de proliférer indéfiniment, sans avoir de caractéristique cancéreuse. Etablies pour la culture cellulaire, les lignées immortalisées s'entretiennent avec un milieu de culture contenant du glucose, des acides aminés, vitamines et parfois des anti-oxydants, et complémenté en sérum et antibiotiques. Du fait de ces apports nutritifs essentiels à leur développement, le métabolisme des cellules immortalisées peut être considéré comme glycolytique, tout en étant différent du métabolisme des cellules cancéreuses. Une modification des conditions de culture peut engendrer une modification du phénotype des cellules. Au sein du laboratoire, un traitement antibiotique prolongé et inapproprié a induit une modification de notre lignée de cellules HMEC-1. De ce fait, il n'a pas été possible de poursuivre les expériences de privation de substrats séparément des privations d'oxygène, ni de tester les conditions expérimentales d'anoxie. Pour cette raison, seules les expériences de privation de substrats en présence de 3% O_2 ont pu être réalisées. Les résultats obtenus lors des expériences d'inhibition de la chaîne respiratoire par la roténone et l'oligomycine nous ont permis de confirmer le métabolisme glycolytique de ces cellules. En effet, malgré l'inhibition du complexe I par la roténone, l'ATP fournit par la glycolyse permet le fonctionnement reverse de l'ATPsynthase et le maintien du potentiel membranaire mitochondrial. Lorsque l'oligomycine bloque également cette ATPsynthase, le potentiel s'effondre. Dans un environnement appauvri en susbtrats et à 3% O_2, notre méthodologie a permis de mettre en évidence une ouverture du PTP, prévenue par la CsA.

3/ Visualisation des variations d'ATP et AMPK avec utilisation de biosenseurs et de FRET

De nombreux biosenseurs fluorescents ont été récemment développés pour contribuer à l'étude de phénomènes biologiques et en particulier le métabolisme cellulaire. D'une manière générale, les biosenseurs sont construits avec des couples de protéines fluorescentes dont les propriétés spectrales sont compatibles avec une émission de FRET lorsque les conditions nécessaires sont présentes (voir introduction).

Un certain nombre de biosenseurs ont été mis au point pour visualiser des signaux ou paramètres intracellulaires impliqués dans diverses voies métaboliques. Plusieurs études et revues présentent les biosenseurs disponibles (Lindenburg and Merkx 2014) (Pelosse soumis). L'estimation des concentrations en nucléotides adényliques (ATP, ADP et AMP) et des nicotinamide adenine dinucléotides (NAD, NADP) sont les paramètres les plus représentatifs des réactions métaboliques, puisqu'ils déterminent la quantité d'énergie et l'état redox des cellules. Cameleon a été l'un des premiers biosenseurs mis au point et utilisé pour évaluer les modifications de statut énergétique cellulaire dépendantes de l'utilisation du calcium intracellulaire (Nagai *et al* 2001). Plus récemment, les biosenseurs Peredox et Frex ont été développés pour détecter le NADH et estimer le ratio NADH/NAD+ (Hung *et al* 2011, Zhao *et al* 2011). Cependant, nos propres travaux ont montré que le suivi des variations de l'autofluorescence du NADH permet de visualiser des variations du métabolisme cellulaire par l'estimation de l'activité mitochondriale, notamment du fonctionnement de la chaîne respiratoire (Dumas, Argaud et al. 2009; Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2011) (Lamarche, Carcenac et al. 2013) (Lablanche, Cottet-Rousselle et al. 2015) et ce présent travail). L'intérêt de l'utilisation de ces biosenseurs de NADH est donc discutable, si l'on considère que la transfection des cellules dans le but de leur faire intégrer le biosenseur peut constituer un biais métabolique non négligeable.

L'équipe de Imamura (Imamura, Nhat et al. 2009) a développé les biosenseurs ATeam afin de suivre les fluctuations de concentration intracellulaire d'ATP. Comme décrit en introduction, les protéines fluorescentes sont incluses au niveau de la sous-unité ε de l'ATP-synthase. Le changement de conformation en présence d'ATP provoque un rapprochement suffisant du couple de protéines fluorescentes du biosenseur pour qu'un FRET se produise : ainsi, la présence de FRET est directement liée à la concentration d'ATP présent. Ces biosenseurs ATeam rencontrent un certain succès puisque les publications de travaux utilisant ATeam 1.03 sont de plus en plus nombreuses. C'est ce même biosenseur que nous avons utilisé pour

nos propres expérimentations dont les résultats sont présentés dans ce manuscrit. Contrairement aux travaux des différents auteurs présentant des études à l'échelle d'une cellule unique, nous avons estimé que l'observation d'un champ optique contenant une population cellulaire transfectée de façon homogène constitue une approche plus globale et plus représentative du métabolisme cellulaire, au sein d'une population plutôt qu'à l'échelle d'une seule cellule. De notre point de vue, cette sélection d'une cellule isolée dont la fluorescence est la plus intense consiste à sélectionner une cellule qui a déjà un statut métabolique différente de l'ensemble de la population, ce qui peut biaiser l'interprétation. Du fait des faibles rendements de transfection par la lipofectamine, nous avons donc testé une approche d'infection en intégrant le biosenseur dans un adénovirus. Cependant, les résultats obtenus au cours de nos expérimentations n'ont pas été satisfaisants et dans l'état actuel de nos investigations, nous ne sommes pas en mesure de valider notre protocole expérimental d'utilisation d'ATeam 1.03 pour l'estimation et le suivi des variations de concentration d'ATP au sein de cellules primaires telles que les hépatocytes isolés de rat, ni de cellules cancéreuses de type RT112. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer nos échecs :

- La première repose sur le choix du biosenseur ATeam 1.03, généreusement fourni par Imamura dans un cadre collaboratif. En effet, cette version d'ATeam présente une constante d'affinité K_d de 3.3mM d'ATP permettant de mesurer de concentrations intracellulaire d'ATP de l'ordre du millimolaire. Or, les expériences d'HPLC , effectuées pour contrôler l'absence d'artéfact lié à la présence de l'adénovirus, ont révélé des concentrations d'ATP de l'ordre de plusieurs dizaines de µM d'ATP dans les hépatocytes aussi bien « naturels » qu'infectés par les adénovirus. Les résultats obtenus par imagerie montrent bien une présence de FRET donc la présence d'ATP au sein des cellules. Cependant, les variations de rapport ATP/ADP induites par la présence d'oligomycine et de CCCP et mesurées par HPLC ne sont pas détectables par imagerie dans les mêmes conditions expérimentales. Si la concentration d'ADP augmente (en proportion) de façon plus importante que la baisse de concentration d'ATP, cela est suffisant pour diminuer le ratio mesuré par HPLC. Cependant, l'amplitude de la variation de concentration d'ATP n'est peut-être pas suffisante pour induire une modification de conformation de la sous-unité ε et donc l'efficacité de FRET est compromise, d'où l'absence de variation de FRET détectable.

- La seconde hypothèse repose sur un choix inapproprié de version d'ATeam. D'autres versions d'ATeam existent et ont des affinités différentes pour l'ATP. Par exemple, AT3.10, construit à partir de la sous-unité ε du *Bacillus* sp.PS3, présente un K_d de 7.4µM d'ATP à 37°C (Imamura, Nhat et al. 2009), $AT1.03^{YEMK}$ et $AT3.10^{MGK}$ ont des K_d des 1.2mM et 14µM

respectivement. Si les concentrations d'ATP au sein des hépatocytes de 48h que nous avons utilisés sont effectivement de l'ordre de quelques dizaines de µM, la version AT3.10^{MGK} aurait été davantage appropriée. Cela sous-entend qu'une mesure préalable précise de la concentration intracellulaire d'ATP doit être effectuée pour chaque type cellulaire étudié afin de déterminer quelle construction d'ATeam doit être utilisée. De plus, la spécificité du biosenseur doit être évaluée, ainsi que l'absence d'artéfacts liés à des modifications de paramètres environnementaux. En effet, certains biosenseurs sont sensibles à des variations de pH, ou de température : le K_d de AT1.03 augmente de cinq fois lors d'une variation au-delà de 10°C (Pelosse, Cottet-Rousselle et al. 2016).

Les résultats des expériences effectuées avec les cellules RT112 ont révélé une augmentation des signaux de fluorescence du biosenseur et ce, pour les deux protéines fluorescences simultanément. Ces variations artéfactuelles de fluorescence ont été constatées aussi bien dans la condition « sham » que dans les conditions d'hypoxie sans substrats de façon encore plus accentuée. Bien qu'aucune vérification de détection de la présence de radicaux libres n'ait été effectuée, nous faisons l'hypothèse que cette augmentation de fluorescence pourrait être liée à un stress oxydant induit par une photo-toxicité de l'excitation lumineuse par le laser. Grâce à notre approche précédente TMRM/NADH, nous avons constaté que l'hypoxie en absence de substrats provoque une inhibition de la chaîne respiratoire de ces cellules. Or, cette inhibition peut être suffisante pour déclencher une production de ROS au niveau des complexes de la chaîne respiratoire, ce qui explique pourquoi dans cette situation l'augmentation de fluorescence des protéines fluorescentes est effectivement un artéfact lié à une sensibilité de ce biosenseur à un environnement oxydant.

- Une autre hypothèse concerne notre approche d'intégration du biosenseur dans un adénovirus afin d'améliorer le rendement de cellules infectées. Cette infection induit probablement un biais métabolique suffisant pour provoquer un stress cellulaire, davantage visible sur nos images de RT112 que pour les hépatocytes. La dose d'adénovirus utilisée ainsi que la durée d'infection sont probablement à revoir.

Enfin, Feniouk *et al* (Feniouk, Suzuki et al. 2006; Feniouk, Suzuki et al. 2007) ont décrit le rôle de la sous-unité ε dans la régulation de l'ATP-synthase, notamment dans le changement de conformations se produisant selon la synthèse d'ATP, de son hydrolyse ainsi que l'inhibition de cette hydrolyse par l'ADP. Or, la construction du biosenseur ATeam est basée sur l'insertion des protéines fluorescentes au niveau de cette sous-unité. De ce fait, c'est son changement de qui permet un rapprochement des protéines suffisant pour induire du FRET. Si l'on considère que la transfection et l'infection des cellules par adénovirus constituent déjà un

stress pour les cellules, il est probable que le changement de conformation de la sous-unité ε se soit déjà produit et persiste indépendamment des stress métaboliques que l'on peut infliger aux cellules par la suite. Ce point est à prendre en considération puisqu'il remet en cause la spécificité de la réponse du biosenseur et expliquerait la diminution de l'efficacité de FRET que l'on observe en présence d'oligomycine par exemple.

Le second biosenseur testé dans la présente étude est AMPKAR, développé par Tsou *et al* (Tsou, Zheng et al. 2011) pour suivre l'activité de l'AMPK au niveau cellulaire. Comme la plupart des biosenseurs, AMPKAR est constitué de protéines fluorescences qui, lors de l'activation de l'AMPK par phosphorylation induisant un changement de conformation permettant de produire un signal de FRET. Ce FRET peut être réversible sous l'action de phosphatases qui peuvent dé-phosphoryler le peptide. AMPKAR est donc décrit pour évaluer la balance entre les activités de l'AMPK et des phosphatases, et permet d'estimer l'hétérogénéité de ces activités au niveau cellulaire voire au sein de divers compartiments intracellulaires.

Les expériences de validation de l'utilisation des biosenseurs qui ont été réalisées dans ce travail n'ont pas permis de garantir la spécificité de la réponse du signal FRET aux divers stress métaboliques soumis aux cellules. Comme pour ATeam, nous avons intégré AMPKAR dans des adénovirus afin d'améliorer le nombre de cellules ayant intégré de biosenseur, pour pouvoir évaluer, justement, l'hétérogénéité d'activité d'AMPK au sein d'une population cellulaire, et non à l'échelle d'une cellule individuelle. Dans les conditions d'infection que nous avons établies, presque toutes les cellules ont produit un signal de FRET. Là encore, nous renforçons notre hypothèse selon laquelle l'infection elle-même induit un stress métabolique suffisamment important pour activer l'AMPK, puisque, à priori, une cellule cultivée dans son milieu et dans des conditions environnementales adaptées doivent se trouver dans un état métabolique normal et stable. Or, pour chacune de nos expériences, les images correspondant aux cellules « contrôles », c'est-à-dire avant tout induction de la moindre modification du métabolisme, révèlent un signal de FRET important indiquant déjà une activité de l'AMPK. En l'état actuel de nos investigations, nous interprétons les quelques modifications de FRET observées comme des artéfacts, liés plutôt aux changements de milieu ou d'environnement, mais de expériences supplémentaires doivent être effectuées pour évaluer la reproductibilité de ces réponses. Nous avons volontairement interrompu ces expériences tant que nos doutes subsistent quant à la spécificité de la réponse, et particulièrement tant que nous n'avons pas vérifié si l'activation de l'AMPK observée

d'emblée est effectivement due à l'infection par l'adénovirus. Pour cela, des expériences ont été effectuées dans des conditions expérimentales similaires à celles d'imagerie, mais en maintenant les cellules dans un incubateur classique, en les traitant ou non à l'oligomycine et au CCCP, ou à de l'anoxie sans substrats grâce à la cloche à hypoxie, et ce, de façon parallèle sur des cellules saines et des cellules infectées. Des western blots vont être prochainement réalisés et nous permettrons de vérifier l'état d'activation de l'AMPK dans toutes ces situations expérimentales.

CONCLUSION
et
PERSPECTIVES

CONCLUSION

L'imagerie, en particulier la microscopie confocale, est un outil adapté à l'étude du métabolisme et de la fonction mitochondriale en cellules entières.

L'ensemble de résultats obtenus au cours de ce travail a permis de mettre en valeur la robustesse de la méthode de visualisation de la fonction mitochondriale basée sur l'analyse des variations de fluorescence du TMRM et du NADH.
Au-delà de la simple visualisation de ces variations de fluorescence, la quantification des images a permis de progresser sur la compréhension des effets d'inhibiteurs et de découplants sur la chaîne respiratoire de différents types cellulaires. Appliquée à l'étude du stress métabolique induit par l'ischémie-reperfusion, cette méthode a permis également de mettre en évidence les différences de réponses observées en fonction des types cellulaires étudiés et d'en conclure que l'ouverture du PTP lors de l'ischémie-reperfusion dépend de la présence de réserves endogènes de substrats permettant d'utiliser l'ATP glycolytique :

- les cellules n'ayant pas de réserves endogènes (comme les INS1) sont atteintes par le manque de substrat
- les cellules possédant des réserves ne subsistent pas à la privation d'oxygène
- les cellules cancéreuses résistent à la fois à la privation de substrats et d'oxygène.

Cependant, les expériences réalisées avec les biosenseurs ATeam et AMPKAR, intégrés ou non dans les adénovirus, n'ont pas permis de valider leur utilisation pour évaluer l'état énergétique des cellules dans les conditions expérimentales que nous avons établies. Présentés et proposés comme des outils « clé en mains » pour le suivi des variations du statut énergétique de cellules vivantes par imagerie, l'usage de ces biosenseurs nécessite de nombreux contrôles expérimentaux, notamment par des techniques classiques de mesure du ratio ATP/ADP (par HPLC) ou de biologie moléculaire pour l'activité de l'AMPK (par western blots) , voire des équipements de microscopie pour approfondir les mesures de FRET (FLIM par exemple) qui sont plus coûteux et plus sophistiqués.

PERSPECTIVES

Lorsque ces obstacles techniques seront franchis, nous envisageons de coupler ces deux approches afin de proposer une technique innovante de visualisation du métabolisme énergétique par imagerie.
Afin d'atteindre cet objectif, les perspectives de poursuite de ce projet sont les suivantes :

Partie analyse d'images :
Terminer le développement du protocole d'analyse d'images avec le logiciel Icy afin d'améliorer le délai d'analyse, et rédiger une publication comparative des deux programmes ;

Approche TMRM/NADH
Etendre l'approche à d'autres types cellulaires afin de renforcer l'hypothèse de réponses métaboliques différentes en fonction de la présence de réserves énergétiques endogènes des cellules. Par exemple, nous pouvons envisager de compléter nos expériences avec des cellules neuronales, ayant un métabolisme dépendant du glucose comme les INS 1 ; puis des cellules issues de différents types de fibres musculaires ayant des métabolismes soit oxydatifs, soit glycolytiques.
L'approche réalisée avec les cellules cancéreuses doit être poursuivie afin de comparer les réponses métaboliques de cellules cancéreuses à différentes approches thérapeutiques en comparaison à des cellules chimiorésistantes : est-ce que les traitements utilisés en chimiothérapie conventionnelle ont un effet sur le PTP ? Y a-t-il un lien entre les mécanismes de chimiorésistance et un dysfonctionnement du PTP dans les cellules cancéreuses ?

Utilisation des Biosenseurs
Optimiser les conditions de transfection à la lipofectamine et/ou développer des lignées stables permettant d'éviter le stress cellulaire lié à la transfection ;
Reprendre les conditions expérimentales de doses et temps d'infection des cellules par les adénovirus ;
Comparer les résultats obtenus avec les adénovirus par rapport à des transfections telles qu'elles sont utilisées dans les différents travaux décrits dans la littérature ;
Tester les conditions expérimentales sur des cellules en lignées plutôt que des cellules primaires qui sont probablement plus sensibles à l'infecti

Références Bibliographiques

Acin-Perez, R. and J. A. Enriquez (2014). "The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model." Biochim Biophys Acta **1837**(4): 444-450.

Alameddine, A. K., P. Visintainer, et al. (2014). "Cancer Rates in Adults After Cardiac Interventions: A Preliminary Observational Report." Am J Clin Oncol.

Alavian, K. N., G. Beutner, et al. (2014). "An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore." Proc Natl Acad Sci U S A **111**(29): 10580-10585.

Ambros, J. T., I. Herrero-Fresneda, et al. (2007). "Ischemic preconditioning in solid organ transplantation: from experimental to clinics." Transpl Int **20**(3): 219-229.

Andrianaivomananjaona, T., M. Moune-Dimala, et al. (2011). "How the N-terminal extremity of Saccharomyces cerevisiae IF1 interacts with ATP synthase: a kinetic approach." Biochim Biophys Acta **1807**(2): 197-204.

Argaud, L., O. Gateau-Roesch, et al. (2004). "Preconditioning delays Ca2+-induced mitochondrial permeability transition." Cardiovasc Res **61**(1): 115-122.

Asfari, M., D. Janjic, et al. (1992). "Establishment of 2-mercaptoethanol-dependent differentiated insulin-secreting cell lines." Endocrinology **130**(1): 167-178.

Baines, C. P., R. A. Kaiser, et al. (2007). "Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death." Nat Cell Biol **9**(5): 550-555.

Baker, L. A., I. N. Watt, et al. (2012). "Arrangement of subunits in intact mammalian mitochondrial ATP synthase determined by cryo-EM." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(29): 11675-11680.

Banko, M. R., J. J. Allen, et al. (2011). "Chemical genetic screen for AMPKalpha2 substrates uncovers a network of proteins involved in mitosis." Mol Cell **44**(6): 878-892.

Baradaran, R., J. M. Berrisford, et al. (2013). "Crystal structure of the entire respiratory complex I." Nature **494**(7438): 443-448.

Bernardi, P. (2013). "The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved?" Front Physiol **4**: 95.

Bernier, M., D. J. Hearse, et al. (1986). "Reperfusion-induced arrhythmias and oxygen-derived free radicals. Studies with "anti-free radical" interventions and a free radical-generating system in the isolated perfused rat heart." Circ Res **58**(3): 331-340.

Bochaton, T., C. Crola-Da-Silva, et al. (2015). "Inhibition of myocardial reperfusion injury by ischemic postconditioning requires sirtuin 3-mediated deacetylation of cyclophilin D." J Mol Cell Cardiol **84**: 61-69.

Bos, M. J., M. J. van Rijn, et al. (2007). "Incidence and prognosis of transient neurological attacks." JAMA **298**(24): 2877-2885.

Buhlman, L., M. Damiano, et al. (2014). "Functional interplay between Parkin and Drp1 in mitochondrial fission and clearance." Biochim Biophys Acta **1843**(9): 2012-2026.

Bulkley, G. B. (1994). "Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function." Lancet **344**(8927): 934-936.

Carling, D. (2004). "The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control." Trends Biochem Sci **29**(1): 18-24.

Chaban, Y., E. J. Boekema, et al. (2014). "Structures of mitochondrial oxidative phosphorylation supercomplexes and mechanisms for their stabilisation." Biochim Biophys Acta **1837**(4): 418-426.
Chance, B. and G. R. Williams (1955). "Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state." J Biol Chem **217**(1): 409-427.
Chevrollier, A., J. Cassereau, et al. (2012). "Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function." Int J Biochem Cell Biol **44**(6): 980-988.
Cho, D. H., T. Nakamura, et al. (2009). "S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury." Science **324**(5923): 102-105.
Clarke, S. J., I. Khaliulin, et al. (2008). "Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation." Circ Res **102**(9): 1082-1090.
Cooper, C. E. and C. Giulivi (2007). "Nitric oxide regulation of mitochondrial oxygen consumption II: Molecular mechanism and tissue physiology." Am J Physiol Cell Physiol **292**(6): C1993-2003.
Cottet-Rousselle, C., X. Ronot, et al. (2011). "Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes." Cytometry A **79**(6): 405-425.
Cung, T. T., O. Morel, et al. (2015). "Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction." N Engl J Med **373**(11): 1021-1031.
Davies, K. M., C. Anselmi, et al. (2012). "Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(34): 13602-13607.
Dedkova, E. N. and L. A. Blatter (2012). "Measuring mitochondrial function in intact cardiac myocytes." J Mol Cell Cardiol **52**(1): 48-61.
Dirnagl, U., C. Iadecola, et al. (1999). "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view." Trends Neurosci **22**(9): 391-397.
Dragun, D., U. Hoff, et al. (2001). "Prolonged cold preservation augments vascular injury independent of renal transplant immunogenicity and function." Kidney Int **60**(3): 1173-1181.
Dudkina, N. V., R. Kouril, et al. (2010). "Structure and function of mitochondrial supercomplexes." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 664-670.
Dumas, J. F., L. Argaud, et al. (2009). "Effect of transient and permanent permeability transition pore opening on NAD(P)H localization in intact cells." J Biol Chem **284**(22): 15117-15125.
Efremov, R. G. and L. A. Sazanov (2011). "Structure of the membrane domain of respiratory complex I." Nature **476**(7361): 414-420.
El-Mir, M. Y., V. Nogueira, et al. (2000). "Dimethylbiguanide Inhibits Cell Respiration via an Indirect Effect Targeted on the Respiratory Chain Complex I." Journal of Biological Chemistry **275**(1): 223-228.
Eto, K., Y. Tsubamoto, et al. (1999). "Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion." Science **283**(5404): 981-985.
Feniouk, B. A., T. Suzuki, et al. (2006). "The role of subunit epsilon in the catalysis and regulation of FOF1-ATP synthase." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 326-338.
Feniouk, B. A., T. Suzuki, et al. (2007). "Regulatory interplay between proton motive force, ADP, phosphate, and subunit epsilon in bacterial ATP synthase." J Biol Chem **282**(1): 764-772.

Fiaschi, T. and P. Chiarugi (2012). "Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison." Int J Cell Biol **2012**: 762825.

Fontaine, E., O. Eriksson, et al. (1998). "Regulation of the Permeability Transition Pore in Skeletal Muscle Mitochondria: MODULATION BY ELECTRON FLOW THROUGH THE RESPIRATORY CHAIN COMPLEX I." Journal of Biological Chemistry **273**(20): 12662-12668.

Foretz, M., S. Hebrard, et al. (2010). "Metformin inhibits hepatic gluconeogenesis in mice independently of the LKB1/AMPK pathway via a decrease in hepatic energy state." J Clin Invest **120**(7): 2355-2369.

Foretz, M., N. Taleux, et al. (2006). "[Regulation of energy metabolism by AMPK: a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic and cardiovascular diseases]." Med Sci (Paris) **22**(4): 381-388.

Garlick, P. B., M. J. Davies, et al. (1987). "Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy." Circ Res **61**(5): 757-760.

Genova, M. L. and G. Lenaz (2014). "Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes." Biochim Biophys Acta **1837**(4): 427-443.

Gerencser, A. A., S. A. Mookerjee, et al. (2016). "Measurement of the Absolute Magnitude and Time Courses of Mitochondrial Membrane Potential in Primary and Clonal Pancreatic Beta-Cells." PLoS One **11**(7): e0159199.

Giorgio, V., S. von Stockum, et al. (2013). "Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(15): 5887-5892.

Gusdon, A. M., J. Chen, et al. (2009). "Chapter 24 Quantification, localization, and tissue specificities of mouse mitochondrial reactive oxygen species production." Methods Enzymol **456**: 439-457.

Hackenbrock, C. R., B. Chazotte, et al. (1986). "The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport." J Bioenerg Biomembr **18**(5): 331-368.

Hardie, D. G. (2004). "The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream." J Cell Sci **117**(Pt 23): 5479-5487.

Hardie, D. G. (2011). "Signal transduction: How cells sense energy." Nature **472**(7342): 176-177.

Hardie, D. G., B. E. Schaffer, et al. (2016). "AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs." Trends Cell Biol **26**(3): 190-201.

Henry, T. D., S. L. Archer, et al. (1990). "Enhanced chemiluminescence as a measure of oxygen-derived free radical generation during ischemia and reperfusion." Circ Res **67**(6): 1453-1461.

Hicks, M., A. Hing, et al. (2006). "Organ preservation." Methods Mol Biol **333**: 331-374.

Hom, J. and S. S. Sheu (2009). "Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells." J Mol Cell Cardiol **46**(6): 811-820.

Hyde, B. B., G. Twig, et al. (2010). "Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics." Semin Cell Dev Biol **21**(6): 575-581.

Iglewski, M., J. A. Hill, et al. (2010). "Mitochondrial fission and autophagy in the normal and diseased heart." Curr Hypertens Rep **12**(6): 418-425.

Imamura, H., K. P. Nhat, et al. (2009). "Visualization of ATP levels inside single living cells with fluorescence resonance energy transfer-based genetically encoded indicators." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(37): 15651-15656.

Ishihara, H., H. Wang, et al. (1999). "Overexpression of monocarboxylate transporter and lactate dehydrogenase alters insulin secretory responses to pyruvate and lactate in beta cells." J Clin Invest **104**(11): 1621-1629.
Jassem, W., S. V. Fuggle, et al. (2002). "The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury." Transplantation **73**(4): 493-499.
Kokoszka, J. E., K. G. Waymire, et al. (2004). "The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore." Nature **427**(6973): 461-465.
Koopman, W. J., H. J. Visch, et al. (2006). "Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts." Cytometry A **69**(1): 1-12.
Koopman, W. J., H. J. Visch, et al. (2005). "Mitochondrial network complexity and pathological decrease in complex I activity are tightly correlated in isolated human complex I deficiency." Am J Physiol Cell Physiol **289**(4): C881-890.
Krauskopf, A., O. Eriksson, et al. (2006). "Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 590-595.
Lablanche, S., C. Cottet-Rousselle, et al. (2015). "Respective effects of oxygen and energy substrate deprivation on beta cell viability." Biochim Biophys Acta **1847**(6-7): 629-639.
Lablanche, S., C. Cottet-Rousselle, et al. (2011). "Protection of pancreatic INS-1 beta-cells from glucose- and fructose-induced cell death by inhibiting mitochondrial permeability transition with cyclosporin A or metformin." Cell Death Dis **2**: e134.
Lai, B., L. Zhang, et al. (2006). "Impact of inhibition of Qo site of mitochondrial complex III with myxothiazol on persistent sodium currents via superoxide and protein kinase C in rat hippocampal CA1 cells." Neurobiol Dis **21**(1): 206-216.
Lamarche, F., C. Carcenac, et al. (2013). "Mitochondrial permeability transition pore inhibitors prevent ethanol-induced neuronal death in mice." Chem Res Toxicol **26**(1): 78-88.
Leavesley, H. B., L. Li, et al. (2008). "Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity." Toxicol Sci **101**(1): 101-111.
Lemasters, J. J. and V. K. Ramshesh (2007). "Imaging of mitochondrial polarization and depolarization with cationic fluorophores." Methods Cell Biol **80**: 283-295.
Lenaz, G., A. Baracca, et al. (2010). "Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 633-640.
Lenaz, G. and M. L. Genova (2009). "Mobility and function of coenzyme Q (ubiquinone) in the mitochondrial respiratory chain." Biochim Biophys Acta **1787**(6): 563-573.
Leonard, A. P., R. B. Cameron, et al. (2015). "Quantitative analysis of mitochondrial morphology and membrane potential in living cells using high-content imaging, machine learning, and morphological binning." Biochim Biophys Acta **1853**(2): 348-360.
Li, S., F. Lamarche, et al. (2014). "Expression analysis of ATAD3 isoforms in rodent and human cell lines and tissues." Gene **535**(1): 60-69.
Lihavainen, E., J. Makela, et al. (2012). "Mytoe: automatic analysis of mitochondrial dynamics." Bioinformatics **28**(7): 1050-1051.
Lindenburg, L. and M. Merkx (2014). "Engineering genetically encoded FRET sensors." Sensors (Basel) **14**(7): 11691-11713.
Loor, G., J. Kondapalli, et al. (2011). "Mitochondrial oxidant stress triggers cell death in simulated ischemia-reperfusion." Biochim Biophys Acta **1813**(7): 1382-1394.

Maftah, A., J. M. Petit, et al. (1990). "Specific interaction of the new fluorescent dye 10-N-nonyl acridine orange with inner mitochondrial membrane. A lipid-mediated inhibition of oxidative phosphorylation." FEBS Lett **260**(2): 236-240.

Man, K., K. T. Ng, et al. (2007). "Ischemia-reperfusion of small liver remnant promotes liver tumor growth and metastases--activation of cell invasion and migration pathways." Liver Transpl **13**(12): 1669-1677.

Mannella, C. A. (2006). "The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function." Biochim Biophys Acta **1762**(2): 140-147.

Mazure, N. M. (2017). "VDAC in cancer." Biochim Biophys Acta.

Merola, F., A. Fredj, et al. (2014). "Newly engineered cyan fluorescent proteins with enhanced performances for live cell FRET imaging." Biotechnol J **9**(2): 180-191.

Mitra, K. and J. Lippincott-Schwartz (2010). "Analysis of mitochondrial dynamics and functions using imaging approaches." Curr Protoc Cell Biol **Chapter 4**: Unit 4 25 21-21.

Murry, C. E., R. B. Jennings, et al. (1986). "Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium." Circulation **74**(5): 1124-1136.

Nelson, C. A., C. Case, et al. (2005). "Relationship of extent and nature of dysfunctional myocardium to brain natriuretic peptide in patients with ischemic left ventricular dysfunction." Int J Cardiovasc Imaging **21**(2-3): 295-300; discussion 301-292.

Neumann, D., J. Buckers, et al. (2010). "Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms." PMC Biophys **3**(1): 4.

Nikolaisen, J., L. I. Nilsson, et al. (2014). "Automated quantification and integrative analysis of 2D and 3D mitochondrial shape and network properties." PLoS One **9**(7): e101365.

Opelz, G. and B. Dohler (2007). "Multicenter analysis of kidney preservation." Transplantation **83**(3): 247-253.

Orci, L. A., S. Lacotte, et al. (2014). "The role of hepatic ischemia-reperfusion injury and liver parenchymal quality on cancer recurrence." Dig Dis Sci **59**(9): 2058-2068.

Ozaki, M. and S. Todo (2007). "Surgical stress and tumor behavior: impact of ischemia-reperfusion and hepatic resection on tumor progression." Liver Transpl **13**(12): 1623-1626.

Palmer, A. E., Y. Qin, et al. (2011). "Design and application of genetically encoded biosensors." Trends Biotechnol **29**(3): 144-152.

Park, L. C., H. Zhang, et al. (1999). "Metabolic impairment induces oxidative stress, compromises inflammatory responses, and inactivates a key mitochondrial enzyme in microglia." J Neurochem **72**(5): 1948-1958.

Pearce, L. L., E. L. Bominaar, et al. (2003). "Reversal of cyanide inhibition of cytochrome c oxidase by the auxiliary substrate nitric oxide: an endogenous antidote to cyanide poisoning?" J Biol Chem **278**(52): 52139-52145.

Pelosse, M., C. Cottet-Rousselle, et al. (2016). "Genetically Encoded Fluorescent Biosensors to Explore AMPK Signaling and Energy Metabolism." EXS **107**: 491-523.

Petronilli, V., G. Miotto, et al. (1999). "Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence." Biophys J **76**(2): 725-734.

Pratschke, J., S. G. Tullius, et al. (2004). "Brain death associated ischemia/reperfusion injury." Ann Transplant **9**(1): 78-80.

Presley, A. D., K. M. Fuller, et al. (2003). "MitoTracker Green labeling of mitochondrial proteins and their subsequent analysis by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **793**(1): 141-150.

Pucheu, S., C. Coudray, et al. (1995). "Effect of dietary antioxidant trace element supply on cardiac tolerance to ischemia-reperfusion in the rat." J Mol Cell Cardiol **27**(10): 2303-2314.

Rasola, A. and P. Bernardi (2014). "The mitochondrial permeability transition pore and its adaptive responses in tumor cells." Cell Calcium **56**(6): 437-445.

Rauen, U. and H. de Groot (2004). "New insights into the cellular and molecular mechanisms of cold storage injury." J Investig Med **52**(5): 299-309.

Reznick, R. M. and G. I. Shulman (2006). "The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis." J Physiol **574**(Pt 1): 33-39.

Robin, E., R. D. Guzy, et al. (2007). "Oxidant stress during simulated ischemia primes cardiomyocytes for cell death during reperfusion." J Biol Chem **282**(26): 19133-19143.

Sanderson, T. H., C. A. Reynolds, et al. (2013). "Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation." Mol Neurobiol **47**(1): 9-23.

Scheller, F. W., F. Schubert, et al. (1991). "Second generation biosensors." Biosens Bioelectron **6**(3): 245-253.

Septinus, M., W. Seiffert, et al. (1983). "[Hydrophobic acridine dyes for fluorescence staining of mitochondria in living cells. 1. Thermodynamic and spectroscopic properties of 10-n-alkylacridine orange chlorides]." Histochemistry **79**(3): 443-456.

Strauss, M., G. Hofhaus, et al. (2008). "Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane." EMBO J **27**(7): 1154-1160.

Suleiman, M. S., A. P. Halestrap, et al. (2001). "Mitochondria: a target for myocardial protection." Pharmacol Ther **89**(1): 29-46.

Tanner, C. M., F. Kamel, et al. (2011). "Rotenone, paraquat, and Parkinson's disease." Environ Health Perspect **119**(6): 866-872.

Thomas, D., P. Bron, et al. (2008). "Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase." Biol Cell **100**(10): 591-601.

Tsou, P., B. Zheng, et al. (2011). "A fluorescent reporter of AMPK activity and cellular energy stress." Cell Metab **13**(4): 476-486.

van der Bilt, J. D., O. Kranenburg, et al. (2005). "Ischemia/reperfusion accelerates the outgrowth of hepatic micrometastases in a highly standardized murine model." Hepatology **42**(1): 165-175.

Vanden Hoek, T. L., Z. Shao, et al. (1997). "Mitochondrial electron transport can become a significant source of oxidative injury in cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **29**(9): 2441-2450.

Vendelin, M., N. Beraud, et al. (2005). "Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern." Am J Physiol Cell Physiol **288**(3): C757-767.

Wang, H. and G. Oster (1998). "Energy transduction in the F1 motor of ATP synthase." Nature **396**(6708): 279-282.

Way, J. L. (1984). "Cyanide intoxication and its mechanism of antagonism." Annu Rev Pharmacol Toxicol **24**: 451-481.

Yamanaka, R., S. Tabata, et al. (2016). "Mitochondrial Mg(2+) homeostasis decides cellular energy metabolism and vulnerability to stress." Sci Rep **6**: 30027.

Ziviani, E. and A. J. Whitworth (2010). "How could Parkin-mediated ubiquitination of mitofusin promote mitophagy?" Autophagy **6**(5): 660-662.
Zorzano, A., M. Liesa, et al. (2010). "Mitochondrial fusion proteins: dual regulators of morphology and metabolism." Semin Cell Dev Biol **21**(6): 566-574.
Zweier, J. L., M. Chzhan, et al. (1994). "Development of a highly sensitive probe for measuring oxygen in biological tissues." J Magn Reson B **105**(1): 52-57.

ANNEXES

LISTE DE PUBLICATIONS et COMMUNICATIONS EN LIEN AVEC CE TRAVAIL

1/ Publications Scientifiques

2016

M Pelosse , **C Cottet-Rousselle**, A Grichine, I Berger , U Schlattner .
Genetically Encoded Fluorescent Biosensors to Explore AMPK Signaling and Energy Metabolism. EXS. 2016; DOI: 10.1007/978-3-319-43589-3_20

SOUMIS

S. Lablanche, **C. Cottet-Rousselle,** M.J. Richard, T. Berney**,** P.Y. Benhamou, et E. Fontaine. Metformin protects human islets of Langherans against high glucose- and fructose-induced cell death.

2015

S. Lablanche, **C. Cottet-Rousselle** L. Argaud, **,** F. Lamarche**,** P.Y. Benhamou et E. Fontaine. Respective effects of hypoxia and energy substrates deprivation on beta cell viability. **Biochim Biophys Acta. 2015** Jun-Jul;1847(6-7):629-39. doi: 10.1016/j.bbabio.2015.04.002. Epub 2015 Apr 11.PMID: 25868875

2013

F. Lamarche, C. Carcenac, B. Gonthier, **C. Cottet-Rousselle,** C. Chauvin, L. Barret, M. Savasta and E. Fontaine. PTP inhibitors protect neurons from ethanol-induced toxicity. **Chem Res Toxicol. 2013.** PMID: 23268549 doi: 10.1021/tx300395w

THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 284, NO. 22, pp. 15117–15125, May 29, 2009
© 2009 by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc. Printed in the U.S.A.

Effect of Transient and Permanent Permeability Transition Pore Opening on NAD(P)H Localization in Intact Cells*

Received for publication, February 9, 2009, and in revised form, March 30, 2009 Published, JBC Papers in Press, April 3, 2009, DOI 10.1074/jbc.M900926200

Jean François Dumas[+§1], Laurent Argaud[+§], Cécile Cottet-Rousselle[+§], Guillaume Vial[+§], Cécile Gonzalez[+§], Dominique Detaille[+§], Xavier Leverve[+§], and Eric Fontaine[+§2]

From [+]INSERM, U884, F-38041 Grenoble and the [§]Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier, F-38041 Grenoble, France

To study the effect of mitochondrial permeability transition pore (PTP) opening on NAD(P)H localization, intact cells were exposed to the Ca^{2+} ionophore A23187. PTP opening, mitochondrial membrane potential, mitochondrial volume, and NAD(P)H localization were assessed by time-lapse laser confocal microscopy using the calcein-cobalt technique, tetramethylrhodamine methyl ester, MitoTracker, and NAD(P)H autofluorescence, respectively. Concomitant with PTP opening, NAD(P)H fluorescence increased outside mitochondria. These events occurred in all cells and were prevented by cyclosporin A. Mitochondrial membrane potential was not systematically collapsed, whereas mitochondrial volume did not change, confirming that A23187 induced transient PTP opening in a subpopulation of cells and suggesting that mitochondrial swelling did not immediately occur after PTP opening in intact cells. NAD(P)H autofluorescence remained elevated after PTP opening, particularly after membrane potential had been collapsed by an uncoupler. Extraction of nucleotide for NAD(P)H quantification confirmed that PTP opening led to an increase in NAD(P)H content. Because the oxygen consumption rate decreased, whereas the lactate/pyruvate ratio increased after PTP opening in intact cells, we conclude that PTP opening inhibits respiration and dramatically affects the cytosolic redox potential in intact cells.

The permeability transition pore (PTP)[3] is a mitochondrial channel activated by matrix Ca^{2+} and inhibited by cyclosporin A (CsA) (1, 2). Although its molecular nature remains a matter of debate, the role of the PTP in cell death is now well acknowledged, especially when cell death is triggered by oxidative stress (3–5).

Under normal physiological conditions, the mitochondrial inner membrane is impermeable to almost all metabolites and ions. The compounds that enter or leave mitochondria are generally transported via specific and highly controlled carriers (6). Consequently, intra- and extramitochondrial environments are significantly different in ionic composition. PTP opening dramatically changes the properties of the inner membrane, making it unspecifically permeable to molecules smaller than 1500 Da, which thus equilibrate according to their concentration gradient (1).

In isolated mitochondria, PTP opening leads to the collapse of the protonmotive force and the release of matrix NADH (7, 8). When incubated in the standard media used with isolated organelles, PTP opening leads to mitochondrial swelling because of the presence of matrix proteins that cannot diffuse through the open pore, thus creating an oncotic pressure gradient. This oncotic pressure gradient can be eliminated by incubating mitochondria in media containing osmotic molecules larger than 1500 Da, a particular condition in which PTP opening occurs in the absence of mitochondrial swelling (9). Concomitant to this change in permeability, PTP opening in isolated mitochondria also leads to a partial inhibition of respiratory chain Complex 1 and to a dramatic increase in reactive oxygen species production (10).

It has long been recognized that PTP opening is a reversible event (11). However, not all the consequences of PTP opening are reversible. Closure of the pore restores the protonmotive force and the ionic homeostasis of compounds that are physiologically transported, whereas compounds that only diffuse through an open PTP remain either entrapped or excluded after they have entered or left mitochondria, respectively (12). Consequently, PTP closure in isolated mitochondria does not lead to mitochondrial shrinkage in sucrose- or KCl-based media (13).

PTP opening in intact cells has been visualized using compounds that do not enter mitochondria unless the PTP is open. Two different approaches with calcein have been developed. In experimental conditions where cell loading with calcein acetoxymethyl ester does not load mitochondria, calcein fluorescence is compartmentalized outside mitochondria, and PTP opening is visualized by the distribution of calcein inside mitochondria (14). In experimental conditions where calcein acetoxymethyl ester also loads mitochondria, the fluorescence from cytosolic calcein is quenched by the addition of cobalt that distributes in cells but not in mitochondria. The calcein fluorescence is then compartmentalized within mitochondria until PTP opening permits the distribution of cobalt inside mitochondria, which results in the quenching of calcein fluores-

* This work was supported by grants from INSERM, Agence Nationale de la Recherche (PTPischemia), and the Ministère de l'Enseignement de la Recherche et de la Technologie.

[1] Supported by fellowships from Nestlé and AGIR à dom.

[2] To whom correspondence should be addressed: INSERM U884, Bioénergétique Fondamentale et Appliquée – Université Joseph Fourier – BP 53, F-38041 Grenoble Cedex, France. Tel: 33-476-63-56-01; Fax: 33-476-51-42-18; E-mail: eric.fontaine@ujf-grenoble.fr.

[3] The abbreviations used are: PTP, permeability transition pore; CsA, cyclosporin A; TMRM, tetramethylrhodamine methyl ester; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; MOPS, 4-morpholinepropanesulfonic acid; AU, arbitrary units.

Downloaded from http://www.jbc.org/ at UNIV JOSEPH FOURIER-SICD 1 on October 14, 2014

Biochimica et Biophysica Acta 1847 (2015) 629–639

Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbabio

Respective effects of oxygen and energy substrate deprivation on beta cell viability

Sandrine Lablanche [a,b,c,*], Cécile Cottet-Rousselle [a,b], Laurent Argaud [d], Camille Laporte [a,b], Frédéric Lamarche [a,b], Marie-Jeanne Richard [e], Thierry Berney [f], Pierre-Yves Benhamou [a,b,c], Eric Fontaine [a,b,c]

[a] University of Grenoble Alpes, LBFA, Grenoble F-38000, France
[b] U1055, INSERM, Grenoble F-38000, France
[c] Department of Endocrinology, Grenoble University Hospital, Grenoble F-38043, France
[d] CarMeN Laboratory, U1060, INSERM, Lyon F-69373, France
[e] Cellular Therapy Unit, EFS Rhône-Alpes, Grenoble University Hospital, Grenoble, France
[f] Cell Isolation and Transplant Center, University of Geneva, Level R, 1 rue Michel Servet, Geneva 4, CH-1211, Switzerland

ARTICLE INFO

Article history:
Received 9 October 2014
Received in revised form 30 March 2015
Accepted 5 April 2015
Available online 11 April 2015

Keywords:
Permeability transition
Apoptosis
Beta cell
Ischemia–reperfusion injury

ABSTRACT

Deficit in oxygen and energetic substrates delivery is a key factor in islet loss during islet transplantation. Permeability transition pore (PTP) is a mitochondrial channel involved in cell death. We have studied the respective effects of oxygen and energy substrate deprivation on beta cell viability as well as the involvement of oxidative stress and PTP opening. Energy substrate deprivation for 1 h followed by incubation in normal conditions led to a cyclosporin A (CsA)-sensitive-PTP-opening in INS-1 cells and human islets. Such a procedure dramatically decreased INS-1 cells viability except when transient removal of energy substrates was performed in anoxia, in the presence of antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) or when CsA or metformin inhibited PTP opening. Superoxide production increased during removal of energy substrates and increased again when normal energy substrates were restored. NAC, anoxia or metformin prevented the two phases of oxidative stress while CsA prevented the second one only. Hypoxia or anoxia alone did not induce oxidative stress, PTP opening or cell death. In conclusion, energy substrate deprivation leads to an oxidative stress followed by PTP opening, triggering beta cell death. Pharmacological prevention of PTP opening during islet transplantation may be a suitable option to improve islet survival and graft success.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Islet transplantation is a treatment to be considered for selected type 1 diabetic patients. The amount of engrafted islets is essential for islet transplantation success, but unfortunately, 50–70% of the transplanted islets are lost in the early post transplant period [1]. Among factors responsible for poor islet graft, islet exposition to the ischemia–reperfusion (I/R)[7] phenomenon is important to consider. Normally, pancreatic islets have a dense glomerular-like capillary network that is ideal for the delivery of oxygen and nutrients [2,3]. During the isolation process and in vitro culture, islets vasculature dedifferentiates or degenerates [4,5]. Immediately after transplantation into the portal vein (i.e., after embolization in a capillary), islets are supplied with oxygen and nutrients only by diffusion from the surrounding tissues. The revascularization process is initiated within a few days, and islets are generally thought to be fully revascularized by 15 days post transplant [6,7]. Meanwhile, islets inevitably endure some restrictions in oxygen and nutrients.

Tissue ischemia is characterized by severe hypoxia, acidosis, energy depletion and cell death. Excessive oxidative stress is well accepted as an important component of I/R injury [8]: Reactive oxygen species (ROS) production begins early in ischemia and is followed by a large burst of oxidative stress during the first few minutes of reperfusion [9–11]. Although many details regarding the sources and targets of oxidant stress during I/R injury are not known, a consensus as regards the importance of ROS in I/R injury has emerged, based on studies showing cell death protection during I/R by pretreatment with antioxidants [12,13].

Other studies involved the mitochondrial permeability transition pore (PTP) in I/R-induced cell death. The PTP is a Ca^{2+}-sensitive mitochondrial inner membrane channel, which, on opening, causes cell death [14,15]. Normally closed in order to allow ATP synthesis, permanent PTP opening leads to a drastic ATP synthesis inhibition through the collapse of the proton-motive force, a dramatic increase in ROS production [16,17] and a release of mitochondrial pro-apoptotic proteins (cytochrome *c* or AIF) [18], which results in cell death [19,20]. It has been proposed that PTP remains closed during ischemia and only opens with reperfusion [21] when the conditions for its opening are present: ROS production, high mitochondrial [Ca^{2+}], adenine

* Corresponding author at: U1055, INSERM, Biodénergétique Fondamentale et Appliquée, Université Joseph Fourier, BP 53, Grenoble Cedex F-38041, France. Tel.: +33 476 63 56 01; fax: +33 476 51 42 18.
E-mail address: slablanche@chu-grenoble.fr (S. Lablanche).

http://dx.doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.04.002
0005-2728/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

Résumés

La mitochondrie est un carrefour d'informations au centre du fonctionnement cellulaire puisque son rôle physiologique consiste à récupérer l'énergie fournie par la dégradation des produits issus de notre alimentation pour la transformer en ATP, par le processus d'oxydation phosphorylante. Cependant, des altérations du fonctionnement de la mitochondrie peuvent être responsables de nombreuses pathologies. Parmi les stress métaboliques pouvant entraîner un dysfonctionnement mitochondrial, l'ischémie-reperfusion est un phénomène présent également dans de nombreuses situations pathologiques. L'objectif de ce travail consiste à développer une approche méthodologique basée sur la microscopie confocale et l'analyse d'images afin de décortiquer les conséquences cellulaires des stress métaboliques induits lors d'épisodes de privation de substrats associée ou non à une privation partielle ou totale d'oxygène. Après avoir mis au point le programme d'analyse d'images basée sur la méthode du « tophat », deux approches ont été développées pour visualiser et quantifier la fonction mitochondriale. La première, qui combine le marquage du TMRM et l'autofluorescence du NADH, a permis de mettre en évidence des différences de réponses au stress d'ischémie-reperfusion au niveau de la chaîne respiratoire ou de l'ouverture du PTP pour les quatre types cellulaires testés : HMEC-1, INS1, RT112 ou hépatocytes primaires. La seconde approche a consisté à tester l'utilisation de biosenseurs permettant de suivre les variations de concentration d'ATP (ATeam) ou d'activation de l'AMPK (AMPKAR). Les conditions expérimentales réalisées dans ce travail n'ont pas permis de valider leur utilisation.

Title : Measure by confocal microscopy of the mitochondrial metabolism and energy level of cells exposed to episodes of deprivation in substrata and/or in oxygen.

Mitochondria form an information hub at the center of the cellular metabolism because of its physiological role consisting in the production of ATP from the degradation of products stemming from our food through the OXPHOS process. However, changes in the functioning of the mitochondria can be responsible for numerous diseases. Among the different forms of metabolic stress leading to mitochondrial dysfunctions, ischemia-reperfusion can be found in numerous pathological situations.

This work aims at developing a methodological approach based on confocal microscopy and image analysis to dissect -at cell level- the consequences of metabolic stress induced by episodes of deprivation in substrata associated or not with hypoxia or anoxia.

Having developed the program of image analysis based on the « tophat » method, two approaches were designed to visualize and quantify the mitochondrial function. The first one, combining TMRM labelling with NADH autofluorescence made it possible to highlight some differences in the response to the stress caused by ischemia-reperfusion at the level of the respiratory chain or concerning the PTP opening in the four cellular types that were tested: HMEC-1, INS1, RT112 or primary hepatocytes. The second approach consisted in testing the use of biosensors designed to follow the variations of ATP concentration (ATeam) or the activation of AMPK (AMPKAR). The experimental conditions established in this work did not allow us to validate their use.

Mots-Clés : mitochondrie, chaîne respiratoire, PTP, TMRM, NADH, ATeam, AMPKAR, microsocpie confocale, analyse d'images.

Keywords : mitochondria, OXPHOS, PTP opening, TMRM, NADH, ATeam, AMPKAR, confocal microscopy, image analysis.