



HAL
open science

Développement de nouvelles méthodes de microscopie et d'électrochimie pour des analyses multi-paramétriques de mitochondries individuelles cardiaques

Camille Colin

► **To cite this version:**

Camille Colin. Développement de nouvelles méthodes de microscopie et d'électrochimie pour des analyses multi-paramétriques de mitochondries individuelles cardiaques. Autre. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0149 . tel-03116368

HAL Id: tel-03116368

<https://theses.hal.science/tel-03116368v1>

Submitted on 20 Jan 2021

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.

Thèse présentée
Pour obtenir le grade de docteur de
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École Doctorale
Des Sciences Chimiques
Par **Camille COLIN**

**DÉVELOPPEMENT DE NOUVELLES MÉTHODES DE
MICROSCOPIE ET D'ÉLECTROCHIMIE POUR DES
ANALYSES MULTI-PARAMÉTRIQUES DE MITOCHONDRIES
INDIVIDUELLES CARDIAQUES**

Sous la direction de Stéphane ARBAULT
et de Philippe DIOLEZ

Soutenue le 08/10/2020

Membres du jury :

Mme. PLANAT-BENARD, Valérie	Maître de conférences Université de Toulouse	Rapporteur
M. LEMAITRE, Frédéric	Maître de conférences Sorbonne Université	Rapporteur
Mme. DEVIN, Anne	Directeur de Recherche CNRS Université de Bordeaux	Examineur
Mme. ERARD Marie	Professeur des universités Université Paris Sud	Président
M COGNET Laurent	Directeur de Recherche CNRS Université de Bordeaux	Invité
M. ARBAULT Stéphane	Directeur de Recherche CNRS Université de Bordeaux	Directeur de thèse
M. DIOLEZ Philippe	Chargé de Recherche CNRS Université de Bordeaux	Directeur de thèse

Pour ma mère, partie trop tôt...

Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier tous les membres de mon jury, merci à Valérie Planat-Bénard et Frédéric Lemaître d'avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse. Merci également aux autres membres du jury, Anne Devin, Marie Erard, et Laurent Cognet de participer à l'évaluation de ce travail en tant qu'examineurs. Je vous suis reconnaissant de prendre du temps pour évaluer mon travail.

Je tiens également à vous remercier Stéphane, ou « chef » comme j'aime à vous appeler, merci pour votre soutien tout au long de cette thèse et votre disponibilité permanente. A vos côtés j'ai énormément appris sur le monde de la recherche mais également sur moi-même. Votre calme à toute épreuve a été d'un grand réconfort lors des nombreuses périodes de doute qu'un étudiant en thèse peut traverser. Je me rappellerai avec plaisir nos nombreuses discussions et vos conseils dispensés autours du tableau blanc du laboratoire.

Merci à vous aussi Philippe, de m'avoir accompagné tout au long de mon doctorat. Merci pour vos nombreuses explications sur le fonctionnement mitochondrial et de m'avoir inculqué votre rigueur scientifique, que je n'oublierai jamais.

Manu, je tiens à te remercier énormément pour ton aide plus que précieuse pendant cette troisième année sur le plan technique mais surtout sur la compréhension de la thermodynamique, je n'oublierai jamais ces fameuses deux semaines intensives, pendant lesquelles je t'ai harcelé de questions pour arriver à déchiffrer le livre « bioenergetics ». Un grand merci pour ta patience, ton écoute et ta bonne humeur. Merci également pour ces nombreux apéros et repas, qui m'ont bien aidé à relâcher la pression. J'ai adoré travailler avec toi et j'espère qu'on aura l'occasion de réitérer l'expérience.

Dans mon cas, la thèse a eu un impact important dans ma vie personnelle. J'ai souvent ramené à la maison, les joies et les frustrations des expériences et sans le soutien de ma chère et tendre, ce chapitre de ma vie aurait été bien plus difficile. Un grand merci à ma compagne, de partager ma vie, de m'avoir supporté pendant ce doctorat et d'avoir écouté mes longs monologues (souvent plaintifs) sur mes expériences et mes scripts informatiques, merci pour tout.

Merci également à Audrey et Emma pour avoir préparé les mitochondries et donc d'avoir participé à la bonne réalisation de ce travail de thèse. Sans votre aide je n'aurais sans doute pas pu réaliser toutes ces expériences, merci pour le temps que vous m'avez consacré.

Ce doctorat aura été une formidable expérience humaine et j'ai eu la chance d'avoir des collègues, des fidèles compagnons d'aventures auprès de moi, alors un grand merci à Top, à Roberto et surtout Jerry et Alice pour ces nombreuses « guys night » où nous avons pu cuisiner ensemble autours de pintes de Chouffe, en refaisant le monde. Ces moments de pause font partis des meilleurs souvenirs que je garde de ma thèse.

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui ont participé d'une façon ou d'une autre à ce travail de thèse. Je pense notamment à Bertrand, Patrick et Véronique qui m'ont bien aidé à résoudre les petits problèmes de matériels et d'appareils. Merci aussi à Stéphane Réculusa, pour ton aide avec mes nombreux déboirs informatiques.

Développement de nouvelles méthodes de microscopie et d'électrochimie pour des analyses multi-paramétriques de mitochondries individuelles cardiaques

L'importance de la mitochondrie dans la gestion de l'énergie cellulaire, d'un point de vue physiologique (contraction cardiaque, etc) ou pathologique (cancer, Alzheimer, etc) n'est plus à démontrer. Dans le contexte de la contraction cardiaque, qui est un processus fortement ATP-dépendant, l'intervention exacte de la mitochondrie reste aujourd'hui sujet à débat. Une hypothèse avance que la mitochondrie ne voit qu'un faible pourcentage (1%) du flux calcique nécessaire à la contraction, une autre hypothèse propose que la mitochondrie, qui produit 90% de l'ATP cellulaire, est activée par ce flux calcique à chaque contraction pour répondre à la demande énergétique. Un élément de réponse pourrait être l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP), qui est principalement activé par le calcium. Si ce pore non spécifique est principalement connu pour son ouverture pathologique, notamment dans l'ischémie-reperfusion en déclenchant l'apoptose, c'est son mode d'ouverture physiologique qui serait important dans ce contexte cardiaque en jouant un rôle crucial dans la gestion des flux calciques mitochondriaux. Cependant, ce mode d'ouverture est encore peu caractérisé, notamment car les techniques utilisées reposent bien souvent sur le suivi moyen de large population mitochondriales, or de plus en plus d'études montrent l'existence de sous populations mitochondriales au sein d'une même cellule, présentant des différences d'activités entre elles. L'objectif de cette étude était de développer des nouvelles méthodes d'analyse, afin de pouvoir suivre les variations d'activités des populations mais surtout, de pouvoir analyser les mitochondries individuellement. En utilisant ces méthodes, des études des ouvertures physio-pathologiques du mPTP dans le contexte de contraction cardiaque peuvent être menées.

La première approche que j'ai développée est basée sur la microscopie optique, elle se compose de trois grandes étapes : 1) traitement des images de microscopie, 2) identification des mitochondries et leur suivi dans le temps, 3) analyses informatiques. La deuxième approche a été basée sur l'électrochimie, elle repose sur une détection simultanée de la consommation d'oxygène mitochondriale et du taux de réduction des quinones de la chaîne respiratoire. Pour caractériser ces méthodes, nous avons dans un premier temps suivi les états bioénergétiques mitochondriaux classiques. Nous avons ainsi montré une grande variété de réponses avec l'observation de deux sous-populations mitochondriales de tailles distinctes. Puis, dans un deuxième temps nous avons utilisé la microscopie de fluorescence pour suivre sur mitochondrie unique, des variations transitoires du potentiel de membrane que l'on relie aux ouvertures du mPTP. Nous avons ainsi confirmé que l'activation du mode d'ouverture pathologique peut être induit par un front de concentration de calcium, et est inhibé par la cyclosporine A (CsA). Surtout, nous avons observé des ouvertures transitoires du mPTP, activé également par le calcium mais également par la photo-illumination, en revanche dans notre étude ce mode d'ouverture n'est pas inhibé par la CsA ce qui suggère d'un mécanisme différent.

Mots clés : mitochondrie ; cardiomyocyte ; mPTP, objets uniques ; microscopie de fluorescence ; sondes fluorescentes ; potentiel de membrane ; électrochimie ; quinones ; respiration mitochondriale ; développement méthodologique.

Development of new microscopy and electrochemistry methods for multi-parametric analyses of individual cardiac mitochondria

The importance of mitochondria in the regulation of cellular metabolism, from physiological (cardiac contraction, etc.) or pathological (cancer, Alzheimer's, etc.) processes are well established. In the context of heart contraction, which is a highly ATP-dependent process, the exact intervention of the mitochondrion remains a subject of debate today. One hypothesis suggests that the mitochondria see only a small percentage (1%) of the calcium flow necessary for contraction, while another hypothesis suggests that the mitochondria, which produce 90% of cellular ATP, are activated by this calcium flow at each contraction to supply energy demand. Part of the answer may be in the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), which is mainly activated by calcium. If this non-specific pore is well described for its pathological opening, notably in ischemia-reperfusion by triggering apoptosis, this is its physiological opening mode which would be important in the cardiac context by playing a crucial role in the control of mitochondrial calcium flows. However, this mode of opening is still weakly characterized, in particular because the techniques used are often based on the average monitoring of large mitochondrial populations. However, more and more studies show the existence of mitochondrial subpopulations within a cell, with differences in activities between them. The objective of this study was to develop new methods of analysis, in order to be able to follow the variations of activities of the populations but especially, to be able to analyze individual mitochondria. By Based on these methods, we could study the patho-physiological openings of mPTP in the context of heart contraction was conducted.

The first approach that I developed is based on optical microscopy, it consists of three main steps: 1) processing of microscopy images, 2) identification of mitochondria and their monitoring them over time, 3) data analyses. The second approach was based on electrochemistry, we performed a simultaneous detection of mitochondrial oxygen consumption and the reduction rate of quinones of the respiratory chain. To characterize these methods, we first followed the classical mitochondrial bioenergetic states. We have thus shown a wide variety of responses with the observation of two mitochondrial subpopulations of distinct sizes. Then, in a second step, we used fluorescence microscopy to follow, at the single mitochondrion level, transient variations in the membrane potential that we connect to the openings of the mPTP. We have thus confirmed that the activation of the pathological opening mode can be induced by a calcium concentration transient, and is inhibited by cyclosporin A (CsA). Strikingly, we observed transient openings of mPTP, activated also by calcium and by photo-illumination as well, however in our study this mode of opening is not inhibited by CsA which suggests a different mechanism.

Keywords: mitochondria; cardiomyocyte; mPTP, unique objects; fluorescence microscopy; fluorescent probes; membrane potential; electrochemistry; quinones; mitochondrialmitochondrial respiration; methodological development

Communications Scientifiques

I. Articles

Salinas, G.; Dauphin, A.; **Camille Colin**; Villani, E.; Arbault, S.; Bouffier, L.; Kuhn, A. Chemo- and "Magnetotaxis of Self-propelled Light Emitting Chemo-electronic Swimmers". *Angew. Chem.* 2020, ange.201915705. <https://doi.org/10.1002/ange.201915705>.

Emmanuel SURANITI, **Camille COLIN**, Emma ABELL, Philippe DIOLEZ, Stéphane ARBAULT. "Electrochemical monitoring of quinone redox status in cardiac mitochondria", 2020, en cours de finalisation.

Camille COLIN, Emmanuel SURANITI, Emma ABELL, Audrey SÉMONT, Neso SOJIC, Philippe DIOLEZ, Stéphane ARBAULT. "Single particle-tracking method in fluorescence microscopy to monitor bioenergetic responses of individual mitochondria", *Methods in Molecular Biology*; Springer New York, NY, 2020. En cours de parution.

Bachar Tarraf, Michael Leguèbe, Yves Coudière, Emmanuel Suraniti, **Camille Colin**, Stéphane Arbault, Philippe Diolez. "Global Sensitivity Analysis for Uncertain Parameters Applied to a Cardiac Mitochondrial Model", *Computing in Cardiology*, 2020. En cours de parution.

II. Congrès nationaux et internationaux

Journée de l'école doctorale de chimie, 2018, France

Poster : Fluorescence Microscopy of Individual Mitochondria from Cardiomyocytes Monitoring the mPTP opening

Young Scientists Symposium, 2018, France

Présentation orale : Large-scale analyses of PTP dynamics on individual mitochondria

European Bioenergetics Conference (EBEC), 2018, Budapest, Hongrie

Poster : Large-scale analysis of Transient PTP opening on individual mitochondria

Groupe français de bioélectrochimie (GFB), 2018, Sète, France

Poster : Utilisation d'un plasma à air pour l'activation d'électrodes de carbone vitreux

Présentation orale : Analyse multiparamétrique de la bioénergétique de mitochondries cardiaques individuelles avec les microsystèmes « OptoElecWell »

Young Scientists Symposium, 2019, France

Présentation orale : Large-scale analyses of PTP dynamics on individual mitochondria

Journées d'Electrochimie, 2019, Toulouse, France

Poster : Utilisation d'un plasma à oxygène pour l'activation d'électrodes de carbone vitreux

Groupe français de bioénergétique (GFB), 2019, Autrans, France

Poster : Electrochemical monitoring of the quinone redox status on isolated cardiac mitochondria

Présentation orale : Multiparametric study of mitochondrial activity in relation to the cardiac contraction

TABLE DES MATIERES

Remerciements	4
Communications Scientifiques	9
TABLE DES MATIERES	11
Liste des abréviations	17
INTRODUCTION GENERALE	19
I. Contraction-relaxation cardiaque et calcium	20
a) La cellule cardiaque.....	20
b) Contraction	22
c) Relaxation	25
II. Mitochondrie et phosphorylation oxydative.....	25
a) Structure d'une mitochondrie	25
b) La chaine respiratoire	26
c) Modulation de la chaine respiratoire	30
III. Mitochondrie et calcium.....	31
a) Calcium et métabolisme mitochondrial.....	32
b) Le rôle de la mitochondrie dans le cycle contraction-relaxation : deux modèles proposés	34
i. Premier modèle	34
ii. Deuxième modèle	37
c) L'entrée du calcium.....	39
d) La sortie du calcium	42
IV. Projet ANR « MITOCARD »	43
MATERIELS ET METHODES	52
I. Matériels.....	53
a) Produits chimiques.....	53
b) Appareils	54
c) Autres.....	55

II.	Méthode	55
a)	Préparation des mitochondries	55
i.	Extraction du cœur de rat	55
ii.	Extraction des mitochondries	56
iii.	Quantification des mitochondries	56
b)	Analyses par microscopie optique	56
i.	Préparation des mitochondries	56
ii.	Suivi des états stationnaires bioénergétiques	57
iii.	Suivi de la dépolarisation mitochondriale	57
iv.	Traitement des images de microscopie	57
v.	Utilisation du module « TrackMate » de Fiji	58
vi.	Script « Python »	58
c)	Analyses électrochimiques	59
CHAPITRE I : NOUVELLE METHODE DE SUIVI INDIVIDUEL ET ANALYSES DE MITOCHONDRIES CARDIAQUES		60
I.	Introduction : méthodes d'analyses des mitochondries par microscopie	61
a)	Le potentiel de membrane interne mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)	62
b)	Le couple NADH/NAD ⁺	65
c)	Analyse automatisée des signaux	66
d)	Objectifs	68
II.	Principe du système d'analyse	69
a)	Principe de l'expérience	69
b)	Traitement des images de microscopie	71
c)	Suivi individuel des mitochondries	73
i.	ImageJ-Trackmate	73
ii.	Solution informatique à l'aide du langage de programmation « Python »	75
III.	Suivi du déplacement des mitochondries sur différents supports	76
a)	Premières observations	76
b)	Choix du support et chimie de surface	79
c)	Principe de l'expérience	81

d)	Résultats et discussions	81
i.	Déplacement moyen.....	81
ii.	Intervalles de déplacement	82
iii.	Nombre de mitochondries immobilisées.....	84
iv.	Conséquence sur la réponse en fluorescence	87
e)	Conclusions	89
IV.	Analyses des états stationnaires mitochondriaux.....	90
a)	Principe de l'expérience : Analyse du potentiel de membrane (TMRM) et NADH sur des populations mitochondriales.....	90
b)	Résultats et discussions	91
i.	Suivi multiparamétrique au spectrofluorimètre.....	91
ii.	Etats stationnaires en microscopie.....	92
iii.	Réponse moyenne et variabilité de réponse de la population.....	94
iv.	Distribution des intensités de fluorescence	97
v.	Analyse de la taille des mitochondries observées.....	100
vi.	Rapport des intensités de fluorescence entre états bioénergétiques	103
vii.	Tentative de mesure du potentiel de membrane ($\Delta\Psi_m$) de chaque mitochondrie.....	106
V.	Conclusions	108
CHAPITRE II : OBSERVATION DE DEPOLARISATIONS TRANSITOIRES MITOCHONDRIALES ET PREMIERES CARACTERISATIONS : LIEN AVEC LE PORE DE TRANSITION DE PERMEABILITE MITOCHONDRIAL		
113		
I.	Le pore de transition de perméabilité mitochondrial.....	114
a)	Historique et premières caractérisations	114
b)	Structure du mPTP	115
i.	ANT/VDAC.....	115
ii.	ATP synthétase.....	116
c)	Régulateurs	117
d)	Ischémie reperfusion :	119
e)	Ouverture physiologique :	121
f)	Problématique et objectifs.....	125

g)	Principe de l'expérience.....	126
II.	Suivi de l'ensemble de la population	126
a)	Condition contrôle	128
b)	Ajout de calcium	128
c)	Pré-incubation avec la cyclosporine A.....	130
d)	Fluorescence totale de la population mitochondriale pour le TMRM et le NADH	132
e)	Biais expérimentaux.....	135
f)	Visualisation de dépolarisations transitoires du potentiel membranaire....	138
g)	Parallèle avec le chapitre I : Observations d'ouvertures transitoires lors du suivi des états stationnaires bioénergétiques.	141
III.	Méthode de détection et de classification des dépolarisations transitoires du potentiel de membrane	143
a)	Classification des dépolarisations transitoires du potentiel membranaire	143
b)	Méthode de détection automatisée des différents types.....	147
i.	Détection des Type-3	147
ii.	Détection des Type-2	148
iii.	Détection des Type-1	149
iv.	Détection des Type-0	153
IV.	Caractérisations préliminaires des dépolarisations transitoires du potentiel de membrane	154
a)	Acquisition longue et temporalité des différents types	154
i.	Type-3	154
ii.	Suivi de l'évolution des type-2.....	158
iii.	Suivi de l'évolution des type-1.....	161
iv.	Intégration des différents types.....	163
v.	Bilan des acquisitions longues et premières conclusions.....	164
b)	Acquisition courte et caractérisation des dépolarisations transitoires....	167
i.	Difficulté de l'analyse des dépolarisations de type-1.....	168
ii.	Première caractérisation des amplitudes des dépolarisations (de type-1) pour la condition contrôle.....	171

iii.	Effet photo toxique d'une acquisition courte.....	172
c)	Conclusions et perspectives.....	173
CHAPITRE III : SUIVI DU TAUX DE REDUCTION DES QUINONES PAR ELECTROCHIMIE, EN ASSOCIATION AVEC L'OXYGRAPHIE		179
I.	Introduction : Les quinones mitochondriales	180
a)	Définition et différents types.....	180
b)	Rôle dans la CR.....	182
c)	Théories du transport d'électrons dans la chaîne respiratoire	185
i.	Modèle diffusionnel.....	185
ii.	Supercomplexes.....	186
iii.	Différents réservoirs de quinones.....	187
d)	Analyses de l'état rédox des quinones	187
i.	Analyse statistique par extraction	188
ii.	Analyse dynamique électrochimique	188
e)	Objectifs	190
f)	Principe du système d'analyse	192
i.	Matériels expérimentaux.....	192
ii.	Chronoampérométrie	194
iii.	Suivi de la respiration mitochondriale.....	195
iv.	Suivi du taux de réduction des quinones.....	196
II.	Résultats et discussion	198
a)	Premiers essais du suivi du taux de réduction des quinones en présence de succinate et de roténone	199
b)	Points expérimentaux	201
i.	Choix de la concentration du médiateur rédox et impact sur la respiration	201
1)	Concentration en Q ₂ et courants mesurés.....	201
2)	Ajout successif de quinone.....	203
ii.	Reproductibilité de l'expérience.....	204
1)	Répétabilité au sein d'une même expérience.....	204
2)	Reproductibilité inter-expérience	206

|

c)	Comparaison des différents substrats	207
i.	Glutamate et malate	207
ii.	Glutamate, malate et succinate.....	208
iii.	Comparaison des conditions.....	210
iv.	Relation entre le taux de réduction des quinones et l'activité de la CR..	212
d)	Conclusion.....	213
III.	Perspectives d'études et expériences préliminaires.....	214
a)	Séquences multi-étapes d'activation-inhibition de la CR.....	214
b)	Suivi à l'échelle microscopique du taux de réduction des quinones.....	215
	CONCLUSIONS GENERALES.....	221
	ANNEXES.....	226

Liste des abréviations

ΔG : Energie libre de Gibbs

Δp : Force proto motrice

$\Delta\phi_m$: Potentiel de membrane

ADP : Adénosine diphosphate

ATP : Adénosine triphosphate

I : Courant (A)

IP3R : Inositol trisphosphate 3

MCU : Mitochondrial calcium uniporter

NADH : Nicotinamide adénine dinucléotide

PA : Potentiel d'action

Pi : Phosphate inorganique

PTP : Pore de transition de perméabilité mitochondrial

RyR : Récepteurs de la ryanodine

SERCA : Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase

SR : Réticulum sarcoplasmique

TMRM : Tetramethylrhodamine, Methyl Ester Perchlorate

Tnl : Troponine I

VDAC : Canal dépendant du potentiel

VSL : Voltage-sensitive L-type Ca^{2+} channels

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

I. Contraction-relaxation cardiaque et calcium

a) La cellule cardiaque

Durant ma thèse, nous avons exclusivement travaillé sur des mitochondries d'origine cardiaque. Pour pleinement comprendre et étudier leur fonctionnement, il est important de connaître le contexte cellulaire, c'est-à-dire au sein des cardiomyocytes, et notamment au cours du cycle contraction-relaxation cardiaque (Donald M Bers 2008).

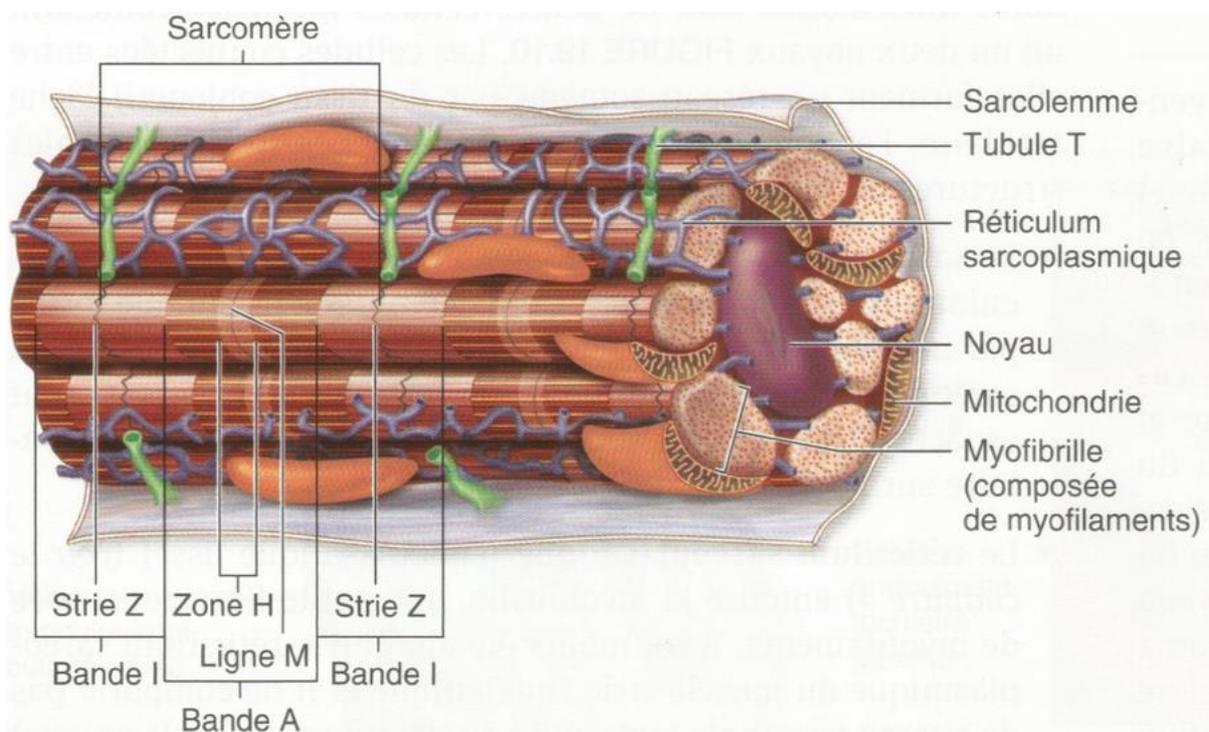


Figure 1 : Schéma d'un cardiomyocyte. Issu du livre, Anatomie et physiologie : une approche intégrée de Michael P McKinley et al 2014.

Le tissu cardiaque ou myocarde est classé comme un muscle strié, tout comme le muscle squelettique. Cette dénomination vient de la structure des fibres musculaires qui le composent et qui comportent une organisation longitudinale en stries, comme on peut le voir dans la figure 1. Ces fibres musculaires sont des cellules ramifiées contenant un ou deux noyaux, connectées entre elles. Au sein de ces cellules, on va retrouver différents composants :

Tout d'abord, des **myofilaments** composés de myofibrilles en grand nombre et parallèles entre eux, s'étendant sur toute la longueur de la cellule. C'est l'élément le plus représenté et qui correspond à 50-60% du volume cellulaire. Chaque myofibrille est constituée d'une succession d'unités de base : les **sarcomères**, chaque unité étant délimitée par une strie Z. C'est le raccourcissement de cette unité de base qui permet la contraction du muscle (en hydrolysant de l'ATP, fourni par les mitochondries) et va résulter en l'éjection du sang au sein du coeur, puis vers le système vasculaire. Pour ce faire, ces sarcomères sont constitués de deux filaments : un filament épais de **myosine** et un plus fin **d'actine**, qui vont se déplacer l'un par rapport à l'autre entraînant le raccourcissement.

Comme pour n'importe quelle cellule, on va retrouver également une membrane cellulaire appelée ici le **sarcolemme**. Celle-ci, à la différence des autres membranes, va présenter des invaginations qui forment des « **tubules T** », qui plongent au sein de la cellule et permettent de mettre en contact le milieu extracellulaire avec l'intérieur de la cellule et plus précisément avec le **réticulum sarcoplasmique (SR)**.

Le SR entoure les myofibrilles et va jouer un rôle prédominant dans la contraction cardiaque, en modulant la concentration calcique cytosolique puisqu'il sert de réserve importante de ce cation. Le SR représente 10% du volume cellulaire (Lionel L Opie et al 2004).

Autre organe très important ici, qui est au cœur de ma thèse : la **mitochondrie** qui constitue 30% du volume cellulaire. Celle-ci est divisée en deux catégories au sein de la cellule cardiaque en fonction de sa localisation : il y a les mitochondries **intra-fibrillaires** qui, comme leur nom l'indique, sont situées au sein des fibres, c'est-à-dire plus profondément dans la cellule et qui représentent la majorité de la population mitochondriale et les mitochondries **subsarcolemmales** qui sont, elles, à proximité immédiate de la membrane cellulaire et du SR. Hormis leur localisation, des différences fonctionnelles ont été trouvées entre ces deux sous-populations mitochondriales, notamment dans le muscle squelettique (Ferreira Rita et al 2010).

COMPOSITION AND FUNCTION OF VENTRICULAR CELL		
Organelle	Percentage of cell volume	Function
Myofibril	≈50-60	Interaction of thick and thin filaments during contraction cycle
Mitochondria	16 in neonate 33 in adult rat 23 in adult man	Provide ATP chiefly for contraction
T-system	≈1	Transmission of electrical signal from sarcolemma to cell interior
SR	10 in neonate 2 in adult	Takes up and releases Ca ²⁺ during contraction cycle
SR terminal cisternae	0.33 in adult	Site of calcium storage and release
Rest of network of SR	Rest of volume	Site of calcium uptake en route to cisternae
Sarcolemma	Very low	Control of ionic gradients, channels for ions (action potential), maintenance of cell integrity, receptors for drugs and hormones
Nucleus	≈3	Transcription
Lysosomes	Very low	Intracellular digestion and proteolysis
Sarcoplasm (= cytoplasm) (includes myofibril but not mitochondria or SR)	60-65	Cytosolic volume within which [Ca _i] _i rises and falls

Tableau 1 : liste des éléments et structures constituant un cardiomyocyte et leurs fonctions. Issu du livre Braunwald's Heart Disease A Textbook of Cardiovascular Medicine, Lionel H Opie et Donald M Bers et al 2014.

Le cycle de contraction/relaxation du cœur se passe en deux grandes étapes avec un effecteur principal : le calcium. Dans cette introduction nous nous intéresserons à lui seulement pour son rôle crucial dans le déclenchement du processus de contraction musculaire dans le cœur (même s'il intervient dans tous les autres muscles).

b) Contraction

La contraction commence par un potentiel d'action (PA) qui est initié par le nœud sinusal (situé dans l'oreillette droite du cœur), ce PA va se propager le long des membranes des cellules conduisant à leur dépolarisation. Cela va entraîner l'entrée de calcium depuis l'espace extracellulaire, qui constitue une réserve très importante de cet ion à une concentration de 1-2 mM (Claire J. Fearnley et al 2011). Cependant, l'intégralité de ce calcium n'entre pas mais seulement une fraction, à savoir 10 à 20 μM (Weilong Yuan et al 1996) pour une concentration cytosolique basale de 100 nM (Shi-Qiang Wang et al 2001). Ce processus d'entrée est réalisé par plusieurs canaux, dont l'acteur principal est le canal au Ca²⁺ dépendant du potentiel de type L ou « voltage-sensitive L-type Ca²⁺ channels » (VSL). Ce flux de calcium entrant représente 25% du total du calcium cytosolique (figure 2).

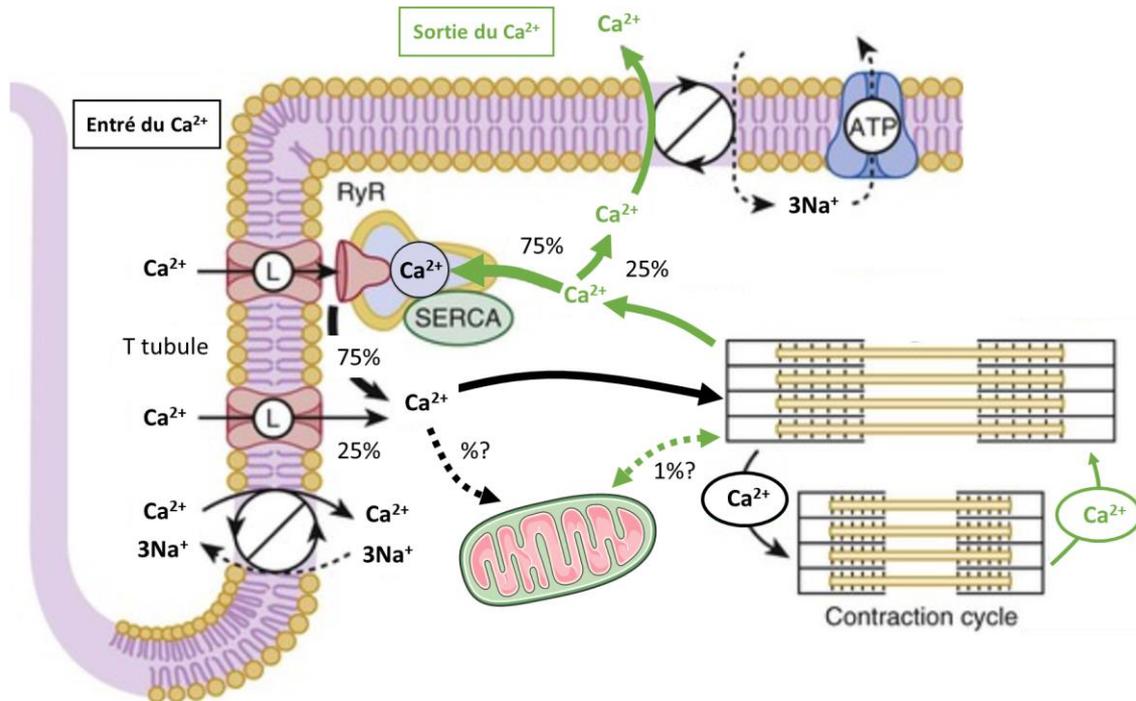


Figure 2 : Schéma des flux calciques au sein d'un cardiomyocyte et pourcentage du flux total que cela représente pendant la contraction (flèches noires) et pendant la relaxation (flèches vertes). Valeurs des pourcentages déterminés chez l'Homme. Figure modifiée à partir de celle de Opie LH et al 2004 et Bers DM et al 2002.

Comme on peut le voir sur la figure 2, cette entrée est localisée au niveau des T-tubules, qui représentent des zones d'invagination du sarcolemme. En effet, cet endroit est le lieu de jonction privilégié entre le sarcolemme et le SR, qui sert de réserve interne du calcium. Quand celui-ci entre dans la cellule (en moins d'une milliseconde) cela va créer localement un gradient très important qui va permettre l'activation des récepteurs de la ryanodine (RyRs) du SR (Martin D.Bootman et al 2011). On retrouve au niveau de ces jonctions des clusters de récepteurs avec environ 10-25 VSL pour 100 à 200 RyRs (Bers et al 2005). Ces derniers, une fois activés, vont permettre le relargage du calcium stocké au sein du SR (Martin D.Bootman et al 2011), ce flux de sortie du calcium du SR représente 75% du calcium cytosolique final, soit 200 à 400 μM .

Cette libération va permettre d'amplifier le signal calcique entrant par les VSL, c'est le phénomène de « calcium induced calcium release » (Fabiato A et al 1983). Cette libération massive va ensuite venir diffuser dans le cytosol ce qui va faire diminuer la concentration locale calcique (dans la zone de microcontact SR et sarcolemme) à cause du pouvoir tampon du cytoplasme. Pour pallier à cela, il existe un synchronisme dans la libération du calcium au niveau de toutes les jonctions pour augmenter significativement la concentration cytosolique (Cheng H and Lederer 2008).

Cette forte concentration de calcium cytosolique va ensuite diffuser jusqu'au système contractile, c'est-à-dire les sarcomères et plus précisément au niveau de l'actine sur les complexes de la troponine C, I et T ; ceux-ci sont des éléments régulateurs de la contraction des myofilaments. La liaison du calcium à la troponine C va entraîner une modification structurale du complexe, TnI va se retirer du site d'actine où il était fixé, levant ainsi son inhibition (figure 3). Ceci libère de nouveaux sites d'actine permettant aux têtes de myosine de se fixer.

Ce démasquage va permettre aux têtes de myosine (qui sont aux repos couplées à de l'ADP et du phosphate inorganique) de se lier à l'actine. Après liaison, l'ADP et le Pi vont partir, entraînant un changement de conformation de la myosine, puis le raccourcissement des sarcomères et donc la contraction. La liaison d'une molécule d'ATP va ensuite entraîner une dissociation de la tête de myosine sur l'actine. Pour finir, l'hydrolyse de l'ATP va alors permettre à la tête de myosine de revenir dans sa configuration initiale. (Parmacek and Solaro 2004 ; Claire J. Fearnley et al 2011).

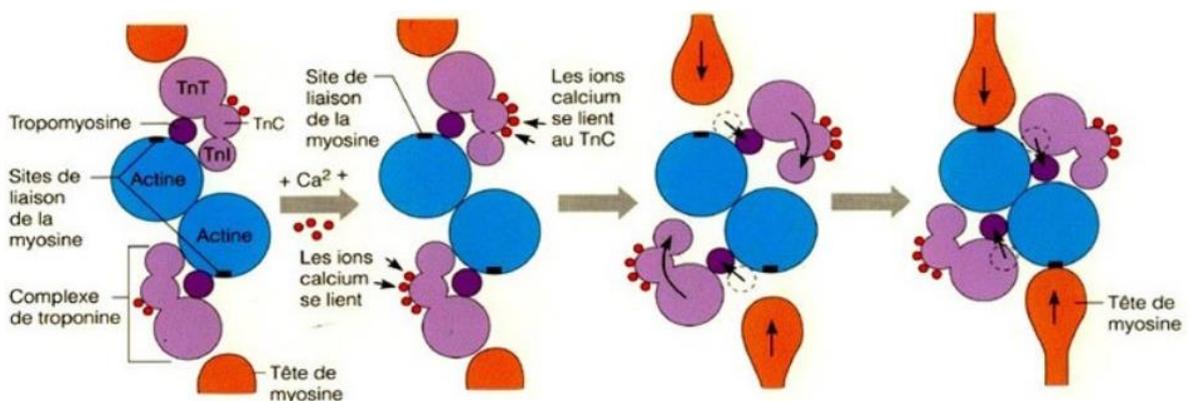


Figure 3 : Schéma du processus de contraction des myofilaments par changement de conformation du complexe de la troponine (C, I et T) sur l'actine sous l'effet du calcium. <https://coeuretmaladiescoronariennes.wordpress.com/2016/05/03/i-presentation-du-coeur/>

c) Relaxation

Si l'augmentation de la concentration calcique cytosolique va permettre la contraction cardiaque, cela va en parallèle activer plusieurs mécanismes de recapture du calcium. En effet, pour qu'un nouveau battement puisse avoir lieu, il faut impérativement diminuer cette concentration (Shannon and Bers 2004). Pour ce faire, la plus grande partie du calcium va être ré-intériorisée au sein du réticulum sarcoplasmique par les récepteurs SERCA, ATPase calcium-magnésium-dépendants (Lechat P et al. 1986). Le résiduel en calcium va quant à lui être exclu hors de la cellule par des échangeurs de type $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (Sham et al. 1995) au niveau du sarcolemme. La concentration calcique baissant, l'affinité de la troponine C pour le calcium va changer, permettant ainsi au cation de se dissocier. Le complexe de troponine va revenir alors à son état de repos (Biesiadecki Brandon J et al 2014). Ces différents mécanismes de recapture du calcium vont entraîner la fin de la contraction et le début de la relaxation (figure 2).

II. Mitochondrie et phosphorylation oxydative

Ce transitoire calcique est l'effecteur principal du cycle de contraction-relaxation des cardiomyocytes ; cependant ce processus est extrêmement demandeur en énergie, c'est-à-dire en ATP, que ce soit au moment de la contraction pour assurer le mouvement des myofilaments ou pendant la relaxation pour assurer le transport d'ion. Il est donc impératif que la mitochondrie, qui assure 90% de la production d'ATP de la cellule dans le cœur (Harris D. A. et A. M. Das 1991), intervienne dans ce cycle pour subvenir aux besoins énergétiques. Pour ce faire, il faut que l'activité mitochondriale soit modulée par le calcium pour faire face aux besoins énergétiques cardiaques (Diolez P et al 2007). D'ailleurs une réduction du transfert de calcium entre le SR et la mitochondrie conduit à une baisse de la phosphorylation oxydative de la CR et donc à une baisse énergétique (César Cárdenas et al 2010).

a) Structure d'une mitochondrie

Si une petite quantité d'ATP va être produite dans le cytoplasme, la majorité de sa production est localisée au niveau de la mitochondrie et plus particulièrement au niveau de sa membrane interne mitochondriale (une petite quantité est également produite dans la matrice).

La membrane interne mitochondriale est bien différente des autres membranes notamment du point de vue de sa composition ; cette membrane est composée en majorité de protéines, avec un ratio protéine/lipide de 80 : 20 contre 50 : 50 pour la membrane externe (Fontanesi, Flavia 2015), et comportent des phospholipides très particuliers, les cardiolipines (ayant quatre chaînes hydrophobes), que l'on ne retrouve quasiment qu'à cet endroit (Schlame, Michael, et al 1993). Ces différences peuvent s'expliquer par l'origine bactérienne de cette membrane. Cette dernière présente des invaginations appelées crêtes mitochondriales ou « *cristae* » qui permettent de maximiser la surface d'échange avec l'espace intermembranaire. Dans ces crêtes se trouvent les complexes composant la chaîne respiratoire (CR) qui sont à l'origine de l'établissement de la force proto-motrice nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthétase.

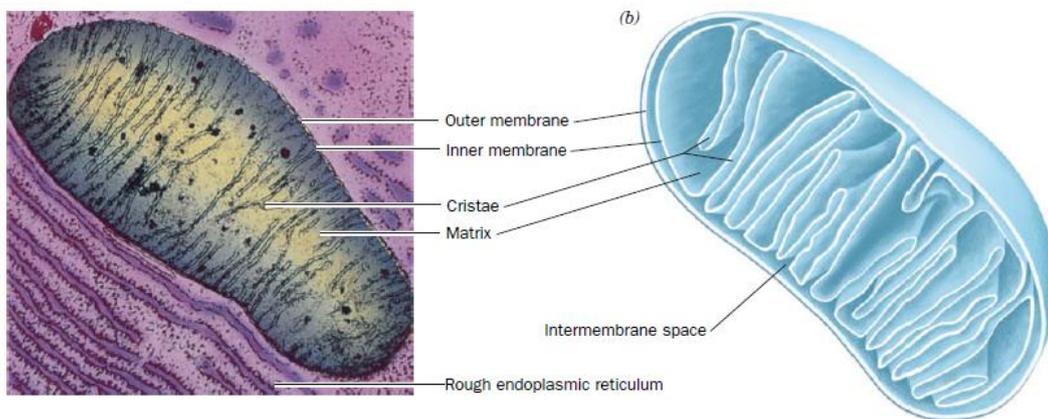


Figure 4 : Schéma de la structure générale d'une mitochondrie, issue du livre *Fundamentals of biochemistry: life at the molecular level* 5^{ème} édition par Voet D et al 2016.

b) La chaîne respiratoire

Plusieurs complexes sont présents dans la chaîne respiratoire de mammifère mais seul quatre d'entre eux vont nous intéresser au cours de ma thèse : le complexe I ou NADH déshydrogénase, le complexe II ou succinate déshydrogénase ; le complexe III ou coenzyme Q cytochrome réductase ; et le complexe IV ou cytochrome c oxydase ainsi que deux médiateurs rédox la coenzyme Q9 (chez le rat) (ou la coenzyme Q10, chez l'homme) et le cytochrome c (figure 5). Il est important de comprendre le fonctionnement de la CR car il est à l'origine de l'établissement de nombreux paramètres d'intérêt (que j'expliquerai par la suite) qui vont être au cœur de ma thèse mais surtout car d'un point de vue physiologique c'est la CR qui assure la génération de la force proto-motrice, nécessaire à la production d'ATP, indispensable à de nombreux processus cellulaires.

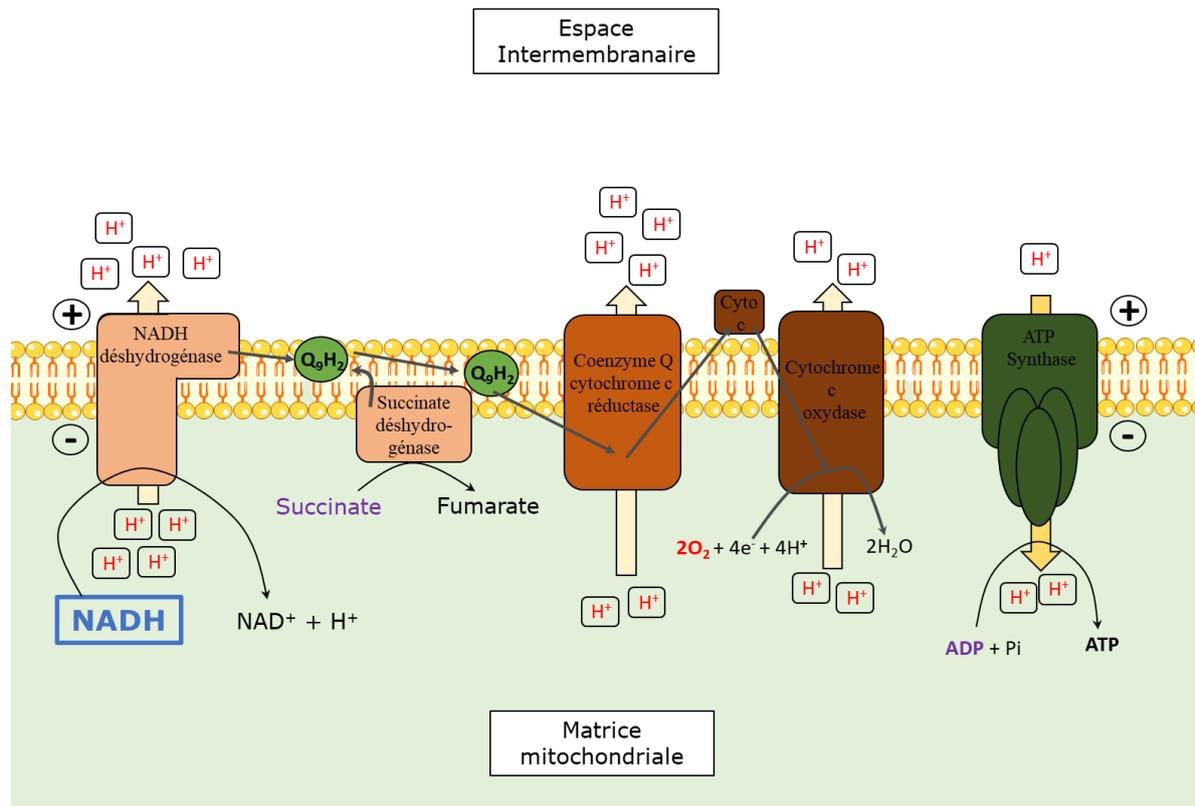


Figure 5 : Schéma de principe de la chaîne respiratoire mitochondriale de mammifère et de l'ATP synthétase.

En 1961 Peter Mitchell a formulé la théorie chimio-osmotique qui permet d'expliquer le fonctionnement de la CR et pour laquelle il recevra un prix Nobel en 1978. Le principe général est une réaction électrochimique, qui va coupler un transfert d'électrons entre complexes et un gradient chimique, sous la forme d'un différentiel de concentration de proton et de charge, de part et d'autre de la membrane interne.

Pour résumer simplement le transfert d'électron : celui-ci va commencer au niveau des complexes I et II qui vont oxyder un substrat, le NADH et le succinate respectivement, cela va permettre le transfert d'électrons au sein des complexes grâce à des chaînes Fe-S, jusqu'au premier médiateur rédox : le coenzyme Q (Q₉ et Q₁₀ principalement) qui va être réduit (2e⁻, 2H⁺). Ce dernier va ensuite transporter les électrons jusqu'au complexe III. Ce complexe va alors transférer les électrons reçus au deuxième médiateur rédox, le cytochrome c, qui va les transférer au complexe IV et c'est à ce niveau que va intervenir l'accepteur final : l'oxygène qui va être réduit en eau. Cette vitesse de réduction de l'oxygène est rapportée sous forme d'intensité respiratoire ou de respiration mitochondriale, qui est un paramètre important puisqu'elle donne finalement une mesure de la vitesse d'oxydation des substrats initiaux. C'est expérimentalement un indicateur de la viabilité et de l'activité des mitochondries. Le transfert d'électron est possible car les potentiels rédox des différents composants sont

croissants (figure 6) et les potentiels standards extrêmes sont ceux des couples NAD^+/NADH ($E'_0 = -0,32\text{V}$) et $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$ ($E'_0 = +0,82\text{V}$), ce qui représente une différence de $+1,14\text{V}$ (figure 6).

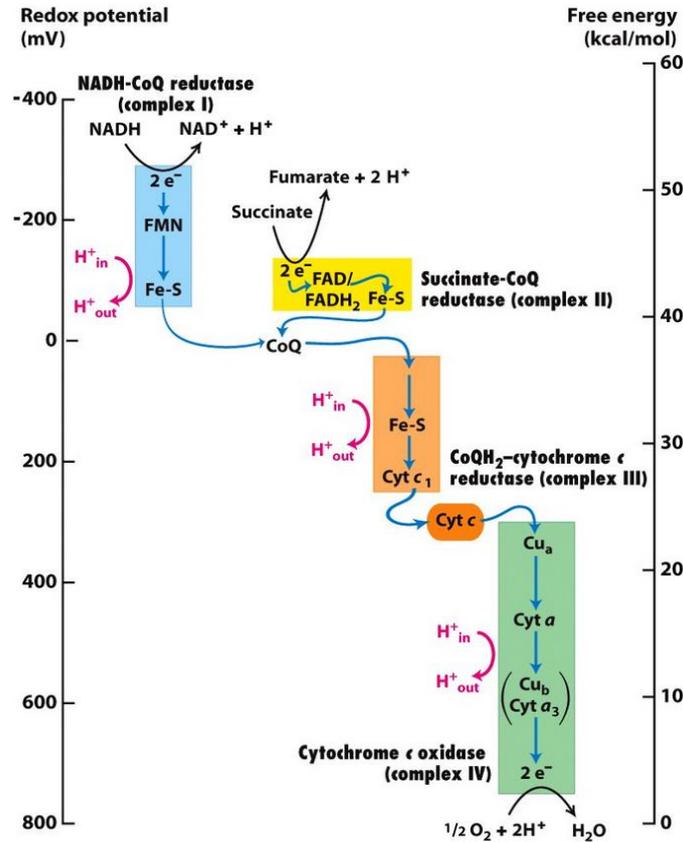


Figure 12-18
Molecular Cell Biology, Sixth Edition
© 2008 W.H. Freeman and Company

Figure 6 : Potentiel redox standard des différents constituants de la chaîne respiratoire, schéma issu de Molecular Cell Biology, 2008 par W.H Freeman.

Ce transfert d'électrons entre deux couples redox de potentiels standards différents, fournit de l'énergie nommée énergie libre ou enthalpie libre de Gibbs (ΔG), selon l'équation suivante :

$$(1) \quad \Delta G = -nF(Ea - Eb)$$

Où n correspond au nombre d'électrons transférés, F est la constante de Faraday et Ea, Eb correspondent au potentiel redox des deux couples impliqués. C'est cette énergie qui est utilisée pour transférer des protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce transfert va se produire au niveau des complexes I (expulsant quatre protons), III (expulsant deux fois deux protons) et IV (expulsant deux protons également), tandis que le complexe II, ne permet pas le passage de protons, car celui-ci n'est pas transmembranaire et sa différence d'énergie avec la coenzyme Q est trop faible. Donc en

fonction du substrat utilisé la quantité de H^+ transférés n'est pas la même, 10 H^+ sont expulsés à partir d'une activation du complexe I contre 6 H^+ à partir du complexe II.

Cette expulsion de protons permet l'établissement d'une différence de charges entre l'espace intermembranaire qui est chargé positivement et la matrice mitochondriale chargée négativement, créant ainsi un potentiel de membrane ($\Delta\varphi_m$). Cela va également créer une différence de concentration en protons et donc de pH entre les deux compartiments, d'environ -0,5 unité. Ces deux processus ensemble forment la force proto-motrice selon l'équation suivante :

$$(2) \quad \Delta p = \Delta\varphi_m - 61 \Delta pH$$

La constante de valeur « -61 mV », est issue de $(-2,3\frac{RT}{F})$ pour une température de 37°C. La membrane interne mitochondriale va présenter une quasi-imperméabilité au proton en fonction du potentiel de membrane. À bas potentiel la membrane va être imperméable alors qu'à haut potentiel, la membrane sera plus perméable, laissant une fraction des protons diffuser dans la matrice. Cette perméabilité joue donc un rôle crucial dans le potentiel de membrane.

Chez les mammifères, le Δp est assuré en majorité par la différence de potentiel de membrane, soit 150 à 180 mV, et une minorité par le pH, entre 30 et 60 mV, (Perry, Seth W, et al 2011) pour un Δp final moyen de 180–220 mV (de signe négatif par convention). Cette force proto-motrice va être ensuite utilisée par l'ATP synthétase pour produire de l'ATP à partir de l'ADP et de phosphate inorganique (cette force est également utilisée pour le transport du phosphate dans la matrice ainsi que par la translocase ATP/ADP), selon le processus global de phosphorylation oxydative. C'est-à-dire que celui-ci va faire entrer des protons dans la matrice mitochondriale, entrée favorisée par le gradient électrochimique, libérant ainsi l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP. L'équation qui relie la force proto-motrice et l'Energie libre de Gibbs que va fournir l'ATP synthétase pour produire de l'ATP est donc la suivante :

$$(3) \quad \Delta G_{p \text{ matrix}} = \left(\frac{H^+}{ATP} \right) F \Delta p$$

Les études structurales de l'ATP synthétase ont permis d'estimer le nombre de sous-unités c nécessaire pour le passage des protons à 8, ce qui permet d'estimer le rapport $\left(\frac{H^+}{ATP} \right)$ chez les vertébrés à une valeur de 8/3, soit 2,7.

c) Modulation de la chaîne respiratoire

Avant la théorie chimio-osmotique, Chance et Williams ont défini dans leurs études reportées dès 1956 un protocole expérimental qui permet de moduler la chaîne respiratoire et l'ATP synthétase. Ils ont ainsi défini des états respiratoires, obtenus sur mitochondries isolées en fonction de l'ordre d'addition des différents réactifs, ces états sont les suivants (figure 7) :

- Etat 1 : mitochondries seules, (en présence de Pi). Etat artificiel, le Δp est nulle.
- Etat 2 : ajout de substrat (succinate), respiration basse en raison du manque d'ADP. Etablissement, puis maintien du Δp qui n'est pas consommée.
- Etat 3 : ajout d'une quantité limitante d'ADP, respiration rapide. Les ATP synthétases fonctionnent, consommant le Δp qui diminue, libérant ainsi le flux d'électrons, la respiration mitochondriale augmente.
- Etat 4 : rapport ATP / ADP très élevé, ADP faible car consommé, peu de synthèse d'ATP et respiration mitochondriale ralentie. Le Δp qui revient à une valeur proche de l'état 2.
- Etat 5 : hypoxie, respiration et Δp chutent en raison de l'absence d'oxygène.

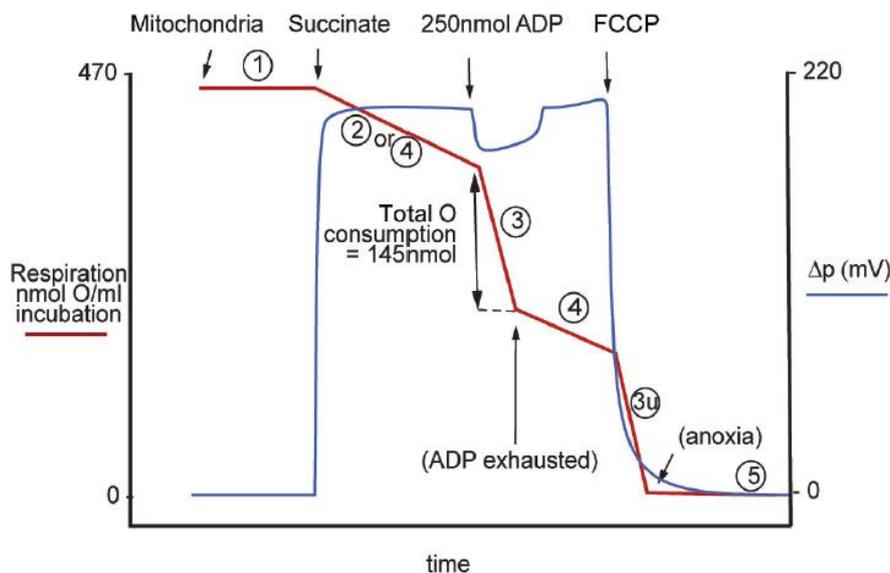


Figure 7 : Schéma du suivi de la respiration mitochondriale, en rouge et du potentiel de membrane en bleu en fonction d'une séquence d'ajout. Les chiffres 1 à 5 représentent les différents états respiratoires cités précédemment. Figure issue de Nicholls, David G, et Stuart J. Ferguson. Bioenergetics. Fourth edition, Academic Press, Elsevier, 2013.

Durant ma thèse, nous avons repris et modifié ces appellations, nous avons travaillé sur mitochondries isolées uniquement en présence de substrat comme le glutamate/malate (qui permet de régénérer le pool de NADH, substrat du complexe I, via le cycle de Krebs) ou du succinate (substrat du complexe II). Nous avons appelé cette condition « état substrat », voisine de l'état 4. Quand nous avons ajouté un inhibiteur de l'ATP synthétase (de l'oligomycine) ou un inhibiteur du translocateur ADP/ATP (du carboxyatractyloside ou C-ATR), qui peuvent induire des conditions non-phosphorylantes avec un potentiel de membrane voisin de l'état 4, nous avons appelé cette condition pseudo-état 4.

III. Mitochondrie et calcium

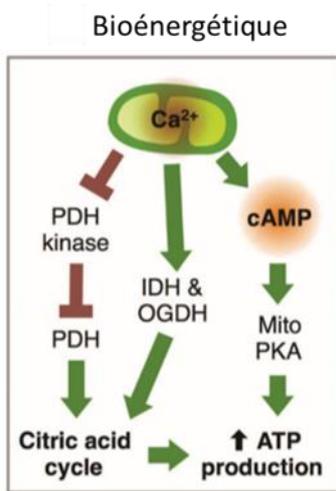


Figure 8 : Effets principaux du calcium sur les mitochondries en activant des voies métaboliques de la mitochondrie. Figure issue de Roberto Bravo-Sagua et al 2017.

Dans la partie précédente, j'ai expliqué les fondements du fonctionnement mitochondrial. Dans le contexte cellulaire, cet organe va être important dans le processus de contraction en répondant à la demande énergétique cellulaire. A travers les zones de microcontact entre la mitochondrie et le SR, le calcium libéré va entrer dans la matrice mitochondriale et agir sur différentes enzymes, notamment au niveau du cycle de Krebs etc (Denton RM et al 1978, McCormack JG et al 1979). D'un point de vue physiologique, cette entrée va avoir pour conséquence une activation du métabolisme qui va se traduire notamment par une augmentation de la production d'ATP (Giulietta Di Benedetto et al 2013 ; García-Bermúdez J, et al 2015).

a) Calcium et métabolisme mitochondrial

Au niveau du cycle de Krebs, le calcium va avoir pour effet d'activer deux enzymes (figure 9) : 1) l'isocitrate déshydrogénase qui catalyse la réaction de l'isocitrate en α -cétoglutarate, régénérant en même temps un NADH (Denton RM et al 1978). 2) Le calcium va agir aussi sur l' α -cétoglutarate déshydrogénase qui permet le passage de α -cétoglutarate en succinyl-CoA, régénérant là aussi un NADH (McCormack JG et al 1979). On voit bien qu'à travers ces deux enzymes le calcium va pouvoir agir sur les réserves de NADH, substrat du complexe I, et donc moduler indirectement l'activité de la CR.

Le calcium va également agir en amont du cycle de Krebs, en inhibant la Pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK) qui, par phosphorylation, va réguler l'activité de l'enzyme pyruvate déshydrogénase (PDH). Celle-ci permet de catalyser la réaction de transformation du pyruvate (issu de la glycolyse) en acétyl-CoA (utilisé dans le cycle de Krebs par la citrate synthase) en régénérant là aussi un NADH. Le calcium en inhibant la PDHK empêche de réguler la PDH ce qui va favoriser la création d'acétyl-CoA et donc moduler là encore le cycle de Krebs (Cooper RH et al 1974 ; Linn TC et al 1969). Le calcium peut également activer des phosphatases qui vont déphosphoryler la PDH et ainsi l'activer (Denton RM et al 1972).

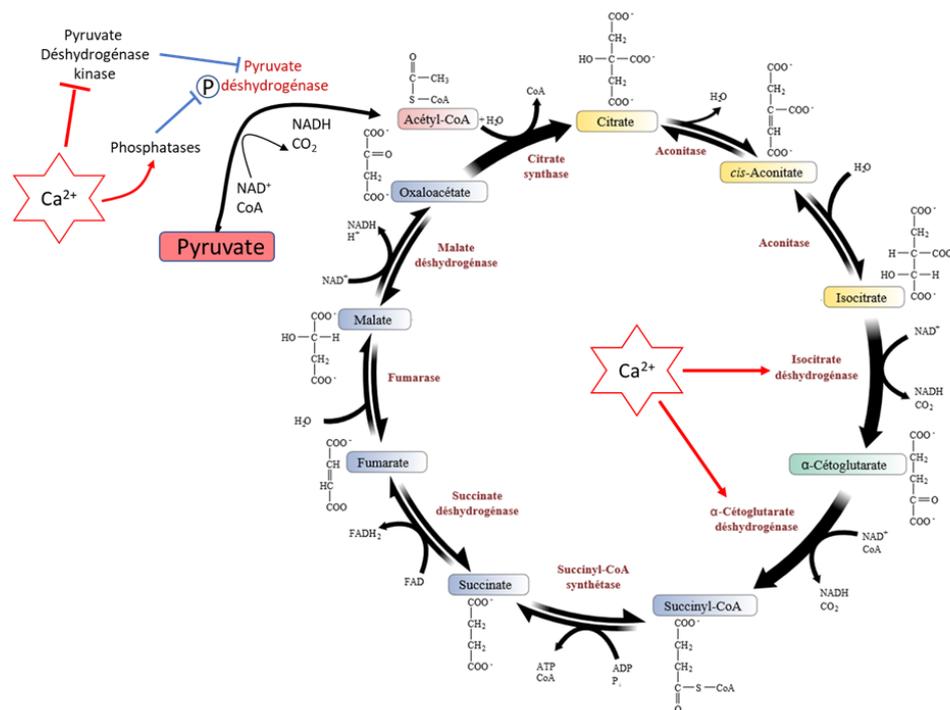


Figure 9 : Mode d'action du calcium sur le cycle de Krebs. Figure modifiée de <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=32481656>, Original : Agrotman, vector version : Flappiefh, licence : CC BY-SA 3.0.

Dernier point, différentes études (Giulietta Di Benedetto et al 2013 et Dávid Katona et al 2015) montrent que l'augmentation de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale est corrélée avec une production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). D'après ces auteurs, l'AMPc permettrait d'activer des protéines kinases A matricielles (PKAm ; Rebeca Acin-Perez et al 2009) qui ensuite iraient agir sur différents complexes de la CR et l'ATP synthétase (figure 10). En effet, les PKAm peuvent phosphoryler les complexes I et IV, ce qui va augmenter leurs activités et donc celui de la CR en général (Ruming Chen et al 2004 ; Rebeca Acin-Perez et al 2009). Les PKAm peuvent également agir sur IF1 qui est connu comme inhibiteur de l'hydrolyse de l'ATP, mais une étude récente de García-Bermúdez J, et al 2015 a montré qu'il inhiberait aussi la synthèse de l'ATP et donc les PKAm, en le phosphorylant, préviendrait son effet. Une autre étude de Domenico De Rasmo et al 2016, a montré l'importance de l'AMPc pour l'organisation and l'activité de l'AP synthétase.

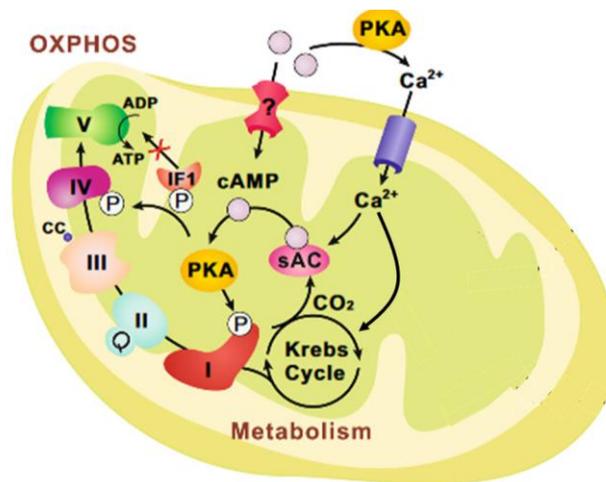


Figure 10 : Production et effet de l'AMPc sur le métabolisme mitochondrial. Schéma modifié depuis Fan Zhang et al 2016.

b) Le rôle de la mitochondrie dans le cycle contraction-relaxation : deux modèles proposés

Dans la partie précédente, nous avons pu voir l'effet du calcium sur son activité métabolique et sur son réseau, cependant les dynamiques d'entrée et de sortie du calcium dans la mitochondrie pendant le cycle contraction-relaxation restent encore aujourd'hui sujet à débat. Il existe deux modèles principaux qui s'opposent sur cette question de la gestion du calcium mitochondrial (figure 11) pour un complément d'information se référer à la revue de Elena N Dedkova et al 2013).

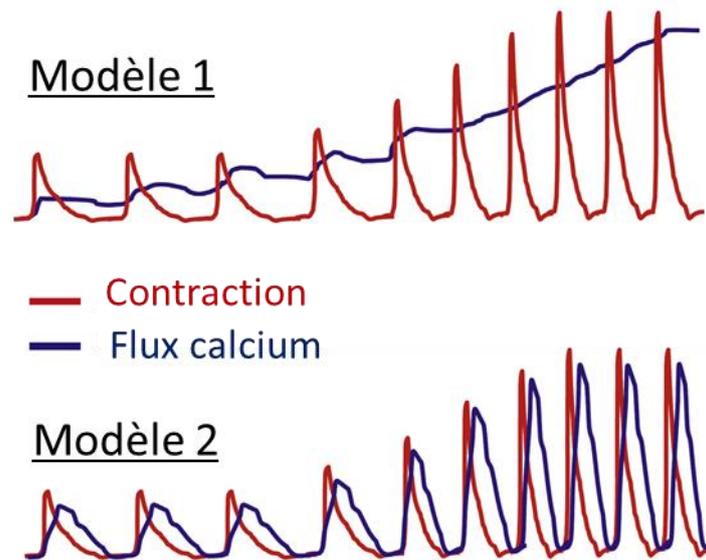


Figure 11 : Suivi de la contraction cardiaque (en rouge) et du flux calcique (en bleu) selon les deux modèles possibles. Issue du livre « Cardiac Electrophysiology from cell to bedside » 2018 par Donald M Bers, voir chapitre « Organellar Ion Channels and Transporters » de Jin O-Uchi et al.

i. Premier modèle

La première hypothèse, introduite par Crompton en 1985, consiste en un mécanisme d'entrée lente du calcium dans la mitochondrie, qui est contrecarré par une sortie encore plus lente de celui-ci, conduisant à son accumulation au cours du temps. Seulement une fraction de la concentration cytosolique serait internalisée à chaque battement, de l'ordre de 1%, résultant en une accumulation faible mais progressive de la concentration calcique matricielle à chaque battement. Il est donc difficile d'imaginer au vu du flux calcique entrant dans la mitochondrie que cela puisse l'activer à chaque battement pour qu'elle subvienne au besoin énergétique.

Ce modèle a été imaginé en prédisant l'évolution des concentrations matricielles et cytosoliques du calcium dans le cœur à partir de résultats obtenus sur mitochondries isolées. Celui-ci a été par la suite validé par différents travaux (Miyata et al en 1991, Sedova M et al 2006, Dedkova and Blatter et al 2013). Dans cette dernière étude, les auteurs ont travaillé sur des cardiomyocytes perméabilisés de chat à l'aide d'une sonde fluorescente (le fluo-3 AM) et de sauts de concentrations calciques. Ils ont ainsi montré qu'un processus rapide d'internalisation par la mitochondrie est possible. Pour cela, ils ont réalisé une variation de concentration de $100 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} et ont regardé par fluorescence la concentration calcique mitochondriale. On peut voir dans la figure 12-A qu'à cette concentration l'internalisation est très rapide, cependant le temps d'efflux de ce calcium est très long (6 minutes). Par la suite, ils ont augmenté la fréquence des sauts en concentration ($0,25$ et 1 Hz), pour se rapprocher des fréquences du battement cardiaque (figure 12B), ils observent alors dans les deux cas une accumulation du calcium matriciel au cours du temps.

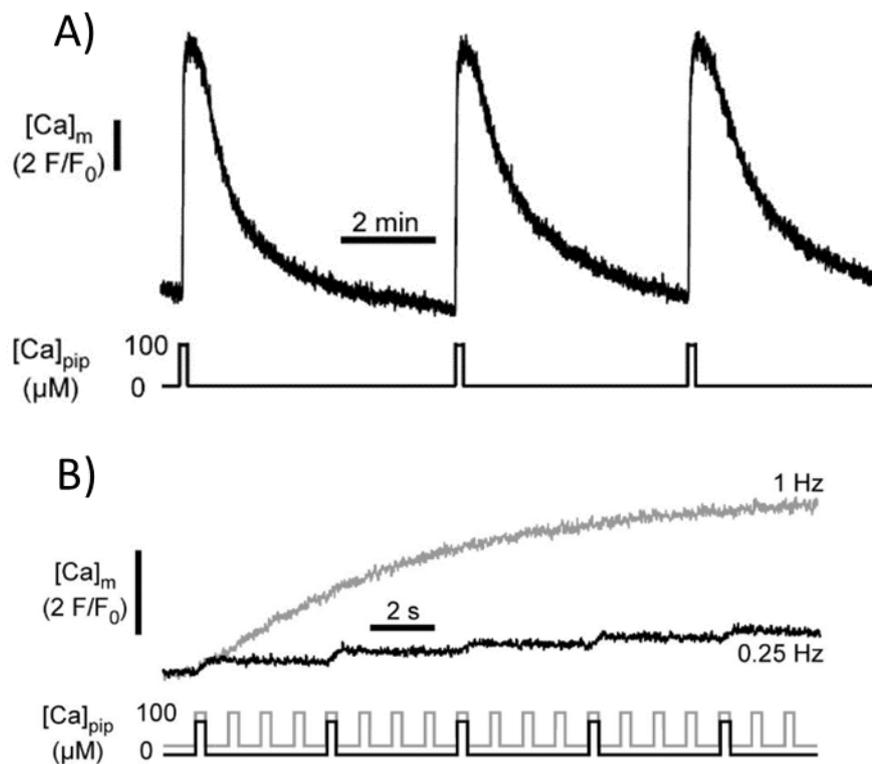


Figure 12 : Suivi par fluorescence de la concentration calcique mitochondrial après des sauts de concentration A) Pour un cardiomyocyte de chat avec ajout calcique de $100 \mu\text{M}$ toutes les 5 minutes. Figure issue de Sedova M et al en 2006. B) Pour une cellule musculaire perméabilisée, changement dans la fréquence des sauts en concentration calcique : $0,25$ et 1 Hz . Résultats issus de Dedkova and Blatter et al 2013 (même équipe).

Dans cette hypothèse, le calcium pourrait donc s'accumuler de façon chronique et continue à chaque cycle de contraction-relaxation. Cependant, une surcharge calcique a des effets délétères sur la mitochondrie puisque cela peut entraîner une production accrue de radicaux libres (ROS, Paul S Brookes et al 2004), qui combinée à la concentration élevée en calcium va activer le pore de transition de perméabilité mitochondriale ou mPTP (Crompton, Martin 1999), dont je parlerai plus en détails par la suite. Une fois ce pore activé de manière permanente, cela peut provoquer une chute du potentiel de membrane et donc de l'activité de la CR entraînant la baisse du niveau d'ATP (Paul S Brookes et al 2004) qui peut également activer l'apoptose ou la nécrose de la cellule.

En revanche, ce modèle semble être différent en fonction des espèces animales, si les cœurs de rat ou de chat répondent plutôt à l'hypothèse présentée ci-dessus, les cardiomyocytes du cochon d'inde et du lapin semblent plutôt suivre un autre modèle avec un flux d'entrée et de sortie du calcium au sein de la mitochondrie qui est synchronisé avec le cycle de contraction-relaxation (Wendt-Gallitelli M F et G Isenberg. 1991). Les mécanismes à l'origine de ces différences entre espèces ne sont néanmoins pas encore décrits (Griffiths, Elinor J 1999).

A) Summary of Data on Mitochondrial Transients Obtained Using Different Techniques, Species, and Myocardial Preparations

Authors	Species and preparation	Method	Mitochondrial Ca ²⁺ transients?
Miyata <i>et al.</i> (7)	Rat myocytes	Mn-quenching of cytosolic indo-1	No
Wendt-Gallitelli and Isenberg (6)	Guinea-pig myocytes	EPMA	Yes
Moravec and Bond (9)	Hamster myocytes	EPMA	No
Chacon <i>et al.</i> (2)	Rabbit myocytes	Confocal imaging fluo-3 and TMRM	Yes
Schreur <i>et al.</i> (10)	Rat heart	Mn-quenching of cytosolic indo-1	No
Trollinger <i>et al.</i> (11)	Rabbit myocytes	Confocal imaging rho-2	Yes
Moravec <i>et al.</i> (12)	Hamster heart	EPMA	No
Griffiths <i>et al.</i> (8)	Rat myocytes	Selective removal of cytosolic indo-1 (heat-treatment)	No
Horikawa <i>et al.</i> (13)	Rat papillary muscle	EPMA	No
Zhou <i>et al.</i> (5)	Ferret and cat myocytes	Mn-quenching of cytosolic indo-1	No

Note. Presence of mitochondrial transients defined as a change in [Ca²⁺]_m during a single contraction. EPMA, electron probe microanalysis.

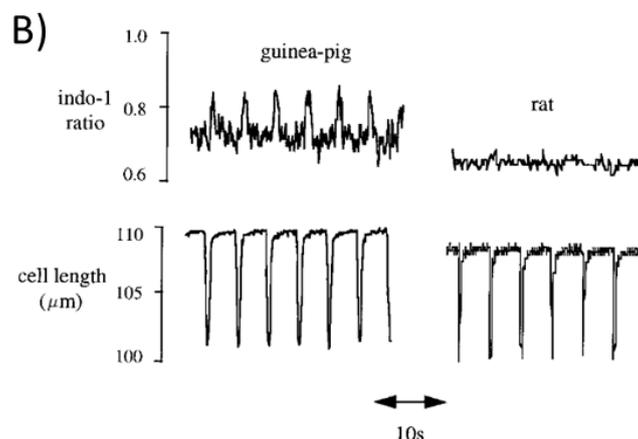


Figure 13 : récapitulatif et exemple de transitoire calcique observé pour des mitochondries au sein de cellules musculaires de différentes origines animales. A) tableau récapitulatif des différences entre espèces pour la présence ou non d'un transitoire calcique à chaque contraction. B) exemple de transitoire calcique observé pour des mitochondries de myocytes. Résultats issus de Griffiths, Elinor J 1999.

ii. Deuxième modèle

Ce deuxième système de flux calciques vu figure 13 permet de proposer un second modèle de fonctionnement qui consiste en une activation cyclique de la mitochondrie, qui suivrait le rythme des cycles de contraction-relaxation. Pour appuyer cette théorie de nombreux arguments existent, d'abord au niveau structural puisqu'il existe des microdomaines au sein des cardiomyocytes, c'est-à-dire des zones de contact entre le réticulum sarcoplasmique et la mitochondrie (voir figure 14A).

La composition moléculaire de ces zones au niveau cardiaque n'est pas encore parfaitement connue. On sait cependant que dans d'autres tissus il existe des microdomaines similaires entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (voir figure 14B) qui sont eux composés du récepteur de l'inositol trisphosphate 3 (IP3R) au niveau du réticulum endoplasmique et de porines : canal dépendant du potentiel (VDAC1) et de l'uniporteur à calcium mitochondrial (MCU) au niveau des membranes mitochondriales (Veronica Eisner et al 2013 ; Martijn Kerkhofs et al 2018). Ce microdomaine serait maintenu par un ensemble protéique qui comprendrait, par exemple, la « mitofusin 2 » qui appartient à la famille des « inter-organelle tether proteins » (Cecília García-Pérez et al 2011).

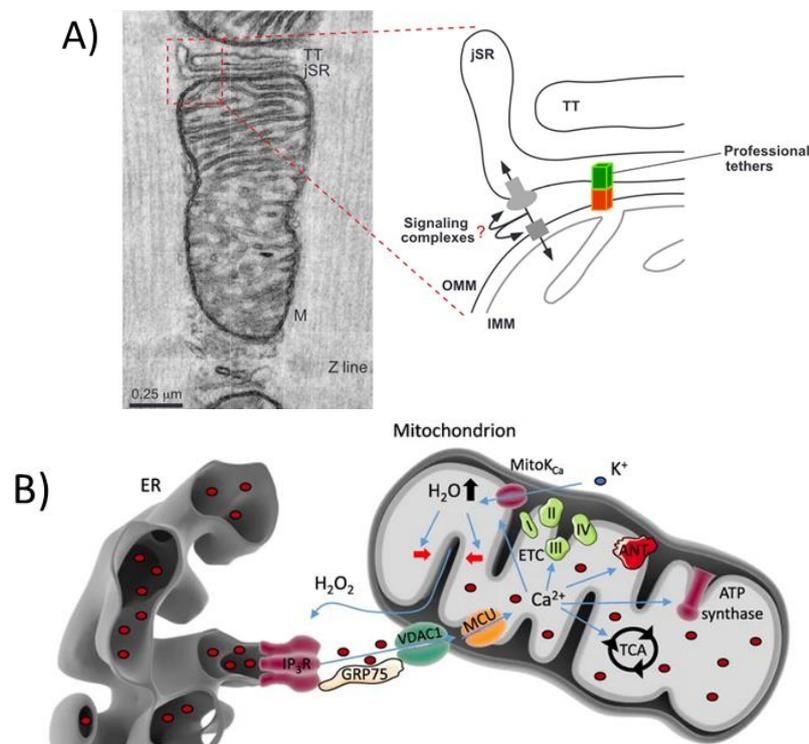


Figure 14 : Visualisation des zones de microcontact entre le SR et une mitochondrie. A) Image d'une coupe de muscle cardiaque et schéma de la zone. Image obtenue depuis l'étude de Veronica Eisner et al 2013. B) Schéma d'une zone de microcontact entre le réticulum endoplasmique (RE) et une mitochondrie et les protéines impliquées dans le maintien de cette zone, schéma issu de l'étude de Martijn Kerkhofs et al 2018.

Ces microdomaines pourraient permettre un transport rapide du calcium entre ces deux compartiments et augmenteraient fortement, localement la concentration calcique, suffisamment pour activer les récepteurs de la mitochondrie et son internalisation rapide vue ci-dessus. En revanche, au niveau du SR, le relargage du calcium ne se fait quasi-uniquement qu'au niveau du RyR2 et non pas par le IP3R. Le RyR2 semble être présent exclusivement à proximité des T-tubules en juxtaposition avec le VLC, pour assurer une signalisation rapide du calcium après le passage du PA. On peut cependant émettre l'hypothèse qu'après le relargage du calcium par le SR, celui-ci va diffuser jusqu'au myofilament mais également au niveau des mitochondries (voir figure ci-dessous), tout en conservant une concentration locale suffisante pour permettre son internalisation rapide. L'autre hypothèse est que certains RyR2 pourraient être situés aux extrémités du SR, qui sont proches de la mitochondrie, et permettraient de l'activer. L'étude de Choon Kee MIN et al 2012 va plus loin en montrant que des interactions directes du RyR2 (du SR) et VDAC semblent être possibles, cette interaction serait analogue au microdomaine IP3R/VDAC/MCU.

Comme expliqué précédemment, il existe deux types de mitochondries que l'on différencie par leur localisation au sein des cardiomyocytes et l'existence de ces microdomaines semble montrer le rôle important de la position des différents acteurs au niveau cellulaire. On peut notamment penser à un rôle prédominant des mitochondries subsarcolemmales (en contact direct avec le SR), qui permettrait d'internaliser une partie du calcium relargué alors que les mitochondries intrafibrillaires verraient une concentration plus faible en calcium.

Un autre argument en faveur de ce modèle est que les mitochondries peuvent représenter jusqu'à 35% du volume cellulaire, il est donc difficile d'imaginer qu'au moment du pic de calcium cytosolique, la mitochondrie ne puisse pas en internaliser une partie plus importante que 1% (figure 2) comme mentionné dans le modèle 1 et ce d'autant plus que son potentiel de membrane de -180 mV crée une force importante d'attraction pour des cations divalents comme Ca^{2+} . Dans ce modèle la mitochondrie jouerait donc un rôle important dans la modulation des vagues calciques, là où dans le modèle 1 (figure 11), son rôle serait plus passif (Donald M Bers 2008).

c) L'entrée du calcium

La force principale qui permet l'entrée du calcium au sein de la mitochondrie est sa différence de potentiel de membrane ($\Delta\varphi$), qui est proche de -180 mV à l'état 4 et de -150 mV à l'état 3 (O Uchi et al 2012). $\Delta\varphi$ assure une force électromotrice suffisante pour favoriser le passage du Ca^{2+} mais au final cela va faire entrer dans la matrice mitochondriale deux charges positives qui vont à l'encontre du potentiel, ce qui est défavorable énergétiquement. Cela va être compensé par la chaîne respiratoire nouvellement activée qui va permettre de restaurer le potentiel de membrane et produire plus d'ATP. Ce flux de calcium servirait de signal pour assurer la balance énergétique cellulaire. Dans certains cas pathologiques, comme l'ischémie reperfusion (dont je reparlerai dans le chapitre II), il peut y avoir une entrée massive de calcium au sein de la mitochondrie qui peut aller jusqu'à annuler son potentiel de membrane. La deuxième force qui permet l'entrée du cation est son gradient de concentration de part et d'autre de la membrane interne, puisqu'au moment de la contraction il sera relativement concentré dans le cytosol et moins concentré dans la matrice mitochondriale (Dedkova and Blatter et al 2013).

D'un point de vue moléculaire, cette entrée dans la mitochondrie est médiée par différents acteurs dont principalement le canal dépendant du voltage (VDAC) au niveau de la membrane externe, et l'unipporteur à calcium mitochondrial (MCU) dans la membrane interne (comme vu précédemment). Ce dernier est le système d'entrée du calcium le plus établi dans la mitochondrie, puisque son inhibition par le rouge de ruthénium empêche presque complètement l'entrée du calcium dans la mitochondrie (Gunter et al 1990). Sa structure moléculaire n'a été connue que bien après sa découverte (Joshua M. Baughman et al 2011 ; De Stefani et al 2011), elle est composée de la protéine transmembranaire anciennement connue sous le nom de CCDC109A, qui possède deux domaines transmembranaires qui formeraient le canal à calcium. Au niveau du MCU, ce transport se fait sans l'intervention d'autres ions, seul le calcium entre par ce pore (Kirichok et al 2004). Cet unipporteur est régulé par différents facteurs comme le MICU1 ou « mitochondrial calcium uptake 1 » qui servirait de sensibilisateur permettant de réguler le seuillage nécessaire à son activation et par conséquent à la régulation du flux d'entrée du calcium (Perocchi et al 2010). Il existe également d'autres régulateurs comme le CaMKII ou « calmodulin-dependent protein kinase II » qui est impliqué dans des cas pathologiques comme l'ischémie-reperfusion. En revanche, d'après les études de De Stefani et al 2011 le MCU possède une faible densité d'expression au niveau du cœur et d'un point de vue cinétique, il ne permettrait une internalisation rapide du calcium qu'au-delà d'un seuil d'activation relativement fort ($>1 \mu\text{M}$), ce qui ouvre l'hypothèse que d'autres acteurs en plus du MCU permettraient la régulation des flux d'entrée du calcium.

L'étude de O-Uchi et al 2018 (dans le livre « Cardiac-Electrophysiology-From-Cell-to-Bedside ») montre que le mRyR1 (mentionné précédemment) pourrait être un candidat sérieux pour accompagner le rôle qu'on attribue historiquement au MCU, celui-ci possède en effet une activation bimodale en fonction de la concentration en calcium (Beth A Altschafli et al 2007). Ce nouveau récepteur est la forme mitochondriale du RyR1 (Gisela Beutner et al 2001) qui est présent, étonnamment, principalement au sein du muscle squelettique (voir partie précédente) au niveau du SR, ces deux récepteurs ont des structures et des activités similaires. Cependant, au sein d'un même cardiomyocyte on retrouverait préférentiellement le RyR2 au niveau du SR et mRyR1 au niveau de la mitochondrie (Gisela Beutner et al 2005).

Il y aurait également un mode rapide d'internalisation du calcium ou RaM (Linus Buntinas et al 2001) qui a été démontré dans des mitochondries isolées, et qui permettrait une entrée du calcium 50 fois plus rapide que le MCU (Jason N Bazil et al 2011), notamment au moment de la première phase d'augmentation du calcium cytosolique. Cependant, la durée nécessaire pour le réactiver après un premier apport calcique serait longue, supérieure à 60 secondes, ce qui rend cette cinétique à elle seule incompatible avec le rythme de l'excitation-contraction cardiaque.

Un autre acteur, le LETM 1 ou « Leucine-zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1 » est connu pour son rôle dans le maintien ionique (Yuwen Li et al 2019) grâce à son activité antiporteur K^+ ou Mg^{2+}/H^+ . Ce dernier pourrait, d'après des études plus récentes, jouer un rôle dans l'entrée du calcium grâce à un échangeur Ca^{2+}/H^+ quand la concentration serait supérieure à 100 nM. Des KO de cette protéine empêchent la phase initiale de l'internalisation du calcium, ce qui suggère qu'il intervient très tôt dans la séquence d'entrée. Cependant, certaines questions subsistent comme le fait que cet échange ne soit pas en faveur d'une entrée du calcium puisqu'il va voir son activité antiporteur être limitée par le gradient de pH généré par la chaîne respiratoire, cela pourrait être contrebalancé par son activité K^+/H^+ qui aiderait à moduler le potentiel de membrane. Celui-ci possède également une activité d'extrusion du calcium en cas de surcharge calcique (Dawei Jiang et al 2009), ce qui fait de lui un acteur potentiel très intéressant.

L'étude de O-Uchi et al 2012, va plus loin dans cette hypothèse (voir figure ci-dessous), les auteurs ont modélisé la séquence et la contribution de chacun de ces acteurs mentionnés au préalable, pour permettre l'internalisation rapide du calcium au sein de la matrice mitochondriale (courbe en bleu) émis par le SR (courbe en rouge) au niveau des microdomaines.

Cette séquence commencerait par l'activation du RaM, puisqu'il montre un transport du calcium 50 fois plus rapide que le MCU et un seuil d'activation de seulement 50 nM, ensuite Letm1 serait activé quand la concentration dépasserait 200 nM. Quand celle-ci serait supérieure à 1 μ M, le mRyR1 serait activé, celui-ci présentant une vitesse de transport 5 fois supérieure au MCU. En parallèle, le MCU commencerait à être activé et internaliserait de plus en plus de calcium à mesure que la concentration calcique au sein du microdomaine augmente. Le MCU est le transporteur principal dans l'internalisation du calcium mais possède un seuil d'activation assez fort et une activité faible pour des concentrations basses.

Cependant, au fur et à mesure que la concentration augmente, ce système va être inhibé, notamment si la concentration dépasse 20 μ M, le mRyR1 est inhibé à 50%, ce qui veut dire d'un point de vue cinétique qu'il sera inhibé avant d'atteindre le pic maximum du relargage en calcium. Le LETM1 voit également son activité changer après le pic puisqu'à trop fortes concentrations, celui-ci va commencer à relarguer du calcium plutôt que de l'internaliser.

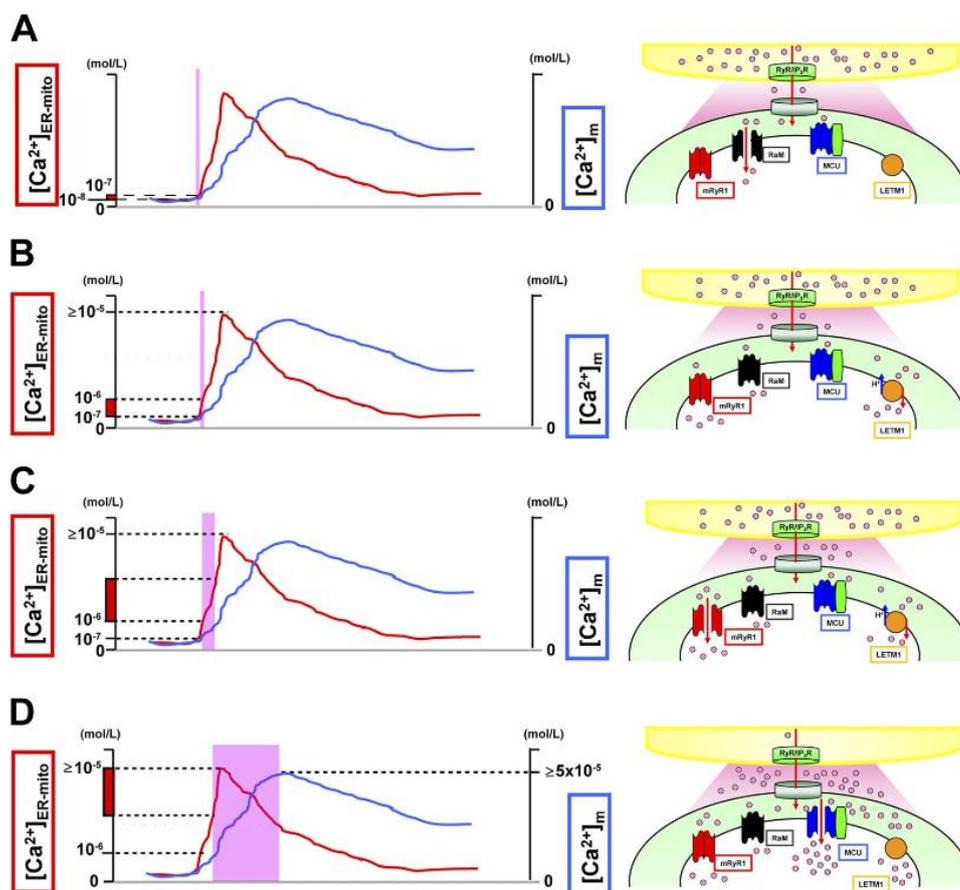


Figure 15 : Suivi du calcium au niveau de la zone de microcontact RE-mitochondrie (en rouge) et du calcium matricielle (en bleu) lors de la contraction cardiaque (de A à D) et schéma des acteurs et leurs activités dans l'entrée du calcium dans la matrice aux différentes étapes. Résultats issus de O-Uchi et al 2012.

d) La sortie du calcium

La sortie du calcium de la matrice mitochondriale est médiée par d'autres acteurs que ceux vus précédemment, avec deux grands types reconnus et un troisième acteur plus controversé. Le premier type de mécanisme, le principal dans le cœur (Maack et al 2006), est celui des échanges sodium/calcium mitochondriaux ou « mNCX » (Carafoli E et al 1974 ; Palty et al 2010) qui permettent d'exclure un ion calcium en faisant entrer trois sodiums, avec une différence d'une charge positive au total. Cet échange est possible grâce au gradient de sodium et électrochimique à travers la membrane interne. Cette différence de charge va avoir tendance à diminuer le potentiel de membrane, ce qui permet en retour de diminuer la force d'attraction de l'entrée du calcium. Cet échangeur est très important pour la modulation de la concentration calcique entre la matrice et le cytosol. Ce phénomène est couplé au mNHX qui permet d'exclure le sodium de la mitochondrie vers le cytosol et ainsi, maintenir le gradient sodique en échange de l'entrée d'un proton dans la matrice. Donc l'énergie principale pour ce mécanisme d'exclusion du calcium est intimement liée à l'activité de la chaîne respiratoire via le gradient électrochimique.

Le deuxième mécanisme comprend les échanges proton/calcium ou « mHCX » comme notamment opérés par le Letm1 (Jiang et al 2009), qui, au moment de la surcharge calcique mitochondriale, change son activité d'entrée du calcium pour permettre son relargage, cependant ce système est minoritaire dans le cœur en comparaison du mNCX mentionné ci-dessus.

Le dernier acteur impliqué dans la sortie du calcium et le plus important dans le cadre de ma thèse est le mPTP. Je reviendrai plus particulièrement dessus dans le chapitre II, mais pour résumer simplement, ce dernier correspond à un pore non spécifique aux implications physiologiques et pathologiques multiples, de structure moléculaire encore inconnue (Halestrap A 2004, Halestrap Andrew P et Philippe Pasdois 2009, Paolo Bernardi et al 2012). Il joue un rôle primordial dans la gestion du calcium au niveau mitochondrial. Il présente deux types d'ouvertures : le premier mode et le plus étudié correspond à une ouverture définitive qui est associée avec le déclenchement de la mort cellulaire par libération du cytochrome c depuis l'espace intermembranaire vers le cytosol, déclenchant ensuite une cascade d'activation menant à l'apoptose. Le deuxième mode, correspond à une ouverture transitoire qui jouerait potentiellement un rôle physiologique en permettant de laisser passer tous les solutés et ions de taille inférieure à 1,5 kDa depuis la matrice vers le cytosol et inversement. Il permet ainsi une sortie rapide du calcium au moment de la relaxation (Lu Xiyuan et al 2019) mais également du NADH et d'autres molécules, collapsant de façon transitoire le potentiel de membrane (Javadov Sabzali, et Morris Karmazyn 2007). Cependant ce mécanisme d'ouverture est encore mal connu et sujet à débat car peu caractérisé.

En revanche, quel que soit le type d'ouverture, parmi les activateurs principaux de l'ouverture du pore on retrouve le calcium et les ROS mitochondriaux. Il a été montré que des concentrations importantes de calcium déclencheraient l'ouverture définitive, là où des études plus récentes semblent montrer qu'à plus faible concentration cela déclencherait l'ouverture transitoire du pore (Lu Xiyuan et al 2019 ; Mnatsakanyan Nelli et al 2017). Cependant, l'intervention exacte de ce pore dans le cycle physiologique de contraction-relaxation reste encore aujourd'hui sujet à débat et sera au cœur du projet ANR Mitocard dont ma thèse a fait partie.

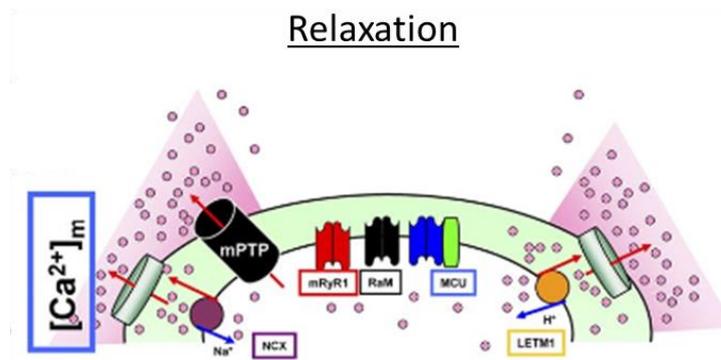


Figure 16 : Schéma des acteurs de la sortie du calcium de la matrice mitochondriale au moment de la relaxation des cardiomyocytes. Schéma issu de O-Uchi et al 2012.

IV. Projet ANR « MITOCARD »

L'introduction ci-dessus a permis de décrire le contexte général de contraction-relaxation cardiaque dans lequel s'inscrit le projet de recherche « MITOCARD », financé par l'ANR et dont ma thèse a fait partie intégrante. Dans ce projet, nous nous sommes intéressés au second modèle des flux calciques mitochondriaux discuté ci-dessus, avec comme élément central le mPTP. L'hypothèse initiale du projet est que ce pore présenterait une activité rythmique, c'est-à-dire qu'au moment de la relaxation, il serait activé par le calcium et les ROS mitochondriaux pour permettre l'efflux rapide du cation. En effet, des résultats antérieurs à ma thèse, réalisés par mon codirecteur de thèse Philippe Diolez, ont montré une activation directe de la mitochondrie (spécifique au cœur) par le calcium lors de la contraction pour répondre aux besoins énergétiques ; ce qui est en faveur du modèle 2 décrit précédemment (Diolez P et al 2007 ; Diolez P et al 2015). Ceci veut dire qu'au moment de la relaxation, la demande énergétique baisse, favorisant la production de ROS mais également une concentration calcique matricielle élevée. Ces deux facteurs combinés permettraient l'activation du mPTP (pore non spécifique) et son ouverture transitoire, induisant la sortie du calcium matriciel afin que la mitochondrie soit prête pour le prochain cycle de contraction-relaxation (figure 23).

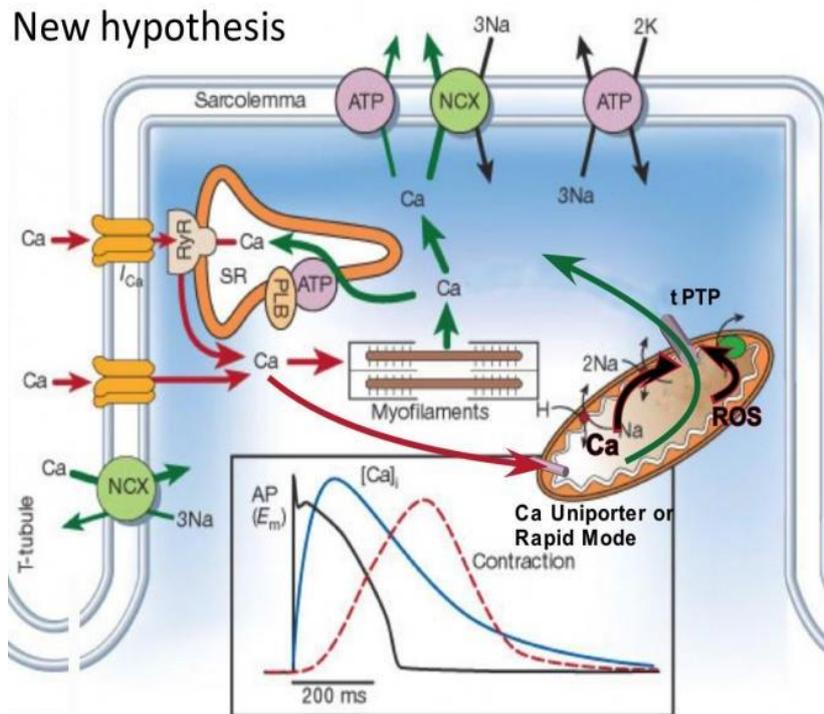


Figure 17 : Schéma de l'hypothèse de travail du projet ANR Mitocard. Schéma modifié de l'étude de Bers, D.M. et al nature 2002.

MITOCARD est un projet interdisciplinaire qui regroupe le savoir-faire de quatre équipes de recherche de thématiques différentes (ISM, LYRIC, LAAS, CARMEN) pour travailler sur cette hypothèse. Une grande partie du travail réalisé au sein de ce projet a consisté à développer de nouvelles méthodes d'analyses électrochimiques ou optiques, en particulier dans le cadre de ma Thèse, pour suivre différents paramètres mitochondriaux et les caractériser dans le contexte de la contraction-relaxation cardiaque, comme : le potentiel de membrane, la production de radicaux libres, la consommation d'oxygène, l'état redox des quinones, etc... De plus, ce projet implique des modélisateurs (équipe CARMEN, Inria) afin de créer au final un modèle *in silico* du fonctionnement mitochondrial à partir de la littérature mais aussi à partir des résultats expérimentaux obtenus.

Les objectifs de ma thèse se sont inscrits à différents niveaux de ce projet transverse. Le but premier était de caractériser les mécanismes essentiels impliquant le mPTP grâce à de nouvelles méthodes, j'ai tout d'abord développé une méthode semi-automatique d'analyse par microscopie de fluorescence de paramètres essentiels de l'activité mitochondriale, le potentiel de membrane (via une sonde fluorescente exogène) et le taux de NADH endogène (figure 18 n°1). Des protocoles ont été développés pour analyser simultanément et de manière dynamique des milliers de mitochondries isolées, permettant de caractériser leurs états stationnaires bioénergétiques à l'échelle individuelle ; ceci constitue l'étude présentée dans le chapitre I.

Ensuite, j'ai mis en œuvre ces méthodes dans le but de mesurer des variations transitoires du potentiel de membrane et ainsi caractériser les ouvertures définitives et/ou transitoires du mPTP, au cœur de l'hypothèse de travail du projet MITOCARD. Grâce à l'analyse d'un grand nombre de données, j'ai cherché à observer son activité basale, puis à la moduler, d'une part à l'aide de son inducteur principal le calcium et puis d'un inhibiteur spécifique la cyclosporine A (figure 18 n°2). Cette étude, complétée par des analyses statistiques des événements observés sur des mitochondries cardiaques uniques, constitue le chapitre II de mon manuscrit.

Un dernier objectif a été de mettre en œuvre des méthodes électrochimiques pour réaliser un suivi d'autres paramètres mitochondriaux importants et différents de ceux mesurés par fluorescence. En étroite collaboration avec le docteur Emmanuel Suraniti (travaillant pour le projet MITOCARD), j'ai participé à la mise en place d'un suivi simultané de la consommation d'oxygène mitochondriale et du taux de réduction des quinones (figure 18 n°3) ; les premiers résultats obtenus sont présentés dans le chapitre III. Par cette approche, notre objectif est de connaître l'état rédox des quinones au cours des états bioénergétiques, car celui-ci contrôle la production de ROS, qui ont à la fois des rôles physio- et pathologiques, dont celui d'activer l'ouverture du mPTP. Ceci constitue donc une autre approche, complémentaire, pour caractériser des mécanismes impliqués dans la contraction-relaxation du cardiomyocyte.

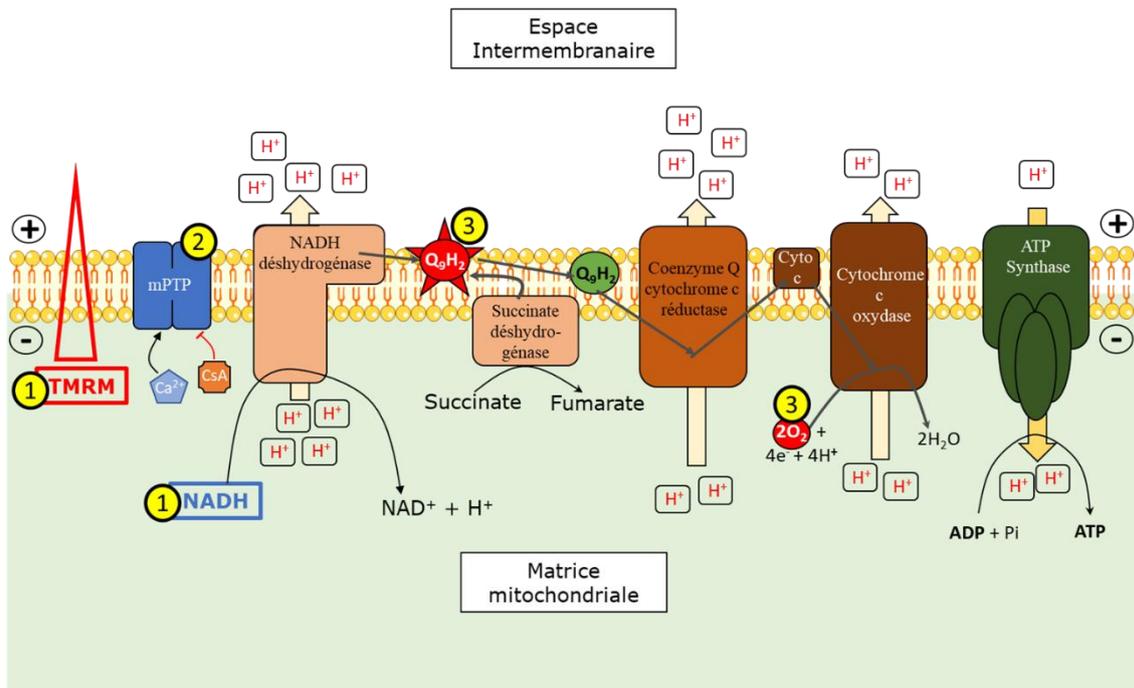


Figure 18 : Schéma de la chaîne respiratoire mitochondriale et des paramètres d'intérêts étudiés durant ma thèse. Chapitre I : suivi des états stationnaires bioénergétiques par microscopie de fluorescence à l'aide du NADH endogène (auto fluorescent) et du potentiel de membrane avec la sonde TMRM. Chapitre II : suivi des mêmes paramètres pour observer les ouvertures définitives et transitoires du mPTP. Chapitre III : Suivi par électrochimie de l'état redox de la CR par détection du taux de réduction des quinones et de l'intensité respiratoire mitochondriale.

Bibliographie

- Acin-Perez, Rebeca, et al. « Cyclic AMP Produced inside Mitochondria Regulates Oxidative Phosphorylation ». *Cell Metabolism*, vol. 9, n° 3, mars 2009, p. 265-76. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.cmet.2009.01.012.
- Altschafli, Beth A., et al. « The Mitochondrial Ryanodine Receptor in Rat Heart: A Pharmacokinetic Profile ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1768, n° 7, juillet 2007, p. 1784-95. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbamem.2007.04.011.
- Baughman, Joshua M., et al. « Integrative Genomics Identifies MCU as an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter ». *Nature*, vol. 476, n° 7360, août 2011, p. 341-45. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nature10234.
- Bazil, Jason N., et Ranjan K. Dash. « A Minimal Model for the Mitochondrial Rapid Mode of Ca²⁺ Uptake Mechanism ». *PLoS ONE*, édité par Matjaz Perc, vol. 6, n° 6, juin 2011, p. e21324. DOI.org (Crossref), doi:10.1371/journal.pone.0021324.
- Bernardi, Paolo, et Sophia von Stockum. « The Permeability Transition Pore as a Ca²⁺ Release Channel: New Answers to an Old Question ». *Cell Calcium*, vol. 52, n° 1, juillet 2012, p. 22-27. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.ceca.2012.03.004.
- Bers, D. Cardiac excitation–contraction coupling. *Nature* 415, p. 198–205 (2002). doi.org/10.1038/415198a.
- Bers, Donald M., et Tao Guo. « Calcium Signaling in Cardiac Ventricular Myocytes ». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1047, n° 1, juin 2005, p. 86-98. DOI.org (Crossref), doi:10.1196/annals.1341.008.
- Bers, Donald M. « Calcium Cycling and Signaling in Cardiac Myocytes ». *Annual Review of Physiology*, vol. 70, n° 1, mars 2008, p. 23-49. DOI.org (Crossref), doi:10.1146/annurev.physiol.70.113006.100455.
- Beutner, Gisela, Virendra K. Sharma, David R. Giovannucci, et al. « Identification of a Ryanodine Receptor in Rat Heart Mitochondria ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, n° 24, juin 2001, p. 21482-88. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.M101486200.
- Beutner, Gisela, Virendra K. Sharma, Lin Lin, et al. « Type 1 Ryanodine Receptor in Cardiac Mitochondria: Transducer of Excitation–Metabolism Coupling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1717, n° 1, novembre 2005, p. 1-10. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbamem.2005.09.016.
- Biesiadecki, Brandon J., et al. « Tri-Modal Regulation of Cardiac Muscle Relaxation; Intracellular Calcium Decline, Thin Filament Deactivation, and Cross-Bridge Cycling Kinetics ». *Biophysical Reviews*, vol. 6, n° 3-4, décembre 2014, p. 273-89. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s12551-014-0143-5.
- Bootman, Martin D., et al. « Atrial Cardiomyocyte Calcium Signalling ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1813, n° 5, mai 2011, p. 922-34. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbamcr.2011.01.030.
- Bravo-Sagua, Roberto, et al. « Calcium Transport and Signaling in Mitochondria ». *Comprehensive Physiology*, édité par Ronald Terjung, John Wiley & Sons, Inc., 2017, p. 623-34. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/cphy.c160013.
- Brookes, Paul S., et al. « Calcium, ATP, and ROS: A Mitochondrial Love-Hate Triangle ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 287, n° 4, octobre 2004, p. C817-33. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpcell.00139.2004.
- Buntinas, Linas, et al. « The Rapid Mode of Calcium Uptake into Heart Mitochondria (RaM): Comparison to RaM in Liver Mitochondria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1504, n° 2-3, avril 2001, p. 248-61. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0005-2728(00)00254-1.
- Carafoli E, Tiozzo R, Lugli G, Crovetto F, Kratzig C. The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *J Mol Cell Cardiol*. 1974 Aug;6(4):361-71. PubMed PMID: 4855051.
- Cárdenas, César, et al. « Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP₃ Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria ». *Cell*, vol. 142, n° 2, juillet 2010, p. 270-83. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.cell.2010.06.007.

Chance, Britton, et G. R. Williams. « The Respiratory Chain and Oxidative Phosphorylation ». *Advances in Enzymology - and Related Areas of Molecular Biology*, édité par F. F. Nord, John Wiley & Sons, Inc., 2006, p. 65-134. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/9780470122624.ch2.

Chen, Ruming, et al. « The Phosphorylation of Subunits of Complex I from Bovine Heart Mitochondria ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, n° 25, juin 2004, p. 26036-45. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.M402710200.

Cheng H, Lederer WJ. Calcium sparks. *Physiol Rev.* 2008 Oct;88(4):1491-545. doi: 10.1152/physrev.00030.2007. Review. PubMed PMID: 18923188.

Cooper, Ronald H., et al. « Regulation of Heart Muscle Pyruvate Dehydrogenase Kinase ». *Biochemical Journal*, vol. 143, n° 3, décembre 1974, p. 625-41. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj1430625.

Crompton, Martin. « The Regulation of Mitochondrial Calcium Transport in Heart ». *Current Topics in Membranes and Transport*, vol. 25, Elsevier, 1985, p. 231-76. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0070-2161(08)60769-8.

Crompton, M. "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death." *The Biochemical journal* vol. 341 (Pt 2), Pt 2 (1999): 233-49.

De Rasmio, Domenico, et al. « CAMP Regulates the Functional Activity, Coupling Efficiency and Structural Organization of Mammalian F₀F₁ ATP Synthase ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1857, n° 4, avril 2016, p. 350-58. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbabi.2016.01.006.

De Stefani, Diego, et al. « A Forty-Kilodalton Protein of the Inner Membrane Is the Mitochondrial Calcium Uniporter ». *Nature*, vol. 476, n° 7360, août 2011, p. 336-40. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nature10230.

Dedkova, Elena N., et Lothar A. Blatter. « Calcium Signaling in Cardiac Mitochondria ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 58, mai 2013, p. 125-33. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.yjmcc.2012.12.021.

Denton, R. M., P. J. Randle, et al. « Stimulation by Calcium Ions of Pyruvate Dehydrogenase Phosphate Phosphatase ». *Biochemical Journal*, vol. 128, n° 1, juin 1972, p. 161-63. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj1280161

Denton, R. M., D. A. Richards, et al. « Calcium Ions and the Regulation of NAD⁺-Linked Isocitrate Dehydrogenase from the Mitochondria of Rat Heart and Other Tissues ». *Biochemical Journal*, vol. 176, n° 3, décembre 1978, p. 899-906. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj1760899.

Di Benedetto, Giulietta, et al. « Mitochondrial Ca²⁺ Uptake Induces Cyclic AMP Generation in the Matrix and Modulates Organelle ATP Levels ». *Cell Metabolism*, vol. 17, n° 6, juin 2013, p. 965-75. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.cmet.2013.05.003.

Diolez, Philippe, et al. « Modular Regulation Analysis of Heart Contraction: Application to in Situ Demonstration of a Direct Mitochondrial Activation by Calcium in Beating Heart ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, vol. 293, n° 1, juillet 2007, p. R13-19. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpregu.00189.2006.

Diolez, Philippe & Deschodt-Arsac et al. (2015). *Integrative Methods for Studying Cardiac Energetics. Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). 1264. 289-303. 10.1007/978-1-4939-2257-4_26.

Eisner, V., et al. « Interactions between Sarco-Endoplasmic Reticulum and Mitochondria in Cardiac and Skeletal Muscle - Pivotal Roles in Ca²⁺ and Reactive Oxygen Species Signaling ». *Journal of Cell Science*, vol. 126, n° 14, juillet 2013, p. 2965-78. DOI.org (Crossref), doi:10.1242/jcs.093609.

Fabiato, A. « Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 245, n° 1, American Physiological Society, juillet 1983, p. C1-14, doi:10.1152/ajpcell.1983.245.1.C1.

Fearnley, C. J., et al. « Calcium Signaling in Cardiac Myocytes ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 3, n° 11, novembre 2011, p. a004242-a004242. DOI.org (Crossref), doi:10.1101/cshperspect.a004242.

Ferreira, Rita, et al. « Subsarcolemmal and Intermyo-fibrillar Mitochondria Proteome Differences Disclose Functional Specializations in Skeletal Muscle ». *PROTEOMICS*, vol. 10, n° 17, septembre 2010, p. 3142-54. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/pmic.201000173.

García-Bermúdez, Javier, et al. « PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H⁺-ATP Synthase ». *Cell Reports*, vol. 12, n° 12, septembre 2015, p. 2143-55. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.celrep.2015.08.052.

García-Pérez, Cecilia, et al. « Alignment of Sarcoplasmic Reticulum-Mitochondrial Junctions with Mitochondrial Contact Points ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 301, n° 5, novembre 2011, p. H1907-15. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpheart.00397.2011.

Griffiths, Elinor J. « Species Dependence of Mitochondrial Calcium Transients during Excitation–Contraction Coupling in Isolated Cardiomyocytes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 263, n° 2, septembre 1999, p. 554-59. DOI.org (Crossref), doi:10.1006/bbrc.1999.1311.

Gunter, T. E., et D. R. Pfeiffer. « Mechanisms by Which Mitochondria Transport Calcium ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 258, n° 5, mai 1990, p. C755-86. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpcell.1990.258.5.C755.

Halestrap, A. « Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening during Myocardial Reperfusion—a Target for Cardioprotection ». *Cardiovascular Research*, vol. 61, n° 3, février 2004, p. 372-85. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0008-6363(03)00533-9.

Halestrap, Andrew P., et Philippe Pasdois. « The Role of the Mitochondrial Permeability Transition Pore in Heart Disease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1787, n° 11, novembre 2009, p. 1402-15. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbabi.2008.12.017.

Harris, D. A., et A. M. Das. « Control of Mitochondrial ATP Synthesis in the Heart ». *Biochemical Journal*, vol. 280, n° 3, décembre 1991, p. 561-73. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj2800561.

Jiang, D., et al. « Genome-Wide RNAi Screen Identifies Letm1 as a Mitochondrial Ca²⁺/H⁺ Antiporter ». *Science*, vol. 326, n° 5949, octobre 2009, p. 144-47. DOI.org (Crossref), doi:10.1126/science.1175145.

Katona, Dávid, et al. « Calcium-Dependent Mitochondrial cAMP Production Enhances Aldosterone Secretion ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. 412, septembre 2015, p. 196-204. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.mce.2015.05.002.

Kerkhofs, Martijn, et al. « Emerging Molecular Mechanisms in Chemotherapy: Ca²⁺ Signaling at the Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes ». *Cell Death & Disease*, vol. 9, n° 3, mars 2018, p. 334. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/s41419-017-0179-0.

Kirichok, Yuriy, et al. « The Mitochondrial Calcium Uniporter Is a Highly Selective Ion Channel ». *Nature*, vol. 427, n° 6972, janvier 2004, p. 360-64. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nature02246.

Fontanesi, Flavia. « Mitochondria: Structure and Role in Respiration ». *ELS*, édité par John Wiley & Sons Ltd, John Wiley & Sons Ltd, 2015, p. 1-13. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/9780470015902.a0001380.pub2.

Lechat, P., et al. « Mécanismes de la contractilité cardiaque ». *médecine/sciences*, vol. 2, n° 2, 1986, p. 73. DOI.org (Crossref), doi:10.4267/10608/3441.

Li, Yuwen, et al. « LETM1 Is Required for Mitochondrial Homeostasis and Cellular Viability (Review) ». *Molecular Medicine Reports*, mars 2019. DOI.org (Crossref), doi:10.3892/mmr.2019.10041.

Linn, T C et al. "Alpha-keto acid dehydrogenase complexes. X. Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex from beef kidney mitochondria by phosphorylation and dephosphorylation." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 62,1 (1969): 234-41. doi:10.1073/pnas.62.1.234

Lionel H. Opie and Donald M. Bers. "Mechanisms of Cardiac Contraction and Relaxation". Braunwald's Heart Disease_ A Textbook of Cardiovascular Medicine, edited by SAUNDERS, 18th September 2014, p.429-453.

Lodish, Harvey F, Arnold Berk, Chris Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Bretscher, Hidde L. Ploegh, and Paul T. Matsudaira. Molecular Cell Biology. New York: W.H. Freeman, 2008. Print.

Lu, Xiyuan, et al. « Intrafibrillar and Perinuclear Mitochondrial Heterogeneity in Adult Cardiac Myocytes ». Journal of Molecular and Cellular Cardiology, vol. 136, novembre 2019, p. 72-84. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.yjmcc.2019.08.013.

Maack, Christoph, et al. « Elevated Cytosolic Na⁺ Decreases Mitochondrial Ca²⁺ Uptake During Excitation-Contraction Coupling and Impairs Energetic Adaptation in Cardiac Myocytes ». Circulation Research, vol. 99, n° 2, juillet 2006, p. 172-82. DOI.org (Crossref), doi:10.1161/01.RES.0000232546.92777.05.

McCormack, J. G., et R. M. Denton. « The Effects of Calcium Ions and Adenine Nucleotides on the Activity of Pig Heart 2-Oxoglutarate Dehydrogenase Complex ». Biochemical Journal, vol. 180, n° 3, juin 1979, p. 533-44. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj1800533.

Min, Choon Kee, et al. « Coupling of Ryanodine Receptor 2 and Voltage-Dependent Anion Channel 2 Is Essential for Ca²⁺ Transfer from the Sarcoplasmic Reticulum to the Mitochondria in the Heart ». Biochemical Journal, vol. 447, n° 3, novembre 2012, p. 371-79. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/BJ20120705.

Mitchell, Peter, et Jennifer Moyle. « Chemiosmotic Hypothesis of Oxidative Phosphorylation ». Nature, vol. 213, n° 5072, janvier 1967, p. 137-39. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/213137a0.

Miyata, H., et al. « Measurement of Mitochondrial Free Ca²⁺ Concentration in Living Single Rat Cardiac Myocytes ». American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, vol. 261, n° 4, octobre 1991, p. H1123-34. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpheart.1991.261.4.H1123.

Nicholls, David G., et Stuart J. Ferguson. Bioenergetics. Fourth edition, Academic Press, Elsevier, 2013.

O-Uchi, Jin, et al. « Molecular Identities of Mitochondrial Ca²⁺ Influx Mechanism: Updated Passwords for Accessing Mitochondrial Ca²⁺-Linked Health and Disease ». The Journal of General Physiology, vol. 139, n° 6, juin 2012, p. 435-43. DOI.org (Crossref), doi:10.1085/jgp.201210795.

Palty, R., et al. « NCLX Is an Essential Component of Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ Exchange ». Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 107, n° 1, janvier 2010, p. 436-41. DOI.org (Crossref), doi:10.1073/pnas.0908099107.

Parmacek, Michael S., et R. John Solaro. « Biology of the Troponin Complex in Cardiac Myocytes ». Progress in Cardiovascular Diseases, vol. 47, n° 3, novembre 2004, p. 159-76. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.pcad.2004.07.003.

Perocchi, Fabiana, et al. « MICU1 Encodes a Mitochondrial EF Hand Protein Required for Ca²⁺ Uptake ». Nature, vol. 467, n° 7313, septembre 2010, p. 291-96. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nature09358.

Perry, Seth W., et al. « Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide ». BioTechniques, vol. 50, n° 2, février 2011, p. 98-115. DOI.org (Crossref), doi:10.2144/000113610.

Schlame, Michael, et al. « Mitochondrial Cardiolipin in Diverse Eukaryotes. Comparison of Biosynthetic Reactions and Molecular Acyl Species ». European Journal of Biochemistry, vol. 212, n° 3, mars 1993, p. 727-33. DOI.org (Crossref), doi:10.1111/j.1432-1033.1993.tb17711.x.

Sedova, Marina, et al. « Integration of Rapid Cytosolic Ca²⁺ Signals by Mitochondria in Cat Ventricular Myocytes ». American Journal of Physiology-Cell Physiology, vol. 291, n° 5, novembre 2006, p. C840-50. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpcell.00619.2005.

Sham, J. S., et al. « Species Differences in the Activity of the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger in Mammalian Cardiac Myocytes. » The Journal of Physiology, vol. 488, n° 3, novembre 1995, p. 623-31. DOI.org (Crossref), doi:10.1113/jphysiol.1995.sp020995.

Shannon, Thomas R., et Donald M. Bers. « Integrated Ca²⁺ Management in Cardiac Myocytes ». *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1015, n° 1, mai 2004, p. 28-38. DOI.org (Crossref), doi:10.1196/annals.1302.003.

Voet, Donald, et al. *Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level*. 5th edition, John Wiley & Sons, 2016.

Wang, Shi-Qiang, et al. « Ca²⁺ Signalling between Single L-Type Ca²⁺ Channels and Ryanodine Receptors in Heart Cells ». *Nature*, vol. 410, n° 6828, mars 2001, p. 592-96. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/35069083.

Wendt-Gallitelli, M. F., et G. Isenberg. « Total and Free Myoplasmic Calcium during a Contraction Cycle: X-Ray Microanalysis in Guinea-Pig Ventricular Myocytes. » *The Journal of Physiology*, vol. 435, n° 1, avril 1991, p. 349-72. DOI.org (Crossref), doi:10.1113/jphysiol.1991.sp018514.

Yuan, W., et al. « Comparison of Sarcolemmal Calcium Channel Current in Rabbit and Rat Ventricular Myocytes. » *The Journal of Physiology*, vol. 493, n° 3, juin 1996, p. 733-46. DOI.org (Crossref), doi:10.1113/jphysiol.1996.sp021418.

Zhang, Fan, Liping Zhang, et al. « Mitochondrial cAMP Signaling ». *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 73, n° 24, décembre 2016, p. 4577-90. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s00018-016-2282-2.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Matériels

a) Produits chimiques

Avant de montrer les différents résultats obtenus au cours de ma thèse, je tenais d'abord à lister et à décrire dans cette partie le matériel et les méthodes utilisés afin d'aider à la compréhension des différents chapitres qui suivent. Les noms des produits utilisés et reportés dans le tableau ci-dessous sont ceux, en anglais, que l'on retrouve dans les catalogues des fournisseurs ; entre parenthèses, sont données leurs abréviations usuelles.

Fonctions	Produits	Fournisseur	Référence
Sonde fluorescente	Tetramethylrhodamine, Methyl Ester Perchlorate (TMRM)	Sigma	T5428
Inhibiteurs mitochondriaux	Antimycin A de Streptomyces (Aa)	Sigma	A8674
	Myxothiazol	Sigma	T5580
	Oligomycin A	Sigma	75351
	Carboxyatractyloside potassium salt (C-ATR)	Sigma	C4992
	Cyclosporin A (CsA)	Sigma	C3662
	Rotenone	Sigma	R8875
Activateurs mitochondriaux	Adenosine 5'-diphosphate sodium salt	Sigma	A2754
	Sodium Succinate dibasic hexahydrate	Sigma	S2378
	L(-)-Malic acid disodium salt	Sigma	M9138
	L-Glutamic acid monosodium salt hydrate	Sigma	G1626
	Calcium chloride solution	Sigma	21115
Méiateur rédox	Coenzyme Q2	Sigma	C8081

Tampon de mesure	Sucrose	Sigma	S7903
	Ethylene glycol-bis (2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)	Sigma	E0396
	Tris base	Sigma	10708976001
	Bovine serum albumin (BSA)	Sigma	A2153
	Potassium chloride (KCl)	Sigma	P3911
	Magnesium chloride (MgCl ₂)	Sigma	M8266
	Potassium phosphate monobasic (KH ₂ PO ₄)	Sigma	P5655

b) Appareils

Appareils	Marque	Modèle
Microscope plein champ inversé	Leica	DM 6000 B
Objectif : 40x, NA : 0,75	Leica	/
Source de lumière externe pour excitation en fluorescence	Leica	EL6000
Caméra CMOS	Hamatsu	Orca-flash 4.0 V2
Potentiostat	Biologic	VSP-300
Plasma Cleaner	Harrick Plasma	PDC-002
Spectrophotomètre de Fluorescence	Varian	Cary Eclipse
Spectrophotomètre UV-visible	Varian	Cary 100

c) Autres

Désignation	Marque	Référence
Fil d'argent (diamètre 1 mm) chloruré : Électrode de référence	GoodFellow	AG005160
Electrode de référence intégrée solide	eDAQ	ET072-1
Fil de platine (diamètre 1 mm) : contre-électrode	GoodFellow	PT005155
Electrode de carbone vitreux (3 mm) : électrode de travail	Palmsens	PS104P
Electrode de Clark	/	/
Lamelle de verre (170 μm d'épaisseur)	Fischer Scientific	NC9537307
Graisse de silicone	Fischer Scientific	NC0477082

II. Méthodes

a) Préparation des mitochondries

i. Extraction du cœur de rat

Les mitochondries sont préparées le matin de l'expérience à l'IHU Iryc. Pour cela un mâle Wistar (Laboratoire Janvier, France) pesant entre 250 et 350 g est anesthésié à l'aide d'isoflurane à 4% pendant 2 minutes. Le rat est ensuite pesé puis on lui injecte en sous-cutané 0,1 mL à 5000 U.mL⁻¹ d'héparine (anti-coagulant), il est alors replacé dans la chambre avec l'isoflurane pendant 5 minutes. Le rat est ensuite euthanasié par dislocation cervicale, très rapidement ensuite le cœur est prélevé (il doit être toujours battant) et déposé dans la solution d'extraction (sucrose 300 mM, tris 10 mM, EGTA 2 mM, pH 7,2) préalablement conservée dans la glace. Le cœur est ensuite rincé et pesé. Le reste du protocole s'effectue ensuite en chambre froide.

ii. Extraction des mitochondries

Le cœur est alors découpé afin de ne garder que les ventricules, qui sont ensuite finement découpés et ajoutés à 30 mL de tampon d'extraction froid dans lequel $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ de protéinases ont préalablement été ajoutés, le tout est ensuite agité pendant 7 minutes. Cette solution est ensuite mise dans un potter qui à l'aide d'un piston va être homogénéisé afin de dissocier les tissus fragilisés par la protéase les derniers morceaux de tissu pendant 3 minutes, pour une vingtaine d'aller-retours du piston dans le potter. Cette solution homogénéisée est ensuite centrifugée pendant 7 minutes à 7500 g. Le surnageant est jeté et le culot est re-suspendu dans le tampon d'extraction supplémenté par de la BSA (0.2% masse) et maintenu dans la glace. Cette nouvelle solution est ensuite centrifugée pendant 10 minutes à 680 g. Le surnageant contenant les mitochondries est ensuite filtré à l'aide d'une toile à bluter puis centrifugé pendant 10 minutes à 7000 g. Le surnageant est alors jeté et le culot re-suspendu dans $40 \mu\text{L}$ de tampon d'extraction avec BSA ; les mitochondries sont prêtes.

iii. Quantification des mitochondries

La quantification des mitochondries est réalisée par la technique de Bradford, pour cela les mitochondries sont diluées au demi dans de l'eau MilliQ. Une gamme étalon de BSA est alors préparée de concentrations égales à 0-0,1-0,25-0,5-0,6-0,75 mg.ml^{-1} dans $400 \mu\text{L}$ de tampon Bradford. Les cuves sont ensuite laissées dans le noir pendant 10 minutes avant lecture de la densité optique à 595 nm.

b) Analyses par microscopie optique

i. Préparation des mitochondries

Avant le début de l'expérience, les mitochondries sont diluées à une concentration finale de 50 mg.ml^{-1} dans du tampon de respiration (Sucrose 300 mM, KCl 100 mM, EGTA 1 mM, MgCl_2 20 mM, KH_2PO_4 10 mM et BSA 0,1 %). Après 10 minutes les mitochondries sont diluées à la concentration de travail de $0,1 \text{ mg.ml}^{-1}$ dans le tampon de respiration en présence de 10 nM de TMRM (sonde de potentiel de membrane). De nouveau, 10 minutes sont attendues avant que $600 \mu\text{L}$ de la solution soit déposée sur une lamelle de verre, préalablement traitée avec un plasma oxygène ($P = 300 \text{ mTorr}$, 100 % O_2) mise en place sur le microscope. En fonction du but recherché, un temps d'attente de 20 minutes peut être requis afin de laisser les mitochondries sédimenter et se déposer sur le support.

ii. Suivi des états stationnaires bioénergétiques

Pour réaliser ce suivi (cf chapitre I), toutes les 10 secondes une image est prise pendant 10 minutes. Pour le suivi du TMRM, une exposition de 40 msec a été réalisée à l'aide du filtre N2.1 de Leica (excitation : 515-560 nm ; émission : >590 nm). Pour le suivi du NADH endogène, l'exposition (500 msec) a été réalisée avec le filtre A de Leica (excitation : 340-380 nm, émission : >425 nm) pour une puissance de lampe de 1. Pour l'observation en lumière transmise, l'exposition était de 40 msec également. Après un certain temps, les activateurs-inhibiteurs mitochondriaux sont ajoutés selon la séquence suivante : 1) Glutamate-Malate (5 mM) ou succinate (5 mM) et roténone (4 µM) ou glutamate-malate-succinate. 2) ADP à 1 mM. 3) Olygomycine à 5 µM ou C- ATR à 5 µM. 4) CCCP à 0,5 µM.

iii. Suivi de la dépolarisation mitochondriale

Pour suivre l'évolution du potentiel de membrane mitochondrial (ouverture du mPTP - cf chapitre II), les mitochondries ont été utilisées à 0.1 mg.ml⁻¹ et incubées avec du TMRM à 10 nM. Deux protocoles d'acquisition ont été utilisés en fonction de la durée d'observation voulue : un premier protocole, d'acquisition longue avec une prise d'image toutes les 10 secondes pendant 1 heure avec une exposition de 40 msec et aucun temps de sédimentation. Le deuxième protocole correspond à une acquisition courte avec une prise d'image toutes les 400 msec pour une exposition de 40 msec pendant 3 minutes. Un temps de sédimentation de 20 minutes a été attendu avant le début de l'acquisition. Ce protocole a été répété à trois reprises consécutives sur le même échantillon, mais entre chaque acquisition une nouvelle zone de la lamelle a été choisie (autres mitochondries analysées). Pour induire l'ouverture du mPTP, du calcium à 1 mM (concentration finale) est ajouté dans la solution mitochondriale, juste après sédimentation ou après 15 minutes. Pour inhiber l'ouverture du pore, de la CsA à 2 µM est ajoutée pendant l'étape de dilution des mitochondries à 0.1 mg.ml⁻¹ en amont de l'expérience.

iv. Traitement des images de microscopie

Nous avons calculé la résolution optique de notre système de microscopie avec la formule suivante :

$$(1) \quad d = \frac{0,61 * \lambda}{\text{Ouverture numérique}}$$

Cette équation permet de connaître la distance minimale nécessaire entre deux objets pour les distinguer (critère de Rayleigh selon les dimensions de la figure de Airy). Elle comprend comme paramètres l'ouverture numérique (O.N. ou N.A. en anglais) de l'objectif 40x utilisé, qui est de 0,75, ainsi que les longueurs maximales d'émission (λ), à savoir 575 nm pour le TMRM et 450 nm pour le NADH. On trouve alors une résolution théorique de 467 nm pour le TMRM, et de 366 nm pour le NADH. La caméra utilisée présente une taille de pixel de 6,5 μm et un champ d'acquisition de 2048 x 2048 pixels, ce qui correspond à un champ de 332.8 x 322.8 μm au 40x.

Afin d'éliminer le défaut d'illumination non homogène sur l'ensemble du champ (cf chapitre I), un traitement des images a été réalisé avec le logiciel libre « Fiji ». Tout d'abord, les images à traiter sont compilées (image/stack/images to stack). Cette compilation va être dupliquée (image/duplicate). Sur une des compilations, un filtre Gaussien d'indice 60 est utilisé (process/filters/Gaussian Blur), la compilation résultante est soustraite à la compilation brute (image/process/image calculator/subtract). Sur cette nouvelle compilation, un filtre médian d'indice 2 est utilisé (image/process/filters/median). L'image ainsi obtenue est celle sur laquelle le reste du protocole va être employé.

v. *Utilisation du module « TrackMate » de Fiji*

Une fois les images traitées et compilées, celles-ci vont être analysées par le module « Trackmate » (plugin/Tracking/TrackMate) pour suivre le déplacement des objets et l'évolution de leur intensité de fluorescence au cours des images. Pour cela le « DoG detector » est utilisé, avec un « Estimated blob diameter » de 10 pixels pour un seuillage compris entre 1 et 5. Par la suite, le « simple LAP Tracker » est choisi avec un « Linking max distance » de 15, un « Gap-closing max distance » de 15 également, et un « Gap-closing max frame gap » de 50. Finalement, en cliquant sur « Analysis », les fichiers « Spots in track statistics », « Link in track statistics » et « Tracks statistics » sont sauvegardés en fichier csv. Toutes ces valeurs peuvent être modifiées en fonction de la compilation d'images et du but recherché.

vi. *Script « Python »*

Une fois les jeux de données générés, ceux-ci vont être analysés par différents scripts écrits avec le langage de programmation « Python » et l'éditeur de texte « Spyder ». Ces différents scripts et leurs descriptions sont consultables en annexes.

c) Analyses électrochimiques

Le double suivi par électrochimie du taux de réduction des quinones et de la respiration mitochondriale a été réalisé par chronoampérométrie (suivi du courant d'oxydation ou de réduction au cours du temps). L'ensemble du matériel (cuve d'oxygraphie avec les électrodes, détecteurs du potentiostat, agitateur) a été placé dans une cage de Faraday, puisque des courants inférieurs au nanoampère peuvent être détectés (voir chapitre III). 6 mL de tampon de respiration sont placés dans la cuve d'oxygraphie et sont maintenus sous agitation à 800 rpm. Les mitochondries sont ajoutées (0.2 à 0.4 mg.ml⁻¹) après stabilisation des courants de chaque électrode (plusieurs minutes).

Le suivi du taux de réduction des quinones a été effectué à l'aide d'une électrode de carbone vitreux (électrode de travail), de l'électrode de référence « Leakless » et d'un fil de platine (contre électrode), le potentiel utilisé était de 0,35 V vs Ag/AgCl. Le suivi de la respiration mitochondriale a été effectué à l'aide d'une électrode de Clark à un potentiel de -0,8V vs Ag/AgCl. Le contrôle respiratoire a été déterminé en divisant la vitesse de consommation d'oxygène à l'état 3 (ADP) par la vitesse à l'état substrat.

En amont de l'ajout des mitochondries, la quinone Q₂ (médiateur rédox) est ajoutée à une concentration de 0,5 µM à 5 µM. Par la suite, différentes séquences d'ajouts sont utilisées : 1) Glutamate-Malate (5 mM) ou succinate (5 mM) et roténone (4 µM) ou glutamate-malate et succinate. 2) ADP en excès (5 mM), ou limitant (1 mM) dans ce cas-là plusieurs injections peuvent être faites. 3) Olygomycine à 5 µM ou C-ATR à 5µM. 4) Aa à 2,5 µM ou alors l'hypoxie est attendue.

|

CHAPITRE I : NOUVELLE
METHODE DE SUIVI
INDIVIDUEL ET ANALYSES DE
MITOCHONDRIES CARDIAQUES

CHAPITRE I

I. Introduction : méthodes d'analyses des mitochondries par microscopie

L'analyse par microscopie de mitochondries, individuelles ou au sein de cellules, reste à l'heure actuelle une technique extrêmement importante pour l'étude de leur fonctionnement, que ce soit d'un point de vue physiologique (De Giorgi, F., et al 2000) ou pathologique (cancer, d'Alzheimer etc... ; Creed, Sarah, et Matthew McKenzie 2019 ; Quintanilla, Rodrigo A., et al 2009). En effet grâce au progrès des techniques de microscopie cette approche permet de comparer facilement des populations entre elles et d'observer des cinétiques d'évènements de façon non-invasive.

L'existence d'un catalogue de sondes fluorescentes admis par la communauté scientifique pour toutes les grandes fonctions mitochondriales (potentiel de membrane, production de ROS, etc ...) participe grandement à la démocratisation de cette approche.

De par l'amélioration constante des techniques de microscopie et l'élaboration de nouvelles sondes de fluorescence (Jiang, Na, et al 2015), l'analyse par microscopie du fonctionnement mitochondrial restera encore grandement utilisée dans les années à venir.

a) Le potentiel de membrane interne mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

Un des paramètres mitochondriaux classiquement suivis en microscopie est le potentiel de membrane. Ce dernier participant à la production de l'ATP (cf introduction générale), cela fait de lui un paramètre important à étudier. Pour ce faire, différentes sondes

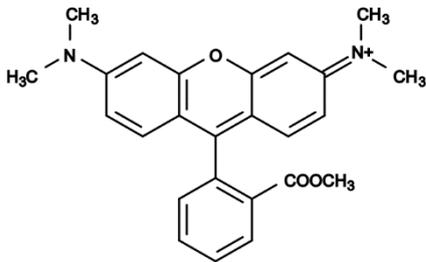


Figure 1 : Structure chimique du Tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM)

fluorescentes existent (JC-1, Safranine, DiOC₆, Rhodamine 123, etc ...), chacune ayant ses spécificités en termes de mode d'action, longueur d'onde, rendement quantique etc... (Voir revue de Perry, Seth W., et al 2011 pour plus d'informations). Durant ma thèse nous nous sommes intéressés au Tetramethylrhodamine-methyl-ester (TMRM) qui est une sonde dérivée de la rhodamine, très proche de la sonde Tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE).

Cette sonde fluorescente rouge orange, lipophile et cationique peut traverser les membranes librement et s'accumuler au sein de la matrice mitochondriale de manière proportionnelle au $\Delta\Psi_m$ (Nicholls, David G et al 2000). Il existe deux méthodes pour utiliser cette sonde qui vont dépendre de sa concentration ; un premier mode dit de « quenching » quand la sonde est utilisée à forte concentration $> 1 \mu\text{M}$ (Creed, Sarah, et Matthew McKenzie 2019). Dans ce mode la fluorescence diminue plus le $\Delta\Psi_m$ est négatif et inversement. Ce mécanisme s'explique par une agrégation à forte concentration de la sonde au sein de la matrice (notamment quand le $\Delta\Psi_m$ est très négatif) qui va réduire sa capacité à absorber la lumière, et provoque donc une diminution de fluorescence. Ce mode est utilisé pour amplifier des changements faibles ou rapides du $\Delta\Psi_m$ et donc les visualiser plus facilement (Davidson, Sean M., et al 2007 ; Nicholls, David G 2018). Cependant, une forte concentration de la sonde provoque le phénomène dit de « phototoxicité », c'est-à-dire une production de ROS issue d'un processus photoélectrochimique de réaction de l'oxygène (Pouvreau, Sandrine 2010), sous l'effet de l'illumination. Cela va ainsi perturber les activités bioénergétiques de la mitochondrie en inhibant la chaîne respiratoire (Perry, Seth W., et al 2011), et peut également provoquer l'ouverture du mPTP (Bonora Massimo, et al 2016), dont je discuterai plus en détail dans le chapitre II.

Le deuxième mode est celui dit de « non quenching » (10-500 nM), qui au contraire du mode précédent va voir son intensité de fluorescence augmenter avec le $\Delta\Psi_m$ devenant plus négatif (sa concentration intra-mitochondriale augmentant). Cette approche permet d'être plus quantitatif et moins phototoxique du fait de la concentration plus faible en TMRM. En tout cas, quel que soit le mode choisi, le TMRM présente une vitesse d'équilibrage rapide de part et d'autre de la membrane interne (20 fois supérieur à la rhodamine 123 a titre d'exemple ; Nicholls, David G et al 2000), cette sonde possède également une très faible toxicité directe (Davidson, Sean M., et al 2007). Au vu de l'effet phototoxique à forte concentration, durant ma thèse j'ai choisi de travailler uniquement avec le mode « non quenching » à une concentration de 10 nM et une illumination la plus faible possible.

Nom	Excitation (nm)	Emission (nm)	Concentration	Remarques
JC-1	510 (vert) 585 (rouge)	527 (vert) 590 (rouge)	2 μ M	Quand cette sonde s'accumule dans la matrice mitochondriale il y a un changement dans la fluorescence émise qui passe du vert au rouge qui s'explique par un changement de concentration locale, la sonde étant sous la forme monomérique (fluorescence verte) va venir s'accumuler et former des agrégats (fluorescence rouge). Il est donc nécessaire de réaliser un ratio de ces deux émissions pour pouvoir suivre le potentiel de membrane, il faut donc être prudent avec la concentration utilisée.
TMRM/TMRE	548	574	10-100 nM mode non quenching >1 μ M mode quenching	Cette sonde s'équilibre rapidement avec les mitochondries. Il existe deux modes d'utilisation de cette sonde qui dépendent de la concentration choisie. Pour une concentration supérieure à 1 μ M, c'est le mode « quenching » qui est utilisé, alors que pour une concentration inférieure c'est le mode « non-quenching ». Le choix d'un mode ou l'autre est défini en fonction de l'objectif d'utilisation.
Rhodamine 123	507	529	50 nM mode non quenching >1 μ M mode quenching	La Rhodamine 123 a une perméabilité plus lente avec la mitochondrie mais cela facilite la visualisation des changements de fluorescence. A un effet plus fort d'inhibition sur la CR et se lie moins bien aux mitochondries que le TMRM (Scaduto, Russell C., et Lee W 1999). Possède également un mode quenching et non-quenching.
Safranine	495	587	1 μ M à 10 μ M	Au contraire des autres sondes présentées, la safranine peut se fixer dans la membrane interne mitochondriale (Figueira, Tiago R, et al 2012).
DiOC ₆	484	501	1 nM	Cette sonde est le plus souvent utilisé en cytométrie en flux. Elle permet de suivre efficacement le potentiel de membrane mitochondrial même à faible concentration \approx 1 nM (Rottenberg, Hagai, et Shaolong Wu 1998).

Table I : Liste des sondes fluorescentes pour le suivi du potentiel de membrane interne mitochondrial

b) Le couple NADH/NAD⁺

En parallèle du suivi du $\Delta\Psi_m$ par le TMRM, nous avons également suivi le ratio du couple NAD⁺/NADH, par la mesure du NADH endogène mitochondrial. Substrat du complexe I, cette molécule est fluorescente que ce soit sous sa forme oxydée ou réduite avec un pic d'absorption dans l'ultraviolet à 259 nm. Cependant, la forme réduite (NADH) présente un deuxième pic d'absorption à 339 nm, ce qui permet de mesurer par spectrophotométrie la conversion de l'un vers l'autre. Toutefois le NAD⁺ ne présente pas de pic d'émission, seul le NADH possède un pic à 460 nm. Si dans le cadre de ma thèse, nous avons choisi de suivre cette molécule endogène fluorescente c'est que cela permet de donner une indication de l'état de la CR, sans besoin d'une sonde externe et que son spectre d'émission est suffisamment éloigné de celui du TMRM pour éviter tout chevauchement.

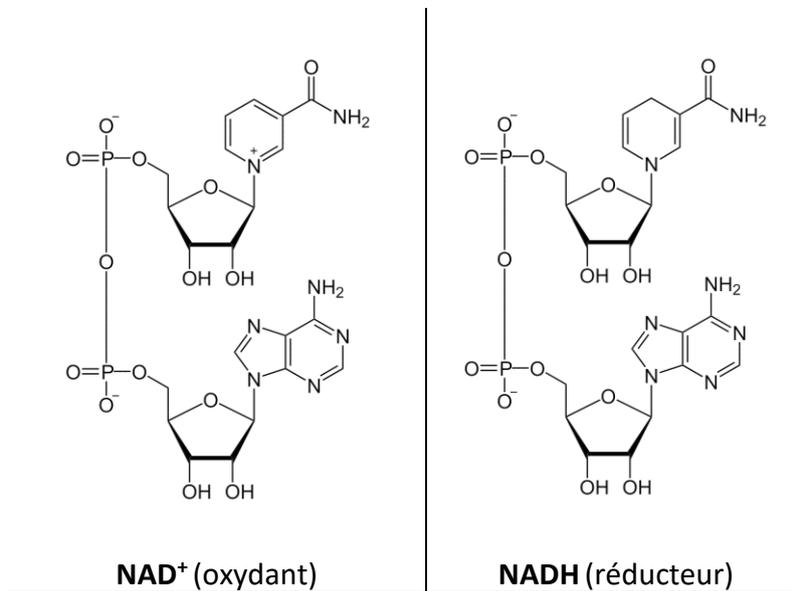


Figure 2 : Structure chimique du nicotinamide adénine dinucléotide sous sa forme oxydée (NAD⁺), à gauche, et sous sa forme réduite (NADH) à droite.

Pour résumer le protocole expérimental que j'ai utilisé et que j'ai mentionné ci-dessus, nous allons par épifluorescence suivre simultanément deux paramètres en fluorescence à savoir : le $\Delta\Psi_m$ avec la sonde TMRM et l'état rédox moyen de la CR avec le NAD^+/NADH . Un dernier paramètre sera suivi en même temps : l'intégrité physique des mitochondries isolées grâce à leur image en lumière blanche transmise, ce dernier point sera important dans le contexte du mPTP détaillé plus longuement dans le chapitre suivant. Ces trois paramètres ensemble ont pour vocation de nous aider à s'assurer du bon fonctionnement des mitochondries isolées, et à suivre leur activité bioénergétique.

c) Analyse automatisée des signaux

Le dernier point que j'aimerais aborder dans cette introduction est l'analyse automatisée, informatisée, pour traiter d'importants jeux de données expérimentaux. En effet de plus en plus de publications montrent la force de ces approches informatisées pour traiter ces données d'une nouvelle façon. Ces approches font partie intégrante de la bio-informatique qui a été historiquement démocratisée dans les années 2000 par l'étude des « omiques », particulièrement la génomique et l'avènement du séquençage haut débit (Shendure, Jay, et al 2017), ainsi que la métabolomique (Scossa, Federico, et al 2018). Ces approches informatiques devenues classiques dans ces domaines répondent au besoin du « big-data », c'est-à-dire l'essor de volumes de données expérimentales très importants que les logiciels classiques comme « Excel ou Origin Pro » ne permettent pas de traiter. Pour y faire face, de nouveaux outils se sont développés, comme les logiciels « Matlab » ou « R », qui permettent grâce à des langages de programmation simplifiés tels que « python » d'accéder aux outils du traitement automatisé (Zhang, Bo, et al 2017).

Ces nouveaux outils se démocratisent également dans les autres pans de la recherche en biologie et particulièrement en microscopie, que ce soit dans le secteur académique (Kostal, Vratislav, et al 2011 ; Andrews, Simon et al 2010) ou industriel (Molecular devices, « Evaluation of mitochondrial integrity and mitochondria membrane potential using automated cell imaging and analysis »). En effet, avec le développement de méthodes d'acquisition automatisées en microscopie (Iannetti, Eligio F., et al 2016), ou d'analyse à grande échelle de cellules, la microscopie peut être également confrontée aux problématiques du « big data » et nécessiter de nouvelles approches. C'est notamment l'exemple de l'outil développé par Radstake, F. D. W., et al 2019, qui est un logiciel en libre accès nommé « CALIMA », qui permet l'étude et l'analyse de flux calciques dans des cellules. Dans leurs travaux ces auteurs ont utilisé ce logiciel pour suivre les communications neuronales dans des cultures *in vitro*. Cette étude est le parfait exemple des avantages que peut apporter l'automatisation des données comme un gain de temps ou encore la capacité

d'analyser de grands jeux de données mais également une plus grande reproductibilité et fiabilité dans l'analyse des résultats.

De plus, l'approche très complète développée par Leonard, Anthony P., et al 2015 constitue un autre exemple intéressant de l'étude de la dynamique du réseau mitochondrial (événements de fusion, fission etc ...) notamment grâce à des notions de « machine learning », c'est-à-dire qu'une intelligence artificielle (IA) est créée et va « apprendre » au fur et à mesure des tests pour se perfectionner. Ce dernier point est, selon moi, l'ultime étape du développement de ces approches car la mise en place d'IAs de plus en plus pointues va aider grandement à la démocratisation et à la prise en main de ces approches. De nombreux autres exemples intéressants existent comme l'étude développée par Caffrey Brian J et al 2019 qui utilise ici aussi du « machine learning » pour présenter une nouvelle méthode plus rapide de segmentation (c'est-à-dire l'identification des différentes structures) sur une coupe de muscle squelettique, et qui leur a permis de reconstruire les réseaux mitochondriaux en 3D, pour les caractériser. La segmentation est un autre point fort de ces approches automatisées car cela permet d'identifier plus rapidement les différentes structures présentes au sein d'une cellule ou d'un tissu pour pouvoir les analyser par la suite.

À l'opposé des avantages cités ci-dessus, divers arguments vont freiner cette démocratisation et le développement de ces approches. Notamment, la nécessité d'acquérir des compétences en informatique et mathématiques appliquées pour maîtriser un langage de programmation qui peut être rébarbative pour certaines personnes car jugées trop difficile d'accès. Un autre inconvénient est la méconnaissance de l'utilité de ces approches, même si de plus en plus de publications montrent l'avantage de développer ces méthodes, elles restent pour l'instant encore trop peu utilisées.

Au cours de ma thèse, j'ai été également confronté à la gestion de jeux de données importants, pour le suivi individuel simultané de plusieurs milliers de mitochondries, j'ai fait le choix de développer une nouvelle approche semi automatisée à l'aide du langage de programmation « python » et d'un module du logiciel « ImageJ » nommé « trackmate » (Tinevez, Jean-Yves, et al 2017). Si dans ce chapitre je parlerai un peu de ce traitement automatisé, c'est surtout dans le chapitre II que j'irai plus loin en expliquant la force de cette méthode pour le traitement du signal de fluorescence de mitochondries individuelles et la détection d'évènements particuliers liés au potentiel de membrane.

d) Objectifs

A travers les différents points abordés dans cette introduction, j'ai cherché à décrire les différents paramètres utilisés pour le suivi de mitochondries individuelles, ainsi que la nécessité d'améliorer les méthodes de traitement des données grâce aux outils informatiques. L'objectif de ce chapitre a été de créer un nouveau système d'analyse semi-automatisé pour le suivi multiparamétrique par fluorescence de mitochondries individuelles, avec pour but final de l'utiliser pour le suivi des ouvertures du mPTP (cf chapitre II).

Pour caractériser cette méthode, nous avons suivi les états stationnaires bioénergétiques mitochondriaux à l'aide du TMRM ($\Delta\Psi_m$) et le NADH intra-mitochondrial. Le protocole mis en place est réalisé en trois étapes : 1) Le traitement des images de microscopie ; 2) Un suivi individuel avec le module « Trackmate » d'Image-J ; 3) Un post-traitement informatique des paramètres cinétiques et d'amplitude des variations de fluorescence sur un grand nombre de réponses.

II. Principe du système d'analyse

a) Principe de l'expérience

Le design des expériences réalisées en microscopie présenté dans ce chapitre est le suivant : le matin de l'expérience un rat est sacrifié, son cœur prélevé et les mitochondries sont isolées des cardiomyocytes par centrifugations différentielles (cf matériels et méthodes). Je tiens d'ailleurs à remercier ici, le docteur Sémont Audrey et Emma Abdel du Lyric qui ont réalisé pour nous ces extractions mitochondriales tout au long de ce travail. Les mitochondries sont ensuite diluées à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, ce qui peut paraître faible au vu des concentrations plus généralement utilisées par les équipes de recherches travaillant dans le domaine, cependant la différence ici est que nous souhaitons travailler sur une population large (plusieurs centaines voire quelques milliers de mitochondries) tout en conservant une résolution individuelle. Cette contrainte technique intimement liée à la résolution optique recherchée et déterminée par la combinaison microscope, caméra et objectif, nous a conduit à diminuer la concentration de travail. Une fois diluée les mitochondries sont observées à l'aide d'un microscope inversé en lumière transmise et en fluorescence (Figure 3A). Ensuite, je laisse les mitochondries en suspension sédimenter pendant 20 minutes, afin qu'un grand nombre d'entre elles puissent se déposer sur la lamelle. Chaque point sur les images en lumière blanche (figure 3B) ou en fluorescence (figure 3C et D) correspond à une mitochondrie isolée, bien que l'on puisse également observer en très faible nombre des amas.

Au préalable, la suspension de mitochondries a été marquée avec la sonde fluorescente TMRM à une concentration de 10 nM (mode « non quenching ») afin de pouvoir suivre les variations du potentiel de membrane interne de chaque mitochondrie (figure 3B). Cette mesure reste cependant qualitative, nous évaluons les différences du potentiel de manière relative même si à la fin du chapitre nous discuterons d'une méthode pour essayer de l'estimer quantitativement. Classiquement, d'autres solutions sont utilisées pour quantifier le $\Delta\Psi_m$, notamment les électrodes sensibles au cation triphenylphosphonium (TPP) et TPP^+ (Kamo Naoki, et al 1979).

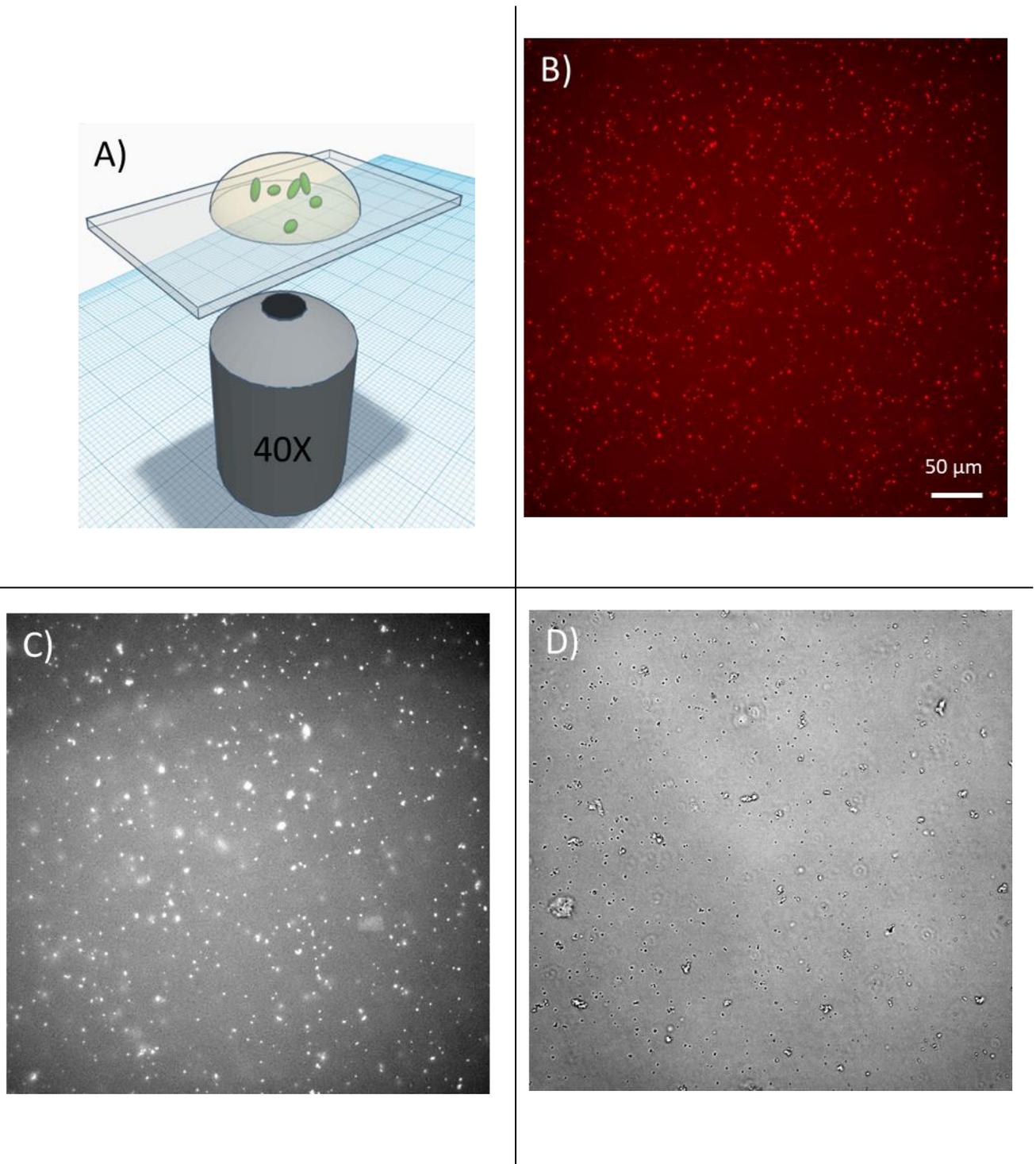


Figure 3 : A) Schéma de l'expérience de microscopie pour le suivi de mitochondries individuelles. B) Exemple d'une image obtenue en microscopie inversée après sédimentation des mitochondries sur une lamelle en verre. La suspension mitochondriale a été incubée pendant toute la durée de l'expérience avec la sonde TMRM à 10 nM dans le tampon d'analyse. C) Exemple d'une image obtenue pour le suivi du NADH endogène mitochondrial. D) Exemple d'une image obtenue par observation en lumière blanche. Chaque point lumineux (figure 3-B et C) ou noir de petite dimension (figure 3-D) représente une mitochondrie individuelle.

b) Traitement des images de microscopie

Le système d'illumination utilisé présente un défaut caractéristique à la microscopie plein champ nommé « shading effect » (Young, Ian T 2000), qui se traduit sous la forme d'une intensité lumineuse plus forte au centre de l'image qu'en périphérie. C'est ce que l'on peut observer grâce à la mesure des intensités de fluorescence de la diagonale de l'image brute, présentée en bas à droite de la figure 4A. La correction préalable de cette inhomogénéité diminue les erreurs dans la mesure de la fluorescence des mitochondries. Cela facilite également la bonne détection des mitochondries par le système d'analyse, grâce à un rapport signal-sur-fond amélioré.

Pour pallier à ce défaut optique, j'ai mis en place un protocole de traitement des images en trois grandes étapes, présenté dans la figure 4 : 1) Un filtre gaussien est appliqué afin de caractériser précisément le défaut d'illumination (figure 4B) ; 2) Cette nouvelle image est par la suite soustraite de l'image originale (figure 4C) ; on obtient ainsi une image où toutes les intensités de fluorescence sont soustraites du défaut d'illumination. On peut alors observer avec le profil d'intensité que celui-ci présente un meilleur rapport signal- sur- fond (S/F), passant de 9 (avant traitement) à 130 (amplitude moyenne divisée par l'écart type du fond). Cependant l'image présente un aspect « granuleux » qui est dû à un bruit important résultant de la soustraction. Pour remédier à cela, la dernière étape de ce traitement consiste à appliquer un filtre médian qui va permettre de « lisser » le bruit (figure 4C). On obtient ainsi une image dont le rapport S/F est élevé et permet la bonne visualisation des mitochondries et leur détection. À noter que dans la figure précédente les mitochondries marquées avec la sonde fluorescente TMRM étaient représentées par la couleur rouge, tandis que dans la figure 4, nous avons changé de couleur pour un niveau de gris plus facilement appréhendable.

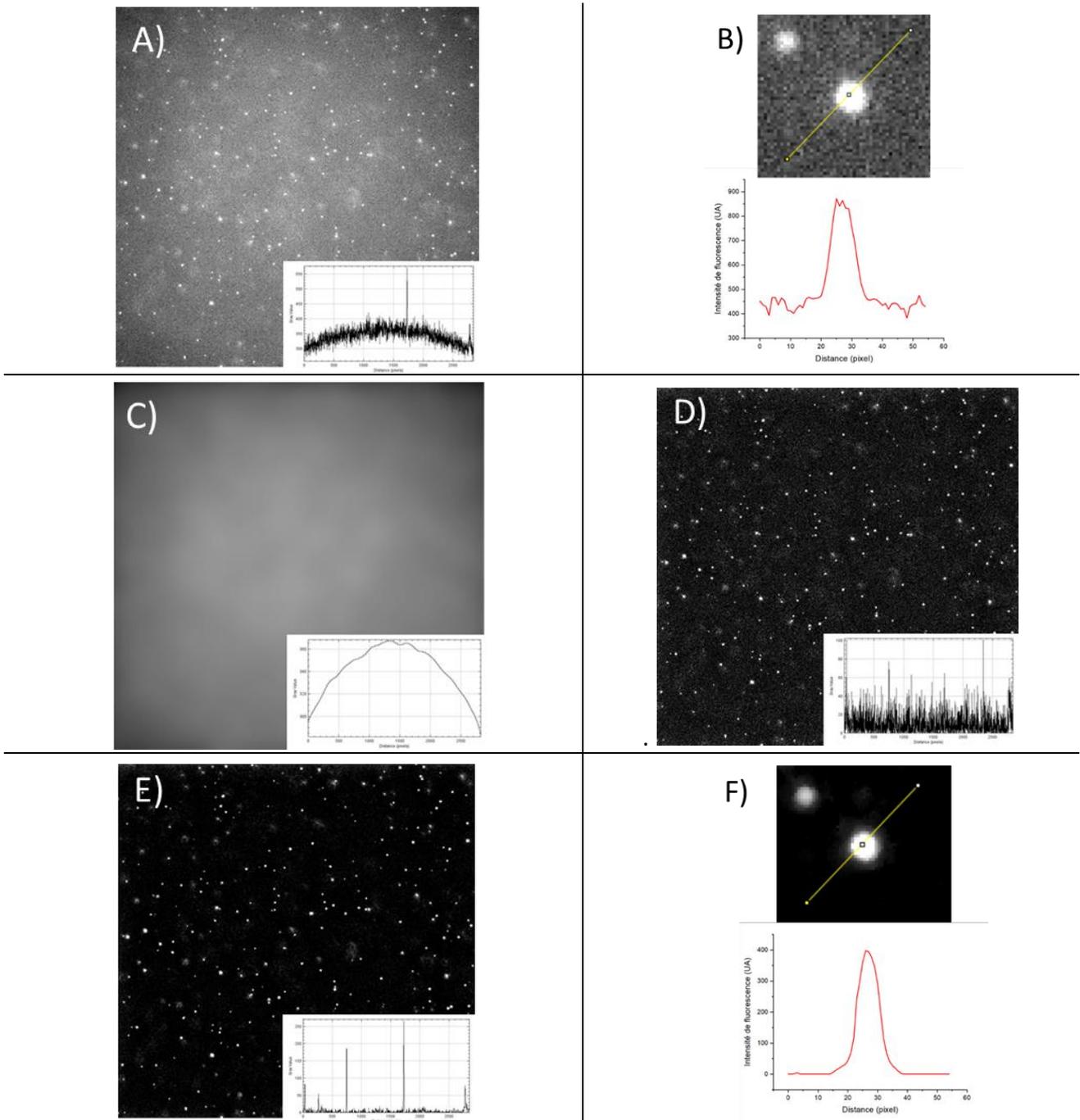


Figure 4 : Protocole de traitement des images de fluorescence réalisé avec le logiciel « ImageJ ». En bas à droite de chaque image est présenté le profil d'intensité en niveau de gris de la diagonale de l'image. A) Image brute (au 40x ; 40 msec d'exposition à niveau de puissance 1 de la lampe) après illumination des mitochondries marquées au TMRM. B) Exemple du profil d'intensité de fluorescence pour le TMRM d'une mitochondrie avant traitement. C) Filtre gaussien appliqué à l'image A avec un facteur de 60. D) Image après soustraction de l'image A par l'image C, cela correspond à une soustraction du défaut d'illumination. E) Application à l'image C d'un filtre médian de facteur 2, pour corriger le bruit résiduel. F) Profil d'intensité de fluorescence après traitement d'image de la même mitochondrie qu'en B. Chaque point lumineux correspond à l'observation d'une mitochondrie incubée pendant toute la durée de l'expérience avec la sonde TMRM à 10 nM dans le tampon d'analyse.

c) Suivi individuel des mitochondries

i. *ImageJ-Trackmate*

Les images de microscopie reportées dans les figures 3 et 4 montrent que beaucoup de mitochondries sont présentes de façon individuelle ou plus rarement en amas dans le champ observé (332,8 μm *332,8 μm). Pour donner un ordre d'idée, après 20 minutes de sédimentation, il y a environ 1500 mitochondries dans le champ d'acquisition. Ce qui nous a amenés à nous demander comment suivre toutes ces mitochondries simultanément au cours du temps.

Après plusieurs recherches et tests, j'ai mis en place différentes solutions, dont la plus pertinente me semble être le module nommé « Trackmate » disponible dans le logiciel « Fiji », qui est une version plus complète « d'ImageJ ». Ce module créé à l'institut Pasteur en 2017 par Jean-Yves Tinevez, Nick Perry et Johannes Schindelin, permet de réaliser un suivi de particules en 4D, c'est-à-dire en XYZ et au cours du temps (Tinevez Jean- Yves, et al 2017). Cet outil très performant (qui est toujours mis à jour au moment où j'écris ces lignes) fonctionne d'une manière simplifiée en deux grandes étapes, une première étape consistant à détecter les objets sur chacune des images et une deuxième étape permettant l'identification d'un même objet au cours du temps.

Pour la première étape de détection des objets, le logiciel met à disposition de l'utilisateur différentes méthodes mathématiques, chacune avec son degré de précision en fonction des objets à étudier. Pour ma part, j'ai opté pour la méthode dite de différence de gaussiennes, après avoir testé les autres méthodes (résultat non montré). Cette méthode, qui est la plus adaptée pour la détection des objets de petite taille (< 5 pixels), consiste à appliquer deux filtres gaussiens de facteur différent sur la même image. Le premier permet de faire ressortir les niveaux de gris de base, correspondants au bruit. Le deuxième filtre permet de faire ressortir les objets présents dans l'image. Ensuite, si les niveaux de gris des objets sont plus intenses qu'un certain seuillage, défini par l'utilisateur (ici il est d'environ de 2 UA), l'objet est détecté. C'est pour faciliter la détection des objets, en augmentant le rapport signal-sur-fond, qu'il est important de corriger le défaut d'illumination. Toutefois, la détection des mitochondries est quand même possible sur les images brutes, cependant moins d'objets sont détectés, puisque toutes les mitochondries avec une intensité trop faible sont exclues. On ne récupère alors qu'une information partielle. Cependant le diamètre moyen mesuré des mitochondries avant (comprenant la fonction d'étalement du point ou PSF) ou après le traitement de l'image (délimitée par la gaussienne du filtre appliqué) est identique : 1,45 μm contre 1,46 μm .

Pour augmenter le degré de précision de la méthode de détection, il est important de prendre en compte la taille des particules à suivre. Dans le cas présent la grande majorité des mitochondries font entre 800 nm et 1,5 μm soit 4,9 pixels et 9,2 pixels respectivement (1 pixel = 0,1625 μm). En effet, avant la détection il faut indiquer la longueur de l'objet. Cette valeur permet de définir la région d'intérêt centrée sur l'objet dans laquelle seront récupérées les valeurs d'intensité de fluorescence. Une seule longueur peut être donnée par test, donc dans le cas où il y aurait des objets de tailles très variées, il faudrait répéter l'opération plusieurs fois. Dans le cas ici présent, j'ai choisi une valeur de 10 pixels. Cette taille légèrement supérieure à la taille des mitochondries permet de bien les détecter sans toutefois prendre trop en compte le bruit de fond ou les amas. Ces derniers sont d'ailleurs peu présents au sein de notre échantillon, ce qui limite les erreurs dans les identifications. En effet les mitochondries en amas sont trop proches les unes des autres (sous la limite de la résolution optique, cf matériels et méthodes), ce qui empêche leur identification par le logiciel.

La deuxième grande étape de cette méthode consiste à identifier un même objet au cours du temps, c'est-à-dire être capable de reconnaître une seule mitochondrie et de la suivre, que l'objet se déplace ou non. Là encore le logiciel fournit différentes approches, en fonction du comportement de l'objet. Une méthode très intéressante mais non utilisée ici car non pertinente pour l'étude de mitochondries isolées, permet de suivre des objets qui pourraient fusionner ou se diviser comme par exemple des noyaux cellulaires. Cela a été notamment utilisé pour suivre le transport de granules d'ARN dans des neurones *in vitro* (Bauer Karl E et al 2017) ou encore pour suivre l'infection par *Shigella flexneri* des cellules du large intestin (Arena Ellen T et al 2015).

Dans ce travail, le suivi des mitochondries est plus simple car il n'y a pas de fusion ou de division possible dans nos conditions *in vitro*, c'est pourquoi la méthode nommée « Simple LAP tracker » a été choisie. Pour utiliser cette méthode il faut fournir trois informations, qui permettent de faciliter le suivi : tout d'abord, il faut renseigner le « Linking max distance », ce qui correspond au déplacement maximal que peut effectuer l'objet d'une image à l'autre ; en fonction du support et de l'application voulue, les valeurs que j'ai utilisées vont de 15 à 100 pixels. La deuxième information à renseigner est le « Gap-closing max distance », pour lequel différentes valeurs en fonction de l'application ont été choisies, comprises entre 4 et 20 pixels. Pour comprendre ce paramètre, il faut un exemple : si un objet disparaît pendant un certain nombre d'images et réapparaît légèrement à côté de sa position initiale, le logiciel va le définir comme un nouvel objet, et ce malgré le « Linking max distance ». En effet, ce dernier ne fonctionne que sur les objets visibles d'une image à une autre. Les raisons de ces disparitions transitoires, très souvent observées à l'aide du TMRM au cours de ma thèse, seront au cœur du chapitre II. Le « Gap-closing max distance » permet donc d'identifier une même mitochondrie et ce malgré sa disparition. Le troisième paramètre est le « Gap-closing max

frame gap », celui-ci correspond au nombre maximal d'images au cours duquel un objet peut disparaître et réapparaître tout en étant identifié comme le même objet. Comme mentionné précédemment, pour que cela soit possible, l'objet doit réapparaître à une position proche de sa position initiale (comprise dans l'intervalle du « Gap-closing max distance »). Après avoir donné toutes ces informations, le logiciel va appliquer la méthode choisie de suivi des objets sur toutes les images. Une fois terminé, le logiciel permet, grâce à un module nommé « TrackScheme », de venir facilement analyser le suivi de chaque mitochondrie.

On peut également extraire les informations générées par le logiciel sous la forme de trois fichiers, chacun représentant un aspect du suivi. Le fichier qui nous intéresse ici est le « Spots in tracks statistics » qui regroupe les différentes informations de toutes les mitochondries, leur affectant un numéro d'identification unique. On retrouve notamment dans le fichier : la moyenne, la médiane, et même le maximum ou le minimum des intensités de fluorescence. Cependant, la taille de la région d'intérêt (d'un diamètre de 10 pixels) est supérieure à la taille des mitochondries, d'autant plus que ces dernières ont des tailles variables, des pixels du bruit de fond sont pris en compte dans l'estimation de la moyenne de fluorescence (je reviendrai dessus dans le chapitre II). Pour éviter ce biais nous avons décidé de travailler uniquement avec le « Total Intensity » qui correspond à la somme de fluorescence de tous les pixels dans la région d'intérêt. En effet, le bruit de fond étant proche de zéro, les pixels où se trouvent la mitochondrie participeront grandement à la somme de fluorescence, on a ainsi un paramètre plus fidèle de la fluorescence réelle de l'objet. Dans la suite de ma thèse, seule la somme de fluorescence sera utilisée comme paramètre d'analyse.

Un autre problème est très vite apparu, celui du volume des données générées. En effet, pour donner un ordre d'idée, il n'est pas rare d'avoir un fichier Excel (après un suivi de 20 minutes) d'environ un demi-million de ligne pour 1500-3000 mitochondries analysées. Cette masse de données ne peut être utilisée que difficilement par les logiciels classiques comme Microsoft Excel ou Origin Pro. Il a donc fallu trouver une autre solution.

ii. Solution informatique à l'aide du langage de programmation « Python »

Cette solution informatique est la troisième et dernière partie de ce protocole. Afin de traiter au mieux les données, j'ai mis en place différents scripts écrits à l'aide du langage de programmation « Python » et des bibliothèques « NumPy, SciPy, Matplotlib et Pandas ». Ces scripts ont pour vocation de faciliter, à la suite de Trackmate, la manipulation du volume important de données générées (cf scripts en annexe). Le premier script consiste à calculer la moyenne des intensités de fluorescence de toutes les mitochondries pour chaque image, de calculer l'écart-type moyen ainsi que le nombre de mitochondries détectées. L'objectif est d'obtenir une première vision simple du changement de l'intensité de fluorescence moyen.

Le deuxième script écrit consiste quant à lui à tracer les représentations graphiques de la réponse en fluorescence en fonction du temps de chaque mitochondrie individualisée afin de pouvoir observer facilement les différents comportements. Cependant, au vu du grand nombre d'objets analysables, des erreurs ou faux positifs sont possibles. Pour contrecarrer cela, deux filtres dans les différents scripts ont été mis au point, le premier concernant le déplacement, le deuxième filtre vis-à-vis du nombre d'images où apparaît la mitochondrie car si l'objet apparaît trop peu de temps nous ne pourrions pas visualiser ses variations de fluorescence.

Pour conclure cette partie, j'ai présenté une nouvelle méthode en trois grandes étapes qui permet le suivi, par microscopie, de mitochondries isolées individuelles. Cette démarche suit la logique suivante : 1) Traitements des images de microscopie. 2) Suivi individuel des mitochondries et leur identification. 3) Analyse des données et représentations.

Ce nouveau protocole répond à l'objectif fixé, à savoir : de mettre en place une approche multiparamétrique, semi-automatique qui permet de suivre une large population de mitochondries de façon individuelle, tout en travaillant avec peu de matériel biologique. Dans le chapitre III, nous verrons une perspective de cette méthode en allant plus loin, en couplant cette approche avec une technique d'électrochimie pour pouvoir suivre des paramètres supplémentaires et complémentaires. D'autres perspectives sont également possibles, comme l'implémentation d'autres sondes de fluorescence notamment par rapport à la production des radicaux libres ou encore vis-à-vis du calcium. D'un point de vue informatique, nous pourrions implémenter d'autres filtres de sélection et d'analyse des données afin d'affiner encore plus les résultats, comme pour la taille des mitochondries dont je parlerai plus en détails à la fin de ce chapitre.

Je vais maintenant utiliser cette méthode d'analyse multi-échelle développée avec deux applications différentes : dans une première partie je vais étudier le déplacement des mitochondries en fonction du support sur lequel elles sont déposées et observées et dans la deuxième partie, je parlerai de l'étude des états stationnaires mitochondriaux vis-à-vis de leur potentiel de membrane et de leur contenu en NADH.

III. Suivi du déplacement des mitochondries sur différents supports

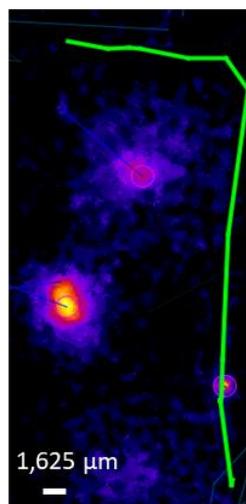
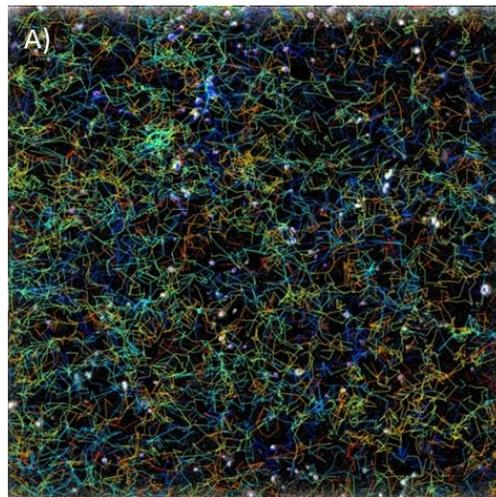
a) Premières observations

Une des premières observations faites après le dépôt d'une solution de mitochondries sur une lamelle de verre est leur mobilité au cours du temps. C'est ce que l'on peut observer dans la figure 5A où est représentée une image de microscopie de fluorescence des mitochondries marquées au TMRM. Chaque trait de couleur représente le déplacement d'une

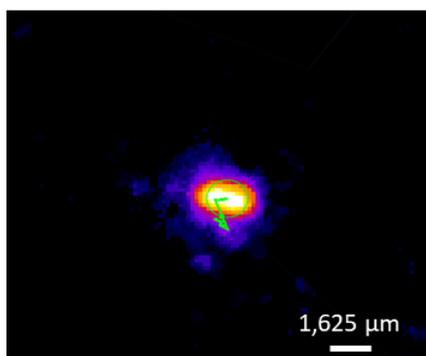
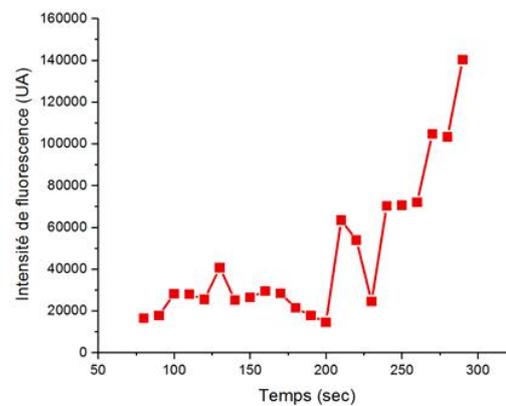
mitochondrie établie par « Trackmate ». On peut distinctement observer un grand nombre de déplacements et en regardant à l'échelle individuelle (figures 5 B et C), les différents comportements apparaissent. Par exemple, certaines présentes dans le plan focal ne vont faire que se déplacer au cours du temps, c'est le cas de l'exemple montré dans la figure 5B, le trait vert représentant le déplacement total de la mitochondrie et le cercle violet représentant la région d'intérêt dans laquelle est mesurée sa fluorescence. D'autres mitochondries vont quant à elles venir se déposer rapidement à la surface pour ne plus bouger, c'est le cas de l'exemple montré dans la figure 5C. Des mélanges de ces deux comportements sont également possibles avec notamment des mitochondries qui vont se déplacer au début de l'expérience, de par la sédimentation ou à des mouvements de solution, pour venir par la suite se déposer à la surface et rester immobiles.

Cependant, pour atteindre notre objectif de suivi des variations fines de fluorescence de mitochondries individuelles au cours du temps, il est primordial que celle-ci ne bouge pas ou très peu. En effet son déplacement peu impacter la mesure de sa fluorescence, en sortant du champ d'acquisition (mouvement en x et y) ou en sortant du plan focal (mouvement en z). C'est ce que l'on peut observer dans la figure 5B où la bordure droite de l'image correspond à la limite du champ d'acquisition que la mitochondrie a pratiquement dépassée. Si cela avait été le cas on ne récupérerait alors qu'une information partielle. Un autre inconvénient majeur est que le déplacement introduit un biais au niveau des intensités de fluorescence mesurées comme on peut le voir si on compare les valeurs de fluorescence du TMRM au cours du temps, des mitochondries présentes dans les figures 5B et 5C.

On peut clairement voir des réponses aux antipodes. Le profil de la figure 5C est celui attendu, se rapprochant le plus de la moyenne de fluorescence de l'ensemble des mitochondries. Ces variations de fluorescence en plateau correspondent aux états stationnaires classiques, c'est-à-dire à une augmentation du potentiel après ajout des substrats de la chaîne respiratoire (état substrat, cf introduction générale), suivi d'une diminution de potentiel après l'ajout de l'ADP (état 3) et pour finir une nouvelle augmentation après ajout de l'oligomycine, inhibiteur de l'ATP synthétase (pseudo état 4). En revanche, on peut voir qu'à cause de son déplacement, la mitochondrie de la figure 5B, présente un profil bien différent avec l'absence d'états stationnaires clairement définis. Des observations expérimentales faites sur un grand nombre d'analyses il semble que l'ensemble des déplacements semble le plus souvent correspondre à un mouvement linéaire qui serait lié à un mouvement de la solution et n'aurait pas de relation biologique avec les mitochondries individuelles.



B)



C)

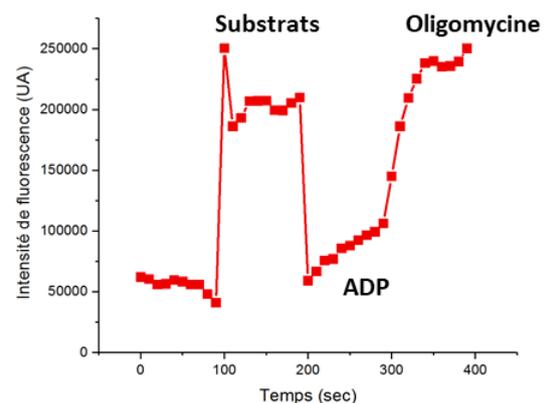


Figure 5 : Exemple des déplacements des mitochondries sur une lamelle de verre. A) Ensemble des mouvements ou « Tracks » de l'ensemble des mitochondries, mis en évidence par « Trackmate ». B) À gauche, image en microscopie inversée de la trajectoire d'une mitochondrie marquée au TMRM, à 10 nM. Le trait vert représente l'ensemble du déplacement réalisé par la mitochondrie pendant la durée de l'acquisition. À droite, graphique de l'intensité de fluorescence de cette même mitochondrie au cours d'une séquence d'activation et d'inhibition de la phosphorylation oxydative. C) Autre exemple du déplacement d'une mitochondrie dans les mêmes conditions que B.

b) Choix du support et chimie de surface

Un des buts recherchés était de limiter au maximum les déplacements des mitochondries, en aidant à leur immobilisation sans pour autant les forcer à adhérer par un traitement spécifique et ainsi risquer de modifier leur activité. Pour cela, nous nous sommes intéressés au support sur lequel la solution de mitochondries individuelles est déposée. Les supports que nous avons décidé de sélectionner devaient remplir certains critères : ils se devaient d'être simple d'utilisation, communément utilisés et biocompatibles. Pour cela, notre choix s'est porté sur les lamelles de verre nues et ou avec un dépôt très fin de polydiméthylsiloxane (ou PDMS).

Le PDMS est un polymère de la famille des silicones qui est le résultat d'un mélange de deux produits, un réticulant et le polymère. Ce matériau est fréquemment utilisé dans le laboratoire car biocompatible et facilement manipulable, il a été notamment employé au préalable pour étudier l'activité bioénergétique de mitochondries isolées de levure (*Saccharomyces cerevisiae*), en utilisant des micropuits structurés (Vajrala, Venkata Suresh, et al 2016). Ces deux supports, le verre et le PDMS sont à l'état naturel hydrophobes mais à différents degrés. En effet, le PDMS est intrinsèquement hydrophobe. Le verre quant à lui, s'il n'est pas nettoyé, est légèrement hydrophobe à cause du dépôt possible de molécules organiques présentes dans l'air qui peuvent polluer sa surface. Il est d'ailleurs recommandé pour faire adhérer du matériel biologique de nettoyer le verre avec de l'éthanol qui permet de « décontaminer » la surface la rendant ainsi plus hydrophile. Dans ce contexte, nous nous sommes demandés si une modification de la chimie de surface simple pourrait aider à augmenter l'attractivité de ces supports pour les mitochondries. Pour cela, nous nous sommes intéressés à deux traitements : 1) Une exposition à un plasma oxygène ; 2) Un dépôt de molécules de PLL-g-PEG.

Le premier traitement consiste à mettre la surface de verre ou de PDMS en présence d'un gaz (ici l'oxygène) qui va être ionisé grâce à un champ électrique intense sous vide, c'est-à-dire un plasma. Les molécules réactives vont alors réagir avec la surface présente dans la chambre. Cela va avoir deux principaux effets : le nettoyage de la surface en dégradant toutes les molécules organiques présentes ; le deuxième effet consiste à modifier la chimie de surface, en allant oxyder les groupements chimiques carbonés et silices. Dans le cas présent les espèces réactives de l'oxygène vont entraîner une représentation plus importante des groupements : C-OH, C-O-C, C=O, COOR, SiOH et Si(OOH). Tout ceci va avoir pour conséquence de rendre les surfaces de verre et de PDMS hydrophiles.

La deuxième modification est le dépôt de PLL-g-PEG qui est une molécule de polylysine (PLL) couplée à un groupement poly-éthylène glycol ; (PEG). Le groupement PLL interagit électrostatiquement avec la surface, tandis que les chaînes latérales de PEG s'étendent à partir de la surface pour former une brosse de polymère plus ou moins dense en fonction de la concentration. Cette molécule est très utilisée pour permettre de défavoriser l'adhésion de différents éléments biologiques comme des cellules (Foncy, Julie, et al 2018), en rendant la surface plus hydrophobe. Cette molécule servira ici de contrôle positif pour l'étude du déplacement, en empêchant l'immobilisation des mitochondries, on peut s'attendre à un mouvement plus important de celles-ci par convection et aussi brownien.

Si nous nous sommes intéressés à des modifications de la chimie de ces supports, c'est que les surfaces hydrophiles ont montré une plus grande efficacité pour immobiliser du matériel biologique comme des cellules (Curtis A. S. G. 1964). Cependant les mécanismes par lesquels cela intervient ne sont pas encore parfaitement connus dans un contexte cellulaire et encore moins vis-à-vis de mitochondries isolées.

Les premières observations expérimentales montrent que les mitochondries déposées à la surface ne présentent pas une adhésion forte (il n'y a pas de molécule d'adhésion à la surface) mais plutôt une immobilisation légère, ce qui laisse imaginer que des interactions faibles sont en jeu. Par exemple une pseudo-couche d'hydratation peut se mettre en place qui, grâce à des liaisons hydrogènes, permettrait de faire l'intermédiaire entre la surface et la membrane externe mitochondriale, aidant ainsi à son immobilisation (Israelachvili, Jacob N 2011). Une autre hypothèse très décrite (Wilson, Cameron J., et al 2005) correspond à des interactions de charges, notamment électrostatiques, avec la surface (Khalili, Amelia, et Mohd Ahmad 2015). Les surfaces hydrophiles étant chargées négativement, cela permettrait l'interaction avec des protéines de la mitochondrie ou en solution. Ces dernières peuvent également finir par créer une fine couche, qui servirait ensuite d'ancrage pour l'adhésion des membranes. Le point crucial pour nous n'est pas exactement de caractériser précisément les interactions mises en jeu, mais de nous assurer que l'adhésion au support n'ait pas d'impact sur l'activité bioénergétique des mitochondries.

Donc pour résumer, l'objectif est ici d'utiliser la méthode décrite dans la partie précédente pour caractériser le meilleur support avec ou sans combinaison avec une chimie de surface, pour aider à l'immobilisation des mitochondries au cours du temps et donc faciliter et améliorer leur analyse par microscopie.

c) Principe de l'expérience

Les expériences ont été réalisées de la manière présentée précédemment. Pour rappel, une solution de mitochondries isolées est déposée sur les différents supports soumis ou non à une modification de la chimie de surface. Le suivi du déplacement des mitochondries a été réalisé grâce à la méthode présentée ci-dessus, sur la base de la détection de la fluorescence du TMRM pendant 10 minutes avec une acquisition toutes les 10 secondes. Simultanément, des images ont également été prises en lumière blanche afin de s'assurer à chaque instant de l'intégrité physique des mitochondries. Après traitement des images de microscopie, j'ai utilisé le module « Trackmate », avec un paramètre de suivi, « Linking max distance » de 16,25 μm . Cette valeur choisie de façon arbitraire est largement supérieure au déplacement observé. Pour le « Gap-closing max frame gap », la valeur est de 0,65 μm (4 pixels) et elle est de 1,65 μm (10 pixels) pour le « Gap-closing max distance ».

d) Résultats et discussions

i. Déplacement moyen

Lorsque l'on évalue le déplacement moyen des mitochondries pendant 10 minutes (figure 6), on peut clairement voir des différences majeures en fonction des supports et de la chimie de surface. Trois comportements sont observables : 1) Un déplacement de longueur de 5,5 à 6 μm pour le PDMS sans traitement ou avec un dépôt de PLL-g-PEG, ainsi que pour le verre avec le même dépôt ; 2) Un déplacement intermédiaire de 3 μm pour le verre nu (sans traitement, juste nettoyé) ; 3) Un déplacement faible de l'ordre de 1,5 μm en moyenne qui correspond aux supports verre ou PDMS traités avec le plasma. Ces différences importantes de mobilité permettent de conclure que la nature du support n'est pas anodine. Si on observe le verre et le PDMS nu, il y a déjà un écart important entre les deux. L'application d'une chimie de surface semble aussi être très importante car elle permet de modifier efficacement le déplacement. Entre un traitement au PLL-g-PEG et au plasma des différences majeures sont observables quels que soient les supports.

Ces résultats montrent que l'hydrophilie/hydrophobie du support est importante pour l'immobilisation des mitochondries. Effectivement, les supports les plus hydrophobes utilisés ici comme le verre et le PDMS avec un traitement au PLL-g-PEG ou le PDMS nu sont ceux qui induisent un déplacement moyen important. Le PDMS étant déjà hydrophobe, il y a un peu de changement quant au déplacement moyen après traitement au PLL-g-PEG. À l'inverse les surfaces hydrophiles favorisent fortement l'immobilisation des mitochondries en prévenant leurs déplacements, c'est le cas du verre et du PDMS traités au plasma ou le verre nu. Ce dernier présente un déplacement légèrement supérieur car, comme expliqué préalablement, il peut être contaminé par des molécules organiques environnantes qui peuvent réduire

l'hydrophilie. On peut également observer que les chimies de surface utilisées sont très efficaces, car un support hydrophobe peut devenir hydrophile (PDMS nu avant et après traitement au plasma) et inversement (Verre nu avant et après traitement avec le PLL-g-PEG). Tout ceci semble montrer qu'outre le type de support, c'est bien l'état de surface qui est important. Plus précisément ce sont les surfaces les plus hydrophiles (le verre et le PDMS avec un traitement au plasma à oxygène) qui sont les plus efficaces pour l'immobilisation des mitochondries.

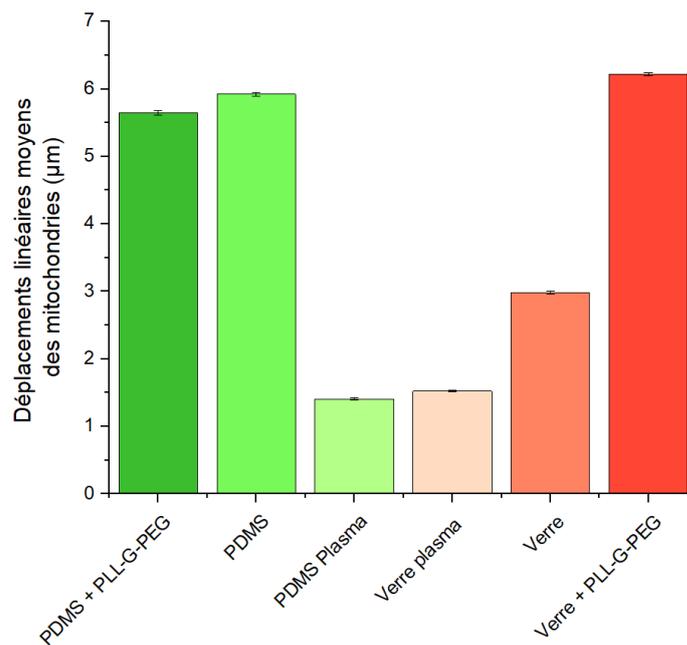


Figure 6 : Déplacement moyen des mitochondries au cours des observations en microscopie, en fonction du support et de la modification de surface. Résultats obtenus après utilisation du module « Trackmate » sur les images en fluorescence avec le marquage mitochondrial par TMRM. Distance maximale possible = 16,25 µm. Le code couleur utilisé ici sera le même pour toute cette partie du chapitre. En moyenne 20 000 déplacements ont été analysés par support pour environ 2000 mitochondries.

ii. Intervalles de déplacement

Pour aller plus loin et essayer de caractériser les déplacements, je me suis intéressé à un même support : le verre. Pour cela, j'ai comparé les deux conditions extrêmes en termes de déplacement moyen, c'est-à-dire après traitement au plasma (hydrophile) ou dépôt de PLL-g-PEG (hydrophobe) (Figure 7). Ces fréquences de déplacement sont exprimées en pourcentage du nombre total de déplacements. Pour un souci de clarté, les intervalles de l'abscisse sont donnés en nombre de pixels (unité = 0,1625 µm). On peut observer qu'il existe une vraie dichotomie entre les deux conditions pour le déplacement, c'est-à-dire : un

mouvement faible voire nul compris entre 0 et 0,325 μm (0 à 3 pixels) et un autre important compris entre 1,6 et 16 μm (10 à 100 pixels). Pour le premier intervalle de déplacement entre 0 à 3 pixels, ces valeurs très faibles correspondent aux mitochondries qui ne bougent pas. Sous cette barre des 3 pixels, nous tombons dans la marge d'erreur du protocole pour la détection du centre des mitochondries, ce qui correspond à 76% des déplacements pour la lamelle de verre exposée au plasma et à 3% des déplacements pour la lamelle de verre avec un dépôt de PLL-g-PEG. En effet, le logiciel peut faire légèrement fluctuer le centroïde d'un même objet au cours du temps. Cela peut s'expliquer par la taille des mitochondries qui est d'environ 1 μm de diamètre sur l'image, ce qui correspond à un peu plus de 6 pixels. Le deuxième intervalle de déplacement correspond aux mitochondries qui bougent réellement sur le support. Cet intervalle est bien plus représenté pour le verre avec le dépôt de PLL-g-PEG (90% de la population), contrairement au verre traité par le plasma à oxygène, qui, lui, présente une majorité de mitochondries immobiles sur le support (83% de la population). Cependant aucun de ces traitements ne semble fonctionner entièrement car malgré le dépôt de PLL-g-PEG, une petite partie des mitochondries semble être capable de sédimenter et s'immobiliser au support (10%). À l'inverse, pour le verre traité au plasma, une petite fraction de mitochondries ne semble pas avoir adhéré à la surface (17%). Un traitement au plasma ne permet donc pas d'immobiliser l'intégralité de la population. Ces résultats permettent toutefois de montrer l'efficacité de la méthode mise en place pour la caractérisation d'événements fins à l'échelle individuelle. En effet, grâce à cela, on est capable de dire précisément quelle mitochondrie s'est immobilisée à la surface et laquelle n'a fait que se déplacer. Il est donc possible de sélectionner facilement une population d'intérêt pour réaliser des études d'activités au cours du temps.

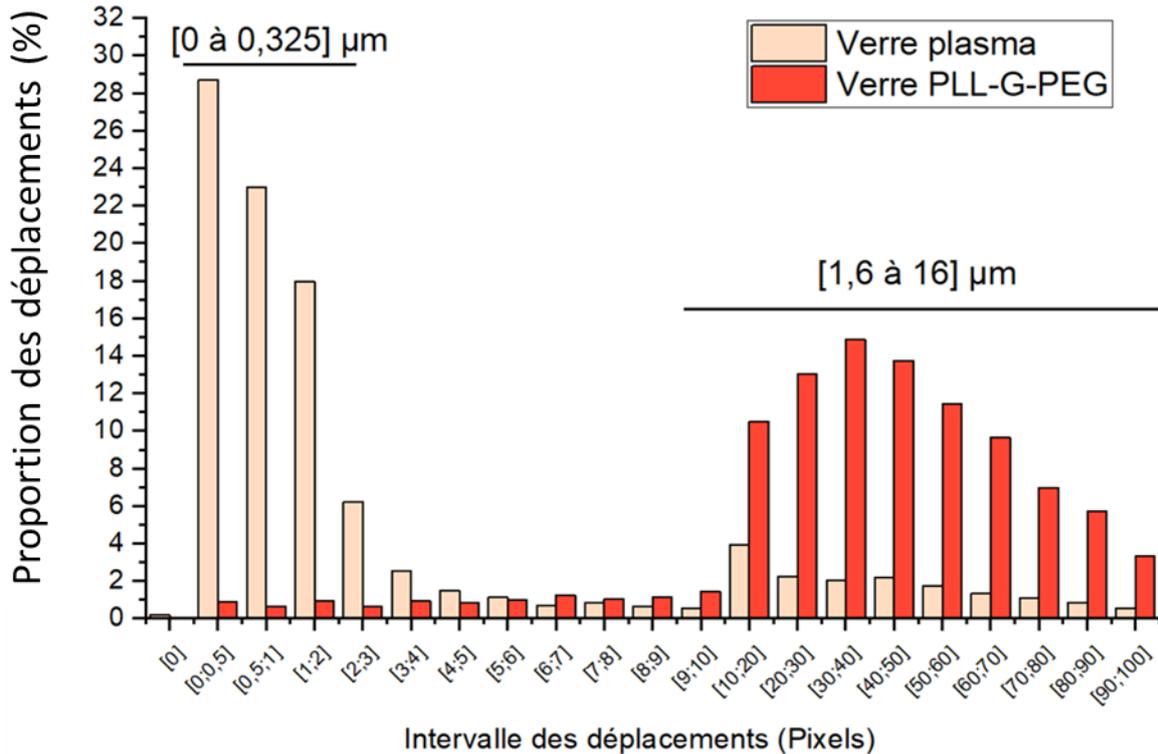


Figure 7 : Proportion des déplacements mitochondriaux sur le verre après exposition au plasma à oxygène ou après dépôt de PLL-g-PEG solution à 1 mM dans du PBS pendant 30 minutes. Les intervalles des déplacements sont donnés en pixels (1 pixel = 0,1625 µm).

iii. Nombre de mitochondries immobilisées

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact que pouvait avoir la surface sur le nombre de mitochondries présentes après 20 minutes de sédimentation. Les données présentées dans la figure 6 sont issues d'une même préparation mitochondriale, qui a été diluée de la même manière pour chaque condition, afin d'obtenir un nombre très proche de mitochondries par dépôt.

Les résultats présentés en Figure 8A nous montrent des différences importantes du nombre en fonction du support et de la chimie de surface. Les conditions présentant le plus de mitochondries au final sont celles qui ont montré précédemment un déplacement moyen faible, et une hydrophilie importante c'est-à-dire : le PDMS et le verre traités au plasma. L'inverse est également vrai, les conditions qui présentent le moins de mitochondries sont celles qui ont montré un déplacement moyen important et sont également les conditions les plus hydrophobes, c'est-à-dire : le PDMS et verre traité au PLL-g-PEG ainsi que le PDMS seul.

Cependant, les nombres reportés ici correspondent à l'ensemble des mitochondries, ce qui comprend celles qui vont se déplacer et celles qui vont s'immobiliser à la surface. Dans une optique de suivi individuel de fluorescence, seuls les objets immobiles doivent être pris en compte. Pour rappel une mitochondrie qui se déplace peut-être analysée, cependant son mouvement entraînera un biais dans les variations de fluorescence mesurées. Cela peut également entraîner l'objet à sortir du champ d'acquisition, on ne récupèrera alors qu'une information partielle. Pour limiter cela au maximum, un filtre d'exclusion a été ajouté sur le script informatique qui permet d'exclure tous les objets qui auraient un déplacement supérieur à 10 pixels soit 1,6 μm . Pour plus d'information sur le script, voir en annexe. Ce seuil choisi correspond au début de l'intervalle de la population qui se déplace (figure 7). Une fois ce filtre appliqué, le nombre de mitochondries restantes qui correspond aux mitochondries immobiles est analysé (figure 8B).

Là encore, on peut voir des différences très importantes en fonction du support. Le PDMS seul ou modifié avec le PLL-g-PEG présente très peu de mitochondries immobilisées, soit $n < 50$ mitochondries. Pour le verre seul ou avec un dépôt de PLL-g-PEG, le nombre de mitochondries est relativement proche de 280 et est supérieur au PDMS pour les mêmes traitements. Le verre, malgré le traitement au PLL-g-PEG qui doit le rendre hydrophobe, permet tout de même à certaines mitochondries d'adhérer, ce qui peut être dû à un dépôt non homogène dans cette expérience. À l'opposé, les conditions qui présentent le plus de mitochondries immobiles, sont une fois encore les surfaces exposées au plasma à oxygène. La chimie de surface du support montre là encore son importance, et tout ceci tend vers le caractère bénéfique de l'hydrophilie pour l'immobilisation des mitochondries et inversement.

Si on compare le nombre total de mitochondries avec celui après filtre, on voit une différence importante. La figure 8C montre le pourcentage de mitochondries retenues après application du filtre. Ce pourcentage correspond à la proportion de mitochondries qui ne vont pas se déplacer ou très peu, autrement dit, celles qui se sont immobilisées et qui sont donc analysables. Cette figure nous montre là encore une hétérogénéité de résultats en fonction du support et de la chimie de surface. Les conditions qui présentent le plus de déplacements sont le PDMS seul et avec PLL-g-PEG et sont celles qui présentent également un ratio faible. Par ailleurs le verre quant à lui présente un ratio supérieur à 30% quelles que soient les conditions, notamment pour la condition avec PLL-g-PEG. À l'inverse les deux conditions exposées au plasma à oxygène sont celles qui présentent le ratio le plus fort : 40% pour le PDMS et 50% pour le verre. Cependant, aucune condition ne permet d'immobiliser la totalité des mitochondries, ce qui veut dire qu'un certain nombre d'objets ne seront pas analysables. Il est néanmoins possible d'accroître le ratio en augmentant le temps de sédimentation. En revanche un certain nombre de mitochondries se déplaceront tout de même du fait de la convection du milieu environnant. Le filtre qui permet d'exclure ces objets est donc une étape

indispensable de la méthode d'analyse. Une fois encore le plasma semble montrer son importance car en plus de réduire de façon significative le déplacement, il permet d'immobiliser le plus grand nombre de mitochondries.

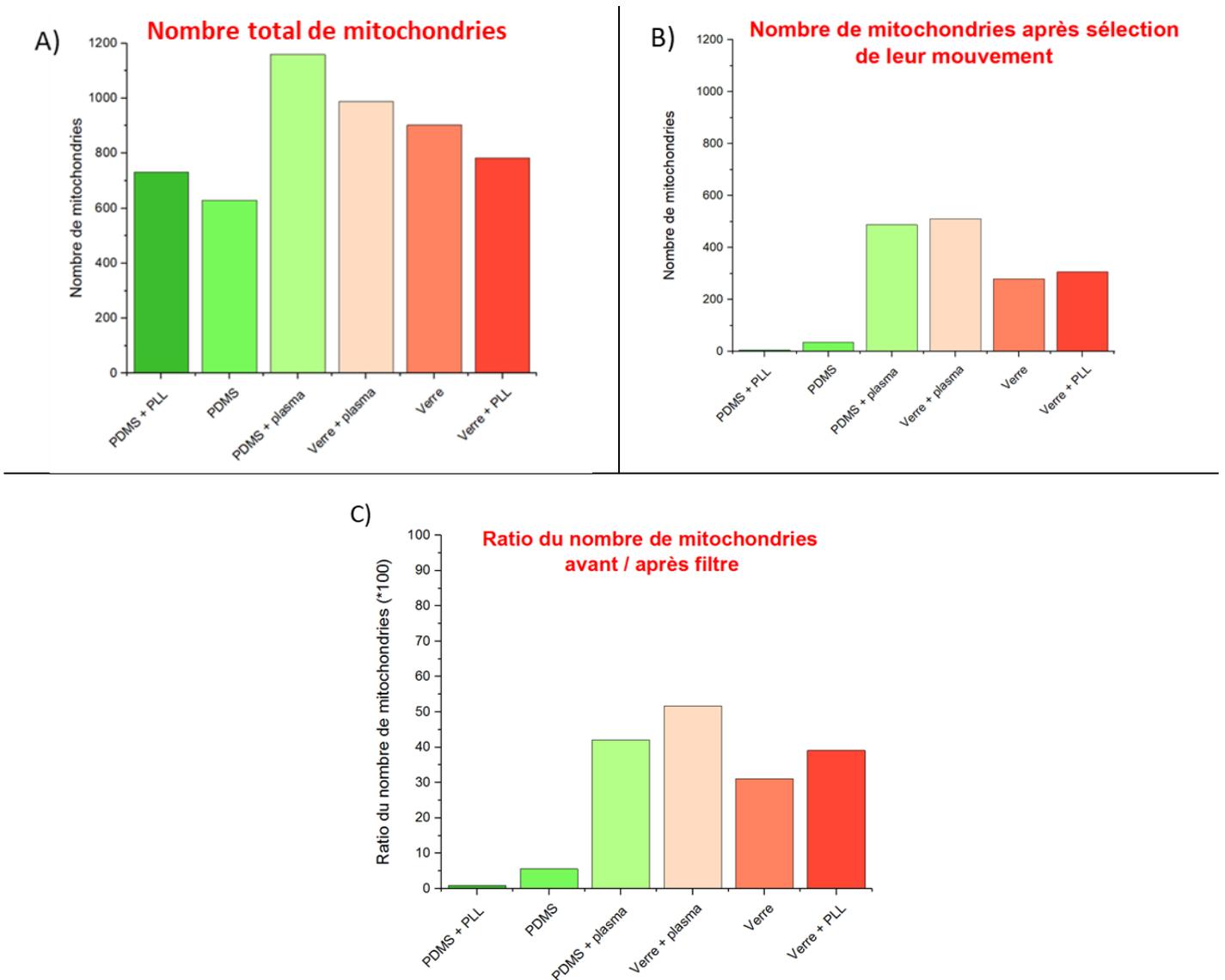


Figure 8 : Etude du nombre de mitochondries présentes à la surface des supports après 20 minutes de sédimentation. Le nombre de mitochondries est calculé par leur détection en TMRM. A) Nombre total de mitochondries. B) Nombre de mitochondries après l'utilisation d'un filtre de sélection, toutes les mitochondries avec un mouvement supérieur à 10 pixels (1,6 μm) sont exclues. C) Pourcentage du nombre de mitochondries après sélection quant à leur mobilité.

iv. Conséquence sur la réponse en fluorescence

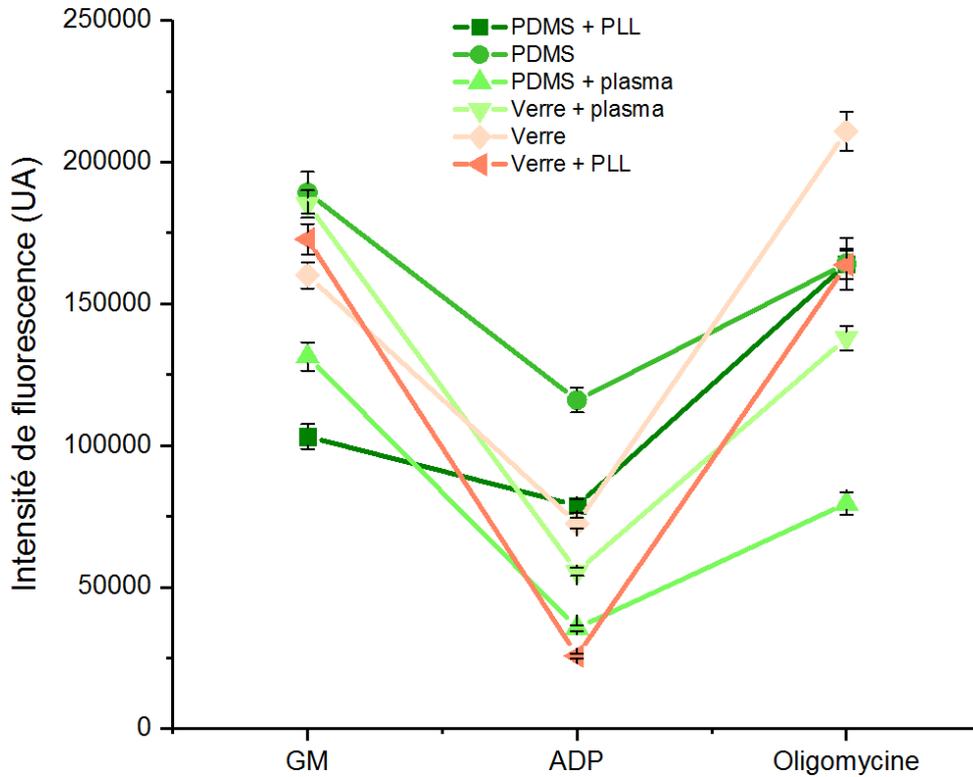


Figure 9 : Moyennes des intensités de fluorescence après injection du Glutamate/Malate (GM), ADP et oligomycine. Ces injections sont réalisées séquentiellement dans l'ordre montré.

Le dernier paramètre à analyser et certainement le plus important pour la suite de ce travail, est la réponse en fluorescence des mitochondries sur les différents supports. On a pu effectivement voir que les supports et leur chimie de surface entraînaient des modifications pour le déplacement et le nombre de mitochondries présentes. La suite logique est de savoir si ces supports ont un impact sur l'activité des mitochondries immobiles. Pour cela, la figure 9 montre les moyennes des intensités de fluorescence des mitochondries, sur chaque support à différentes étapes : après l'injection des substrats du complexe I (glutamate et malate), puis l'ajout de l'ADP et pour finir l'ajout d'un inhibiteur de l'ATP synthétase (oligomycine). Toutes ces molécules ont été injectées en excès afin de n'être à aucun moment limitante. Comme précédemment ces résultats sont issus d'une même préparation mitochondriale, afin de limiter au maximum toute hétérogénéité liée à la variabilité entre préparations mitochondriales.

La séquence classique (déjà vue dans la figure 5) utilisée ici permet de modifier le potentiel de membrane de façon significative et donc l'intensité de la fluorescence du TMRM. Pour bien comprendre cette séquence, le schéma ci-dessous de la CR permet de montrer les différents paramètres à analyser (NADH et TMRM) ainsi que les molécules utilisées dans cette deuxième partie de chapitre et à quels niveaux elles agissent.

Les mitochondries, quand elles sont déposées à la surface des supports, ne sont en présence d'aucun substrat de la chaîne respiratoire. Elles peuvent en contenir de façon endogène après leur isolement cellulaire (état 1, cf introduction générale) mais la fluorescence observée reste faible. L'ajout du Glutamate/Malate conduisant à la formation du NADH, substrat du complexe I (figure 10 schéma ci-dessous) active la chaîne respiratoire (état substrat). Le potentiel de membrane augmente, ce qui doit être visible d'un point de vue de la fluorescence du TMRM. S'ensuit l'injection d'ADP qui permet d'activer les ATP synthétases (état 3), la force proto-motrice préalablement constituée est utilisée pour former de l'ATP, cela s'accompagne d'une diminution du potentiel de membrane visible en fluorescence. L'ajout de l'oligomycine permet en inhibant les ATP synthétases de revenir à un pseudo-état 4, le potentiel de membrane revient à un niveau proche de celui mesuré après injection de Glutamate et Malate. Cette baisse puis remontée du potentiel de membrane est très importante car elle permet de montrer le couplage de la phosphorylation oxydative des mitochondries, qui est un indice de leur viabilité. Ce couplage mesuré par fluorescence reste cependant qualitatif.

Cette mesure indirecte de la viabilité a pour objectif de visualiser si une condition montrerait une perte du couplage du potentiel de membrane. Toutes les conditions montrent des variations relatives à un bon couplage, ce qui semble montrer que d'un point de vue de l'activité bioénergétique mitochondriale tous les supports avec ou sans chimie de surface sont utilisables. Néanmoins, les variations les plus fortes du potentiel sont observées avec les supports facilitant l'immobilisation et l'observation, potentiellement car il y a plus de mitochondries immobiles. Des résultats similaires (non présentés) ont été obtenus en analysant le niveau en NADH des mitochondries individuelles. Seul le PDMS avec le dépôt de PLL-g-PEG montre une faible diminution de fluorescence après l'ajout d'ADP et aurait potentiellement un impact sur la viabilité mitochondriale avec ce paramètre d'analyse.

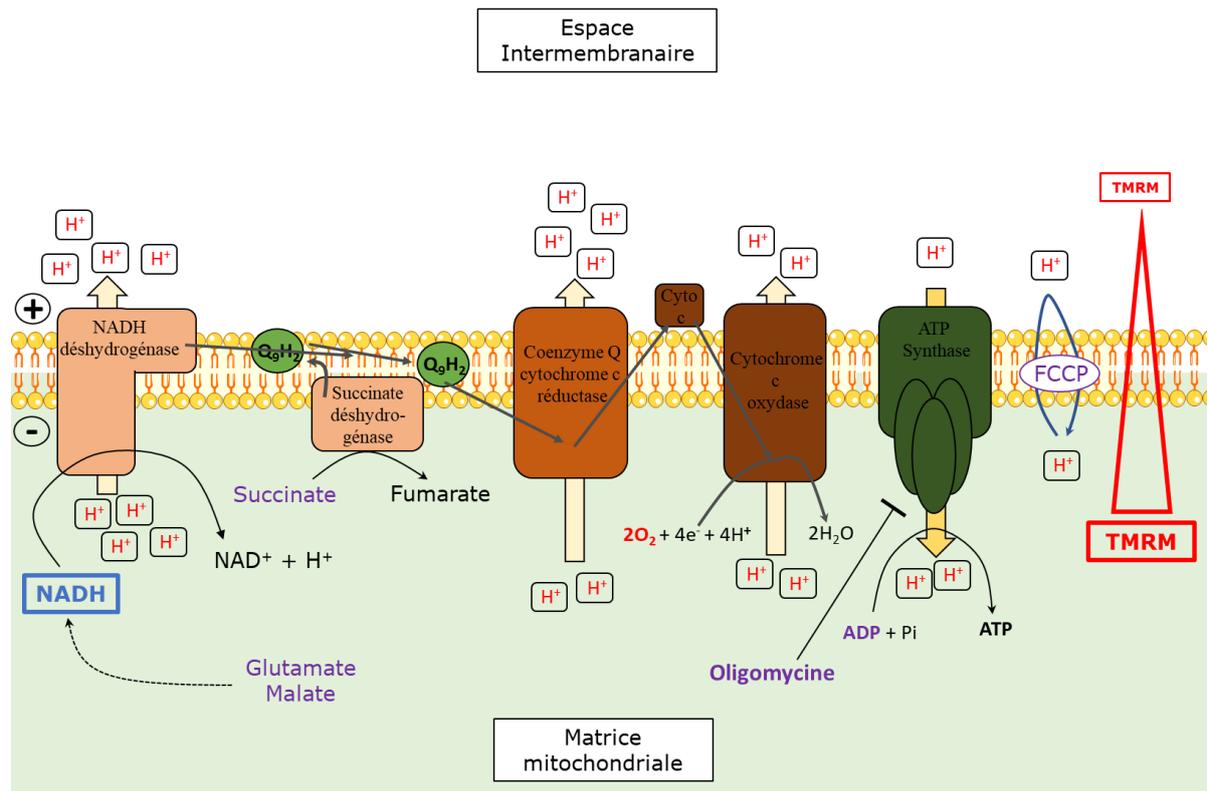


Figure 10 : Schéma de la chaîne respiratoire couplée à l'ATP synthétase ainsi que les substrats (glutamate, malate et succinate) et molécules (ADP, oligomycine, FCCP) que l'on a utilisés (en violet) pour agir sur l'activité bioénergétique mitochondriale. NADH et TMRM correspondent aux molécules fluorescentes suivies par microscopie dans ce chapitre.

e) Conclusions

J'espère avoir montré, à travers ces résultats, l'efficacité de la méthode que j'ai mise en place et qui a permis de caractériser finement l'impact que peut avoir le support, avec ou sans chimie de surface, sur l'immobilisation des mitochondries au cours de leur sédimentation. On peut d'ailleurs remarquer l'importance de la chimie de surface du support. Dans le cas ici présent, il semble que ce ne soit pas le support (PDMS ou verre) qui soit le plus important, même si la rugosité de la surface peut également intervenir, mais plutôt son hydrophobie/hydrophilie. En effet, plus le support est hydrophobe (PDMS et verre seul ou avec PLL-g-PEG), et plus il prévient l'immobilisation de mitochondries à sa surface et un déplacement important est observé. À l'inverse, plus le support est hydrophile (PDMS et verre traité exposé au plasma) et plus cela permet d'aider à immobiliser des mitochondries à sa surface, celles-ci présenteront alors un déplacement faible. La chimie de surface n'a également pas d'impact majeur sur le suivi des variations des réponses en fluorescence du potentiel de membrane des mitochondries en TMRM. L'ensemble des résultats expérimentaux présentés ici vont dans le sens des conclusions trouvées dans la littérature, à savoir que ce sont bien les surfaces les plus hydrophiles qui permettent une meilleure

immobilisation des échantillons biologiques, que ce soit par liaisons électrostatiques ou avec des liaisons faibles avec la mise en place d'une pseudo-couche d'hydratation.

Au vu de ces résultats, j'ai choisi par la suite de réaliser mes expériences sur une lamelle de verre traitée au plasma à oxygène, afin d'immobiliser le plus de mitochondries et qu'elles se déplacent le moins possible. Malgré des caractéristiques similaires au verre avec le même traitement, le choix du PDMS exposé au plasma a été exclu puisque sa préparation nécessite une étape supplémentaire de « spin coating » du PDMS qui rallonge grandement le temps de préparation des expériences et qui présente une moins bonne reproductibilité.

IV. Analyses des états stationnaires mitochondriaux

Dans la suite de ce travail, j'ai appliqué cette même méthode d'analyse semi-automatisée pour appréhender des variabilités individuelles ou des sous-populations mitochondriales comme j'ai commencé à le faire avec la figure 7. En effet, l'objectif premier de ma thèse était d'être capable de suivre individuellement les variations d'activité des mitochondries.

a) Principe de l'expérience : Analyse du potentiel de membrane (TMRM) et NADH sur des populations mitochondriales

Pour cette partie, l'expérience réalisée est identique à celle décrite précédemment (figure 9). Deux différences sont à noter, tout d'abord le mélange de substrats est ajouté en premier et comprend en plus du glutamate et malate du succinate. Ce dernier permet d'activer le complexe II de la CR (figure 10 schéma). La deuxième différence est qu'à la fin de la séquence, du Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazine (CCCP) est ajouté. Cette molécule présente également dans la figure 10 est un découplant du gradient de proton mitochondrial, cela va avoir pour effet de dissiper le potentiel de membrane. Les différents effecteurs sont ajoutés toutes les 10 images (100 secondes). Le choix de mettre ensemble les substrats des complexes mitochondriaux a été dicté par la volonté d'être au plus près de la réalité physiologique où tous les substrats générés par les voies métaboliques ne sont pas en quantités limitantes. Ce choix est d'autant plus important pour la caractérisation de l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP), présentée dans le chapitre II.

b) Résultats et discussions

i. Suivi multiparamétrique au spectrofluorimètre

Une des méthodes classiques pour étudier la mitochondrie est de suivre le potentiel de membrane à l'aide d'un spectrofluorimètre. C'est ce qui est représenté avec la figure 11, dans laquelle est présentée au cours du temps l'intensité de fluorescence du TMRM et du NADH en fonction des substrats/inhibiteurs ajoutés. La séquence des ajouts est identique à celle utilisée dans la partie précédente (figure 7) sauf que les substrats sont ici ajoutés avant le début du suivi. Pour l'analyse du TMRM, nous avons suivi le protocole décrit par Scaduto, Russell C., et Lee W. Grotyohann 1999 qui utilise un ratio de deux longueurs d'onde d'excitation 576 et 546 nm pour une même longueur d'onde d'émission 590 nm. Ces longueurs d'onde d'excitation différentes permettent de suivre en même temps l'intensité de fluorescence des mitochondries en solution (avec excitation à 546 nm) et les variations de la solution (avec excitation à 573 nm).

Que ce soit pour le potentiel de membrane ou le NADH, on observe des variations de fluorescence de même direction (augmentation ou diminution) et stables au cours du temps similaire à celles observées figure 5. L'ajout du CCCP nouveau dans cette séquence, permet de faire chuter la fluorescence des deux paramètres. Que ce soit pour le ratio du TMRM ou le NADH (Figure 11 A et B) ces résultats nous montrent que la fluorescence des mitochondries est stable dans le temps avec un suivi possible jusqu'au moins 800 secondes. Cette séquence est classiquement utilisée car elle représente un bon contrôle de la viabilité et de l'activité des mitochondries.

Cependant, l'inconvénient de cette méthode est qu'elle ne permet de récupérer qu'une fluorescence moyenne. La valeur obtenue est liée à l'ensemble des réponses des mitochondries. En considérant la variabilité des échantillons biologiques en général ; il est fort possible que les mitochondries isolées présentent elles aussi une variabilité de réponse. Grâce à cette méthode mise en place au cours de ma thèse et décrite dans la partie précédente, j'ai cherché à mettre en évidence cette hétérogénéité de réponse.

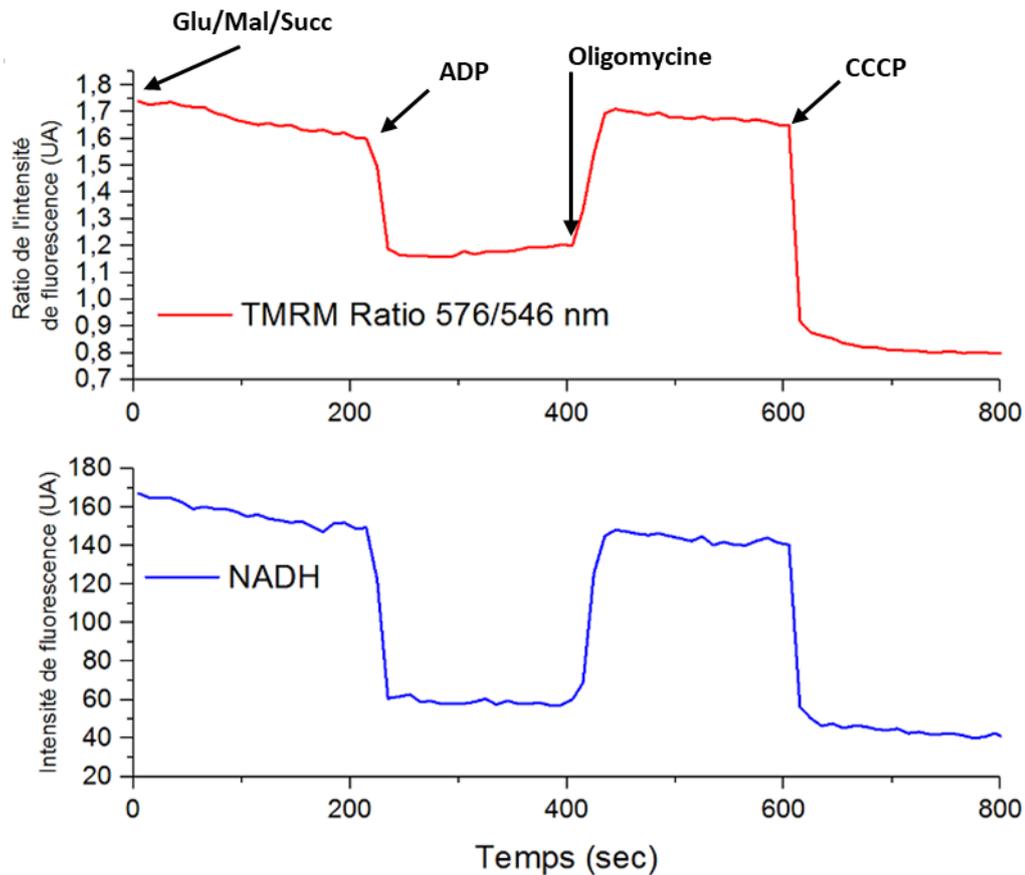


Figure 11 : Analyses spectrofluorimétriques des variations du potentiel de membrane avec la sonde TMRM (10 nM) et du NADH (auto-fluorescent) endogène mitochondrial sur une solution de mitochondries isolées à 0.2 mg.mL^{-1} . A) Résultat du ratio des intensités de fluorescence du TMRM pour deux longueurs d'ondes d'excitation (546 et 576 nm) et pour une même longueur d'onde d'émission (590 nm). B) Suivi de l'intensité de fluorescence du NADH. Séquences des ajouts. 1) T=0, Glutamate/Malate/Succinate. 2) T=200 sec, ADP 3) T=400 sec, Oligomycine 4) T=600 sec, CCCP.

ii. Etats stationnaires en microscopie

Pour cela, la première étape a consisté à réaliser la même séquence que précédemment mais sur une solution de mitochondries isolées que l'on observerait au microscope (figure 12). Chaque image présentée (Figure 12 de A à E) montre l'intensité de fluorescence du TMRM de l'ensemble des mitochondries au début de l'expérience et après chaque ajout. Les images montrées ici sont celles après traitement du défaut d'illumination (en annexe est présenté la même séquence sur les images brutes). La figure 12F montre la moyenne de fluorescence de l'ensemble des mitochondries (en rouge) comparée à la moyenne de fluorescence du bruit de fond (en bleu). On peut noter un bruit quasiment nul après traitement des images qui permet de bien faire ressortir les variations de fluorescence des mitochondries et l'on observe au final que les variations des moyennes de fluorescence sont très semblables à celles observées au spectrofluorimètre.

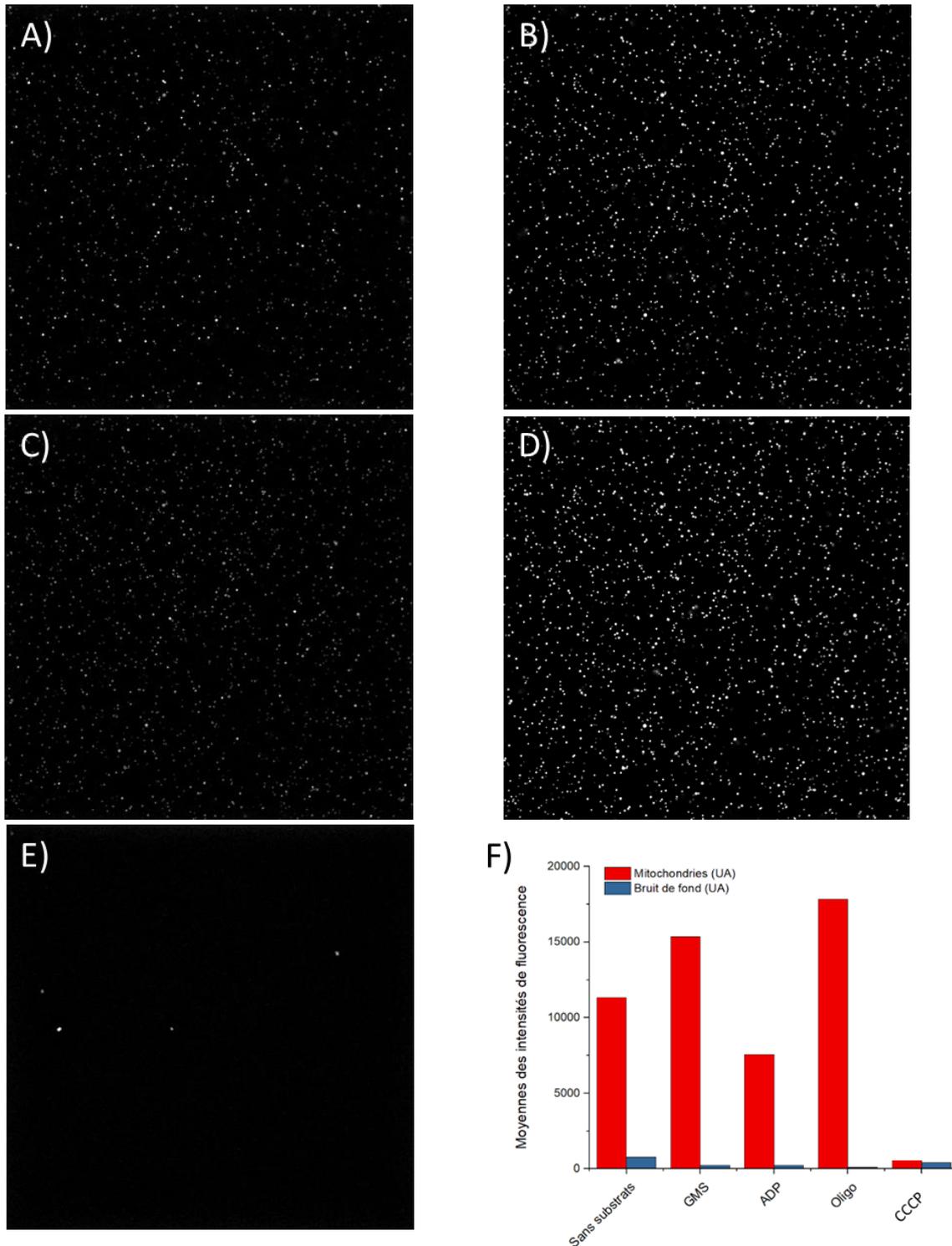


Figure 12 : Réponses des mitochondries isolées à une séquence d'activation-inhibition du potentiel de membrane (visualisé par le TMRM à 100 nM). Chaque image est traitée par le protocole présenté dans la figure 4. A) Mitochondries après 20 minutes de sédimentation. B) Après injection de glutamate-malate et succinate. C) Après injection d'ADP. D) Après injection d'oligomycine. E) Après injection du CCCP. F) Comparaison des intensités moyennes de fluorescence pour les mitochondries et le bruit de fond à chaque étape.

iii. Réponse moyenne et variabilité de réponse de la population

Afin de mieux comprendre les évolutions et les variations de réponse des mitochondries au sein de la population observée au cours d'une étude par microscopie, nous avons regardé les variations de la moyenne de fluorescence du TMRM mais également du NADH en fonction du temps (figure 13A). En moyenne 1000 mitochondries sont observées à la surface de la lamelle de verre, même si on verra par la suite que ce nombre varie au cours de la séquence. Comme pour la figure 11, en rouge est représentée la moyenne de fluorescence du TMRM de l'ensemble des mitochondries et en bleu celle du NADH. En noir sont représentés les écart-types des moyennes de fluorescence. Pour le potentiel de membrane, une seule longueur d'onde est suivie et non plus un ratio de deux longueurs d'ondes comme au préalable car en microscopie à épifluorescence on excite la sonde fluorescente sur une bande plus large du spectre visible qu'au spectrofluorimètre, ici nous avons utilisé le filtre d'excitation (N2.1 de Leica) qui permet d'illuminer entre 515 et 560 nm et un filtre d'émission à large bande passante qui permet de détecter les longueurs d'ondes > 590 nm. Mais la raison principale est qu'avec la microscopie on peut suivre sur une même image la fluorescence des mitochondries et celle du bruit de fond, la double illumination spécifique à l'un ou à l'autre n'est plus nécessaire. À noter aussi qu'ici, les mitochondries sont mises en présence des substrats pendant le suivi et non en amont comme dans la figure 11.

On obtient ainsi d'une autre façon un résultat identique à celui obtenu avec le spectrofluorimètre. Les variations de fluorescence sont en effet identiques à la figure 11. On observe une augmentation de la fluorescence après l'ajout des substrats, qui est suivie d'une baisse après l'ajout d'ADP. Ensuite, on observe une remontée de fluorescence du TMRM qui est réduite à zéro après ajout du CCCP. Le grand avantage de cette méthode est qu'ici, la moyenne de fluorescence de la population est reconstruite à partir des suivis individuels de toutes les mitochondries. Il est donc tout à fait possible de corréliser réponses individuelles et variations globales de la population au même titre qu'avec le spectrofluorimètre. Cette première représentation permet très simplement de connaître la réponse globale des mitochondries, cependant on a voulu aller plus loin et connaître la variabilité des réponses de fluorescence.

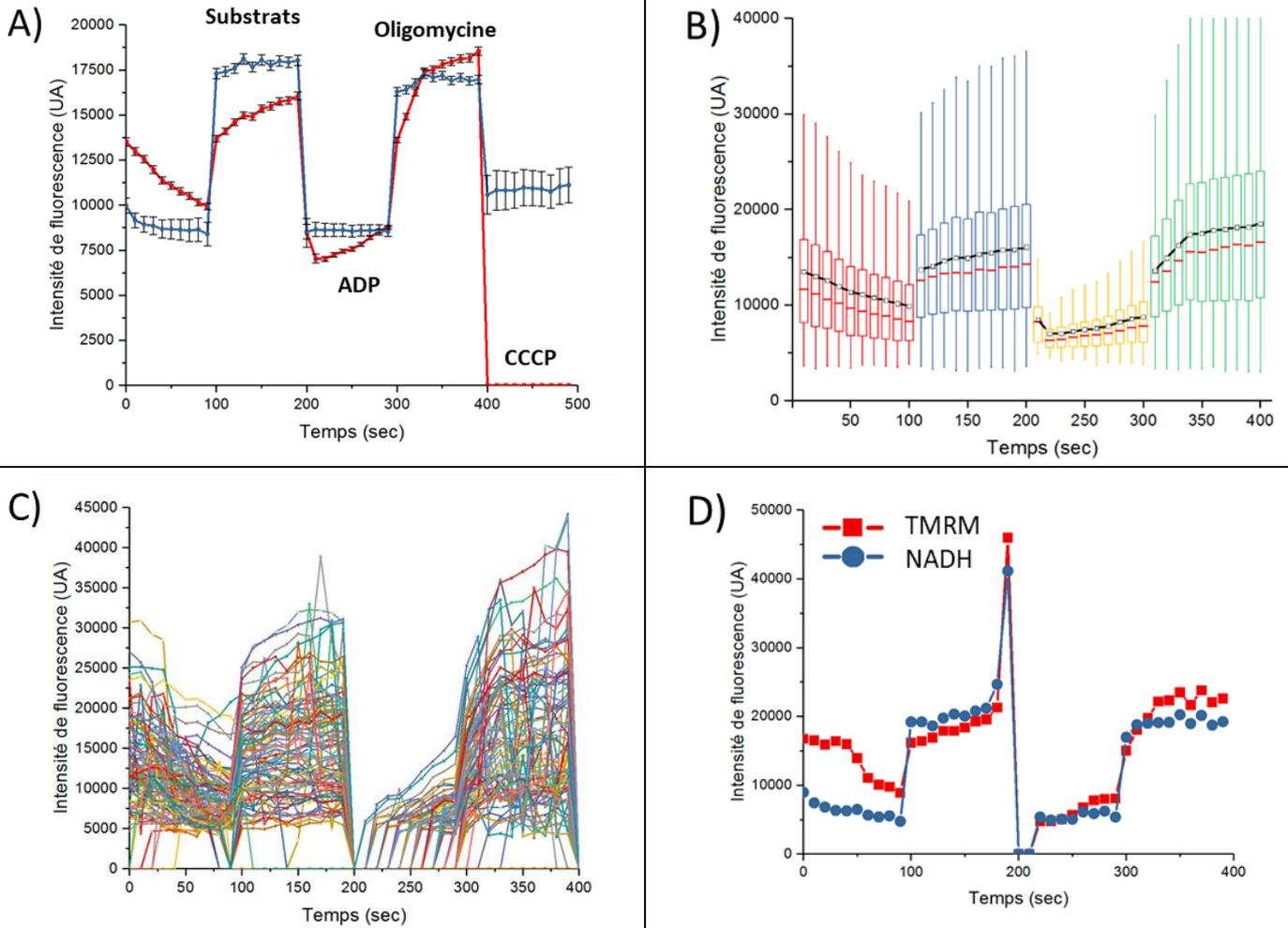


Figure 13 : Variations d'activité des mitochondries individuelles au sein d'une population. A) Variations moyennes du potentiel de membrane avec la sonde TMRM (10 nM) en rouge, ainsi que le suivi du NADH endogène mitochondrial en bleu. B) Autre représentation graphique du même jeu de données, avec ici une distribution des valeurs de la fluorescence du TMRM à chaque image de type « boîte à moustaches ». C) Suivi simultané des intensités de fluorescence au TMRM de 100 mitochondries individuelles. D) Exemple du suivi des intensités de fluorescence pour le NADH endogène (en bleu) et du marquage au TMRM (en rouge) d'une seule mitochondrie. Au début de l'expérience, les mitochondries sont laissées pendant 20 minutes pour favoriser leur sédimentation et leur immobilisation sur la lamelle de verre. Puis une séquence de substrats/inhibiteur est utilisée pour moduler la fluorescence de ces deux paramètres, dans l'ordre : après 100 secondes, ajout des substrats glutamate, malate et succinate, puis ajout de l'ADP (à 200 secondes), et après de l'oligomycine (à 300 secondes) et pour finir du CCCP à 400 secondes (seulement A).

La figure 13B est une représentation des distributions des valeurs de la fluorescence du TMRM de type « boîte à moustache » de l'ensemble des réponses mitochondriales dans chaque image. Il est important de comprendre que les résultats présentés ici sont issus des mêmes données que la figure 13A, seule la représentation est différente. À noter également qu'ici et dans la suite de cette partie, nous avons choisi de nous concentrer spécifiquement sur le potentiel de membrane (TMRM), qui sera également au cœur du chapitre suivant. Chaque couleur du graphique de la figure 13A représente une étape de la séquence : en rouge sont représentées les mitochondries au début de l'expérience, après les 20 minutes de sédimentation sur la lamelle de verre ; en bleu, sont représentées les mitochondries après l'ajout des substrats (glutamate/ malate/ succinate) ; en jaune, les mitochondries après l'ajout d'ADP et en vert après l'ajout d'Oligomycine. Pour les figures 13B, C et D la condition CCCP n'est pas montrée car aucune mitochondrie n'est détectée, la fluorescence est donc nulle. Les carrés blancs reliés entre eux correspondent aux moyennes de fluorescence du TMRM vues dans la figure 13A. Les barres rouges horizontales lues, correspondent aux médianes. Les barres verticales représentent l'ensemble de 1 à 99% de la population. Les boîtes quant à elles représentent les limites des 1^{er} et 4^{ème} quartiles. Ce que l'on peut observer dans ce graphique est que, sauf après l'ajout d'ADP, quels que soient les états de la mitochondrie, la gamme de réponses en fluorescence est très étendue, pouvant aller de 3000 à plus de 30 000 UA, par exemple après l'ajout des substrats. Cependant si l'on s'intéresse aux quartiles de la population mitochondriale, on peut observer que les réponses en fluorescence sont relativement centrées.

Une autre façon de représenter cette hétérogénéité de réponse pour le TMRM est visible figure 13C, où est réalisé le suivi simultané de 100 mitochondries individuelles. Chaque couleur représente ici une seule mitochondrie. Si dans l'ensemble on voit des variations communes, on remarque ici à quel point chaque mitochondrie possède son propre niveau de réponse en fluorescence. La figure 13D représente une seule mitochondrie du même échantillon mais cette fois-ci sont représentés les suivis du TMRM en rouge et du NADH en bleu. On peut observer des variations similaires des niveaux de fluorescence pour ces deux paramètres, avec tout de même de légères variations entre elles, ce qui rajoute un niveau d'hétérogénéité supplémentaire au suivi qu'on réalise. Le pic aux alentours de 200 secondes correspond à un artefact à cause d'une autre mitochondrie qui est passée dans le champ au-dessus de celle-ci, gênant ainsi la mesure.

L'étape après l'ajout d'ADP semble faire exception au vu du reste des résultats car ici la variabilité est beaucoup plus faible avec des valeurs très resserrées. Cela peut s'expliquer par l'effet de l'ADP qui permet d'activer les ATP synthétases, ce qui fait baisser le potentiel de membrane. Ceci a pour effet de diminuer fortement la concentration intra-mitochondriale en TMRM au point que certaines mitochondries « disparaissent », c'est à dire ne sont plus visibles

(rapport signal/bruit) dans nos conditions. Dans cette expérience 1700 mitochondries étaient observables après l'ajout du Glu/Mal/Succ, mais seulement 900 étaient visibles après l'ajout de l'ADP. Ces mitochondries ne sont pas altérées ou ne sont pas sorties du champ d'acquisition, leur fluorescence étant tellement faible elles se confondent avec le bruit de fond, rendant leur suivi impossible. Comme une partie de la population n'est plus visible à ce moment-là, ceci a pour effet de centrer encore plus les valeurs de fluorescence.

Même si les états bioénergétiques mitochondriaux observés ici sont stationnaires, on peut cependant voir une évolution au cours du temps après l'ajout d'ADP et d'oligomycine. Après ajout d'ADP, l'effet est maximal avec une moyenne de fluorescence faible, cependant il semblerait qu'il soit consommé au fur et à mesure, ce qui a pour conséquence de faire remonter le potentiel de membrane progressivement. Après ajout de l'oligomycine, c'est l'inverse : son effet n'est pas immédiat mais semble s'installer au cours du temps. Cela peut s'expliquer par son mode de fonctionnement, qui est d'interférer avec les processus d'activation de l'ATP synthétase et conduit donc à une inhibition graduelle et non directe (Valerio, Marie, et al 1994).

iv. Distribution des intensités de fluorescence

Les résultats précédents (figure 13) ont permis de mettre en évidence une hétérogénéité d'intensité de fluorescence des mitochondries. Pour aller plus loin et essayer de caractériser au mieux cette disparité, je me suis intéressé à la distribution de ces valeurs pour une image donnée après chaque ajout des molécules effectrices (Figure 14 A à D). Chaque figure représente une comparaison des distributions des valeurs d'intensité de fluorescence à deux instants. Pour aider à la compréhension, le code couleur employé est le même ici que dans la figure 13B. Pour rappel, le rouge correspond aux mitochondries après 20 minutes de sédimentation sur la lamelle de verre, le bleu correspond à l'addition des substrats (Glutamate/Malate/Succinate), en jaune après l'injection d'ADP et en vert après l'injection de l'oligomycine. Comme expliqué précédemment, le nombre de mitochondries visibles varie en fonction de la molécule ajoutée, pour y pallier les distributions ont été normalisées par rapport au nombre total de mitochondries présentes dans l'image sélectionnée. La figure 14A correspond aux valeurs de fluorescence avant et après addition des substrats. On observe un changement important en termes de distribution des valeurs de fluorescence : elles sont initialement resserrées sur les intervalles bas entre 3000 et 17000 UA, ensuite elles deviennent plus étalées selon des valeurs comprises entre 3000 et 29 000 UA. Cette dichotomie de distribution se répète par la suite.

Après l'ajout d'ADP, la distribution étalée se resserre de nouveau, pour revenir quasiment à l'identique de celle avant l'ajout des substrats. À l'inverse, après ajout de l'oligomycine, ces valeurs resserrées vont à nouveau être plus étalées. Quelle que soit la distribution, il semble qu'elles suivent toutes une loi Log-normale, plus qu'une loi normale (voir analyses ultérieures de la taille). Ces distributions nous permettent de voir que la réalité derrière la courbe obtenue en spectrofluorimétrie est beaucoup plus complexe. En effet, les largeurs peuvent passer du simple au double, cela montre que chaque mitochondrie issue d'une même préparation peut présenter une grande palette d'intensités de réponse en TMRM. En revanche, on voit bien dans l'ensemble qu'il existe deux comportements moyens. On peut donc rassembler les distributions deux par deux : avant les substrats et après ajout de l'ADP ; en présence des substrats et après ajout de l'oligomycine. Même si les différences de distribution sont importantes entre ces deux comportements, au sein de celles-ci, les valeurs sont très proches.

Ce parallèle deux à deux peut s'expliquer par les changements induits au niveau de la CR et la phosphorylation oxydative. Après injection des substrats, comme déjà mentionné on passe à l'état substrat, le potentiel de membrane est de l'ordre de -180 mV, après injection de l'oligomycine les ATP synthétases sont inhibées, le potentiel de membrane augmente pour revenir légèrement à une valeur supérieure à celle de l'état 4, environ -190 mV (de Gan, Florence Macouillard-Poullétier et al 1998 ; Masini, Alberto, et al 1984), ce qui explique que les distributions des intensités de fluorescence pour ces deux états soient similaires. À noter également que si l'on s'intéresse aux courbes de la figure 13 ainsi que la figure 12, on remarque qu'en TMRM, que ce soit pour la moyenne de fluorescence ou à l'échelle individuelle, la fluorescence après ajout de l'oligomycine est légèrement plus forte ce qui corrobore cette montée légère du potentiel de membrane.

Pour l'état 3 (en présence d'ADP), le potentiel de membrane diminue jusqu'à -150 mV (Masini, Alberto, et al 1984), les intensités de fluorescence diminuent, la distribution se resserre, d'autant plus (comme déjà mentionné) que certaines mitochondries ont une fluorescence suffisamment faible pour ne plus être détectées, ce qui diminue l'étendue de la distribution. Cependant, pour les mitochondries après sédimentation il est difficile de comprendre ce qui se passe, au vu de la distribution proche de celle de l'état 3, cela suggère que le potentiel de membrane est faible, les mitochondries ayant consommé leurs substrats endogènes.

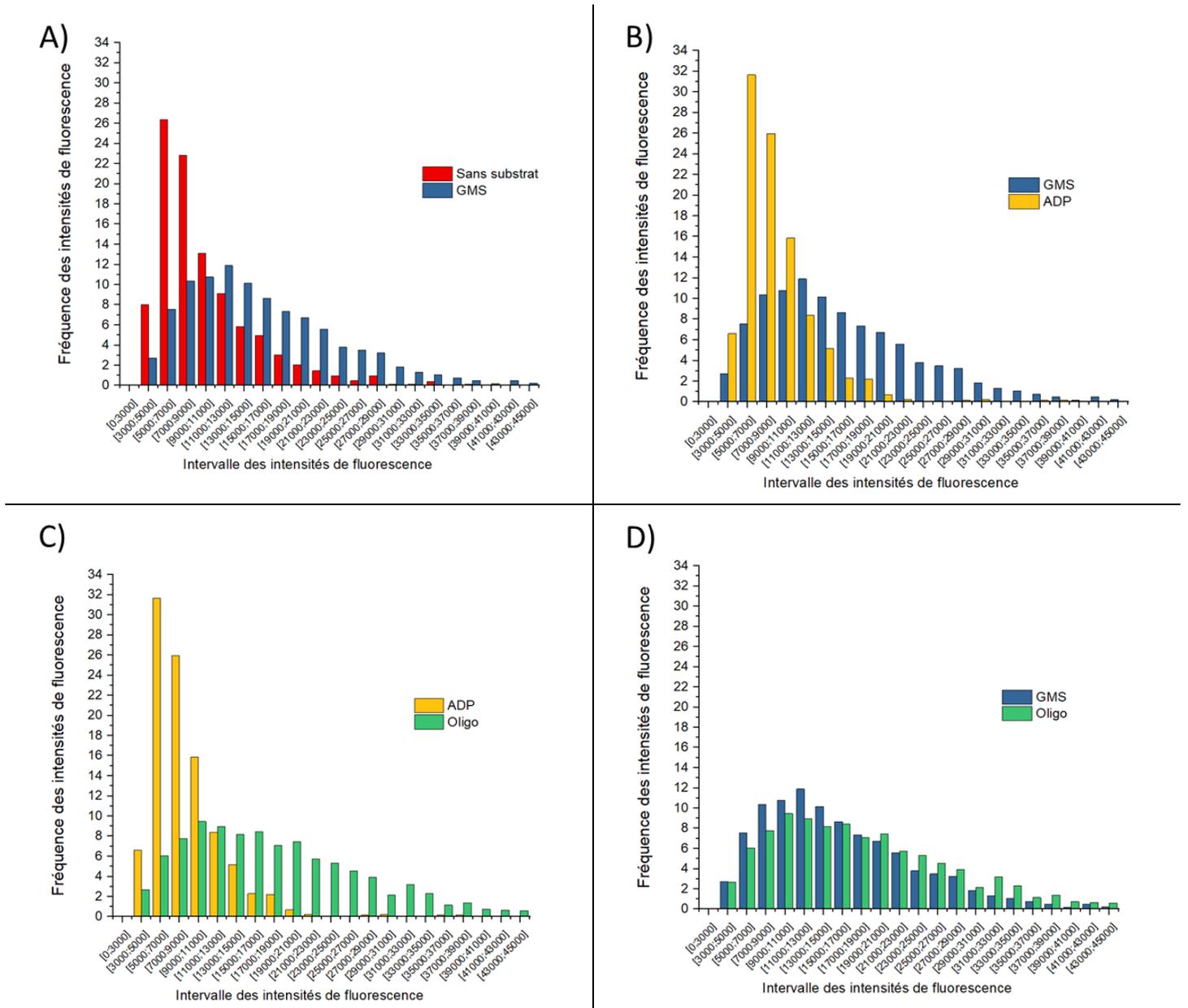


Figure 14 : Distributions des intensités de fluorescence de l'ensemble des mitochondries observées à chaque étape de la séquence d'ajout. A) Comparaison avant (rouge) et après ajout des substrats (Glutamate/ Malate/ Succinate en bleu). B) Comparaison en présence des substrats (bleu) et après ajout de l'ADP (jaune). C) Comparaison en présence d'ADP (jaune) et après ajout de l'oligomycine (vert). D) Comparaison en présence des substrats (bleu) et de l'oligomycine (vert). Le code couleur employé ici est le même que pour la figure 9B.

v. *Analyse de la taille des mitochondries observées*

Pour aller plus loin et essayer de comprendre pourquoi au sein d'un même état une mitochondrie peut présenter une intensité de 3000 à 29 000 UA, je me suis intéressé aux différents facteurs qui modulent leur fluorescence. Hormis la concentration de la sonde, la température ou encore la concentration mitochondriale, qui sont des paramètres fixés, je me suis intéressé à l'effet de la taille des mitochondries, c'est-à-dire au volume de ces dernières. En effet à concentration et à potentiel de membrane égaux, une mitochondrie plus « volumineuse » contiendra plus de molécules de la sonde en son sein et sera par conséquent plus fluorescente. Dans la figure 15 est représentée l'étude du diamètre estimé (valeurs issues du module « Trackmate ») de chaque mitochondrie après ajout des substrats (Glu/Mal/Succ) et après ajout de l'ADP. Je me suis intéressé particulièrement à ces deux états car en oxygraphie (qui est le suivi de la consommation d'oxygène par les mitochondries, dont je reparlerai plus en détail dans le chapitre III), la valeur du rapport des pentes de ces deux états est un indice de leur viabilité (figure 9). La figure 15 A et B montre le diamètre estimé en fonction de la zone d'émission de la fluorescence pour respectivement le TMRM et le NADH.

On peut observer qu'il existe deux populations principales très bien définies. La première correspond à un diamètre de 5,14 pixels soit 0,840 μm et la deuxième à un diamètre de 8,79 pixels soit 1,42 μm . Ces valeurs de taille moyenne sont identiques en TMRM et en NADH (mesures réalisées sur le même échantillon). Cependant pour savoir si ces valeurs sont réalistes et ne sont pas modifiées par le système d'analyse en microscopie, nous avons vérifié la limite de diffraction (ou tâche d'Airy) en fluorescence selon l'équation suivante :

$$(1) \quad \theta \cong 1,22 \frac{\lambda}{NA * 2}$$

Cette équation prend en compte deux paramètres, la longueur d'onde du maximum d'émission de 575 nm pour le TMRM et de 450 nm pour le NADH, ainsi que l'ouverture numérique de l'objectif qui est ici de 0,75 conduisant aux valeurs de 467 nm pour le TMRM contre 366 nm pour le NADH (vu dans le matériel et méthode). Cela veut dire qu'en TMRM, il est difficile de calculer correctement le diamètre des mitochondries de petite taille. Cependant en NADH, il est tout à fait possible de le faire dans les deux cas et on retrouve les deux mêmes valeurs de diamètre des mitochondries, suffisamment différentes et très peu dispersées statistiquement. Ces éléments semblent confirmer l'existence de deux populations mitochondriales distinctes dans nos échantillons. Une troisième population est aussi visible autour de 18,8 pixels, mais celle-ci correspond à une erreur de calcul du module quand le contraste de la mitochondrie est trop faible.

D'un point de vue physiologique, il existe deux types de mitochondries au sein des fibres cardiaques : les mitochondries intra-fibrillaires et celles localisées au niveau subsarcolemmal. Les deux populations que l'on retrouve ici semblent être corrélées avec ces deux types de mitochondries présentes dans les cellules cardiaques. En effet d'après l'étude de Hollander John M et al 2014, les tailles mesurées avec nos images correspondraient à celles retrouvées classiquement, notamment à partir d'études par microscopie électronique sur des populations de mitochondries isolées spécifiquement en fonction de leur localisation. Pour avoir une idée de cette différence de taille, la figure 15E présente l'image de deux mitochondries chacune appartenant à une des deux populations.

Pour en revenir à la question de départ sur les variabilités des réponses en fluorescence, nous avons analysé avec les figures 15 C et D le diamètre estimé pour chaque population en TMRM. On note qu'il n'existe pas de relation linéaire entre ces deux paramètres que ce soit en présence des substrats (état substrat) ou de l'ADP (état 3). Donc quel que soit son diamètre, une mitochondrie peut présenter une large gamme d'intensité de fluorescence possible. La distribution avec une faible disparité de diamètre n'explique donc pas les variations. Cependant, si la taille n'a pas d'impact sur les variations de fluorescence possibles, elle a un impact sur son maximum, comme observé dans la figure 15 A et B. Les plus petites mitochondries présentent une large gamme de fluorescence entre 3000 et 25 000 UA, cependant cet intervalle est plus faible que celui des intensités des mitochondries les plus « volumineuses » qui est entre 3000 et 50 000 UA.

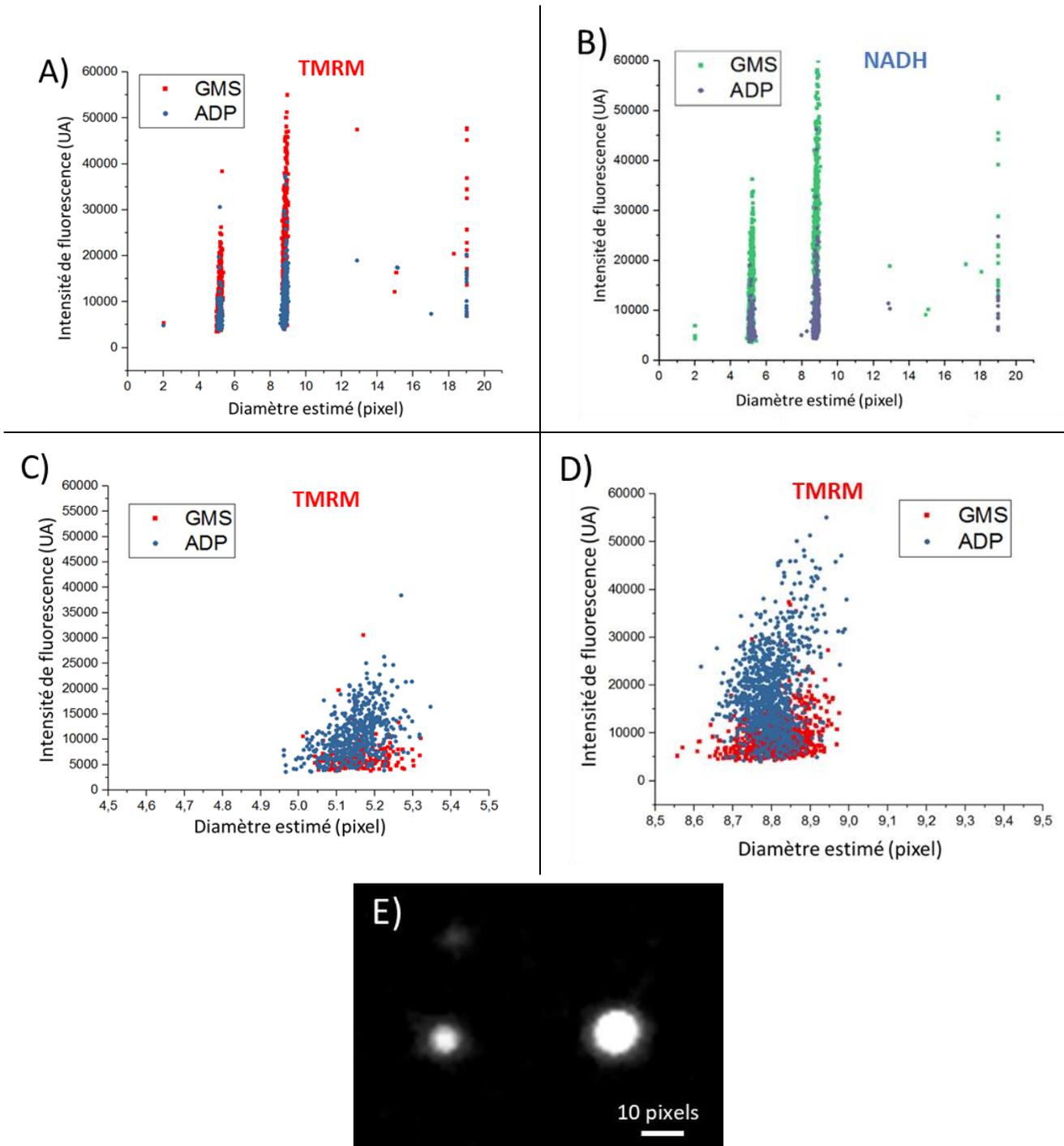


Figure 15 : Nuage de point des intensités de fluorescence en fonction du diamètre estimé par « Trackmate ». A) Résultat pour le TMRM après ajout des substrats (en rouge) ou après ajout de l'ADP (en bleu). B) Résultat pour le NADH après ajout des substrats (en vert) ou après ajout de l'ADP (en violet). C et D) Zooms de deux zones de la figure A. E) Image de microscopie du TMRM de deux mitochondries représentatives des diamètres estimés.

vi. Rapport des intensités de fluorescence entre états bioénergétiques

Si le diamètre des organites ne semble pas à lui seul expliquer la grande disparité des intensités de fluorescence, cela a permis de montrer qu'il existe deux sous-populations mitochondriales observables. J'ai donc par la suite essayé de comprendre leur contribution sur les deux états comparés précédemment, c'est-à-dire après ajout des substrats (état substrat) et de l'ADP (état 3 ; figure 16). Pour cela, dans la figure 16A est représentée la corrélation entre les valeurs de fluorescence en présence des substrats et en présence d'ADP pour chaque mitochondrie. Sur les 1500 observables en GMS et les 1100 en ADP seulement 931 sont visibles dans les 2 images et reportées.

Si dans la figure 9 étaient présentés les rapports de fluorescence des moyennes, ici nous pouvons observer ce même rapport mais à l'échelle individuelle. Le nuage de points permet de visualiser une corrélation linéaire générale entre les deux séries de valeurs, et donc qu'un rapport assez constant existe entre les deux états, même si un nombre significatif de valeurs sont en dehors de cette relation linéaire. La figure 16B montre le même résultat mais cette fois-en séparant les contributions de chaque sous-population de diamètre, en rouge la population de 1,42 μm et en bleu celle de 836 nm. Là encore, dans chaque cas la linéarité apparaît, mais on peut voir que la population rouge est bien plus dispersée que la bleue, liée potentiellement à leur différence de diamètre. À noter également que pour les plus petites tailles, le nuage de points est très proche de la limite de détection par notre méthode qui est ici de l'ordre de 3000 UA. L'analyse seule de cette population est donc risquée car un biais pourrait être introduit à cause de ces intensités de fluorescence trop faibles. L'absence de comportement différent au sein d'une même population de taille semble confirmer le fait qu'une mitochondrie puisse avoir une grande variabilité de fluorescence, bien que dans l'ensemble elles réagissent en majorité de la même manière. Au vu de l'importance de ces deux états, l'état 4 (non phosphorylant) et l'état 3 (phosphorylant) vis-à-vis de la bioénergétique mitochondriale, il est tout à fait compréhensible que ce comportement soit identique pour toutes les mitochondries.

Le rapport des valeurs entre ces deux états a été calculé et leur distribution étudiée dans les figures 16C et D. Dans la figure 16C, est montrée la distribution de toutes les valeurs confondues. On peut voir que cette distribution suit bien une gaussienne qui est bien définie et centrée autour d'une valeur proche de 2,5. Les données comprises dans l'intervalle entre 2 et 3, représentent 87,5 % de la population, soit 815 des 931 mitochondries analysées. Donc la majorité des mitochondries présentent un rapport linéaire et sont activées. La figure 16D présente ce même résultat mais pour chaque sous-population de taille. Dans les deux cas les distributions sont centrées autour de valeurs proches mais pas tout à fait identiques. Pour les mitochondries de petite taille la moyenne est de 2.16 contre 2.44 pour les plus grandes. Cela semble montrer une fois encore que dans l'ensemble les mitochondries répondent de la même façon. Dans l'état actuel des choses il est donc difficile de comprendre la différence de rapport qu'il y a entre ces deux sous-populations, c'est pourquoi d'autres études seraient à réaliser. Il serait intéressant soit de relier les différences vues avec la mesure d'activités spécifiques de chaque type mitochondrial des cellules cardiaques, ou soit d'autre organes, comme le foie ou un muscle squelettique, ou même de venir comparer ce résultat à celui de mitochondries d'autres espèces.

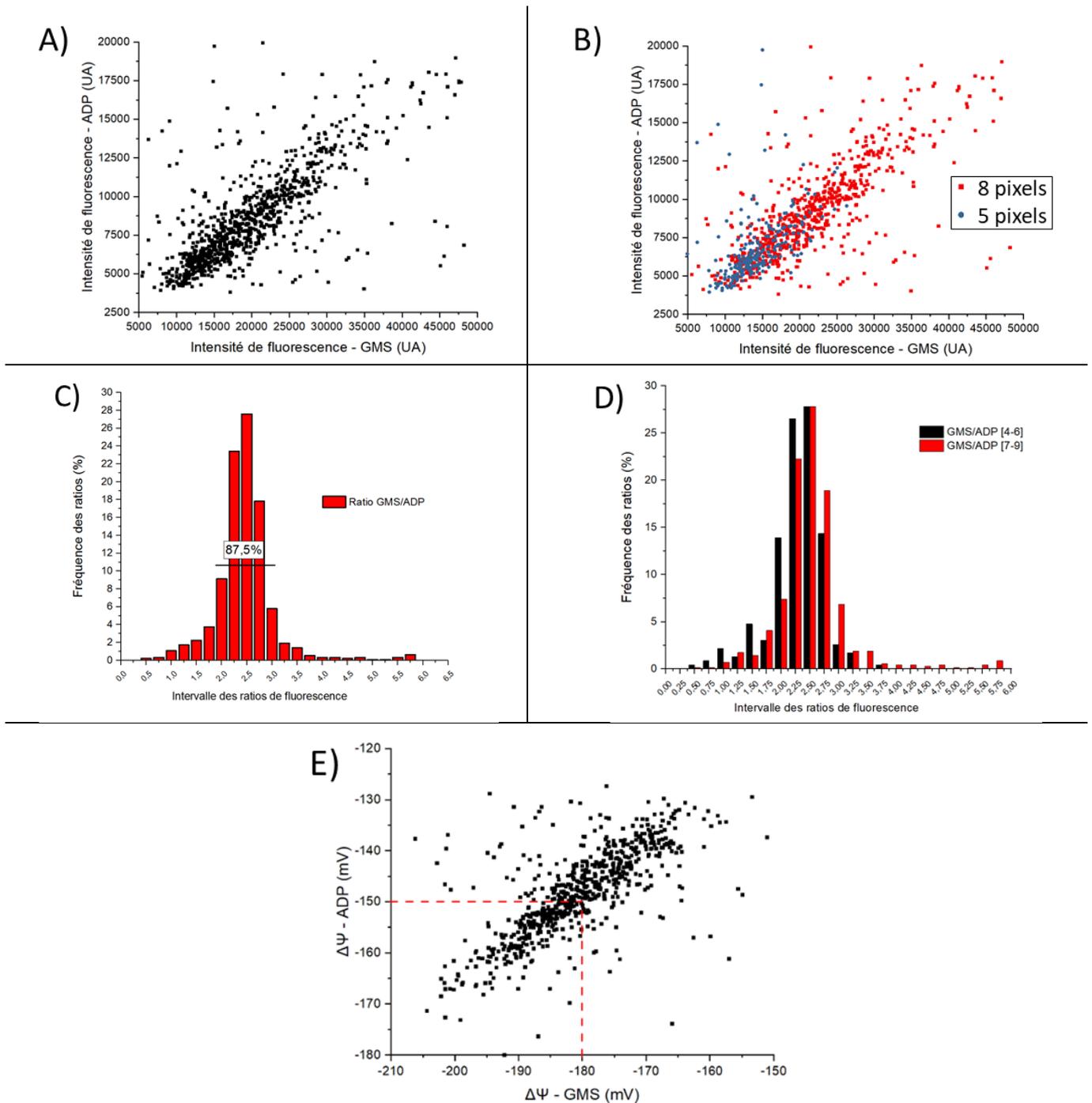


Figure 16 : Etude des corrélations entre les intensités de fluorescence en TMRM après ajout des substrats et de l'ADP. A) Corrélations entre les réponses de toutes les mitochondries individuelles entre l'état substrat et l'état 3. B) Même graphique que A, en fonction des diamètres des mitochondries: en bleu, les mitochondries de 5 pixels (840 nm) ; en rouge, les mitochondries de 8 pixels de diamètre (1,42 μm). C) Ratio des intensités de fluorescence de l'ensemble de la population mitochondriale. A à C, 931 mitochondries individuelles sont représentées. D) Ratio des intensités de fluorescence des mitochondries de 8 pixels de diamètre (en rouge) et de 5 pixels de diamètre (en noir). E) Conversion des intensités de fluorescence en valeurs de différence de potentiel de membrane en mV grâce à l'équation n°3.

vii. *Tentative de mesure du potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$) de chaque mitochondrie*

Puisque l'hétérogénéité intrinsèque à une population de mitochondries vis-à-vis de leur réponse en fluorescence n'a pas pu s'expliquer par leur taille, nous avons essayé de rapprocher ces valeurs d'intensités arbitraires au potentiel de membrane réel. L'hypothèse est de savoir si des différences légères du potentiel pour chaque mitochondrie étaient observables. Pour y arriver nous nous sommes intéressés au protocole décrit par Cottet Rousselle Cécile et al 2011, qui permet de corrélérer les valeurs d'intensités du TMRM d'une mitochondrie au sein d'une cellule à une valeur en mV du potentiel de membrane avec l'équation suivante :

$$(2) \quad \Delta\psi_m = -59 \log\left(\frac{\text{Fluorescence mitochondrie}}{\text{Fluorescence cytoplasme}}\right)$$

Cette équation fondée sur celle de *Nernst*, prend en compte le rapport des fluorescences de la sonde au sein de la matrice mitochondriale à celle de la sonde au sein du cytoplasme (qui sera le bruit de fond dans nos expériences), c'est-à-dire un rapport de concentrations pour évaluer le potentiel de membrane. D'autres techniques sont possibles, comme par électrochimie grâce à une électrode sensible au TPP/TPP⁺ (Kamo, Naoki, et al 1979), qui permet de mesurer le potentiel de la solution en proton de la quantité en TPP⁺ accumulé au sein de la matrice mitochondriale et donc en fonction du potentiel de membrane. Pour faire varier ce dernier, celui-ci est aboli dans un premier temps grâce à un ionophore, la valinomycine, puis des doses croissantes de K⁺ sont ajoutées ce qui permet de le reconstituer. En utilisant l'équation de *Nernst* et en calculant le volume matriciel en amont, on peut alors calculer la valeur exacte du potentiel de membrane à chaque ajout. En réalisant une calibration similaire avec des mitochondries marquées au TMRM, on peut a priori corrélérer potentiel de membrane et valeur d'intensité de fluorescence pour chaque mitochondrie individuelle, alors que la sonde à TPP/TPP⁺ va l'estimer pour la population entière.

En connaissance de cause nous avons choisi d'utiliser notre approche afin d'avoir une idée des variations de potentiels. Pour cela, nous avons modifié l'équation pour prendre en compte les hypothèses suivantes : la valeur de fluorescence moyenne après ajout des substrats doit être proche de la valeur théorique de -180 mV, et après ajout de l'ADP cette valeur moyenne doit être proche de -150 mV. Ces correspondances entre les valeurs moyennes de fluorescence et ces valeurs théoriques vont permettre de calibrer les données de fluorescence pour toutes les mitochondries individuelles et d'estimer leurs variations de potentiels de membranes. Cela donne l'équation suivante :

$$(3) \quad \Delta\psi_m = -59 \log\left(\frac{\text{Somme de fluorescence} / \text{Surface}}{\text{Moyenne de fluorescence corrigée}}\right)$$

Pour calculer cette équation, il faut tout d'abord diviser la somme de fluorescence c'est-à-dire le « Total Intensity » que l'on récupère avec le module « Trackmate », par sa surface estimée à parti de son diamètre, on obtient ainsi une moyenne de fluorescence par unité de surface. Il faut ensuite calculer la moyenne de fluorescence corrigée selon l'équation suivante :

$$(4) \text{ Moyenne de fluorescence corrigée} = \frac{\text{Moyenne de fluorescence population}}{10^{\left(\frac{-180}{59}\right)}}$$

Cette équation permet de corréliser la moyenne de fluorescence de l'ensemble des mitochondries individuelles avec la valeur théorique de -180 mV à l'état 4-substrats, ou de -150 mV à l'état 3 (attention à la valeur dans l'équation). Cette moyenne de fluorescence corrigée calculée, va servir de facteur de proportionnalité par la suite pour estimer le potentiel de membrane de chaque mitochondrie individuelle vis-à-vis de la moyenne de fluorescence.

Les résultats présentés dans la figure 16E, montrent la conversion des intensités de fluorescence de toutes les mitochondries individuelles en potentiel de membrane. Ces valeurs sont issues seulement de la population de 1,42 μm . J'ai choisi d'exclure la population de mitochondries de petite taille de ce calcul car elles sont trop proches de la limite de résolution de notre méthode d'observation, ce qui pourrait entraîner un biais dans les estimations. Ce que l'on peut observer dans ce nuage de point, c'est que la stabilité du rapport entre les valeurs présentes dans la figure 16A est également visible ici. On observe qu'après l'ajout des substrats la disparité des réponses en fluorescence vue plutôt, correspondrait à des potentiels compris entre -210 à -160 mV soit 50 mV d'écart. Même si cette gamme de valeur est étendue, elle reste dans un intervalle considéré physiologique, avec des distributions gaussiennes des valeurs. Après ajout d'ADP, les réponses sont comprises entre -180 à -145 mV soit un écart de 35 mV. Cette différence dans l'amplitude des réponses possibles, pourrait s'expliquer par le fait que certaines mitochondries après ajout de l'ADP présentent une fluorescence trop faible pour être détectée, l'absence de celles-ci empêcherait de visualiser l'ensemble des réponses possibles. Cependant cette estimation du $\Delta\Psi_m$ pourrait être une bonne perspective pour comprendre la diversité des réponses de fluorescence d'un point de vue individuel. On ne peut qu'émettre des hypothèses sur les origines de ces diversités de potentiels de membrane comme une différence dans les activités enzymatiques de la CR, ou alors dans le nombre ou l'organisation des complexes etc ...

V. Conclusions

Au travers de ce chapitre, nous avons proposé une nouvelle méthode d'analyse semi-automatique en trois grandes étapes, qui permet le suivi simultané de plusieurs centaines voire milliers de mitochondries individuelles. Ce nombre important d'objets que l'on peut suivre, permet une analyse statistique fiable et poussée.

J'ai également montré l'intérêt de cette approche pour différentes applications comme la caractérisation du déplacement des mitochondries sur un support. On a ainsi pu voir qu'il était important pour un suivi optimal des mitochondries que celles-ci ne bougent pas ou peu (< 10 pixels), pour éviter tout biais dans la collecte de la fluorescence. Cela a permis de mettre également en évidence le rôle du support, car celui-ci a un réel impact sur les déplacements du point de vue de sa chimie de surface. En effet, plus le support est hydrophile et plus il favorise l'immobilisation des mitochondries à sa surface et inversement pour une surface hydrophobe. En résumé, parmi les conditions que j'ai pu tester, la lamelle de verre exposée à un plasma à oxygène basse puissance est le meilleur support pour le suivi des mitochondries, car outre ses qualités optiques ce traitement permet d'immobiliser efficacement et durablement dans le temps, plus de la moitié des mitochondries présentes à sa surface.

Une autre application vue à travers cette méthode d'analyse est l'étude des états stationnaires pour le potentiel de membrane et du NADH. On a ainsi pu voir que cette approche permet d'obtenir, comme dans le cas du spectrofluorimètre, l'étude de l'ensemble de la population mitochondriale, mais avec une résolution plus fine. En effet, deux sous-populations mitochondriales ont pu être mises en avant grâce à leur diamètre, celles-ci semblent être corrélées avec les deux populations présentes dans les cardiomyocytes. Un intérêt supplémentaire de cette approche est qu'elle nous permet de corréler étude de population et comportement individuel. On peut ainsi regarder ce qu'il se cache derrière les moyennes de fluorescence des intensités et très vite, on se rend compte qu'il existe un vrai panel de réponses en fonction des mitochondries. Cette hétérogénéité dans les valeurs de fluorescence peut être corrélée aux variations des valeurs du potentiel de membrane, celles-ci restant dans des gammes physiologiques. Malgré une diversité de réponse en fluorescence importante, les mitochondries présentent une vraie constance entre deux états donnés après ajout des substrats et de l'ADP. Ceci veut dire que chaque mitochondrie a sa propre valeur initiale de potentiel donc de fluorescence en TMRM, cependant elles vont dans l'ensemble toutes varier de la même manière avec un ratio des deux états mentionnés entre 2 et 3 pour 87,5% de la population. Un autre avantage est le suivi multiparamétrique, de chaque objet, nous nous sommes intéressés au NADH et au TMRM en même temps, que ce soit pour la

population entière ou à l'échelle unique mais d'autres sondes endogènes pourraient a priori être suivies (FAD, MitoSox, JC1 ...).

Cette méthode présente tout de même certaines limites. La première est due au système lui-même, c'est-à-dire que toute technique de microscopie est limitée par le rapport signal sur bruit de l'objet étudié. Comme on a pu le voir pour des intensités de fluorescence basses < 3000 UA, ce qui correspondrait à des potentiels de membrane bas (< -130 mV), l'objet n'est plus suffisamment fluorescent et n'est plus visible, une partie des données est alors manquantes. Un autre aspect à prendre en compte est le volume des données générées, il n'est pas rare de devoir manipuler des tableaux de grande taille qui nécessitent bien souvent l'intervention d'un langage de programmation (ici Python) pour pouvoir les analyser. Ce faisant toute personne sans une initiation au préalable ne pourra utiliser cette approche. En revanche, un autre avantage hormis ceux mentionnés ci-dessus, est l'universalité de cette méthode. Le principe de cette approche est le suivi de particules, on peut donc en principe l'employer dans de nombreuses autres applications biologiques.

Les travaux que j'ai réalisés dans ce chapitre, ont je l'espère su convaincre de l'utilité de cette approche pour l'analyse des mitochondries. Si nous avons travaillé ici sur mitochondries isolées pour être dans la configuration la plus facile d'appréhension, dans le futur il serait important de confronter cette méthode à un système plus complexe en analysant des mitochondries au sein de la cellule.

Bibliographie

- Andrews, Simon, et al. « Difference Tracker: ImageJ Plugins for Fully Automated Analysis of Multiple Axonal Transport Parameters ». *Journal of Neuroscience Methods*, vol. 193, n° 2, novembre 2010, p. 281-87. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.jneumeth.2010.09.007.
- Arena, Ellen T., et al. « Bioimage Analysis of Shigella Infection Reveals Targeting of Colonic Crypts ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 112, n° 25, juin 2015, p. E3282-90. DOI.org (Crossref), doi:10.1073/pnas.1509091112.
- Bauer, Karl E., et al. « Visualizing RNA Granule Transport and Translation in Living Neurons ». *Methods*, vol. 126, août 2017, p. 177-85. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.ymeth.2017.06.013.
- Bonora, Massimo, et al. « Comprehensive Analysis of Mitochondrial Permeability Transition Pore Activity in Living Cells Using Fluorescence-Imaging-Based Techniques ». *Nature Protocols*, vol. 11, n° 6, juin 2016, p. 1067-80. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nprot.2016.064.
- Caffrey, Brian J., et al. « Semi-Automated 3D Segmentation of Human Skeletal Muscle Using Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopic Images ». *Journal of Structural Biology*, vol. 207, n° 1, juillet 2019, p. 1-11. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.jsb.2019.03.008.
- Cottet-Rousselle, Cécile, et al. « Cytometric Assessment of Mitochondria Using Fluorescent Probes ». *Cytometry Part A*, vol. 79A, n° 6, juin 2011, p. 405-25. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/cyto.a.21061.
- Creed, Sarah, et Matthew McKenzie. « Measurement of Mitochondrial Membrane Potential with the Fluorescent Dye Tetramethylrhodamine Methyl Ester (TMRM): Methods and Protocols ». *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 1928, 2019, p. 69-76, doi:10.1007/978-1-4939-9027-6_5.
- Curtis, A. S. G. « THE MECHANISM OF ADHESION OF CELLS TO GLASS ». *The Journal of Cell Biology*, vol. 20, n° 2, février 1964, p. 199-215. DOI.org (Crossref), doi:10.1083/jcb.20.2.199.
- Davidson, Sean M., et al. « Assessing Mitochondrial Potential, Calcium, and Redox State in Isolated Mammalian Cells Using Confocal Microscopy ». *Mitochondria*, édité par Dario Leister et Johannes M. Herrmann, vol. 372, Humana Press, 2007, p. 421-30. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/978-1-59745-365-3_30.
- de Gann, Florence Macouillard-Pouletier, et al. (1998). Flow cytometric analysis of mitochondrial activity in situ: Application to acetylceramide-induced mitochondrial swelling and apoptosis, p.7. *Cytometry*. 33. 333-9.
- De Giorgi, F., et al. « Electrical Coupling and Plasticity of the Mitochondrial Network ». *Cell Calcium*, vol. 28, n° 5-6, novembre 2000, p. 365-70. DOI.org (Crossref), doi:10.1054/ceca.2000.0177.
- Figueira, Tiago R., et al. « Safranin as a Fluorescent Probe for the Evaluation of Mitochondrial Membrane Potential in Isolated Organelles and Permeabilized Cells ». *Mitochondrial Bioenergetics*, édité par Carlos M. Palmeira et António J. Moreno, vol. 810, Humana Press, 2012, p. 103-17. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/978-1-61779-382-0_7.
- Foncy, Julie, et al. « Fabrication of Biomolecule Microarrays for Cell Immobilization Using Automated Microcontact Printing ». *Cell-Based Microarrays*, édité par Peter Ertl et Mario Rothbauer, vol. 1771, Springer New York, 2018, p. 83-95. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/978-1-4939-7792-5_7.
- Hollander, John M., et al. « Physiological and Structural Differences in Spatially Distinct Subpopulations of Cardiac Mitochondria: Influence of Cardiac Pathologies ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 307, n° 1, juillet 2014, p. H1-14. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpheart.00747.2013.
- Iannetti, Eligio F., et al. « Multiplexed High-Content Analysis of Mitochondrial Morphofunction Using Live-Cell Microscopy ». *Nature Protocols*, vol. 11, n° 9, septembre 2016, p. 1693-710. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nprot.2016.094.

Israelachvili, Jacob N. « 8 - Special Interactions: Hydrogen-Bonding and Hydrophobic and Hydrophilic Interactions ». *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, édité par Jacob N. Israelachvili, Academic Press, 2011, p. 151-67, doi:10.1016/B978-0-12-375182-9.10008-9.

Jiang, Na, et al. « Ratiometric Fluorescence Imaging of Cellular Polarity: Decrease in Mitochondrial Polarity in Cancer Cells ». *Angewandte Chemie International Edition*, vol. 54, n° 8, février 2015, p. 2510-14. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/anie.201410645.

Kamo, Naoki, et al. « Membrane Potential of Mitochondria Measured with an Electrode Sensitive to Tetraphenyl Phosphonium and Relationship between Proton Electrochemical Potential and Phosphorylation Potential in Steady State ». *The Journal of Membrane Biology*, vol. 49, n° 2, juin 1979, p. 105-21. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/BF01868720.

Khalili, Amelia, et Mohd Ahmad. « A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications ». *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 16, n° 8, août 2015, p. 18149-84. DOI.org (Crossref), doi:10.3390/ijms160818149.

Kostal, Vratislav, et al. « Semi-Automated Image Analysis: Detecting Carbonylation in Subcellular Regions of Skeletal Muscle ». *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 400, n° 1, avril 2011, p. 213-22. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s00216-011-4725-9.

Leonard, Anthony P., et al. « Quantitative Analysis of Mitochondrial Morphology and Membrane Potential in Living Cells Using High-Content Imaging, Machine Learning, and Morphological Binning ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1853, n° 2, février 2015, p. 348-60. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.002.

Masini, Alberto, et al. « An Investigation on the Effect of Oligomycin on State-4 Respiration in Isolated Rat-Liver Mitochondria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 767, n° 1, octobre 1984, p. 130-37. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/0005-2728(84)90087-2.

Nicholls, David. *Fluorescence Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Changes in Cultured Cells. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. (2012). p15. 810. 119-33. 10.1007/978-1-61779-382-0_8.

Nicholls, David, et Manus Ward. « Mitochondrial membrane potential and neuronal glutamate excitotoxicity: Mortality and millivolts ». *Trends in neurosciences*, vol. 23, mai 2000, p. 166-74, doi:10.1016/S0166-2236(99)01534-9.

Perry, Seth W., et al. « Mitochondrial Membrane Potential Probes and the Proton Gradient: A Practical Usage Guide ». *BioTechniques*, vol. 50, n° 2, février 2011, p. 98-115. DOI.org (Crossref), doi:10.2144/000113610.

Pouvreau, Sandrine. « Superoxide Flashes in Mouse Skeletal Muscle Are Produced by Discrete Arrays of Active Mitochondria Operating Coherently ». *PLoS ONE*, édité par Maria Moran, vol. 5, n° 9, septembre 2010, p. e13035. DOI.org (Crossref), doi:10.1371/journal.pone.0013035.

Quintanilla, Rodrigo A., et al. « Caspase-Cleaved Tau Expression Induces Mitochondrial Dysfunction in Immortalized Cortical Neurons: IMPLICATIONS FOR THE PATHOGENESIS OF ALZHEIMER DISEASE ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, n° 28, juillet 2009, p. 18754-66. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.M808908200.

Radstake, F. D. W., et al. « CALIMA: The Semi-Automated Open-Source Calcium Imaging Analyzer ». *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, vol. 179, octobre 2019, p. 104991. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.cmpb.2019.104991.

Rottenberg, Hagai, et Shaolong Wu. « Quantitative Assay by Flow Cytometry of the Mitochondrial Membrane Potential in Intact Cells ». *Biochimica et Biophysica Acta*, p. 12. 1998.

Scaduto, Russell C., et Lee W. Grotyohann. « Measurement of Mitochondrial Membrane Potential Using Fluorescent Rhodamine Derivatives ». *Biophysical Journal*, vol. 76, n° 1, janvier 1999, p. 469-77. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0006-3495(99)77214-0.

Scossa, Federico, et al. « The Integration of Metabolomics and Next-Generation Sequencing Data to Elucidate the Pathways of Natural Product Metabolism in Medicinal Plants ». *Planta Medica*, vol. 84, n° 12/13, août 2018, p. 855-73. DOI.org (Crossref), doi:10.1055/a-0630-1899.

Sharaf, Mahmoud S., et al. « Zinc and Calcium Alter the Relationship between Mitochondrial Respiration, ROS and Membrane Potential in Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Liver Mitochondria ». *Aquatic Toxicology*, vol. 189, août 2017, p. 170-83. CrossRef, doi:10.1016/j.aquatox.2017.06.005.

Shendure, Jay, et al. « DNA Sequencing at 40: Past, Present and Future ». *Nature*, vol. 550, n° 7676, octobre 2017, p. 345-53. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nature24286.

Tinevez, Jean-Yves, et al. « TrackMate: An Open and Extensible Platform for Single-Particle Tracking ». *Methods*, vol. 115, février 2017, p. 80-90. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.ymeth.2016.09.016.

Vajrala, Venkata Suresh, et al. « PDMS Microwells for Multi-Parametric Monitoring of Single Mitochondria on a Large Scale: A Study of Their Individual Membrane Potential and Endogenous NADH ». *Integr. Biol.*, vol. 8, n° 8, 2016, p. 836-43. CrossRef, doi:10.1039/C6IB00064A.

Valerio, Marie, et al. « Deactivation of F0F1 ATPase in Intact Plant Mitochondria. Effect of PH and Inhibitors ». *European Journal of Biochemistry*, vol. 221, n° 3, mai 1994, p. 1071-78. DOI.org (Crossref), doi:10.1111/j.1432-1033.1994.tb18826.x.

Wilson, Cameron J., et al. « Mediation of Biomaterial–Cell Interactions by Adsorbed Proteins: A Review ». *Tissue Engineering*, vol. 11, n° 1-2, janvier 2005, p. 1-18. DOI.org (Crossref), doi:10.1089/ten.2005.11.1.

Young, Ian T. « Shading Correction: Compensation for Illumination and Sensor Inhomogeneities ». *Current Protocols in Cytometry*, vol. 14, n° 1, octobre 2000. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/0471142956.cy0211s14.

Zhang, Bo, et al. « NeoAnalysis: A Python-based toolbox for quick electrophysiological data processing and analysis ». *BioMedical Engineering OnLine*, vol. 16, décembre 2017, p. 129, doi:10.1186/s12938-017-0419-7.

Israelachvili, Jacob N. « 8 - Special Interactions: Hydrogen-Bonding and Hydrophobic and Hydrophilic Interactions ». *Intermolecular and Surface Forces (Third Edition)*, édité par Jacob N. Israelachvili, Academic Press, 2011, p. 151-67, doi:10.1016/B978-0-12-375182-9.10008-9.

|

CHAPITRE II : OBSERVATION DE
DEPOLARISATIONS TRANSITOIRES
MITOCHONDRIALES ET PREMIERES
CARACTERISATIONS : LIEN AVEC LE
PORE DE TRANSITION DE PERMEABILITE
MITOCHONDRIAL

CHAPITRE II

I. Le pore de transition de perméabilité mitochondrial

a) Historique et premières caractérisations

Les premières observations du pore de transition de perméabilité mitochondrial (mPTP) ont été réalisées dans les années 1960, en montrant que le calcium matriciel pouvait entraîner une augmentation de la perméabilité membranaire de la mitochondrie (Lehninger 1959; Crofts and Chappell 1965; Hackenbrock and Caplan 1969). En effet, le calcium est le facteur principal d'activation du mPTP et le paramètre le plus étudié, même s'il en existe de nombreux autres dont je parlerai plus tard. Depuis, des études ont montré que cette perméabilité est non spécifique et permet de faire passer toute molécule de taille inférieure ou égale à 1,5 kDa (Hunter et al. 1976 ; Elrod and Molkentin, 2013). Les premières caractérisations de cette ouverture ont montré son irréversibilité (même si à l'heure actuelle cette vision est beaucoup plus complexe), c'est-à-dire qu'une fois le pore activé, celui-ci restera ouvert. Cette caractéristique est d'autant plus importante que cette ouverture, caractérisée expérimentalement par une conductance importante, va provoquer une chute du potentiel de membrane, un découplage de la CR et une entrée d'eau dans la matrice. Cela va ensuite déclencher un gonflement de la membrane interne et une rupture de la membrane externe des mitochondries (plus petite que la membrane interne), l'ensemble du processus provoquant au final le relargage du contenu mitochondrial dans le cytosol, une rupture de la membrane externe mitochondriale, une chute de la pression osmotique des solutés de la matrice ce qui amène au gonflement des mitochondries et leur découplage, avec un potentiel de membrane qui collapse et au final un arrêt de la chaîne respiratoire et la mort de la mitochondrie.

A l'échelle cellulaire cela entraîne une déplétion en ATP mais également un relargage de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome C qui va conduire à la mort cellulaire (Petit Patrice X et al 1998, Halestrap 2010 ; Kinnally et al. 2011). Cette ouverture du pore, néfaste pour la cellule, a été mise en évidence dans de nombreuses pathologies (Ischémie reperfusion, cancer, Giuseppe Paradies et al 2018, Massimo Bonora et al 2014). Plus récemment, des études ont montré (Lu et al 2016, L Wei-Lapierre et al 2019) un nouveau type d'ouvertures transitoires qui ne conduisent pas à la mort de la mitochondrie et dont le rôle pourrait être plus physiologique. C'est ce type d'ouvertures qui sera au cœur des études de ce chapitre.

b) Structure du mPTP

i. ANT/VDAC

A l'heure actuelle, la structure exacte du pore n'est pas encore connue même si de nombreuses hypothèses ont été avancées ces dernières années. Le premier modèle proposé était constitué : 1) du translocateur de nucléotides à adénine (ANT) situé dans la membrane interne, 2) du canal anionique dépendant du potentiel (VDAC) situé dans la membrane externe (Rao et al, 2014) et de la cyclophiline D comme régulateur principal situé dans la matrice mitochondriale (Leung Anna W. C. et al. 2008). D'autres constituants étaient également pensés interagir, comme la protéine p53, ou le transporteur de phosphate, ou encore la protéine BH3 (Elrod and Molkenin, 2013). Ces trois unités principales (VDAC, ANT, Cyclophiline D), une fois assemblées créeraient un « méga canal » qui, une fois ouvert, permettrait un passage libre des molécules entre la matrice et le cytoplasme.

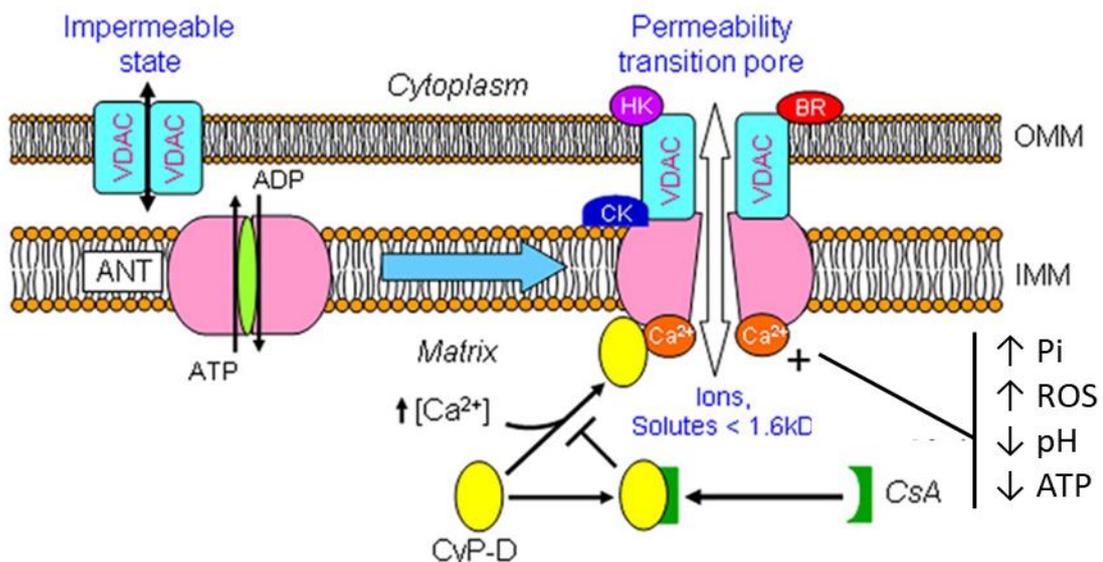


Figure 1 Première hypothèse de la structure du mPTP composée de deux éléments : le translocateur de nucléotides à adénine (ANT) situé dans la membrane interne mitochondriale, et le canal anionique dépendant du potentiel (VDAC) dans la membrane externe mitochondriale. Sont également représentés les principaux régulateurs connus de ce pore : la Cyclophiline D (Cyp-D), le calcium, les ROS, le pH etc. Figure issue de Sabzali Javadov et al 2007.

Cependant, des études ont montré qu'en réalisant un KO des gènes codant pour ces trois constituants, une ouverture d'un canal comparable au mPTP était toujours possible, ce qui semble invalider l'hypothèse que ces protéines constituent la structure du pore. Néanmoins, dans ces études la régulation de l'ouverture du mPTP était modifiée sous l'effet des KO, ces protéines semblent donc être des régulateurs importants de celui-ci. Les souris présentant notamment un KO pour le gène codant pour l'ANT, présentent un mPTP fonctionnant normalement mais avec une capacité de rétention du calcium deux fois supérieure au contrôle (Kokoszka et al, 2004). Les souris KO aux différentes isoformes du VDAC présentent elles aussi une ouverture possible du mPTP (Baines et al, 2007). De ces trois protéines, la cyclophiline D (Cyp-D) semble être un facteur de régulation principal, puisqu'en inhibant son interaction avec le mPTP, cela inhibe fortement son ouverture (Baines et al 2007; Nakagawa et al 2005 ; Izzo et al 2016). Une molécule pharmacologique joue au niveau de cette interaction et est utilisée classiquement comme inhibiteur du pore, la cyclosporine A (Szabo et al 1991).

ii. ATP synthétase

Une nouvelle hypothèse de la structure du mPTP a été proposée plus récemment : celui-ci serait constitué d'un dimère d'ATP synthétases (Jonas et al, 2015). Cette enzyme située dans la membrane interne mitochondriale, plus particulièrement au sein des crêtes mitochondriales, est constituée d'une partie membranaire, la partie F_0 , et d'une partie dans la matrice mitochondriale, la partie F_1 . C'est au niveau de cette dernière, plus particulièrement au niveau de la sous-unité δ /OSCP (« Oligomycin sensitivity-conferring protein »), qu'un site d'interaction a été trouvé avec la cyclophiline D, ce qui permettrait la régulation de cette enzyme (Giorgio et al, 2009). Cette sous-unité modulerait également l'interaction entre l'ATP synthétase et le calcium, qui est un des principaux facteurs d'ouverture de l'ouverture pathologique du pore comme expliqué précédemment. Le calcium entrainerait en se fixant un changement conformationnel de l'enzyme, ce qui a pour conséquence d'arrêter la synthèse d'ATP (Giorgio et al, 2013). Cependant, cette hypothèse n'a pas encore réussi à répondre à toutes les questions entourant le mPTP (Chinopoulos C et al 2018), et certaines publications (He J et al 2017) vont à l'encontre de cette idée. Le calcium a une action également sur IF1 qui est un inhibiteur de l'ATP synthétase (cf introduction générale).

c) Régulateurs

Les régulateurs, qu'ils soient activateurs ou inhibiteurs de l'ouverture du pore sont extrêmement nombreux et il est difficile de tous les recenser. Une liste de ces principaux effecteurs est présentée ci-dessous en tableau I. Pour une liste précise de ces molécules, je conseille de se référer à la revue de Stephen Hurst et al 2017 qui liste les différents effecteurs connus, ainsi que les différentes caractéristiques du pore.

Les voies métaboliques jouent également un rôle comme régulateur, par exemple le potentiel de membrane mitochondrial : si celui-ci est élevé, il semble inhiber le mPTP et inversement (Robert A. Haworth et al 1979). Il y a aussi les inhibiteurs de l'ANT, qui peuvent influencer dans les deux sens le mPTP, comme l'acide Bongkréique qui va en se fixant sur le site catalytique matriciel de l'ANT empêcher l'ATP de s'y fixer et donc de pouvoir sortir de la matrice mitochondriale (Jonathan J. Ruprecht et al 2019), ce qui au final va avoir pour effet d'inhiber le pore. A l'inverse, l'atractyloside, un inhibiteur cytosolique de l'ANT, va lui sensibiliser le pore (Robert A. Haworth et al 1979). Il y a également d'autres facteurs comme le phosphate inorganique, ainsi que l'acidification intracellulaire. A ces inhibiteurs s'ajoutent le magnésium qui agit comme un compétiteur avec le calcium pour le site de fixation dans la matrice mitochondriale ; encore le pH ...

Parmi les nombreux régulateurs du pore que je viens de décrire, celui qui a été le plus étudié et qui va le plus nous intéresser dans ce chapitre, est le calcium. En effet, quelle que soit la structure du mPTP, celui-ci possède un site de fixation à ce cation, qui va agir comme activateur. La Cyp-D que j'ai mentionnée au préalable agit notamment sur le pore en le sensibilisant au calcium, abaissant ainsi le seuil nécessaire pour l'activer. A l'inverse, la cyclosporine A (CsA) qui est une molécule immunosuppressive est le seul inhibiteur connu de l'activation du mPTP, elle fonctionne de la manière suivante : elle interagit avec la Cyclophiline D (régulateur positif) prévenant ainsi sa fixation sur le pore, ce qui va inhiber son ouverture (Szabo et al 1991 ; Giorgio et al 2009). Cette molécule est très utilisée pour prévenir les dégâts liés à l'ischémie-reperfusion (Leducq Nathalie et al 1998, Leducq Nathalie et al 2000, Jean-Christophe Orban et al 2018) que je décrirai par la suite.

Régulateurs	Effets	Mécanisme	Concentration de travail
Cyclosporine A	Inhibiteurs	Prévient la fixation de la Cyclophiline D au mPTP	1 μ M
Mg ²⁺		Entre en compétition avec le site de fixation du calcium du mPTP	2 mM (0,8–1,5 mM concentration matricielle)
Sr ²⁺ ; Mn ²⁺		En compétition avec le calcium pour l'entrée dans la mitochondrie via le MCU	2 mM
ADP		Se fixe à l'ANT et change sa conformation, diminuant l'affinité du site de fixation pour le calcium et /ou se fixe à l'ATP synthétase	
Acide bongkréique		Se fixe à l'ANT et change sa conformation, diminuant l'affinité du site de fixation pour le calcium	20 μ M pour 0,5 mg/mL de mitochondries
NADH>NAD+			
pH < 7		Probablement : Protonation des résidus d'histidine du mPTP	
Calcium	Activateurs	Se fixe au mPTP	>100 nM
Atractyloside		Se fixe à l'ANT et change sa conformation, augmentant l'affinité du site de fixation pour le calcium	20 μ M
CypD		Se fixe au mPTP et le sensibilise au calcium	
ROS/RNS		Action indirecte en modulant la CR (ROS-RNS) ou action directe en modifiant le mPTP (ROS)	
Pi		Probablement : formation de polyP, un inducteur du mPTP et un perturbateur du système tampon calcium	10 mM

Table 1 : Principaux régulateurs du mPTP, activateurs ou inhibiteurs, et les mécanismes d'action proposés.

d) Ischémie reperfusion :

Une des pathologies majeures où le mPTP est clairement impliqué est l'ischémie-reperfusion (Giuseppe Paradies et al 2018) au niveau du cœur. Lors d'une embolie, c'est-à-dire lorsqu'un caillot bloque le flux sanguin dans le système vasculaire, le cœur est privé d'apport en oxygène et en substrats, cela correspond à un infarctus. Dans cet état, une glycolyse anaérobie se met en place consommant les réserves glycogéniques, qui provoque une augmentation du niveau de lactate et une baisse du pH, ce qui est un facteur inhibiteur du mPTP. Au niveau des mitochondries, il y a également une déplétion en nutriments, qui provoque leur dépolarisation, altérant la phosphorylation oxydative, d'autant plus que l'oxygène, accepteur final de la CR, n'est plus présent. Tout ceci entraîne une baisse du taux d'ATP qui va inhiber les fonctions contractiles du cœur.

En parallèle, la baisse de pH active les canaux échangeurs d'ions Na^+/H^+ nécessaires pour tamponner le pH cellulaire, ce qui en retour augmente la concentration en sodium cytoplasmique qui va alors favoriser les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, provoquant une accumulation importante du calcium au sein de la cellule, qui je le rappelle est le facteur principal d'activation du mPTP au sein de la mitochondrie. Après épuisement rapide des réserves en glucose, il y a une baisse du taux d'ATP qui va réduire l'activité des pompes à calcium du sarcolemme, qui est essentiel dans le stockage du calcium cytoplasmique (cf introduction générale). Cela va alors amplifier l'augmentation du calcium cytosolique. Pour finir, on a alors un équilibre entre différents régulateurs du pore : inhibiteur (avec un pH plus faible) et activateur (avec la concentration en calcium cytosolique qui augmente).

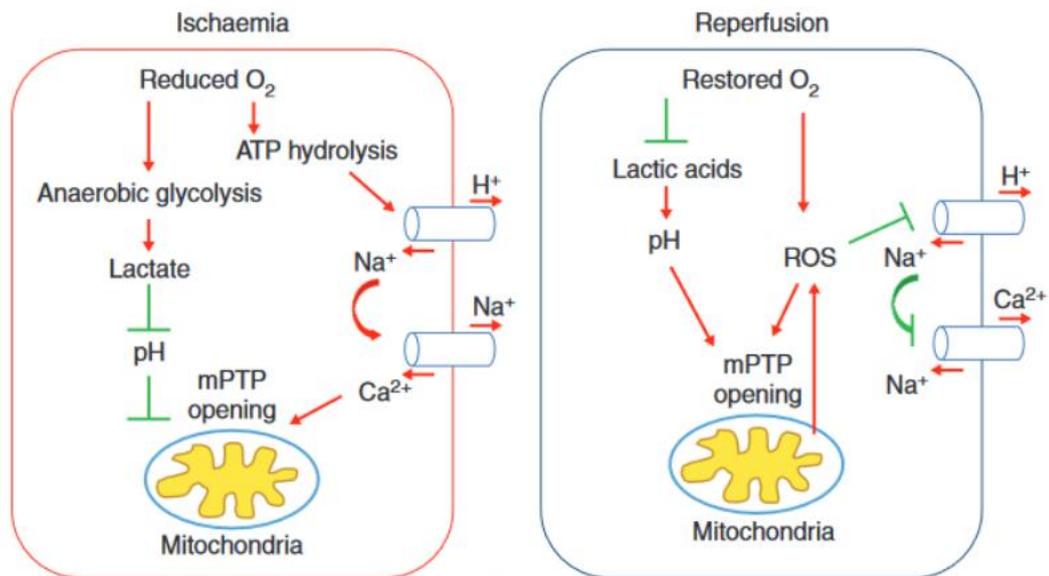


Figure 2 : Schéma des mécanismes impliqués lors d'une ischémie reperfusion, les flèches rouges correspondent aux processus activés et à ceux inhibés en vert. Schéma issu de la publication de Z Xia et al 2016.

Quand le caillot est enlevé le sang circule de nouveau, l'organe est de nouveau vascularisé, l'apport en oxygène est restauré, cela correspond à la reperfusion. Les principales fonctions cardiaques se remettent en place. Cependant l'arrivée d'oxygène va provoquer une surproduction de radicaux libres par la CR nouvellement active (Z Xia et al 2016), avec en parallèle un potentiel de membrane mitochondrial restauré, qui va favoriser l'entrée et l'accumulation du calcium cytoplasmique au sein de la matrice mitochondriale. L'augmentation de la concentration en calcium et en parallèle celle des ROS va alors permettre l'activation du mPTP et son ouverture, entraînant la mort cellulaire (figure 2).

L'inhibition du mPTP grâce à la CsA ou par déplétion génétique de la cyclophiline-D permet de réduire les dommages liés à l'ischémie/reperfusion, ce qui fait de lui un acteur très intéressant dans ce contexte pathologique (Leducq Nathalie et al 1998, Baines CP et al 2007). Cependant une inhibition chronique du mPTP entraîne une surcharge calcique au sein de la mitochondrie et un dysfonctionnement cardiaque (Elrod JW et al 2013). Tout ceci suggère que certaines ouvertures du mPTP sont bénéfiques pour la mitochondrie et seraient nécessaires dans le maintien de son homéostasie.

e) Ouverture physiologique :

A l'opposé du rôle du mPTP décrit dans les exemples ci-dessus, il existe un autre mode d'ouverture découvert plus récemment et dont la principale caractéristique serait d'être transitoire. Si le mode d'ouverture pathologique correspond une conductance importante du mPTP, son mode d'ouverture transitoire correspond à une conductance plus faible (Lesnefsky E et al 2001 ; Korge P et al 2011). Elle resterait non spécifique et provoquerait une chute du potentiel de membrane ainsi qu'un découplage de la CR, et par voie de conséquence un arrêt de la production d'ATP. Cependant, ces effets ne seraient que transitoires puisque le pore serait capable de se refermer, permettant ainsi à la mitochondrie de reconstituer son potentiel de membrane et la production d'ATP. Une hypothèse serait que ce mode d'ouverture transitoire serait un mode intermédiaire de l'ouverture pathologique (Xiyuan Lu et al 2016).

Comme mentionné dans l'introduction générale, ce mode de fonctionnement transitoire pourrait être impliqué dans le contrôle des flux calciques et des ROS, que ce soit : 1) au niveau physiologique, notamment au moment de la relaxation cardiaque où le mPTP serait un des acteurs nécessaires pour exclure le calcium mitochondrial, comme dans le modèle 2 et dans l'hypothèse de travail de l'ANR Mitocard ; ou 2) pré-pathologique afin d'éviter une surcharge au sein de la matrice mitochondriale et ainsi maintenir son homéostasie calcique (Elrod et al 2010).

Cependant, les caractéristiques précises de ces ouvertures transitoires restent à l'heure actuelle méconnues, comme notamment leur cinétique temporelle ou leur fréquence d'apparition. Bien que plusieurs études les aient observées sur mitochondries isolées (Ichas F et al 1997, Hüser J et al 1999), des études à plus large échelle sont nécessaires pour une meilleure appréhension du phénomène mais cela nécessite de pouvoir suivre simultanément de nombreuses mitochondries. Quelques études plus récentes s'intéressent à cet aspect. C'est notamment le cas de l'étude de Lu Xiyuan, et al 2016 où sont suivis par microscopie confocale (à l'aide du TMRM et de la sonde Fluo-8) le potentiel de membrane et les flux calciques au sein des mitochondries de cardiomyocyte. Cette étude a été réalisée en analysant simultanément 500 à 1000 mitochondries. Des dépolarisations transitoires spontanées ou induites ont été observées, qui se manifestent par une chute de la fluorescence du TMRM et de la fluorescence de la sonde Fluo-8, ce qui signifie une chute transitoire du potentiel de membrane accompagnée par un efflux du calcium matriciel. En observant l'autofluorescence du FAD, ils ont pu également observer que ces événements étaient corrélés avec une augmentation de l'oxydation du FAD.

Les auteurs ont également caractérisé en partie ces dépolarisations transitoires en montrant que la fréquence d'apparition au sein des cardiomyocytes était très faible ($< 0,1\%$) et que la durée moyenne était de 57 ± 5 sec. Cependant cette fréquence pouvait être modulée : soit à la hausse en augmentant la concentration calcique, en exposant à du peroxyde d'hydrogène, ou soit dans des cardiomyocytes altérés, ou soit en augmentant la fréquence de contraction particulièrement en présence d'activateurs β -adrénergiques. Cette fréquence peut être également diminuée en inhibant les flux d'entrée du calcium, en inhibant le mPTP grâce à la CsA, ou dans des souris déficientes en Cyclophiline D. Une autre caractéristique importante est que, selon eux, cette ouverture transitoire serait plus faible en taille que l'ouverture définitive car ils n'ont pas observé de fuite de petites molécules comme la Rhod-2 (869 Da) ou la calcéïne (623 Da) et même le NADH (663 Da) lors des ouvertures transitoires, alors que ces molécules présentent une taille inférieure à 1,3 kDa.

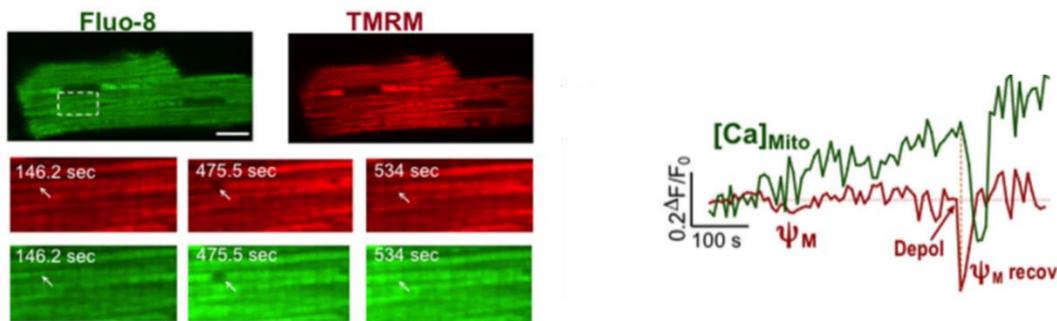


Figure 3 : Exemple d'une ouverture physiologique du mPTP observée dans un cardiomyocyte. Cela se caractérise par une dépolarisation transitoire observée en TMRM et d'une sortie de calcium, observé avec le Fluo-8. Figure issue de la publication Lu Xiyuan, et al 2016.

Cette cinétique rend ces dépolarisations transitoires incompatibles avec le modèle 2 présenté dans l'introduction générale. Une étude plus récente réalisée par L Wei-Lapierre et al 2019 va plus loin en analysant, par une méthode très proche de celle développée au cours de ma thèse, des événements transitoires, ou « mitoflashes », qui correspondent à des pics de production de superoxyde. Ces deux phénomènes sont intimement liés puisqu'ils seraient deux conséquences d'un même mécanisme ; à savoir une ouverture transitoire du mPTP (figure 4). Le suivi des pics de production de superoxyde a été possible en travaillant par microscopie sur des mitochondries isolées et des cardiomyocytes issus de souris exprimant spécifiquement au sein des mitochondries la sonde cpYFP. Ils ont de plus travaillé sur mitochondries isolées et myocytes du muscle squelettique afin de pouvoir comparer leurs résultats et mettre en évidence des différences tissulaires, dont je parlerai plus tard.

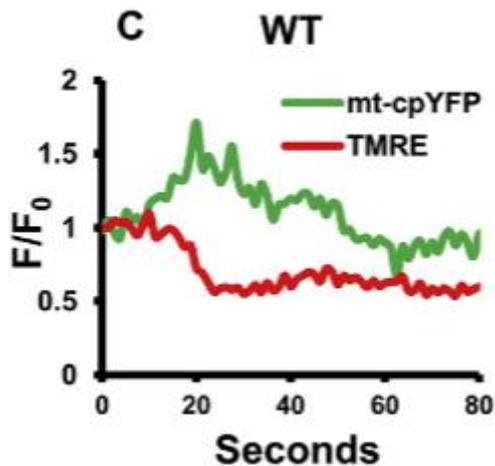


Figure 4 : exemple reporté par L Wei-Lapierre et al 2019 d'une ouverture physiologique du mPTP observée dans un cardiomyocyte. Une dépolarisation transitoire a été observée grâce au TMRE et un « mitoflash » (pic de production de ROS) concomitant a été observé par le mt-cpYFP.

contractile. Cette augmentation était empêchée en prétraitant les cellules avec un inhibiteur du MCU, le RU360, ce qui montre que ce phénomène est bien calcium dépendant. En effet, les souris KO pour la cyclophiline D montrent une internalisation du calcium beaucoup plus importante que les cellules saines, corrélée avec une fréquence des « mitoflashes » plus importante. Ceci laisse penser que le calcium est le facteur primordial pour l'initiation de ce phénomène et que la cyclophiline D est importante pour le contrôle de sa concentration, en évitant les surcharges, par ouverture transitoire du mPTP. Étonnamment, ces auteurs ont observé que l'augmentation de cette fréquence n'est pas empêchée par l'ajout de CsA (inhibiteur classique du mPTP). À l'inverse de l'étude de Xiyuan Lu et al 2016, cela suggère un autre mécanisme d'ouverture pour le mode transitoire que celui impliqué dans l'ouverture pathologique.

Les expériences réalisées sur mitochondries isolées ont permis de montrer qu'il existait deux types de cinétiques pour ces « mitoflashes » (figure 5) : le premier type correspond à un phénomène de grande amplitude mais de faible durée et le deuxième type est l'opposé, à savoir de faible amplitude mais d'une durée plus longue. Les auteurs n'ont pas avancé d'hypothèse pour expliquer ces différences mais suspectent que l'amplitude et la durée sont inversement corrélées. S'ils ont utilisé le TMRE pour corréliser dépolarisations transitoires et mitoflashes (voir figure 4), les cinétiques des mitoflashes observées sont très courtes (10 secondes ou 2,5 secondes) comparées à celle observé par Bers vis-à-vis des dépolarisations transitoires (± 1 minute) mentionné plus tôt (Xiyuan Lu et al 2016), ce qui suggère une

S'ils n'ont pas regardé l'influence de la concentration en calcium sur leurs signaux comme dans l'étude Xiyuan Lu et al 2016, ils se sont plutôt intéressés à la réponse des muscles cardiaque et squelettique vis-à-vis des régulateurs des ouvertures transitoires du mPTP, en croisant leur souris exprimant la sonde cpYFP avec une souris KO pour la cyclophiline D.

Les expériences réalisées sur cellules ont montré une augmentation de la fréquence des pics de production de superoxide dans les muscles squelettique et cardiaque sous l'effet du C-ATR, ainsi qu'en augmentant l'activité

cinétique différente pour ces deux types d'événements avec pour déclencheur commun l'ouverture transitoire du mPTP.

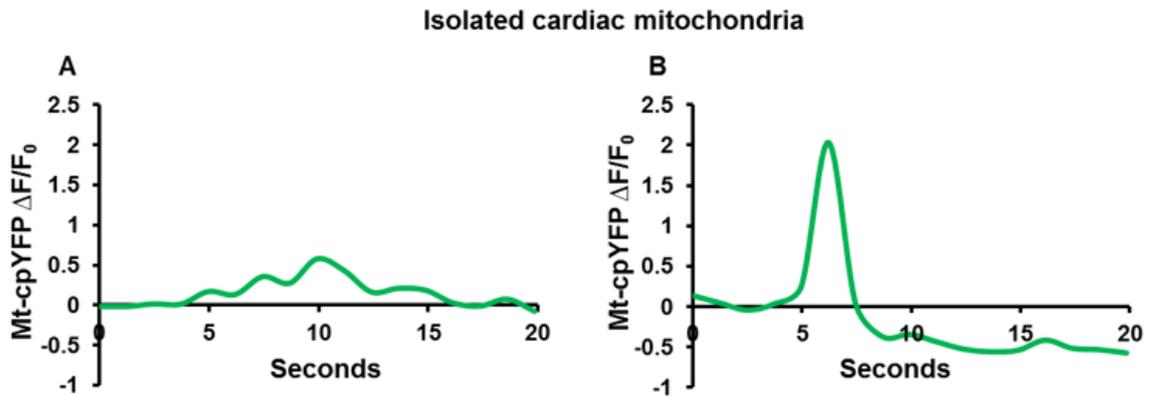


Figure 5 : Exemple de deux cinétiques de « mitoflashes » observés avec la sonde mt-cpYFP sur mitochondries isolées de muscle cardiaque. Figure issue de la publication de L Wei-Lapierre et al 2019.

Si dans l'ensemble, les muscles squelettique et cardiaque répondent de la même façon aux régulateurs du mPTP, il semble exister des différences notables entre ces deux tissus, comme on peut le voir dans la figure 6, que ce soit pour la fréquence ou pour l'amplitude de ces pics de production de superoxide. Notamment, la fréquence basale des ouvertures est plus importante dans les cellules du muscle squelettique que dans les cardiomyocytes et cette fréquence est particulièrement changée sur mitochondries isolées, ce qui sous-entend un contrôle par l'environnement cellulaire différent entre ces deux tissus.

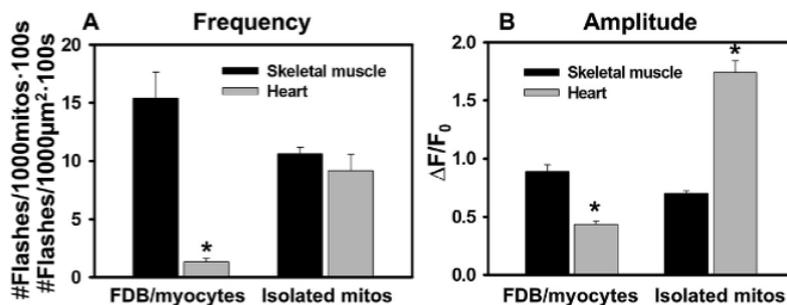


Figure 6 : Caractérisation des « mitoflashes » en fréquence et amplitude, comparaison entre le muscle squelettique et le muscle cardiaque. Figure issue de L Wei-Lapierre et al 2019.

f) Problématique et objectifs

Les objectifs de ce chapitre s'inscrivent dans le projet ANR Mitocard énoncé dans l'introduction générale. Pour rappel, l'hypothèse centrale des études est qu'à chaque contraction, le calcium active les mitochondries (Diolez et al 2007) et le mPTP est un mécanisme important d'extrusion du calcium mitochondrial au moment de la relaxation. Pour cela, ce pore non spécifique s'ouvrirait de manière transitoire (physiologique) permettant au calcium de sortir en provoquant une dépolarisation transitoire.

Pour essayer de répondre à cette hypothèse, j'ai utilisé la méthode développée dans le chapitre I (suivi du potentiel de membrane et du NADH endogène par microscopie) sur des mitochondries individuelles, que j'ai activées par des injections de calcium pour reproduire les conditions de la relaxation. Nous nous sommes particulièrement intéressés au suivi en TMRM, car l'objectif était d'essayer de détecter les dépolarisations transitoires, c'est-à-dire les ouvertures transitoires/physiologiques du mPTP, et également détecter les dépolarisations définitives, c'est-à-dire les ouvertures de nature pathologique, également activées par le calcium.

L'ouverture définitive, pathologique, du mPTP est le mode d'ouverture le plus étudié. Il est classiquement observé par spectrofluorimétrie sur une suspension de mitochondries. Un des objectifs était d'utiliser notre méthode pour d'abord confirmer les résultats reportés dans la littérature, quant à son induction par le calcium et son inhibition par la cyclosporine A.

Cependant, mon but principal était d'essayer de caractériser les ouvertures physiologiques du mPTP, à savoir transitoires, dans un contexte général de contraction cardiaque : pour cela, nous avons essayé de connaître son temps moyen d'ouverture, sa cinétique etc

Dans un premier temps, nous avons décidé de travailler sur une large population mitochondriale afin d'appréhender les variations globales notamment vis-à-vis du calcium, mais aussi afin de maximiser nos chances de détection d'ouvertures (pathologiques ou transitoires) et apporter un poids statistique aux analyses. Puis dans un second temps nous avons travaillé à l'échelle individuelle afin de caractériser finement les différents paramètres liés aux deux types d'ouvertures.

Si l'existence de deux types d'ouvertures du mPTP n'est plus à prouver, l'ouverture transitoire de celui-ci soulève encore de nombreuses questions au vu des nombreux résultats parfois contradictoires de sa caractérisation. C'est dans ce contexte que l'étude de ce chapitre va se dérouler, l'objectif était d'utiliser la méthode décrite dans le chapitre I c'est-à-dire : un suivi de mitochondries individuelles par microscopie à l'aide du TMRM et du NADH afin de visualiser ces dépolarisations transitoires et essayer de les caractériser. Nous avons également

pour objectif de moduler ces évènements à l'aide de calcium et de CsA, respectivement activateur et inhibiteur du pore. Comme on a pu le voir à travers cette introduction, la compréhension du mPTP est complexe et fait intervenir de nombreux acteurs. C'est pour réduire cette complexité que durant ma thèse nous avons travaillé à l'échelle de la mitochondrie isolée.

g) Principe de l'expérience

J'ai fait le choix pour cette première partie, de présenter les résultats d'une étude représentative, comprenant une série d'expériences en fonction des différentes conditions d'intérêt réalisées sur une même journée à partir d'une préparation mitochondriale.

Le protocole global choisi pour cette étude type ressemble à celui employé dans le chapitre précédent, à savoir un suivi simultané de la fluorescence du TMRM et du NADH mitochondrial, ainsi qu'une observation en lumière blanche transmise avec des acquisitions longues, à savoir une image toutes les cinq secondes pendant une heure. Dans les expériences, les mitochondries sont diluées à la concentration de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans le tampon contenant des substrats, le mélange glutamate-malate (complexe I) et succinate (complexe II), et dans certains cas de la cyclosporine A. L'acquisition se fait dès le dépôt de la solution mitochondriale sur la lamelle de verre, préalablement exposée au plasma à oxygène. Après environ 20 minutes (≈ 1000 secondes), du calcium sous forme CaCl_2 à une concentration de 1 mM est ajouté à la solution mitochondriale (figure 10). Il est important de noter que le tampon contient déjà 1 mM d'EGTA, donc la concentration finale en calcium (calcium libre) est donc beaucoup plus faible, de l'ordre de quelques μM (estimation dépendante de la composition complète du milieu et de la température essentiellement).

II. Suivi de l'ensemble de la population

Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à l'évolution du nombre de mitochondries détectées dans le champ d'observation au cours du temps, en fonction des conditions ; les graphiques sont présentés dans la figure 7.

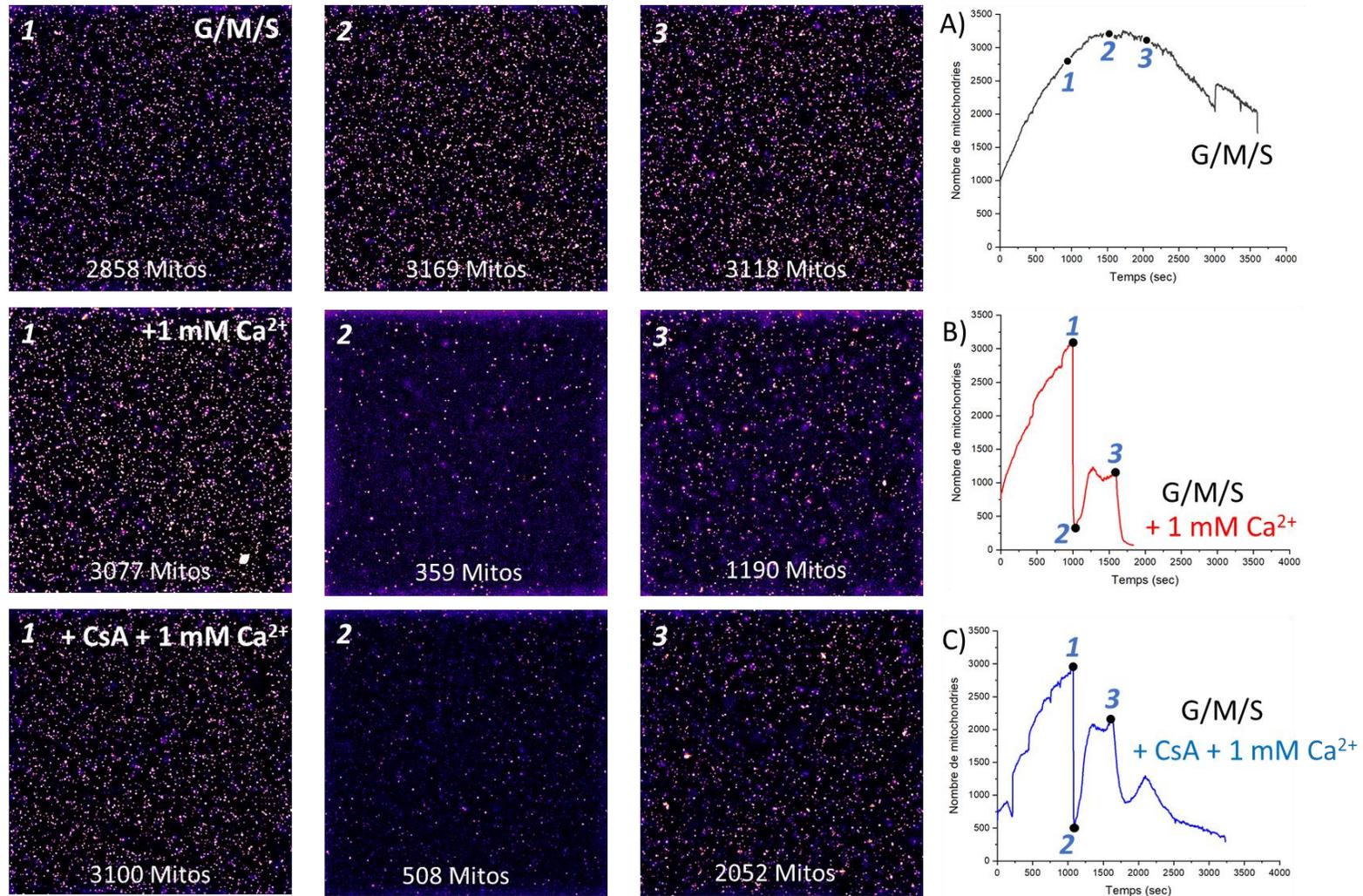


Figure 7 : Suivi en microscopie de l'évolution du nombre de mitochondries visualisées en TMRM pour trois conditions. A) Condition contrôle, mitochondries incubées en présence des substrats (Glutamate/Malate et Succinate à 5mM, excès) et du TMRM (10 nM). B) Même condition que A, sauf ajout de 1mM de calcium après 20 minutes. C) Même condition que B sauf que les mitochondries sont incubées également avec de la CsA à 2 μ M. A gauche : image de microscopie (après traitement) du champ d'acquisition pour le suivi du TMRM. 1. Après 20 minutes de sédimentation. 2. Image prise juste après l'injection du calcium à 1 mM. 3. 10 minutes après injection (sauf A). A droite, les courbes du nombre de mitochondries détectées en fonction du temps pour ces trois conditions, les points 1 à 3 correspondent aux images de microscopies à gauche.

a) Condition contrôle

La première ligne correspond à la condition contrôle : à savoir des mitochondries en présence des substrats dont on suit le potentiel de membrane à l'aide du TMRM pendant une heure. L'évolution du nombre de mitochondries détectées au cours du temps présente une allure en cloche avec une première phase d'augmentation de 0 à 1500 secondes où le nombre détecté passe de 1000 (à $t=0$; juste après dépôt) à 3000 mitochondries. Cela est dû à la sédimentation des mitochondries sur la lamelle, que l'on visualise avec les images 1 et 2 montrant l'ensemble des mitochondries présentes dans le champ d'acquisition. On a ensuite une phase plateau de 1500 à 2000 secondes, où le nombre de mitochondries reste stable, un équilibre entre sédimentation et « disparition » des mitochondries (dont je reparlerai plus tard) est atteint. Dans la dernière phase, le nombre de mitochondries se met à diminuer lentement (image 3). Après une heure d'acquisition le nombre de mitochondries détectées diminue jusqu'à atteindre 2000 objets. La sédimentation a toujours lieu, cependant on « perd » plus d'objets qu'il n'en arrive, ce qui explique que le nombre diminue lentement. Le saut observé à 3000 secondes correspond à un rétablissement de la mise au point de l'image, pour une acquisition longue il arrive que le plan focal de l'image se décale, nécessitant un réajustement.

b) Ajout de calcium

L'effet du calcium au niveau cellulaire est très complexe (cf introduction générale), il l'est également ici sur mitochondries individuelles. Ce cation agit sur de nombreux acteurs importants de la mitochondrie avec soit un effet positif, notamment au niveau de la CR ou du cycle de Krebs (cf introduction générale), soit un effet néfaste en provoquant la mort de la mitochondrie via le mPTP. Le choix de la concentration de Ca^{2+} est donc primordial dans ces expériences, d'autant plus que nous avons observé que la sensibilité des mitochondries au calcium varie également en fonction des préparations mitochondriales.

La présence d'EGTA dans le tampon, élément indispensable pour éliminer les traces restantes de calcium après leur isolation et éviter notamment une ouverture du mPTP précoce, complexifie encore les choses, car après injection cela rend l'estimation de la concentration en calcium libre très difficile à réaliser même si l'on sait que nous sommes dans une gamme de quelques μM , qui est la concentration que l'on retrouve dans les zones de microcontact entre le SR et la mitochondrie (Cf introduction générale). Dans cette partie, j'ai choisi de travailler avec 1 mM de calcium car cela nous a permis de voir des effets forts sur les réponses mitochondriales, mais cette concentration est peut-être trop importante à la vue des effets néfastes que l'on verra sur la population. J'ai réalisé des essais à plus basse concentration (non montrés ici) qui n'ont montré que peu d'effets. La zone de concentrations

à partir de laquelle les effets apparaissent est sûrement restreinte, et probablement dépendante de l'échantillon préparé ou de sa concentration.

Dans la deuxième condition (Figure 7B) un temps de 1000 secondes est attendu avant d'injecter 1 mM de calcium (point 1), à ce moment environ 3000 objets sont détectés (image 1). Instantanément après l'injection, la quasi-totalité des mitochondries ne sont plus visibles, seulement 359 le restent dans cette expérience type (image 2), correspondant à une diminution de 88%. Dans les minutes qui suivent, on peut voir ce nombre augmenter pour venir se stabiliser autour de 1100 mitochondries (image 3). Cette remontée du nombre et cette stabilisation ne sont pas entièrement dues à la sédimentation mais correspondent à la « ré-apparition » d'une partie des mitochondries disparues après ajout du calcium. En effet, la vitesse de « réapparition » (de 2,42 mito/sec) est plus rapide que la vitesse moyenne de sédimentation (de 1,83 mito/sec). Un autre point est que la visualisation de la sédimentation est minimisée car les mitochondries présentes en solution ont, elles aussi, été affectées par ce choc calcique. L'ensemble des mitochondries vont présenter une baisse de leur fluorescence en TMRM, donc l'effet de la sédimentation n'est pratiquement plus visible.

Par la suite, 10 minutes après injection du calcium, le nombre rechute de nouveau jusqu'à atteindre une valeur proche de 0. Cette baisse très rapide du nombre (-8,9 mito/sec) est intéressante car elle semble montrer une « synchronisation » de toutes les mitochondries, que l'on ne retrouve pas dans la condition contrôle. En effet, dans cette dernière on retrouve une baisse du nombre plus progressive. L'ajout de calcium semble donc avoir plusieurs effets en agissant dès son injection mais également à plus long terme en déclenchant cette « synchronisation », observée aussi bien en absence qu'en présence de CsA.

On redémontre ici que le calcium a bien un effet sur le potentiel de membrane (cf introduction), il est admis que cet effecteur permet d'activer l'ouverture du mPTP, plus précisément que c'est un activateur fort de l'ouverture pathologique. On peut suspecter que c'est bien ce qui se passe dans cette condition puisqu'après injection, une majorité des mitochondries (perte de 65% entre les points 1 et 3) n'est plus visible en TMRM mais également en NADH (résultat non montré). Ceci suggère qu'une grande partie des mitochondries ne possède plus d'activité bioénergétique. Cependant, une plus faible proportion des mitochondries a résisté à cet ajout et a reconstitué son potentiel de membrane (point 3).

De plus, une fois le calcium ajouté, celui-ci va rester en solution et semble déclencher 10 minutes après, une deuxième vague synchronisée de chute du nombre de mitochondries détectées (que l'on retrouve également en NADH, figure 10). Cette chute semble définitive car plus aucune mitochondrie n'est détectée ensuite, bien qu'elle soit toujours visible en lumière transmise, même si nous verrons plus tard que certaines sont altérées, ce qui suggère l'implication de l'ouverture pathologique du mPTP.

c) Pré-incubation avec la cyclosporine A

Dans la dernière condition de cette expérience, les mitochondries sont, au moment de leur dilution, incubées avec les substrats et également avec de la cyclosporine A (à 2 μM). Là encore, 20 minutes sont attendues (image 1, 3100 mitochondries détectées en TMRM) avant d'injecter le calcium (image 2, 508 mitochondries détectées). Si dans l'ensemble l'allure de la courbe du nombre de mitochondries en fonction du temps ressemble à la condition B, les quantités diffèrent.

Le nombre de mitochondries avant et après injection sont très proches entre cette condition et celle avec le calcium seul. Cela montre une première étape de sédimentation très reproductible (3100 pour la CsA contre 3077 pour le calcium), ainsi qu'un comportement global à l'ajout du calcium commun (image 2 disparition de 88% des mitochondries dans la condition calcium contre 83% pour la condition en présence de CsA).

Cependant, c'est dans la remontée après l'ajout de calcium que les choses changent puisqu'en présence de CsA le nombre va venir se stabiliser vers 2000 mitochondries ce qui correspond à une baisse (entre l'image 1 et 3) de 35% contre 65% pour la condition calcium seul où environ 1200 mitochondries étaient visibles après l'ajout. Autrement dit, 800 mitochondries semblent avoir été « sauvées » par l'ajout de la CsA.

Après stabilisation, il semblerait qu'un temps similaire à la condition -calcium seul- (environ 10 minutes, point 3) soit également nécessaire avant une nouvelle baisse synchronisée du nombre de mitochondries détectées. Cependant, en présence de CsA cette diminution n'est pas définitive puisqu'on atteint le nombre de 850 avant de remonter de nouveau, cela correspond à une deuxième vague de sédimentation, visible sur les images de microscopie. Pour finir, la dernière étape de la courbe correspond à une baisse lente et progressive du nombre des mitochondries détectables.

Lors de ces différentes étapes, l'incubation avec de la CsA (inhibiteur du mPTP) n'a pas affecté la baisse du nombre de mitochondries détectées juste après l'ajout de calcium, on peut donc supposer que cet événement n'est pas lié au mPTP. Une hypothèse possible est que ce phénomène serait lié à l'entrée massive de calcium dans la matrice mitochondriale, diminuant le potentiel de membrane, provoquant ainsi une baisse de la fluorescence du TMRM et donc moins de mitochondries seraient détectées. En revanche, la présence de la CsA a modifié le nombre de mitochondries qui vont réapparaître après l'injection (point 2), car deux fois plus de mitochondries sont détectées par rapport à la condition calcium seul (B). Le mPTP semble donc bien impliqué ici. Si on continue dans l'hypothèse précédente ; le calcium, en entrant dans la mitochondrie, diminue la fluorescence mais va également activer le mPTP, provoquant son ouverture pathologique. Par contre, l'ajout de la CsA, qui n'inhibe pas l'entrée du calcium mais inhibe l'activation du pore, permettrait à plus de mitochondries de reconstituer leur potentiel de membrane par la suite. Pour la dernière étape (point 3), l'effet de la CsA sur la seconde chute du nombre de mitochondries détectées est plus difficile à comprendre. Que ce soit en présence de calcium (condition B) ou avec incubation de la CsA, cette nouvelle chute semble synchronisée et opère environ 10 minutes après le premier ajout. Autre remarque le nombre absolu de pertes est similaire, avec environ 880 mitochondries qui disparaissent dans les deux cas. Par contre dans la condition B, plus aucune mitochondrie n'est visible après cette seconde chute, là où en présence de CsA de nouvelles mitochondries sédimentent par la suite. On peut supposer que la présence continue du calcium à haute concentration finit par dépasser l'effet protecteur de la CsA (observé au début) et va *in fine* activer l'ouverture pathologique du pore.

d) Fluorescence totale de la population mitochondriale pour le TMRM et le NADH

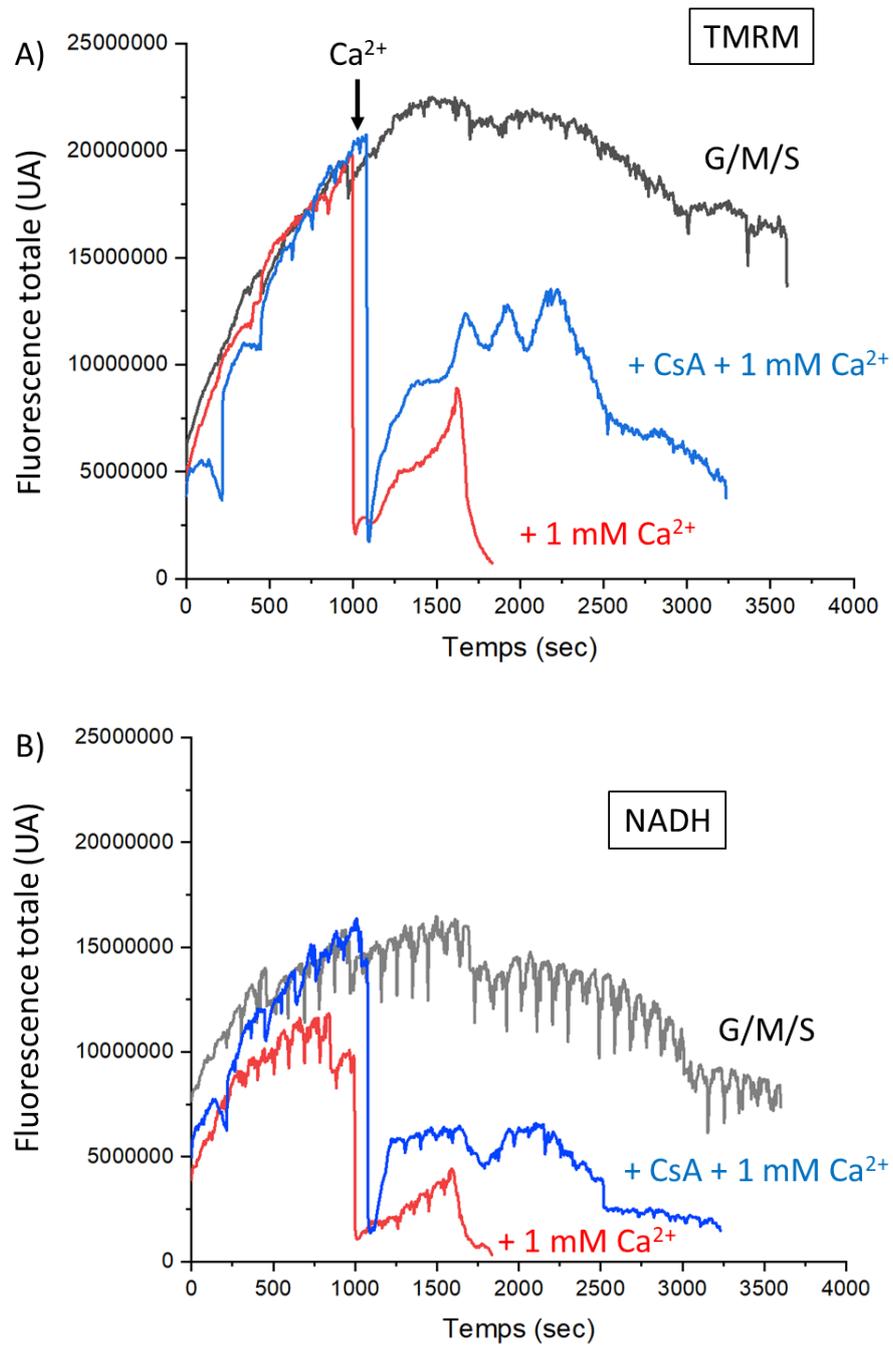


Figure 8 : Suivi des évolutions de la fluorescence totale pour le TMRM (à 10 nM) et le NADH en microscopie au cours du temps, pour les trois conditions mentionnées préalablement. Somme des intensités de fluorescence de l'ensemble des mitochondries pour A) le TMRM et B) le NADH.

Pour aller plus loin dans l'analyse de ces résultats, j'ai affiché dans la figure 8 le suivi de la fluorescence totale (c'est-à-dire la somme de fluorescence de toutes les mitochondries détectées) pour le TMRM et pour le NADH. On peut observer que les courbes du nombre de mitochondries détectées (Figure 7) et le suivi de la fluorescence totale du NADH et du TMRM de l'ensemble des mitochondries (Figure 8) ont des profils très similaires. En effet la détection des mitochondries étant basée sur leur fluorescence, il est logique que ces courbes se suivent.

Cependant, l'intérêt de cette figure est de montrer l'apparition des effets du calcium et de la CsA sur la réponse moyenne d'une population mitochondriale. Notamment, après l'ajout de calcium, on observe une baisse puis une remontée du nombre de mitochondries (dit précédemment) qui correspond bien à une hausse de la fluorescence du TMRM et du NADH. Concernant l'effet sur le niveau de NADH intra-mitochondrial, nous pensons que le calcium en diminuant le potentiel de membrane, libère la CR, accélère la vitesse d'oxydation des substrats, ce qui aurait pour conséquence logique d'abaisser le niveau stationnaire de NADH et donc sa réponse en fluorescence.

Après l'ajout de calcium, on peut également observer que la vitesse de remontée de la fluorescence du TMRM est plus rapide pour la condition CsA (condition C, figure 7), avec 18900 UA/sec, que pour la condition calcium avec 8000 UA/sec. Cela laisse penser que la CsA, en plus d'inhiber l'ouverture pathologique du mPTP vue figure 7, permettrait également une repolarisation du potentiel de membrane plus rapide des mitochondries.

Pour la condition incubée avec de la CsA, la première phase de diminution drastique du nombre mais également de la fluorescence (TMRM et NADH), n'a pas été affectée. En moins d'une image (< 5 secondes) l'effet est total. Cela ne montre aucun effet inhibiteur de la CsA sur ces dépolarisations ce qui peut laisser suggérer que cette étape correspond à une entrée massive de calcium dans la matrice mitochondriale, collapsant ainsi son potentiel de membrane (baisse de la fluorescence en TMRM). La somme des intensités de fluorescence en NADH montre également une baisse, due à la chute du potentiel de membrane, qui comme l'effet d'un découplant accélère la CR qui a pour conséquence d'abaisser le pool de NADH. On verra par la suite qu'à l'échelle individuelle les allures de courbes se suivent parfaitement ce qui montre que le même mécanisme est en jeu et qu'il se met en place très rapidement.

En revanche la remontée du nombre de mitochondries après l'injection de calcium (qui coïncide avec une remontée de la fluorescence) diffère de façon significative entre ces deux conditions. La remontée plus importante du nombre de mitochondries en présence de CsA semble indiquer que l'ouverture pathologique du mPTP est bien impliquée (par l'entrée massive de calcium) puisque son inhibition permet de « sauver » une partie des mitochondries. La CsA semble avoir un effet supplémentaire car l'allure de la courbe pour le suivi de la fluorescence du TMRM et du NADH est modifiée. Cette remontée est plus rapide en présence de CsA qu'en son absence, ce qui laisse suggérer que la CsA permettrait une repolarisation plus rapide des mitochondries. Je reviendrai plus tard sur ce point, en analysant à l'échelle individuelle les allures de courbes.

Toujours en comparant la condition CsA avec la condition calcium seul, on observe dans la deuxième partie de la courbe une nouvelle baisse définitive pour le calcium seul, alors que pour la condition CsA, le nombre diminue avant de remonter. Cependant si on regarde les images de microscopie correspondant à ce moment (images non montrées), on se rend compte que cette remontée n'est pas comme dans le cas précédent, : un transitoire des variations de la fluorescence du TMRM des mitochondries, mais correspond à une perte définitive d'objets avec en parallèle une sédimentation de nouvelles mitochondries. C'est ce qu'on peut observer en regardant la courbe de suivi de la somme de fluorescence où on voit après stabilisation la fluorescence du TMRM qui fluctue autour d'une valeur mais qui ne présente pas de transitoire important comme après l'ajout de calcium. Le nombre diminue de façon importante mais on voit que la somme de fluorescence, elle, ne diminue pas voire même qu'elle augmente légèrement.

e) Biais expérimentaux

Avant de passer à la partie suivante, j'aimerais m'arrêter ici et énoncer certains problèmes expérimentaux rencontrés au cours de cette étude pour en évaluer l'effet potentiel sur les résultats. Tout d'abord, une fois ajouté le calcium va diffuser et s'homogénéiser dans la solution. Les mitochondries vont être en présence continue avec celui-ci et il semble qu'une longue exposition va au final provoquer l'ouverture pathologique du pore, donc la « mort » des mitochondries.

Un autre point concerne le fait que nous avons choisi de représenter la fluorescence totale plutôt que la moyenne de fluorescence comme paramètre d'analyse et de comparaison. La valeur moyenne peut en fait se calculer à partir des données de la figure 8A divisée par celles de la figure 7, puisque pour chaque image, c'est la somme de fluorescence de l'ensemble des mitochondries divisée par leur nombre. Cette moyenne est représentée sur le graphique en bleu dans la figure 9 (les images de microscopie correspondent aux points 1-5 du graphique), et pour tester le mode de représentation, je n'ai utilisé qu'une seule condition, celle avec ajout de calcium seul et uniquement pour le suivi en TMRM. Comme on peut l'observer, une baisse de la moyenne de fluorescence est visible juste après l'ajout de calcium, mais elle va ensuite très vite revenir à un niveau égal et même supérieur à celui de départ (en 6 images soit 30 secondes). Par la suite, ce niveau va diminuer lentement (jusqu'à 1250 secondes) avant de remonter à une valeur proche de celle de départ (à 1600 secondes). Pour finir la valeur de fluorescence augmente drastiquement en un temps très court (100 secondes) avant de diminuer tout aussi rapidement.

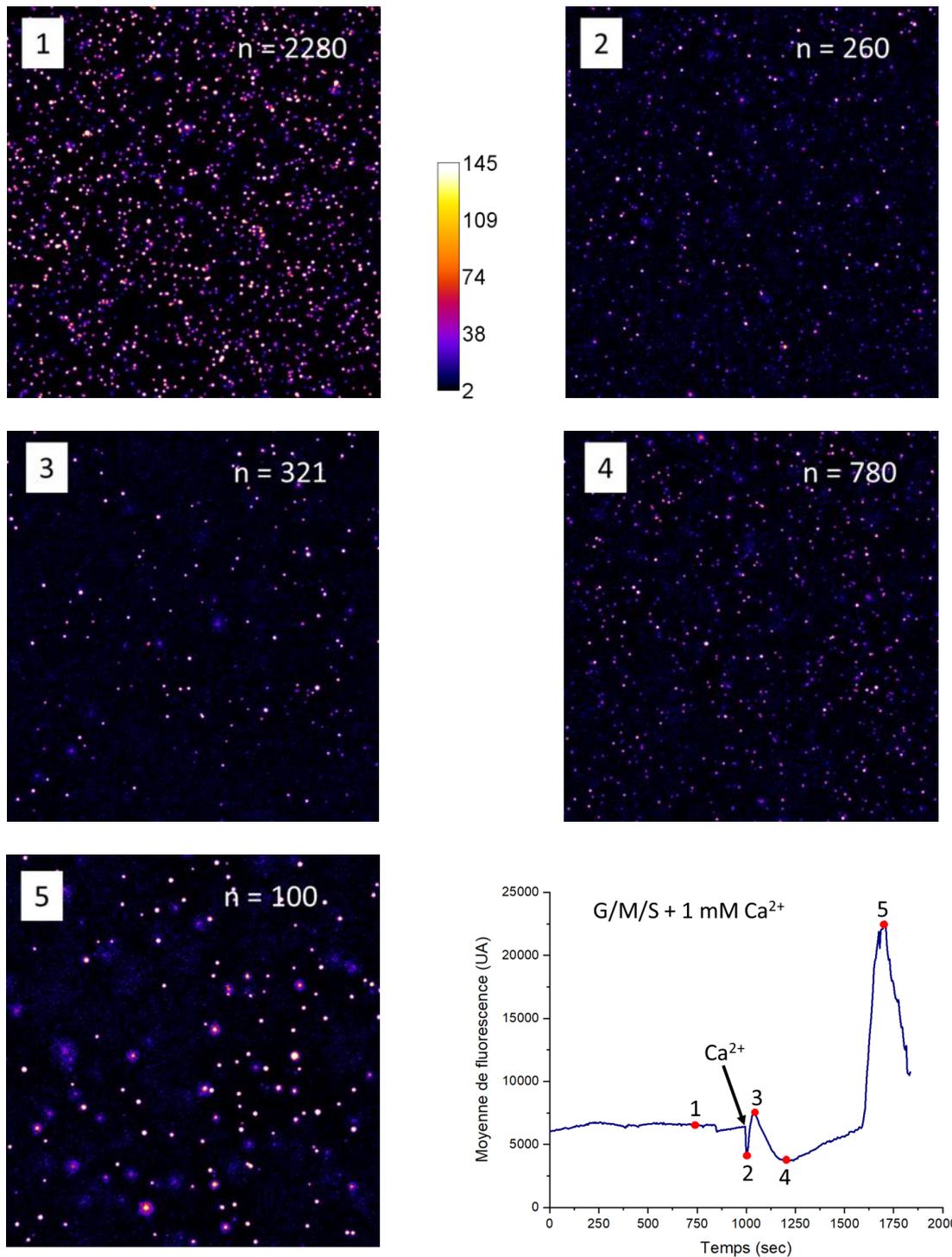


Figure 9 : Images de microscopie à différents moments (1 à 5) du suivi en TMRM (10 nM) des mitochondries individuelles (nombre détecté reporté sur chaque image) pour la condition avec injection de calcium (1 mM) après 20 minutes. Ces images ont été calibrées avec la même luminosité et contraste. En bas à droite : suivi de l'intensité moyenne de fluorescence du TMRM de la population mitochondriale au cours du temps. Les numéros 1 à 5 correspondent aux images de microscopie.

Pour expliquer ces changements, notre hypothèse est que cela correspond à une fluctuation de la concentration en sonde TMRM en parallèle des variations du nombre de mitochondries détectées. En effet, l'ajout de calcium peut entraîner une baisse du potentiel de membrane et donc une sortie importante de la sonde depuis la matrice vers la solution (augmentant sa concentration *in vitro*). L'intensité moyenne de fluorescence peut donc diminuer et le nombre de mitochondries détectées aussi. Cependant, certaines mitochondries vont « résister » à ce front calcique et vont reconstituer leur potentiel de membrane rapidement (dans les secondes qui suivent l'injection) mais le nombre global de mitochondries visibles reste faible au vu du nombre de départ. La concentration en sonde dans la solution étant plus importante qu'au préalable, un nouvel équilibre va se faire entre les mitochondries nouvellement polarisées qui vont alors internaliser une quantité plus importante de sonde (qu'avant injection). Cela augmente leur intensité moyenne de fluorescence jusqu'à un niveau supérieur à celui d'avant l'ajout. Ensuite, le nombre de mitochondries qui se repolarisent augmente, la sonde va alors se rééquilibrer de nouveau abaissant la valeur de l'intensité moyenne de fluorescence du TMRM. Un argument en faveur de cette hypothèse est que la moyenne de fluorescence du NADH ne présente pas cette variation de fluorescence comme le TMRM (figure 10). En effet, la moyenne de fluorescence du NADH (sonde endogène), diminue d'abord après l'ajout du calcium puis revient à sa valeur initiale, mais ne présente pas d'augmentation de la fluorescence.

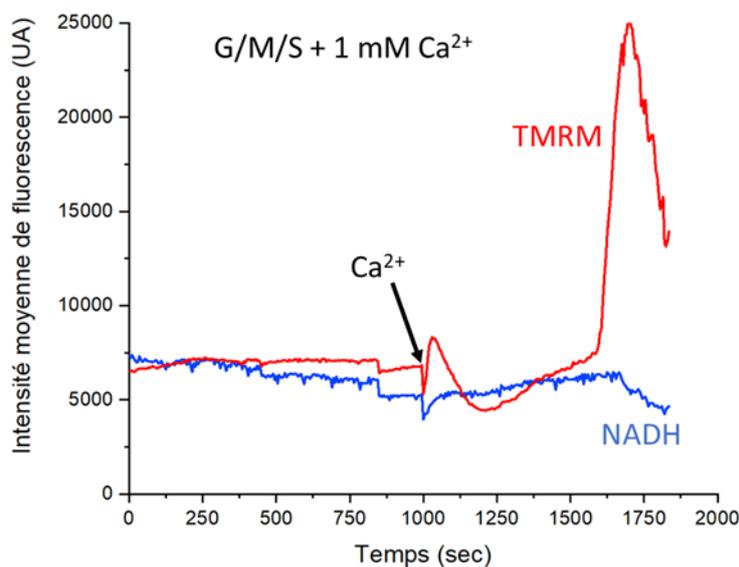


Figure 10 : Suivi de l'intensité moyenne de fluorescence pour le NADH et le TMRM d'une population mitochondriale, pour la condition avec injection de 1 mM de calcium réalisée à 1000 secondes. Valeurs calculées à partir des données des Figures 9 et 10.

Sur la Figure 10, on observe vers la fin de la courbe, une nouvelle augmentation de la moyenne de fluorescence très importante. Notre hypothèse est que le même phénomène que celui expliqué précédemment se passe ici mais à plus grande échelle, c'est-à-dire une « mort » des mitochondries de l'ensemble de l'échantillon (des mitochondries dans le champ d'acquisition mais également en dehors). Cela va changer profondément la répartition de la sonde, augmentant drastiquement la fluorescence des mitochondries restantes alors que dans la première variation transitoire de fluorescence, l'injection du calcium s'est faite localement (au niveau du champ d'acquisition) ce qui a dû impacter un nombre plus restreint de mitochondries. Par contre 10 minutes après l'injection, le calcium a eu le temps nécessaire pour diffuser et être homogène en solution, affectant ainsi la quasi-totalité des mitochondries présentes sur la lamelle.

C'est pour éviter ces biais que nous avons choisi de travailler avec la fluorescence totale, en effet lors de l'ajout de calcium, le nombre de mitochondries chute et la somme de fluorescence de toutes ces mitochondries baisse également même si ces dernières vont être individuellement plus fluorescentes dû au rééquilibrage de la sonde et explique pourquoi la moyenne de fluorescence augmente.

f) Visualisation de dépolarisations transitoires du potentiel membranaire

Les parties précédentes ont, je l'espère, permis de mettre en évidence l'intérêt de la méthode développée dans le chapitre I, pour le suivi dynamique de populations mitochondriales (milliers d'unités). Cela nous a permis également de répondre à certains des objectifs énoncés. En effet, nous avons pu analyser par microscopie l'effet du calcium sur le potentiel de membrane moyen d'une population, comme avec des méthodes plus classiques (spectrofluorimètre), et ainsi confirmer les résultats retrouvés dans la littérature (Sokolova Niina et al 2013, Partownavid Parisa et al 2012). De plus, j'ai observé (dans nos conditions expérimentales) qu'un saut de concentration en calcium permet d'activer l'ouverture pathologique du mPTP au moment de l'injection, et après un délai d'environ 10 minutes en déclenchant une deuxième vague synchronisée entre les mitochondries observées. Nous avons également pu caractériser l'effet de la CsA, qui permet de limiter les effets du calcium, confirmant l'implication du mPTP dans nos réponses. En revanche, il semble que cet effet protecteur ne dure pas dans le temps, et qu'une exposition prolongée au calcium entraîne des dépolarisations permanentes des mitochondries, reliées à l'ouverture pathologique du pore.

Dorénavant, l'objectif de cette étude est de visualiser et de caractériser des événements d'ouverture transitoire du mPTP, résolus à l'échelle de mitochondries individuelles. Si l'accent a été mis précédemment sur le moment juste après l'ajout du calcium, la réalité à l'échelle individuelle est très complexe puisque de multiples événements de dépolarisations transitoires peuvent être observés dans les minutes suivant la variation

calcique. Cela conduit à une quantité d'informations très importante que je vais tenter d'analyser et d'organiser en catégories par la suite.

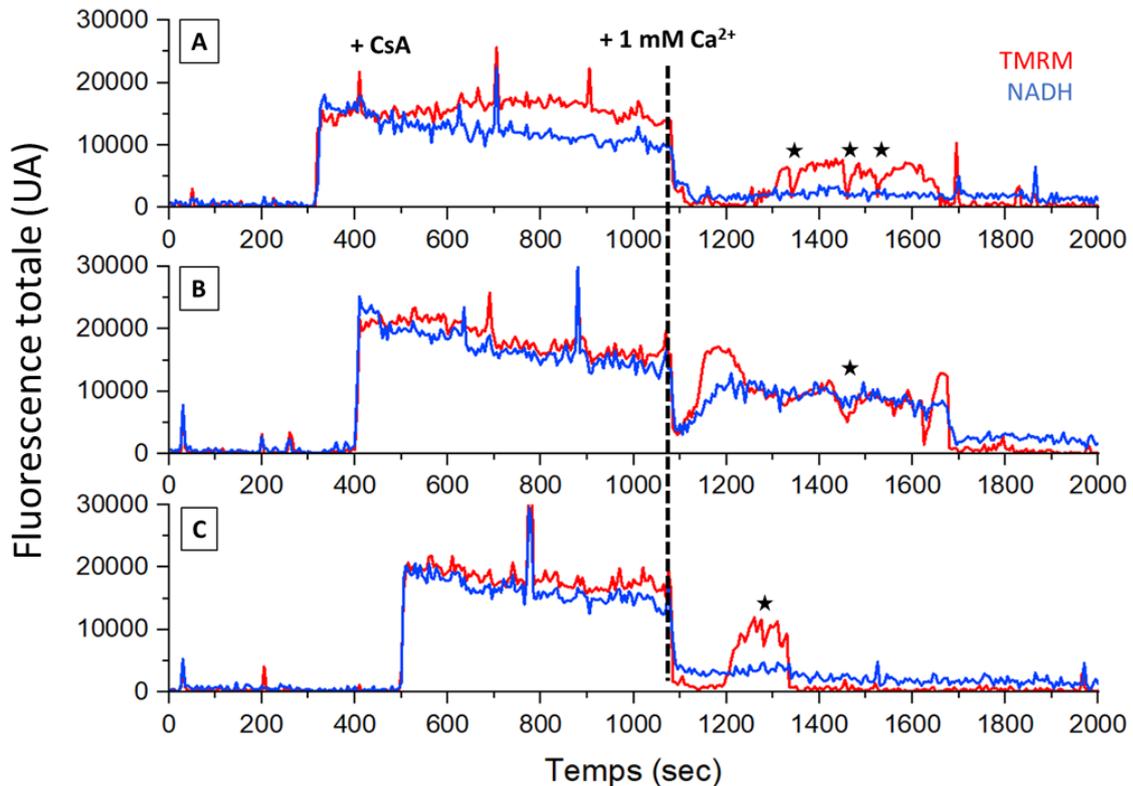


Figure 11 : Suivi de la fluorescence totale du TMRM (rouge) et du NADH (bleu) pour trois mitochondries individuelles. Les mitochondries sont incubées avec 10 nM de TMRM, les substrats (glutamate, malate et succinate à 5 mM) et de la CsA à 2 µM. Peu après 1000 secondes, 1 mM de calcium est ajouté à la solution mitochondriale. Les étoiles correspondent à des variations transitoires de l'intensité de fluorescence du TMRM liées à des dépolarisations membranaires.

La figure 11 montre l'exemple du suivi en TMRM et NADH de trois mitochondries individuelles pour la condition en présence de CsA et avec une injection de 1 mM de calcium (à $t \approx 1100$ sec). Tout d'abord, on remarque que le moment d'apparition dans l'analyse de ces trois mitochondries est différent, correspondant à leur temps de sédimentation. L'autre point est que pour ces trois mitochondries l'ajout du calcium a provoqué une baisse synchronisée de la fluorescence pour les deux paramètres. Cependant, la remontée des intensités du TMRM et du NADH ne le sont pas ensuite, puisque l'intervalle de temps nécessaire et l'intensité finale sont différents selon la mitochondrie. La fluorescence totale du TMRM après injection du calcium est d'ailleurs plus basse qu'auparavant. Tout ceci montre bien la variabilité individuelle au sein d'une population mitochondriale, que l'on étudie ici (cf chapitre I). Le temps nécessaire avant une dépolarisation définitive semble lui aussi être dépendant de la mitochondrie, ce qui suggère que globalement nous avons une réponse différentielle vis-à-vis du calcium en fonction de la mitochondrie étudiée.

Les courbes de suivi du NADH montrent également la complexité des réponses puisque seul l'exemple 11B montre une remontée au niveau de base après l'ajout de calcium, alors que pour le TMRM les intensités de fluorescence remontent dans les trois cas. Une explication possible est que ce phénomène est dépendant de l'intensité de fluorescence et de la sensibilité de notre système de détection. Une illumination plus longue pourrait permettre d'observer une intensité de fluorescence plus importante et on verrait probablement, dans les cas A et C, une légère remontée de la fluorescence du NADH concomitante avec celle du TMRM. On distingue plus aisément le TMRM car cette sonde possède une réponse logarithmique vis-à-vis du potentiel de membrane (cf chapitre I). Des études complémentaires sont à faire pour mieux analyser ce phénomène. Cela semble montrer tout de même qu'après injection du calcium certaines mitochondries semblent altérées mais restent polarisées.

Comme expliqué en amont, notre hypothèse pour expliquer la première variation transitoire de la fluorescence du TMRM est qu'elle puisse être causée par une entrée d'un flux de calcium important dans la matrice mitochondriale qui va diminuer le potentiel de membrane et abaisser le niveau moyen de NADH en augmentant la vitesse de la CR. En revanche, ce qui est intéressant dans cette figure 11 est que l'on observe, après la première variation de fluorescence, de nouvelles dépolarisations de durée d'intervalles plus brèves (indiquées par les étoiles), bien visibles sur la courbe A où trois événements sont visualisés. Ceux-ci ne semblent pas être associés par une variation transitoire en NADH, sauf peut-être dans la figure 18B. Selon notre hypothèse, ce sont ces dépolarisations transitoires qui pourraient être dues à une ouverture transitoire du mPTP. En effet les mitochondries sont en présence d'une grande concentration de calcium dans la matrice qui va par la suite activer une ouverture du mPTP. Je reviendrai plus tard dans ce chapitre sur la différence entre ces deux dépolarisations transitoires en analysant leur temps moyen d'ouverture. Si ces trois mitochondries ont reconstitué leur potentiel de membrane après l'ajout de calcium, on a pu voir (cf figure 7) qu'une partie importante de la population ne l'a pas fait. Dans ce cas-là, l'ouverture pathologique et irréversible du mPTP est certainement en cause car ce phénomène est inhibé par la CsA sans permettre à la mitochondrie de se repolariser.

g) Parallèle avec le chapitre I : Observations d'ouvertures transitoires lors du suivi des états stationnaires bioénergétiques.

Dans la partie précédente j'ai montré des exemples de dépolarisations transitoires, cependant dès le chapitre I, lors du suivi des états stationnaires bioénergétiques et du déplacement de mitochondries individuelles, des événements similaires avaient pu être observés (figure 12).

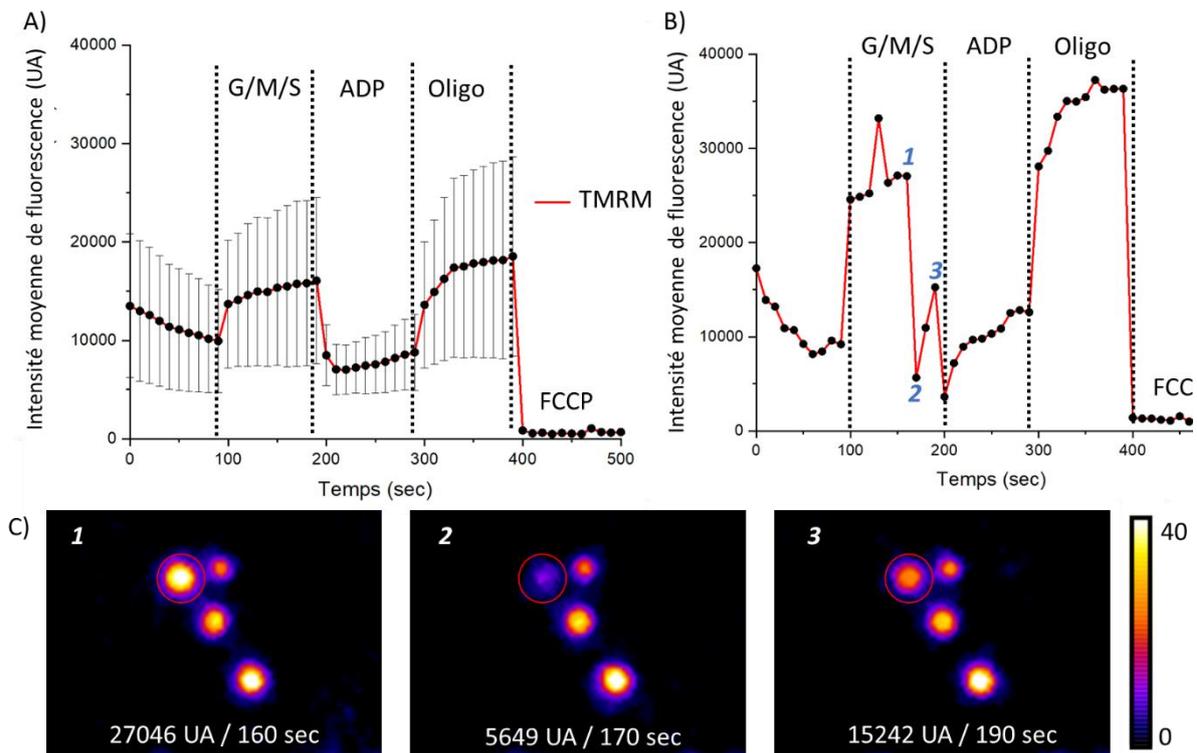


Figure 12 : Suivi des états bioénergétiques du potentiel de membrane (cf chapitre 1) de mitochondries individuelles à l'aide du TMRM (à 10 nM). A) Suivi de l'intensité moyenne de fluorescence du TMRM de la population mitochondriale. B) Suivi d'une mitochondrie individuelle et exemple d'une dépolarisation transitoire spontanée observée. C) Images en microscopie du suivi individuel de la courbe en B à trois temps notés 1 à 3.

La figure 12A correspond au suivi des variations quasi-stationnaires de la réponse en TMRM d'une population en fonction d'une séquence d'activation-inhibition, comme observé dans le chapitre précédent (les barres d'erreurs représentent ici les écart-types). Si on regarde à l'échelle d'une mitochondrie de la population analysée (figure 12B), on retrouve un comportement proche de l'intensité moyenne de fluorescence du TMRM de la population (figure 12A), notamment à l'état 3 et après ajout de l'oligomycine, mais c'est à l'état substrat que l'on observe le même phénomène que dans la figure 11. Une dépolarisation transitoire est visible au niveau de cette réponse individuelle (entre les moments 1 à 3, la mitochondrie est celle définie par les cercles en 12C). Par ailleurs, le pic positif juste avant la dépolarisation transitoire a pu être associé au passage d'une mitochondrie au-dessus de celle que l'on analyse, ce qui augmente localement l'intensité totale de fluorescence.

On observe ainsi une mitochondrie qui était très fluorescente (27046 UA), baisser drastiquement en intensité, pour n'être pratiquement plus détectable par notre système d'analyse (5649 UA) et pour ensuite revenir à un niveau intermédiaire (15242 UA). Au vu de la courbe, on peut supposer que si un temps suffisamment long avait été laissé avant l'ajout de l'ADP, le niveau de fluorescence serait revenu à un niveau proche de celui d'avant. Cette chute de fluorescence est très rapide, inférieure à cinq secondes qui est le temps choisi dans cette expérience entre deux acquisitions. Cependant, la remontée en fluorescence, c'est-à-dire ici la reconstitution du potentiel de membrane, est plus longue, car après dix secondes celui-ci n'est pas revenu à son niveau initial. Je tiens à préciser qu'aucune addition n'a été faite ici, ce phénomène est spontané et non pas induit. On peut également remarquer que dans ce cluster de quelques mitochondries (figure 12C), seule la mitochondrie analysée présente ce phénomène. Ces dépolarisations transitoires ont été observées plus fréquemment après l'ajout des substrats que par rapport aux autres conditions, même si cela nécessite d'être confirmé par d'autres analyses.

III. Méthode de détection et de classification des dépolarisations transitoires du potentiel de membrane

a) Classification des dépolarisations transitoires du potentiel membranaire

Pour aller plus loin et chercher à caractériser les dépolarisations transitoires observées, j'ai analysé les courbes de suivi du TMRM de plusieurs milliers de mitochondries en présence ou en absence de calcium, afin d'essayer de créer une classification. C'est le paramètre de forme temporelle et des changements des intensités de fluorescence de ces dépolarisations transitoires qui m'ont permis de le faire.

Nous avons ainsi trouvé trois grands types d'évènements classés de 1 à 3, ainsi que des mitochondries ne présentant aucun évènement numéroté 0, tout ceci est représenté dans les exemples de la figure 13. Pour ne pas complexifier cette partie importante, les exemples montrés sont issus de la condition contrôle c'est-à-dire uniquement en présence des substrats GMS, bien que des évènements similaires sont également retrouvés dans les deux autres conditions, comme on le verra par la suite. Également, nous avons pu voir dans la figure 12 que des dépolarisations transitoires spontanées (sans inducteur) étaient également possibles. Je reviendrai plus tard sur leurs significations et le mécanisme possible sous-jacent. Pour bien appréhender les différentes dépolarisations, les exemples ci-dessous sont représentés avec des échelles différentes afin de bien visualiser ces évènements. L'objectif n'est pas ici de comparer les amplitudes ou les intervalles de temps mais seulement de montrer des courbes représentatives des différents types observés et leurs allures. La baisse régulière de l'intensité de la ligne de base est attribuée au photo-blanchiment de la sonde TMRM, exposée toutes les 5 sec, mais pendant des durées longues, jusqu'à une heure. Ce phénomène apparait progressivement au cours du temps de mesure et son effet potentiel sur les réponses sera discuté en détails par la suite.

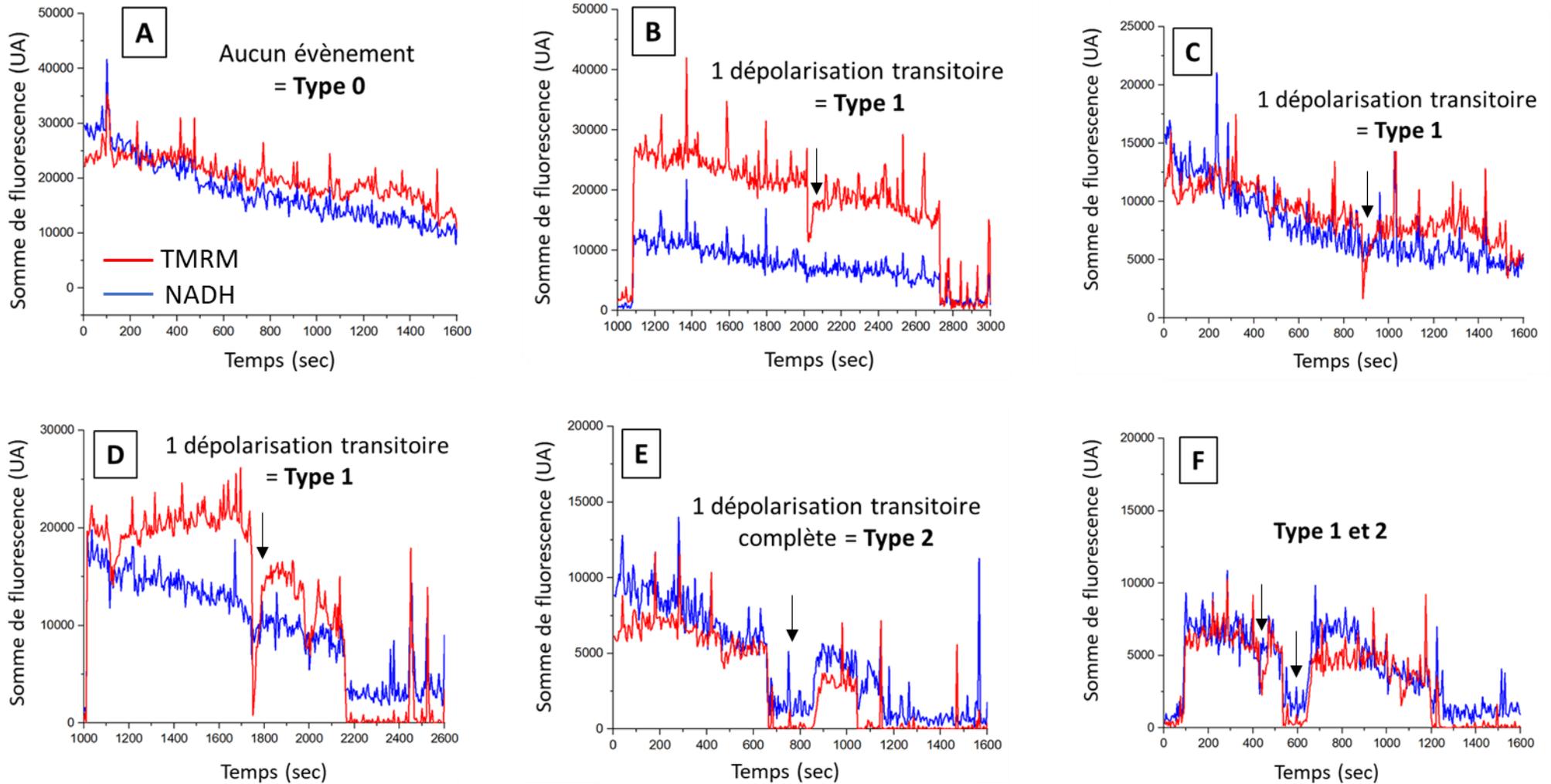


Figure 13 : Suivi de la somme des intensités de fluorescence du NADH (en bleu) et du TMRM (en rouge) de six mitochondries individuelles. Ces dernières sont en présence de substrats en excès (glutamate, malate et succinate à 5 mM). Différentes dépolarisations transitoires en TMRM sont visibles, l'allure de ces transitoires et leurs intensités en fluorescence nous ont permis de les classer en quatre catégories, voir texte.

Le premier type d'événements, nommé **type-0** (courbe 13A) est le plus simple à appréhender, il correspond à une mitochondrie qui ne présente aucune dépolarisation transitoire en TMRM, ni variation de fluorescence en NADH. Ce sont les mitochondries qui n'ont pas de réponse spontanée et celles-ci vont présenter un intérêt moindre dans cette étude, je n'en parlerai que très peu.

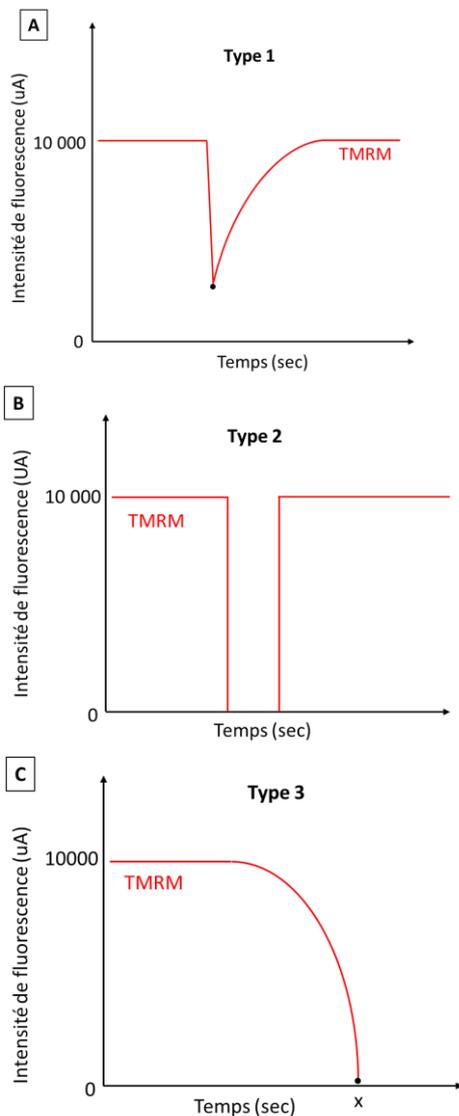


Figure 14 : Schéma des différents types de notre classification des dépolarisations transitoires observées à l'aide du TMRM.

Le deuxième type d'évènement est celui nommé **type-1**, que l'on voit dans les exemples B, C, D et F et qui est schématisé dans la figure 14A ci-contre, il correspond à une dépolarisation transitoire visible par une baisse de la fluorescence du TMRM, il présente cette forme caractéristique de pic. Un point important est qu'à chaque image du suivi, même au plus bas de cette variation transitoire de fluorescence, l'objet reste visible et détecté.

Le **type-2**, correspond lui aussi à une dépolarisation transitoire (courbes E et F) mais dans ce cas-là au moment de la dépolarisation l'objet va « disparaître » complètement, la mitochondrie ne sera plus détectable par le module « Trackmate », cela confère au signal cette forme en « puits » (figure 14B). Une autre différence avec le type-1 est le temps nécessaire à la repolarisation. Pour le type-1, cette étape va être rapide mais on va pouvoir suivre la remontée progressive de la fluorescence alors que pour le type-2, cette remontée est très souvent quasi-instantanée par rapport à la vitesse d'analyse.

Le dernier type d'évènement, le **type-3** (courbes B, D, E et F) est celui qui correspond à une dépolarisation définitive, où la fluorescence en TMRM et en NADH va diminuer drastiquement pour atteindre une valeur proche de celle du bruit de fond

pour ensuite ne jamais remonter, c'est une perte totale d'activité ou l'équivalent de la « mort » des mitochondries (figure 14C).

J'ai choisi les exemples de la figure 13, car ceux-ci montrent la complexité des réponses observées. Si on prend le type-1, on voit que dans les courbes B, C, D et F ces dépolarisations transitoires n'ont rien à voir entre elles, que ce soit en termes d'intensité de fluorescence mais

également en termes de caractéristiques temporelles. Ce commentaire est également vrai pour le type-2 (courbes E et F), ce qui montre la difficulté que cela a été de les caractériser. La courbe F montre un point important sur lequel je tiens à insister : de par le grand nombre de mitochondries analysées simultanément ainsi que leur variabilité, toutes les combinaisons des différents types ont été observées (excepté le type-3 qui comme il amène à une dépolarisation définitive intervient toujours comme événement ultime). Un degré supplémentaire de complexité est que le type-1 et/ou 2 puissent se répéter plusieurs fois ou passer de l'un à l'autre et vice-versa pour une même mitochondrie. Si les exemples A à E sont des exemples uniques des différents types, le comportement moyen des courbes est plus proche de la courbe F, ou de multiples événements sont visibles.

En effet, si la forme caractéristique des différentes dépolarisations transitoires permet de bien les discriminer visuellement, le faire de façon numérique et automatisé a été un défi important de ma thèse. Pour cela je me suis tourné vers le langage de programmation « Python » qui est relativement accessible au débutant, et à la suite d'une formation d'initiation, j'ai commencé à écrire différents scripts pour essayer de détecter automatiquement les différents types mentionnés ci-dessus. L'objectif était de savoir si on pouvait créer à la suite du protocole « trackmate » des outils pour nous permettre de quantifier les dépolarisations transitoires (de type-1 ou 2) et définitives (type-3) d'une expérience, et ainsi comparer les résultats en fonction des conditions expérimentales et par conséquent, commencer à observer les effets d'une exposition au calcium et/ou d'une incubation avec de la CsA. Les différents scripts que j'ai écrits sont présentés en annexe.

Pour toutes les méthodes de détection automatisées que je vais présenter ci-dessous, je tiens à rappeler que sont présents en amont les filtres qui excluent : 1) toutes les mitochondries en mouvement ainsi que 2) celles qui sont présentes moins de 10% du temps total de la mesure.

b) Méthode de détection automatisée des différents types

i. Détection des Type-3

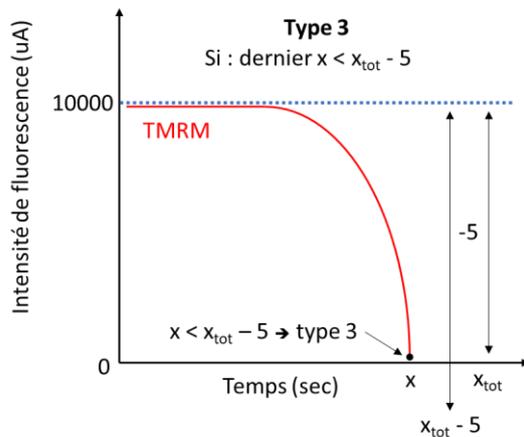


Figure 15 : Schéma de la méthode de détection utilisée pour les type-3.

Le type-3 correspond à une dépolarisation définitive de la mitochondrie qui n'est alors plus détectée. Ce qui veut dire que le numéro de la dernière image (X) où cet objet est visible est inférieur au nombre d'image théorique de l'acquisition entière (X_{tot}), c'est ce critère (intrinsèque au type-3) qui va me servir comme méthode de détection et qui est résumé dans la figure 15. Pour mieux comprendre, prenons un exemple : celui d'une mitochondrie qui

présente une dépolarisation définitive à 1600 secondes, ce temps correspond au dernier moment où l'objet a été détecté, soit $X=1600$ secondes. Pour cette expérience j'ai choisi de réaliser une acquisition toute les 5 secondes pendant une heure donc $X_{tot}=3600$ secondes. Pour m'assurer que c'est bien un type-3 que l'on regarde, et ainsi éviter certaines erreurs notamment à cause des type-2, il faut que l'objet ne soit pas détecté pendant au minimum 5 images (soit 25 secondes) avant X_{tot} . Dans cette exemple $X < (X_{tot}-5) \rightarrow 1600 < (3600-25)$ donc la mitochondrie est considérée comme présentant un type-3.

Après détection, le script va renvoyer les informations suivantes : 1) l'identifiant de la mitochondrie (donné par « Trackmate ») afin de pouvoir regarder la courbe individuelle si besoin pour vérification ; 2) cela renvoie le X, le numéro de la dernière image de la mitochondrie ; 3) cela renvoie aussi son intensité de fluorescence pour cette même image ainsi que 4) la fluorescence moyenne de cette mitochondrie.

Comme pour n'importe quelle méthode de détection, il y a une limite à sa précision. Les trois méthodes de détection que je vais présenter dans cette partie vont comporter un certain nombre de limitations et/ou de faux positifs. Pour le type-3, la limitation principale est l'échelle de temps. Si une mitochondrie présente une dépolarisation transitoire complète ou de type-2, peu de temps avant la fin de l'acquisition au microscope, le script va considérer cette mitochondrie comme présentant un type-3, alors qu'une acquisition de plus longue durée aurait permis de voir que la fluorescence en TMRM remonte par la suite. C'est pour contrecarrer ce biais qu'il faut que la mitochondrie ne soit pas visible pendant au moins 5 images ou (25 secondes ici) pour être considérée comme de type-3. Un autre moyen de limiter ce biais est le temps d'acquisition. Dans les figures précédentes le temps d'acquisition était

d'une heure, ce qui permet d'avoir un temps suffisamment long pour s'affranchir de ce biais. Le problème peut être plus important dans le cas d'acquisitions plus courtes, comme j'ai essayé de le faire un peu plus tard dans ce chapitre.

ii. *Détection des Type-2*

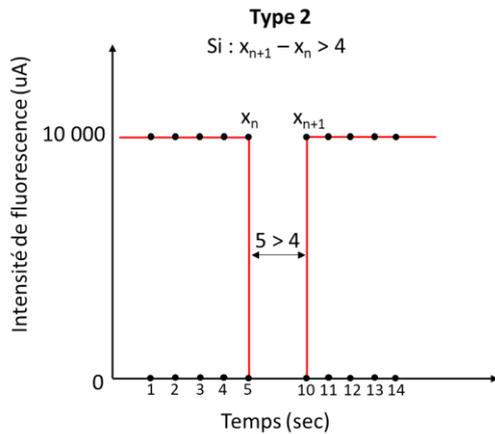


Figure 16 : Schéma de la méthode de détection utilisée pour les type-2.

Le type-2 est caractérisé par une mitochondrie qui, pendant un intervalle de temps, ne va plus être détectée par « Trackmate » car sa fluorescence a diminué drastiquement au point qu'elle ne soit plus discernable de l'intensité du bruit de fond. Pour détecter automatiquement ces types, le script va pour chaque mitochondrie calculer la différence de temps entre deux images, pour que cette valeur soit positive (la différence se fait entre l'image+1 et l'image soit $X_{n+1} - X_n$). Si ce temps est supérieur à une certaine valeur seuil (un nombre d'images) que je définis

en fonction du temps d'acquisition, alors la mitochondrie analysée est considérée comme présentant un type-2. Dans la figure 16 est représenté un exemple pour cette méthode de détection. Dans cette expérience j'ai réalisé une acquisition toute les secondes, j'ai choisi un seuillage de 4 secondes. On voit que pour cette mitochondrie, celle-ci n'est pas visible en TMRM entre les temps 5 et 10 secondes, donc la différence de 5 entre ces deux temps est supérieure au seuillage et la réponse est considérée comme de type-2. Une fois détectée, le script renvoie les informations suivantes : 1) L'identification de la mitochondrie. 2) X_{n+1} et X_n ainsi que la fluorescence de la mitochondrie à ces deux moments.

Il existe deux biais à ce système : le premier est vis-à-vis du seuillage d'acceptation qui est choisi arbitrairement, si sa valeur est trop forte cela peut empêcher de voir des évènements mais s'il est trop faible cela va prendre en compte des erreurs de détection réalisées par « Trackmate ». Ces erreurs arrivent souvent quand 2 mitochondries sont très proches et qu'une troisième mitochondrie en mouvement va passer au-dessus de l'une d'entre elles, cela va provoquer une augmentation de la fluorescence très brève (comme visualisé figure 7) qui va « masquer » et empêcher la détection de celle sous-jacente.

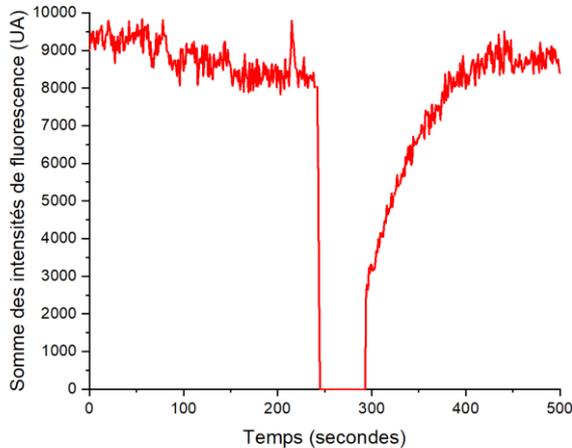


Figure 17 : Exemple d'une dépolarisation transitoire observée en TMRM qui sera à la fois détectée comme un type-1 et un type-2 (faux-positif)

Le deuxième biais est induit par des type-1 profonds, comme représenté dans la figure 17. Cette dépolarisation transitoire présente la forme caractéristique du type-1 avec une repolarisation progressive, mais la diminution de l'intensité de fluorescence étant tellement importante que la mitochondrie n'a plus été détectée par « trackmate » pendant un certain nombre d'images, ce qui la rend détectable par le script de détection des type-2, cette courbe est un faux positif.

L'existence de ce type de courbes permet d'obscurcir la frontière entre les type-1 et 2 car, si dans la suite de ce chapitre je les ai traitées de manière séparée à l'heure actuelle, nous ne connaissons pas le mécanisme précis derrière ces deux phénomènes et il se peut que le type-2 ne soit en réalité qu'un type-1 plus profond ou de plus forte amplitude. Cependant, certains résultats préliminaires me font plutôt penser le contraire. Pour aller plus loin, il serait intéressant d'implémenter le script de détection des type-2 avec un calcul de la vitesse de repolarisation afin de discriminer ces faux positifs et les quantifier.

iii. Détection des Type-1

La détection des type-1 a été de loin la plus compliquée à mettre en place et la plus chronophage. En effet, ce type de dépolarisation transitoire se caractérise principalement par le fait que la mitochondrie soit en tout temps visible en fluorescence à l'opposé des deux autres types. Une simple opération mathématique pour les détecter n'était donc pas aisé à trouver et il a fallu changer d'approche en utilisant des modules du langage de programmation « Python » dédiés au traitement du signal. La figure 18 ci-dessous est une représentation des différentes étapes nécessaires, qu'il a fallu mettre en place pour pouvoir détecter ces dépolarisations transitoires.

La courbe 1 représente le suivi en TMRM d'une mitochondrie présentant un type-1, les pics positifs correspondent au problème que l'on retrouve dans de nombreuses courbes, à savoir le passage d'une mitochondrie en mouvement au-dessus de celle analysée. On voit également que la tendance générale des intensités de fluorescence est à la baisse, cela est dû au « photobleaching » de la sonde TMRM que j'ai volontairement accentuée ici, car si ce phénomène est peu visible dans le cas d'acquisitions longues (figures précédentes), il devient de plus en plus marqué à mesure que la vitesse d'acquisition augmente. La première étape

(courbe 2) a pour objectif de lisser au maximum la courbe à l'aide d'une médiane mobile d'un coefficient de 11, limitant ainsi les dépolarisations transitoires, on obtient ainsi la tendance générale de la courbe et donc l'effet du « photobleaching ». Sur cette courbe filtrée 2 on va par la suite utiliser la fonction « curve_fit » qui va venir ajuster au mieux une exponentielle décroissante de formule :

$$y = a * e^{(-b*x)} + c$$

Les coefficients a , b et c sont calculés par le script pour chaque mitochondrie à partir de valeurs initiales que j'ai données, respectivement : $2.99395788e+06$; $1.07491326e-06$; $-2.98991254e+06$. Ces valeurs sont issues de l'estimation d'une exponentielle décroissante d'une courbe modèle, x correspond ici au temps. Pour limiter l'impact que peut avoir ce calcul sur le temps nécessaire à la réussite de ce script une limite d'essais d'ajustement de cette fonction est utilisée qui est de 1 000 000, il arrive dans de rares cas que cette estimation nécessite plus d'essais, dans ce cas aucune courbe de tendance n'est définie et la détection des pics ne se fera pas.

En parallèle, je vais appliquer sur la courbe brute une seconde médiane mobile mais avec un coefficient faible (typiquement 5) afin de supprimer les pics positifs sans modifier outre mesure la courbe originelle (courbe 4). Il est important de supprimer ces pics car sinon ils peuvent intervenir dans la détection des bordures des type-1 et ainsi modifier l'estimation de leur amplitude. La courbe de tendance précédemment estimée va être soustraite à la courbe 4, afin de s'affranchir de ce « bleaching » de la sonde. La nouvelle courbe générée voit ses valeurs centrées autour de zéro, sauf pour les dépolarisations transitoires qui vont avoir des valeurs négatives. Par la suite, on vient estimer sur cette courbe modifiée, une déviation standard qui permet de quantifier l'intensité moyenne des variations de la mitochondrie qui ne sont pas liées aux dépolarisations transitoires. Cette valeur va être importante pour la détection des vraies dépolarisations transitoires.

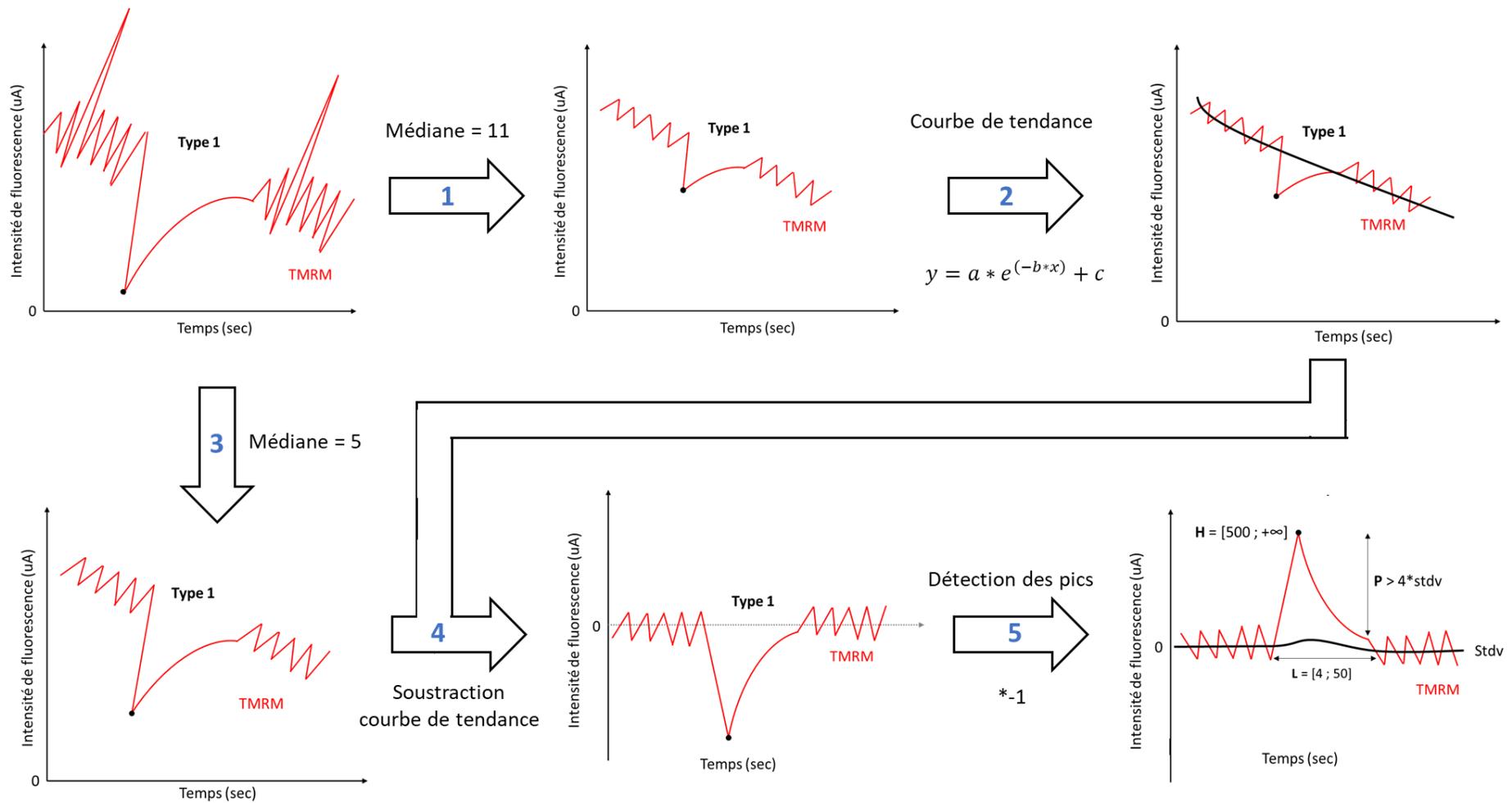


Figure 18 : Schéma des différentes étapes du traitement numérique de chaque courbe de suivi mitochondrial, à partir de la somme des intensités de fluorescence du TMRM en fonction du temps, pour détecter les dépolarisations transitoires de type-1.

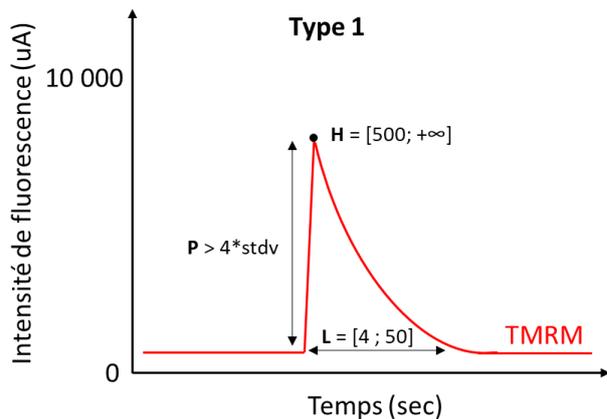


Figure 19 : Schéma de la méthode de détection utilisée pour les type-1.

Toutes ces étapes citées en amont ont pour but de limiter l'effet de la décroissance régulière de la fluorescence du TMRM, due à sa photodégradation progressive, et par conséquent rendre plus juste la détection des dépolarisations transitoires. Pour ce faire, la fonction « find_peaks » du module « Scipy » est utilisée pour détecter ces type-1. Le principe de cette fonction est de trouver les maxima locaux d'une courbe (Les

pics étant négatif, la courbe est multipliée par -1 avant l'utilisation de cette fonction). Différents paramètres sont donnés afin d'améliorer la recherche des pics (figure 25) : 1) la hauteur (H), qui correspond à un intervalle [500 ; +∞] dans lequel la pointe du pic (le maximum local) doit être comprise. L'intervalle ne commence pas à 0 mais à 500 car cela permet d'ajouter un critère supplémentaire de sélection. 2) La promesse du pic (P), c'est-à-dire de combien (en UA) le maximum local se différencie de son bord le plus proche, en d'autres termes cela correspond à l'amplitude du pic. La valeur choisie n'est pas fixe mais est calculée pour chaque mitochondrie. Pour ce faire la valeur de la déviation standard (calculée précédemment) est multipliée par 4, ce qui donne un seuil que l'amplitude du pic détecté doit dépasser. Cela permet ainsi de ne sélectionner que les pics qui ont une amplitude suffisante pour s'extraire des variations de fluorescence basale. 3) La largeur, qui est un intervalle de temps qui va être dépendant de la vitesse d'acquisition. D'autres paramètres peuvent être donnés et ne sont pas mentionnés dans la figure 19, à savoir : la distance, c'est-à-dire le temps minimal entre deux pics successifs et la fenêtre active, c'est-à-dire une fois un pic trouvé, à combien (en temps) le script va-t-il aller chercher les bordures de part et d'autre du pic. Ces deux paramètres dépendent eux aussi de la vitesse d'acquisition.

Une fois les courbes de toutes les mitochondries passées en revues, le script trace la représentation graphique de chaque réponse mitochondriale avec son identifiant, et va calculer les informations suivantes (reportées dans différents fichier Excel): la promesse du pic et ses bordures et la largeur à mi-hauteur (cette information est paramétrable, c'est-à-dire qu'on peut modifier à quel pourcentage de la hauteur du pic on veut qu'il calcule la largeur), les coordonnées de la pointe du pic et pour finir l'aire sous la courbe du pic. Pour tous ces fichiers, l'identifiant de la mitochondrie est donné facilitant la confirmation visuelle grâce au

graphique correspondant. Toutes ces paramètres vont être importants pour aider à caractériser ces dépolarisations transitoires de type-1.

Cette méthode de détection étant celle qui fait intervenir le plus d'étapes et de paramètres de nombreux biais sont *a priori* possibles. Tout d'abord la bonne estimation du « photobleaching » de la sonde qui est faible pour une acquisition à une fréquence lente mais va être important à mesure que l'acquisition est plus rapide, il faut donc dans un premier temps vérifier que les coefficients donnés pour cette étape ne modifient pas fondamentalement l'allure de la courbe, créant ainsi des fausses dépolarisations transitoires comme j'ai déjà pu l'observer. Le biais le plus important reste tout de même dans la détermination des coefficients pour la détection des pics, à la vue du nombre de mitochondries analysées et de leurs diversités de réponse, des pics d'amplitudes très variées sont trouvés mais également dans les variations basales des intensités de fluorescence. Il est donc impossible de déterminer des valeurs de coefficients qui contentent la détection de tous les pics, un équilibre est à trouver. Nous avons fait le choix d'avoir des paramètres qui permettent de ne sélectionner que les pics de grande amplitude, qui s'extraient suffisamment des variations de fluorescence basales, limitant ainsi les chances de détecter des faux positifs. Par la même occasion, le risque est que nous sélectionnions une partie des données et que nous surestimions les caractéristiques du type-1. Pour limiter aux maximum cet effet, il faudrait augmenter le rapport signal-sur-bruit des pics, un moyen simple serait d'augmenter la concentration en TMRM ce qui augmenterait ainsi l'amplitude des pics, facilitant leur détection mais nous verrons un peu plus tard dans ce chapitre que cette sonde a des effets phototoxiques, donc augmenter sa concentration c'est également risquer de modifier la réponse mitochondriale. Une autre difficulté est de déterminer la bonne fenêtre active, qui permet de trouver les bordures des pics.

iv. Détection des Type-0

Le type-0, par l'absence d'évènement est très difficile à détecter. Il est plus aisé de venir soustraire à la quantité de mitochondries détectées celles qui présentent des événements de type-1, 2 ou 3. Le seul problème à cette approche est qu'une même mitochondrie peut présenter chacun des différents types à la fois, cette mitochondrie sera donc comptabilisée trois fois, la quantité de type-0 est donc sous-estimée, méthode malheureusement utilisée ici. Une façon de limiter ce biais (méthode sur laquelle je travaille actuellement) est non plus de travailler sur la quantité de mitochondries mais sur leurs identifiants. Dans ce cas-là, si une même mitochondrie présente différents types elle aura à chaque fois le même identifiant.

IV. Caractérisations préliminaires des dépolarisations transitoires du potentiel de membrane

a) Acquisition longue et temporalité des différents types

Sur la même expérience que précédemment (figure 9), j'ai utilisé les scripts de détection des différents types expliqués ci-dessus. Avant d'essayer de caractériser finement ces dépolarisations transitoires et/ou définitives, le premier objectif a été de connaître leurs évolutions au cours du temps de cette expérience qui est relativement long avec une acquisition pendant une heure. Pour ce faire, je me suis intéressé au nombre d'événements détectés en fonction du temps. Pour faciliter la lecture, j'ai choisi de représenter la somme des événements toutes les 100 secondes pour le TMRM dans un premier temps, je reviendrai sur les valeurs du NADH par la suite.

i. Type-3

Nous nous sommes en premier intéressés aux dépolarisations définitives, ou type-3. La figure 20A représente cette somme d'événements en fonction du temps (par pas de 100 secondes), la figure 20B représente les mêmes données en somme cumulée. Pour cette partie du chapitre le code couleur sera le même : en gris est représentée la condition contrôle (G/M/S), en rouge la condition où j'ai réalisé une injection de calcium à 1 mM à t=15 minutes, et en bleu la condition incubée avec de la CsA à 2 μ M et injection de Ca^{2+} 1 mM également.

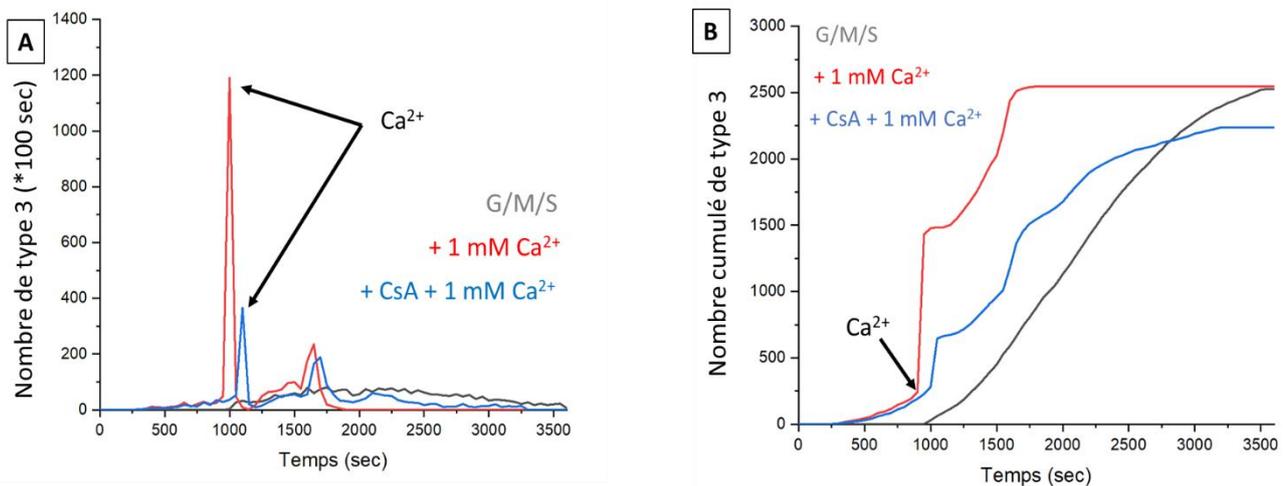


Figure 20 : Suivi de l'évolution du nombre de dépolarisations de type-3 détectées avec la sonde TMRM au cours du temps, pour les trois mêmes conditions qu'au préalable. A) Suivi de la somme du nombre de type-3 détectés toutes les 100 secondes. B) Suivi du nombre cumulé de type-3.

Pour les trois conditions, l'apparition des type-3 n'est pas immédiate mais se fait après un intervalle de temps, on remarque surtout que l'allure des courbes est différente pour les trois conditions. Pour la condition contrôle, on observe une courbe en cloche qui suit avec un léger décalage la courbe du nombre vue dans la figure 10, le maximum du plateau est atteint ici vers 2250 secondes contre 1600 secondes pour le nombre. Cette évolution est logique dans la première partie de l'expérience où peu de mitochondries sont présentes dans le champ d'acquisition. Une sédimentation forte a lieu avec peu de dépolarisations définitives et le nombre de mitochondries augmente. Par la suite, le nombre de type-3 continue d'augmenter cela permet d'atteindre un équilibre entre les mitochondries présentes, celles qui apparaissent (par sédimentation) et les pertes, on est dans la phase plateau. Le nombre de dépolarisations définitives atteint ensuite sa valeur maximale et reste stable, l'équilibre est alors en faveur des « pertes » de mitochondries malgré la sédimentation, le nombre chute faisant baisser à son tour le nombre de type-3 détectés.

Pour les deux autres conditions (calcium et calcium + CsA), les allures de courbes sont similaires, ce que l'on remarque tout de suite est le pic très important de type-3 détectés qui suit l'injection du calcium avec 1200 type-3 détectés pour la condition calcium contre 370 pour la condition incubée avec de la CsA soit une différence de 830 mitochondries pour un nombre avant injection similaire. Si l'on connaissait déjà l'évolution du nombre après injection du calcium grâce à la figure 10, ce résultat permet ici de quantifier précisément la part de cette évolution qui est imputable aux dépolarisations définitives et cela permet de mettre en avant l'effet irréversible du calcium puisqu'il va déclencher l'ouverture pathologique du mPTP. Mais cela nous permet également de confirmer l'effet de la CsA puisqu'elle inhibe ici en grande partie cette perte de mitochondries.

A noter également qu'un second pic de dépolarisations définitives est observé vers 1600 secondes, qui correspond à la seconde chute « synchronisée » du nombre de mitochondries détectées vue précédemment. L'apparition plus rapide des type-3 (peu après 250 secondes) dans les conditions avec injection de calcium et incubées avec de la CsA par rapport la condition contrôle (vers 950 secondes) n'est pour l'instant pas encore expliquée.

Avant de passer à la détection des autres types, j'aimerais montrer ici une autre conséquence de ces ouvertures pathologiques du pore. Dans la figure 21 est représentée une même mitochondrie observée en fluorescence avec le TMRM et le NADH, mais également en lumière blanche transmise. Au centre de la figure sont montrées les images de microscopie avant injection de calcium (à gauche) et 3 minutes après (à droite), de part et d'autre de ces images sont représentés les profils d'intensités de cet objet.

On voit qu'avant injection, la mitochondrie est bien ronde et visible, que ce soit par fluorescence (TMRM, NADH) ou lumière blanche transmise. Cependant, 3 minutes après injection du calcium, cette même mitochondrie n'est plus fluorescente, il y a eu dépolarisation définitive, ouverture pathologique du pore mais surtout, l'image en lumière blanche montre que cette mitochondrie n'est plus aussi « ronde » qu'avant et n'a plus de contraste, ce qu'on visualise très bien avec le profil d'intensité : cette mitochondrie a perdu son intégrité physique. Ce phénomène a été vu pour de nombreuses autres mitochondries après l'injection du calcium. C'est un effet connu de l'ouverture pathologique (cf introduction) qui peut entraîner le gonflement de la mitochondrie et aller jusqu'à une rupture de ses membranes (Javadov S et al 2007).

Ouvertures pathologiques, Type 3

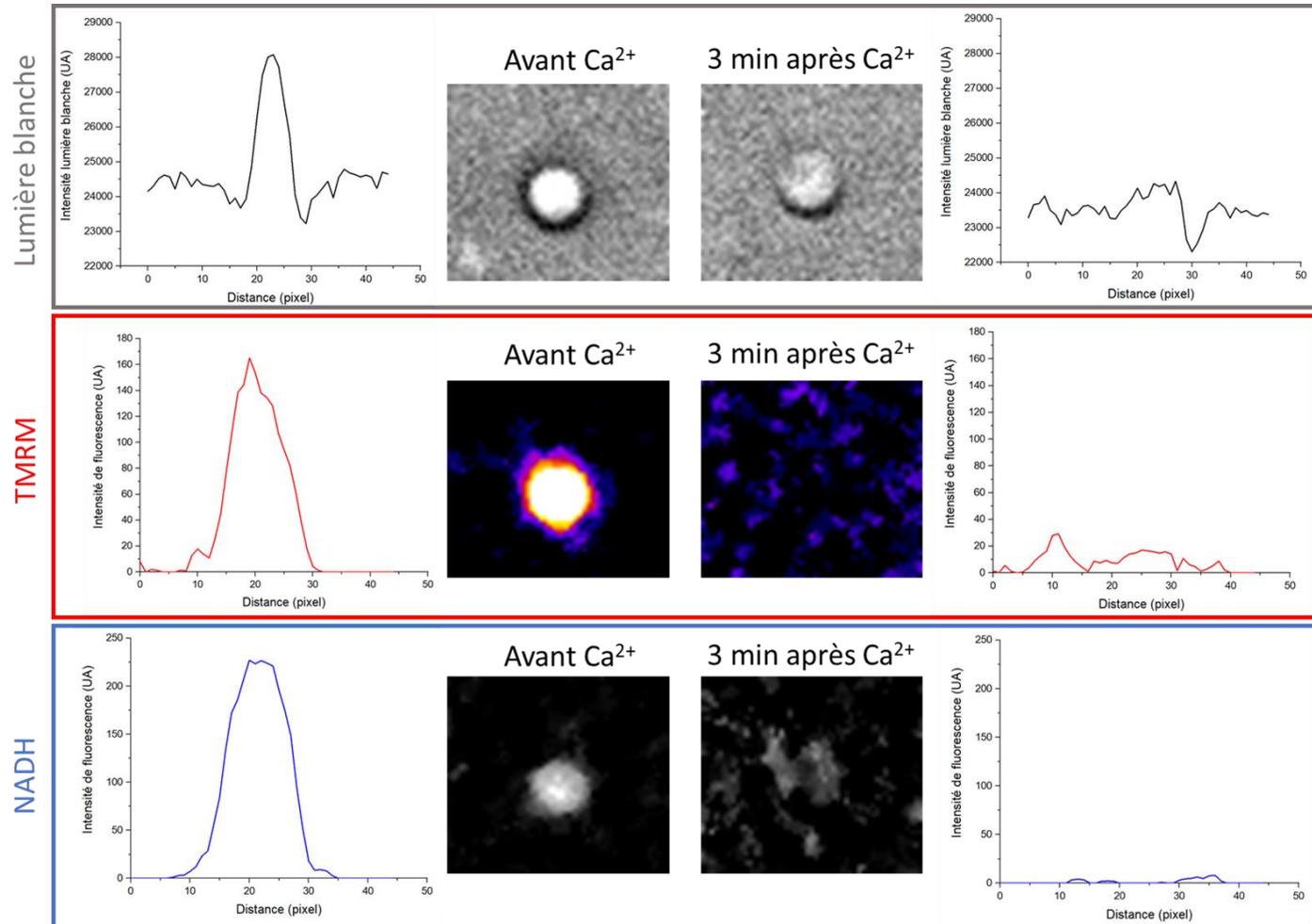


Figure 21 : Conséquence d'une ouverture pathologique du pore sur l'intégrité physique et la réponse en fluorescence d'une mitochondrie individuelle. Au centre, image en microscopie du NADH, TMRM et en lumière blanche d'une mitochondrie avant injection de calcium (1 mM) et 3 minutes après. A gauche et à droite profils d'intensité de cette même mitochondrie pour les différentes acquisitions.

ii. Suivi de l'évolution des type-2

Nous allons maintenant nous intéresser aux réponses de type-2. La figure 22 reprend le mode de représentation de la figure 20, à part qu'ici on suit l'évolution du nombre de dépolarisations transitoires et non plus définitives. Là encore les résultats sont donnés uniquement pour le TMRM en relation avec le mPTP.

A la différence du type-3, le type-2 semble être présent dès le début de l'acquisition et ce quelle que soit la condition. Pour la condition contrôle on retrouve là aussi une réponse en cloche qui suit de façon fidèle l'évolution du nombre de mitochondries. La présence de type-2 en l'absence de calcium montre que ce mécanisme peut être induit par un autre effecteur et notre hypothèse est qu'ici ce sont les ROS (autre activateur fort du pore) produits par la mitochondrie ou induits par l'illumination qui sont en cause. Lionel Blanchet et al 2014 ont en effet montré un effet de « photo-induction » par le TMRM, qui favoriserait la production d'oxygène singulet qui pourrait à son tour provoquer une ouverture transitoire du mPTP. Je reviendrai sur cette notion un peu plus tard dans ce chapitre avec des essais d'acquisition rapide. Pour la production physiologique des ROS nous avons pu montrer grâce au suivi en microscopie du système Amplex Red/HRP (données non montrées) une production de $0,8 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ d' H_2O_2 par les mitochondries à l'état substrat en présence de glutamate/malate et succinate. Les valeurs de production les plus fortes, $1,2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ sont obtenues avec des mitochondries en présence seulement de succinate. Les mitochondries cardiaques peuvent donc produire des quantités importantes de ROS, en tant qu'effecteur du mPTP. Tout ceci permet de montrer que des ROS sont produits et peuvent également interférer dans les mécanismes d'induction du mPTP.

Pour la condition avec injection de calcium et celle incubée avec de la CsA, les courbes ressemblent à celles de la figure 20, cependant des différences importantes sont observées. Dans les deux cas, on voit une augmentation forte des événements qui suit l'injection de calcium mais ici le rapport est inversé, c'est la condition en présence de CsA qui présente le plus grand nombre de type-2 avec 764 événements contre 589, soit une différence de 175. Cela permet de confirmer ce qui a été précédemment dit c'est-à-dire qu'après l'injection de calcium de nombreuses mitochondries vont présenter une dépolarisation transitoire et d'autres une dépolarisation définitive. La présence de CsA ne semble pas inhiber les dépolarisations transitoires et favorise la survie des mitochondries vis-à-vis des ouvertures pathologiques du mPTP, cela semble donc favoriser la détection d'une majorité de transitoires de type-2.

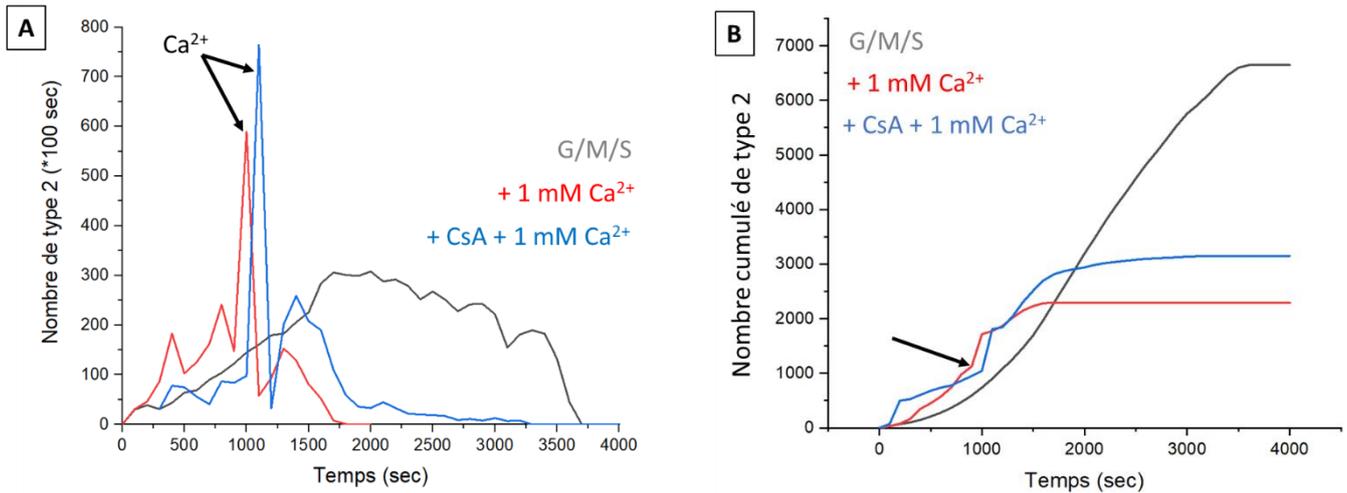


Figure 22 : Suivi de l'évolution du nombre de dépolarisations de type-2 détectées par le TMRM au cours du temps pour les trois mêmes conditions qu'au préalable. A) Suivi de la somme du nombre de type-2 détectés toutes les 100 secondes. B) Suivi du nombre cumulé de type-2.

Les baisses puis remontées de fluorescence du TMRM observées juste après l'injection de calcium sont, selon notre hypothèse, majoritairement dues à une entrée massive de calcium. En revanche, les dépolarisations transitoires que l'on observe plusieurs minutes après cette injection sont selon nous des ouvertures transitoires (physiologique) du pore, conduisant à un efflux de calcium.

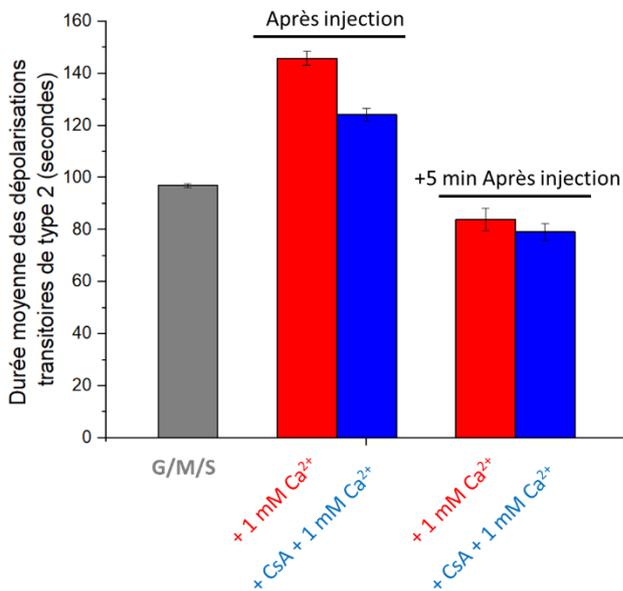


Figure 23 : Quantification du temps moyen des dépolarisations transitoires du type-2 observé en TMRM, pour la condition contrôle (en gris), celle avec ajout d'1 mM de calcium (en rouge) et celle incubée avec de la CsA (en bleu). Pour ces deux dernières conditions ce temps moyen a été calculé après injection de calcium et 5 minutes après.

Pour essayer de discriminer ces deux types d'événements, nous nous sommes intéressés à leur durée moyenne à deux moments : soit juste après l'ajout de calcium, ou 5 minutes après (Figure 23). L'objectif était de savoir si des différences existaient. Nous voulions aussi savoir quel effet pouvait avoir la CsA. Pour cela, j'ai utilisé le script de détection des type-2, en effet si ces deux phénomènes sont différents (l'un correspond à une entrée de calcium, l'autre à sa sortie) du point de vue du traitement du signal, dans les deux cas la variation de fluorescence du TMRM ressemble aux dépolarisations transitoires de type-2.

Pour comparer ces résultats, j'ai

calculé également la durée moyenne des type-2 détectés dans la condition contrôle. En effet, pour cette condition les type-2 détectés ne peuvent être imputables au calcium et pourrait potentiellement être le résultat de la photo-activation du TMRM ou les ROS produit physiologiquement.

On peut voir dans la condition contrôle un temps moyen des dépolarisations transitoires de 97 secondes. Après injection de calcium, on voit ce temps moyen drastiquement augmenter avec un temps de 145 secondes, soit plus 50 % d'augmentation, contre 124 secondes pour la condition d'incubation avec la CsA, soit plus 25 %. 5 minutes après injection on voit que dans ces deux conditions le temps moyen a diminué (84 secondes pour le calcium seul ; 80 secondes si incubation avec de la CsA) pour revenir à une valeur légèrement inférieure à la condition contrôle. Si le temps moyen calculé en GMS est très proche de celui des type-2 détectés 5 minutes après l'ajout du calcium, on peut supposer que le même mécanisme est impliqué dans ces conditions, à savoir une ouverture transitoire (physiologique) du mPTP.

En revanche juste après l'injection de calcium, les durées moyennes des type-2 calculées sont plus fortes que celles calculées 5 minutes après l'injection. Ce résultat est un argument en faveur de l'hypothèse émise, à savoir qu'il y a bien deux phénomènes mis en jeu au moment de l'injection du calcium. Celui-ci va provoquer une dépolarisation massive de la mitochondrie, ce phénomène correspondrait aux durées moyennes de dépolarisation mesurée les plus longues. En revanche, quelques minutes après, les mitochondries ont reconstitué leur potentiel de membrane et contiendraient en leur sein une concentration importante de calcium susceptible d'induire une ouverture transitoire du mPTP, correspondant aux durées moyennes plus courtes et proches de la condition contrôle.

La CsA vient complexifier cette interprétation car si 5 minutes après l'injection les temps moyens calculés sont très proches, juste après l'injection la valeur moyenne est inférieure à la condition en présence de calcium seul, ce qui laisse penser à un possible effet inhibiteur de la CsA sur cette entrée de calcium.

Dans l'ensemble, les temps mesurés sont supérieurs à ceux retrouvés dans la littérature. On peut comparer par exemple avec les résultats de Xiyang Lu et al 2016, qui ont trouvé un temps moyen de 57 ± 5 secondes pour une ouverture transitoire du mPTP. Un élément de réponse pour expliquer ces différences entre nos études est qu'ils ont travaillé sur cellules entières, là où nous avons travaillé sur mitochondries individuelles, ce qui peut sous-entendre un contrôle par l'environnement qui serait manquant dans notre étude.

iii. Suivi de l'évolution des type-1

Pour finir nous allons maintenant nous intéresser aux dépolarisations de type-1, la temporalité d'apparition de ces événements est comme on peut le voir dans la figure 24 bien différente des types précédents. Pour les trois conditions utilisées, les courbes sont très proches, excepté dans la condition contrôle (GMS) pour laquelle on détecte des type-1 pendant plus longtemps. Cela s'explique par l'ajout de calcium dans les deux autres conditions qui fait chuter drastiquement le nombre de mitochondries et donc le nombre de type-1 détectés. En effet, d'après la détection des type-2 et 3 vue précédemment, on sait qu'après l'ajout de calcium beaucoup de mitochondries vont présenter une dépolarisation soit transitoire de type-2 soit définitive de type-3, empêchant ainsi la mitochondrie de présenter une dépolarisation de type-1 (figure 24B).

L'élément le plus surprenant ici est que la quasi-totalité des type-1 sont détectés au début de l'acquisition avant même l'ajout de calcium, la majorité des événements sont détectés dans les 15 premières minutes. Cela est visible dans la figure 12, où une dépolarisation transitoire spontanée dont l'allure est proche d'un type-1 a été observée à l'état substrat, lors de l'acquisition des états stationnaires. Si une induction par le calcium est à écarter ici, l'effet de l'acquisition, de la photochimie du TMRM et de la production physiologique des ROS pourraient ici aussi être à l'origine de ce phénomène.

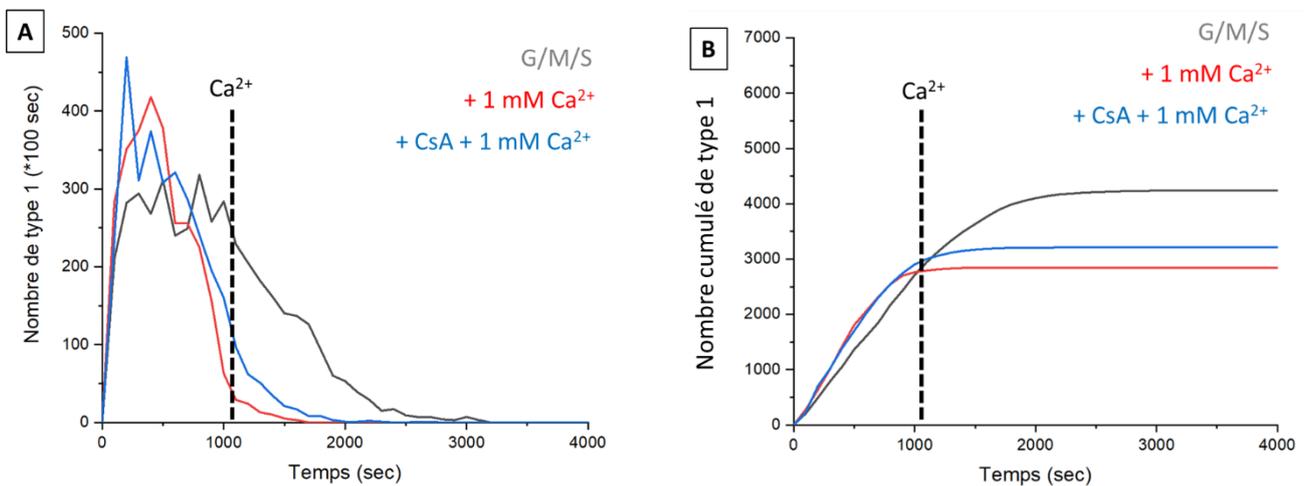


Figure 24 : Suivi de l'évolution du nombre de type-1 détectés par le TMRM au cours du temps pour les trois mêmes conditions qu'au préalable. A) Suivi de la somme du nombre de type-1 détectés toutes les 100 secondes. B) Suivi du nombre cumulé de réponses de type-1.

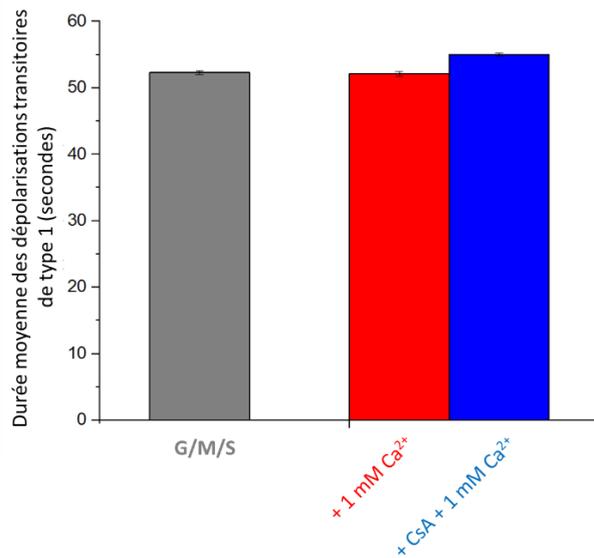


Figure 25 : Quantification de la durée moyenne des dépolarisations transitoires de type-1 observé en TMRM, pour la condition contrôle (en gris), celle avec ajout d'1 mM de calcium (en rouge) et celle incubée avec de la CsA à 2 μ M (en bleu).

image toute les 5 secondes), la délimitation des bordures à la base du pic par le script est difficile et donc source d'erreur. Par contre la largeur à mi-hauteur est une donnée plus juste car facilement quantifiable.

On peut observer que les valeurs pour les trois conditions sont très proches avec une moyenne autour de 53 secondes. L'absence de différence majeure entre ces conditions est en adéquation avec le fait que le nombre de type-1 détectés dans les trois conditions est similaire, et que leurs temporalités d'apparition sont aussi très proches. Ces types étant détectés pour la majorité avant l'injection de calcium, ces trois conditions sont similaires. Excepté pour la condition incubée avec de la CsA. Si pour le type-2, la présence de cet inhibiteur du mPTP affecte modérément le temps moyen des dépolarisations transitoires, pour le type-1 il n'y a pas d'effet significatif visible. L'impossibilité de calculer la durée moyenne totale de ces dépolarisations transitoires empêche toute comparaison fine avec le type-2.

D'après les courbes présentées dans la figure 13, il semble que le temps des dépolarisations transitoires des type-1 soit inférieur à celui des type-2. On sait, grâce à la partie précédente, que dans la condition contrôle le temps moyen des type-2 est de 97 secondes. Pour comparer ces résultats nous avons calculé la largeur moyenne à mi-hauteur des type-1 (figure 25).

Nous avons choisi de regarder les valeurs à mi-hauteur pour les type-1 car après une vérification manuelle des pics, ces résultats sont plus représentatifs de la réalité des courbes. J'ai fait un essai de calcul du temps total, mais à cause du manque de résolution temporelle (une

iv. Intégration des différents types

Pour obtenir une vue d'ensemble de l'effet du calcium et de la CsA sur ces différentes dépolarisations transitoires ou définitives, la figure 26 intègre dans un histogramme cumulé les résultats des quantifications de tous les événements observés, dans les trois parties précédentes. Je me suis intéressé uniquement aux types détectés pour une seule image, celle qui suit l'injection de calcium. Pour comparer ces résultats avec la condition contrôle, j'ai pris les valeurs de quantifications de l'image après 15 minutes de sédimentation. Les résultats sont analysés pour le TMRM.

L'élément nouveau dans cette figure est la quantification des type-0, c'est-à-dire ne présentant aucune dépolarisation, j'en ai peu parlé dans les parties précédentes à cause de la difficulté de leur estimation. Pour ce faire, j'ai pris le nombre de mitochondries détectées pour l'image juste avant l'injection de calcium auquel j'ai soustrait le nombre de mitochondries présentant un type-1, 2 et 3. J'ai déjà pu le dire mais une même mitochondrie peut présenter différents types, ce qui a pour conséquence une sous-estimation des type-0 quantifiés ici.

Pour la condition contrôle on voit qu'après 20 minutes l'ensemble des types détectés pour une seule image ne représente qu'une faible proportion de la population mitochondriale avec seulement 17%. Si j'ai pu avancer l'hypothèse des ROS produites de façon physiologique ou photo-induite par le TMRM, à chaque image cela n'affecte qu'une faible partie des mitochondries ce qui montre le caractère continue de cette stimulation et non aigue. Une acquisition n'est pas suffisante pour affecter l'ensemble de la population mais c'est plutôt le fait que l'illumination soit continue qui affecte l'ensemble des mitochondries. Cela s'explique par la balance entre la production des ROS basales et celle induite qui va être contrecarrée par les processus anti-radicalaires très forts de la mitochondrie.

Pour la condition calcium et CsA, on peut voir que la proportion de type-0 est plus faible que dans la condition contrôle ce qui montre qu'instantanément après l'injection de calcium une grande partie de la population mitochondriale va être affectée. Dans la condition CsA on voit que l'inhibition des type-3 permet de visualiser un plus grand nombre des autres types. Ce qui suggère un effet de cet inhibiteur plus complexe que celui classiquement connu. Un élément très intéressant est que l'étude de Xiyang Lu et al 2016 montre que la CsA inhibe les ouvertures transitoires qu'ils observent, là où pour nous cela semble au contraire les favoriser en prévenant une ouverture pathologique du mPTP.

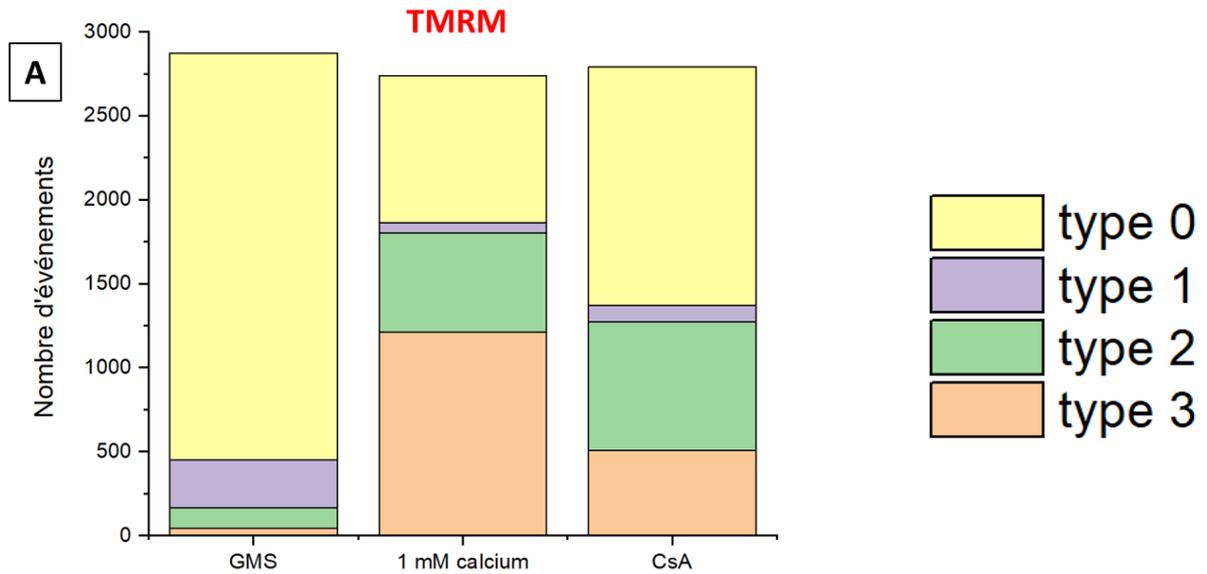


Figure 26 : Histogramme cumulé du nombre des différents types de dépolarisations détectées avec le TMRM, pour les images après 15 minutes de sédimentation pour la condition substrat, juste après injection de calcium et après injection de calcium en présence de CsA.

v. *Bilan des acquisitions longues et premières conclusions*

Les résultats présentés jusqu'à maintenant sont pour la plupart issus d'une même expérience. Si celle-ci est représentative des résultats observés au cours de ma thèse, il n'en reste pas moins que ces données sont préliminaires. Il faudrait par la suite confirmer ces résultats et aller plus loin en utilisant notamment une sonde fluorescente sensible au calcium, pour suivre de façon dynamique les flux correspondants à l'échelle de chaque mitochondrie.

Toutefois, on a pu voir grâce à cette expérience que l'approche en microscopie développée dans le chapitre I, couplée avec différents scripts informatiques d'analyse, permet d'apporter un nouveau degré d'étude et de compréhension des résultats. Si dans la première partie nous nous sommes intéressés à l'étude de la population entière pour connaître les grandes tendances, et ainsi visualiser l'ouverture pathologique du mPTP ou encore l'entrée de calcium dans la matrice, dans la deuxième partie nous avons travaillé sur le suivi de mitochondries individuelles, qui a permis de visualiser deux types de dépolarisations transitoires montrant ainsi la diversité des réponses.

Avant de passer à la partie suivante, je tiens ici à faire un premier bilan et de faire ressortir les premières conclusions, en commençant par la condition contrôle.

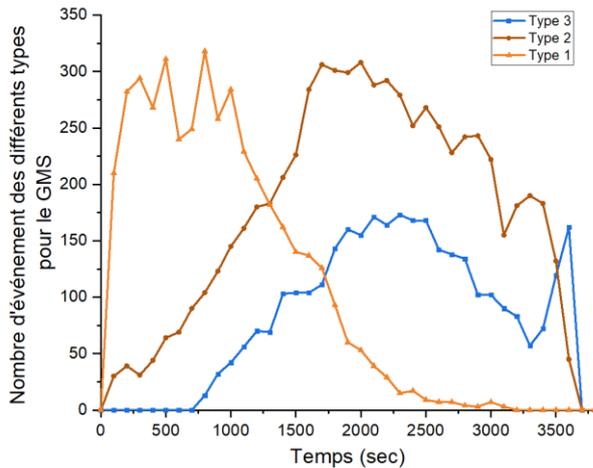


Figure 27 : Suivi de la somme des événements détectés toutes les 100 secondes en fonction de chaque type pour la condition contrôlée.

particulièrement pour les type-1 et 2. Cela peut être un premier indice que ces deux types sont des phénomènes différents.

Un autre argument en faveur de cette hypothèse est que dans l'étude de Xiyuan Lu et al 2016, les dépolarisations transitoires qu'ils observent n'entraînent aucune baisse de la fluorescence du NADH, celui-ci ne sort donc pas de la mitochondrie. Dans la figure 11 la majorité des type-1 ne semble pas présenter de baisse de la fluorescence du NADH. En revanche dans la figure 13, il y a un exemple de type-1 qui présente une baisse de fluorescence en NADH après injection du calcium. Cette sortie ou non du NADH complexifie l'analyse, d'autant plus que d'après nos observations préliminaires, les type-2 corrélerent dans l'ensemble une dépolarisation transitoire avec une baisse simultanée de la fluorescence du NADH, ce qui suggère que des mécanismes différents sont à l'œuvre. Cela peut concerner notamment la taille caractéristique d'ouverture du pore, avec dans un cas une ouverture très petite inférieure à la taille du NADH (663 Da) et dans l'autre, de plus grande taille supérieure à 663 Da. Cet argument est renforcé par le fait que le gradient de NADH entre la matrice mitochondriale et le tampon de respiration constitue une force suffisante pour assurer une sortie très rapide du NADH de la mitochondrie, surtout si la durée moyenne d'ouverture du pore est de 50 secondes pour le type-1.

En revanche, il n'est pas exclu que le type-1 puisse évoluer vers le type-2 et que le passage de l'un à l'autre puisse être modulé. Dans la condition contrôlée, ce passage est progressif, possiblement sous l'effet de la photo-induction du TMRM ou de la production physiologique de ROS par la CR. Cet effet photo-inducteur est d'autant plus important dans cette expérience puisqu'en parallèle du suivi du TMRM, un suivi du NADH est réalisé, ce qui augmente le temps d'illumination total. Dans les deux autres conditions, ce passage du type-

Celle-ci est très intéressante car il n'y pas d'effet du calcium et donc on observe un comportement non modifié, à part comme j'ai pu le mentionner précédemment, par les ROS photo-induits par le TMRM ou ceux produits physiologiquement. Dans la figure 12, on a pu observer que des dépolarisations spontanées de type-1 sont possibles, la figure 27 montre pour cette condition que les trois types d'événements sont détectables. En revanche il y a une vraie temporalité d'apparition des différents types, plus

1 au 2 semble être induit par l'injection de calcium. De nombreuses perspectives sont possibles ici pour essayer de discriminer plus finement ces deux types : une incubation avec un anti-oxydant comme le « Mito-TEMPO » ou le « Trolox » qui permettrait d'aller agir sur la production de ROS. On pourrait ainsi voir si on retarde la détection des type-1 mais également voir si des type-2 sont toujours détectés. Toujours vis-à-vis de la photo-induction, on pourrait envisager d'augmenter la concentration en TMRM qui devrait accroître la production de ROS par voie photochimique et voir les conséquences sur la détection des types.

Si dans la condition contrôle on a pu voir potentiellement l'effet des ROS, via la photo-illumination, sur l'activation du mPTP, dans les deux autres conditions c'est l'effet du calcium sur le mPTP que l'on a essayé de quantifier ainsi que celui de la CsA. Un premier niveau d'analyse concerne les type-3, ou dépolarisations définitives du potentiel de membrane. Si j'ai pu mettre en garde contre le fait qu'une dépolarisation n'est pas toujours à associer au mPTP, plusieurs faisceaux d'indices nous permettent ici d'associer les type-3 à des ouvertures pathologiques du mPTP. En effet, les type-3 sont induits par le calcium et cela va résulter en une perte de l'intégrité physique de la mitochondrie, tous ces effets sont classiquement attribués à l'ouverture pathologique du mPTP, qui collapse le potentiel de membrane et peut provoquer le gonflement de la mitochondrie jusqu'à la rupture de ses membranes. Un autre indice est que tous ces effets sont inhibés par la CsA, inhibiteur spécifique du mPTP (via la cyclophiline D), ce qui confirme son implication dans ces type-3.

Le deuxième niveau d'analyse est vis-à-vis des dépolarisations transitoires de type-1 et 2, pour lesquels l'effet du calcium et de la CsA sont bien différents. Les type-1 se produisant déjà en absence de calcium, il semble que ce phénomène soit sensible à d'autres facteurs comme les ROS. L'apparition progressive des type-2 dans la condition contrôle ou induite par l'ajout de calcium semble montrer que ce phénomène correspond à une stimulation plus importante du mPTP. Tout ceci suggère que l'effet plus ou moins fort de l'inducteur du mPTP va permettre de conditionner son type d'ouverture transitoire ou totale.

En revanche, une autre hypothèse serait que les dépolarisations transitoires de type-1 ou 2 correspondent au même mécanisme, mais d'une amplitude différente. C'est-à-dire que le type-2 serait un type-1 d'amplitude plus profonde. Cette hypothèse est notamment supportée par l'existence de faux positifs entre ces deux types qui obscurcit la frontière entre eux. Cependant tous ces résultats sont préliminaires et d'autres analyses sont à mener pour essayer de répondre à ces questions.

Un point sur lequel j'aimerais insister est que la CsA ne montre pas d'effet d'inhibition sur les dépolarisations transitoires de type 1 et 2, ce qui est contraire aux résultats de Xiyuan Lu et al 2016. Si tout nous laisse penser que le mPTP est bien impliqué au vu de la sensibilité des dépolarisations transitoires au ROS et au calcium, l'absence d'effet de la CsA sur ces

événements suggère un autre mode d'ouverture que celui qu'on retrouve classiquement lors de l'ouverture pathologique, qui est elle inhibée par la CsA.

Par ailleurs, un biais de l'expérience présentée ici est le temps d'acquisition qui est long et peut empêcher (surtout pour le type-1) de caractériser finement ces dépolarisations transitoires. Notamment vis-à-vis d'un paramètre que j'ai mentionné en amont mais que je n'ai pas pu exploiter : l'amplitude de ces dépolarisations.

b) Acquisition courte et caractérisation des dépolarisations transitoires

Dans cette nouvelle expérience, nous avons augmenté la vitesse de prise d'images avec une acquisition toutes les 400 msec. Pour pouvoir descendre en échelle de temps, nous avons réalisé uniquement un suivi du TMRM. En effet le temps d'illumination du NADH est au minimum de 500 msec dans nos conditions d'acquisition ce qui le rend difficilement compatible avec un suivi rapide en plus du TMRM. Une autre difficulté provient du microscope en lui-même, notamment du temps mécanique trop important qui est nécessaire à la roue des filtres pour permettre l'illumination du NADH puis du TMRM mais également au niveau du « shutter » qui permet de couper l'illumination entre deux acquisitions qui ne peut descendre en dessous du temps d'acquisition de 400 msec.

Le principe de cette expérience reste sinon très proche de celle exploitée précédemment. Après 20 minutes de sédimentation, je lance une première acquisition de 3 minutes avec une image toutes les 400 msec. Sept minutes plus tard, soit 30 minutes après dépôt des mitochondries, je change de zone d'acquisition et je lance une deuxième acquisition de 3 minutes. Sept minutes après soit 40 minutes après dépôt, je relance une dernière acquisition de 3 minutes sur une troisième zone. J'ai utilisé les trois mêmes conditions qu'en amont à savoir : en présence des substrats GMS uniquement, en présence des substrats et de calcium à 1 mM et pour finir en présence des substrats, de CsA et de 1 mM de calcium. Ce dernier est injecté juste avant la première acquisition, quant à la CsA, cet inhibiteur est là aussi incubé avec les mitochondries dès le début de l'expérience.

Les résultats présentés dans cette partie correspondent aux toutes dernières analyses réalisées lors de ma thèse et sont donc préliminaires : au vu du temps nécessaire pour traiter les volumes de données générés, je me suis concentré uniquement sur les type-1. Il faudrait ultérieurement poursuivre cette analyse et regarder pour les autres types également.

i. Difficulté de l'analyse des dépolarisations de type-1

L'objectif principal derrière cette augmentation de la fréquence de prise d'images était de pouvoir mieux caractériser le type-1 vis-à-vis du temps de dépolarisation et de l'amplitude des baisses de fluorescence, c'est-à-dire d'obtenir une meilleure résolution temporelle. La figure 28 représente l'amplitude moyenne des type-1 pour les trois conditions aux trois temps d'acquisition. Si on voit que pour le contrôle une légère augmentation est visible, c'est surtout en présence de calcium et de CsA que ces augmentations sont très importantes. Si notre premier réflexe est de conclure à un effet du calcium et de la CsA sur l'ouverture du mPTP, une étude de l'intensité moyenne en fluorescence au début des différentes acquisitions a permis de montrer un biais dont j'ai parlé en amont, celui d'un rééquilibrage de la sonde entre matrice mitochondriale et milieu extérieur.

En effet, l'ajout de calcium a pour effet comme on l'a vu précédemment d'induire la perte irréversible en fluorescence d'un grand nombre de mitochondries, qui conditionne un rééquilibrage du TMRM entre compartiments. Si à 20 minutes l'intensité moyenne de fluorescence est identique dans les trois conditions, à 30 minutes on voit une augmentation très importante pour la condition en présence de calcium et de CsA qui est corrélée avec un nombre de mitochondries plus faible (données non montrées). Ce biais indique que cette augmentation de l'amplitude moyenne des dépolarisations n'est pas due à un effet du calcium et de la CsA sur les ouvertures transitoires du mPTP, mais simplement qu'en modulant le nombre de mitochondries détectées, cela affecte l'équilibre du TMRM. Plus de sonde doit être présente dans les mitochondries restantes qui, au moment d'une ouverture transitoire du mPTP, va sortir en modifiant l'amplitude mesurée. Pour limiter ce biais il faudrait trouver un facteur de normalisation qui permettrait de prendre en compte ce rééquilibrage de la sonde pour pouvoir, par la suite, comparer ces résultats entre eux.

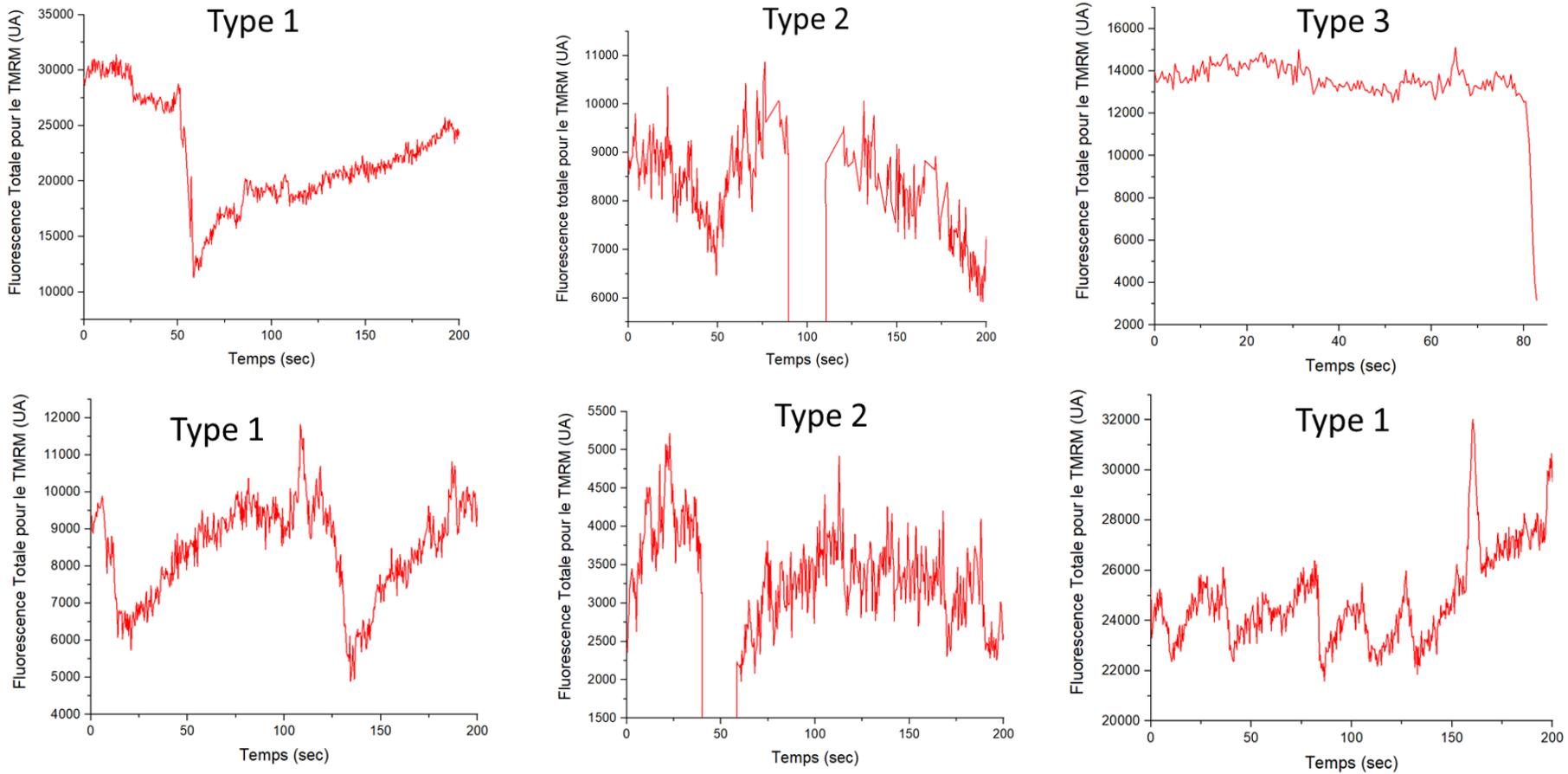


Figure 28 : Exemples de dépolarisations transitoires ou définitives observées via le TMRM lors d'une acquisition courte (200 sec).

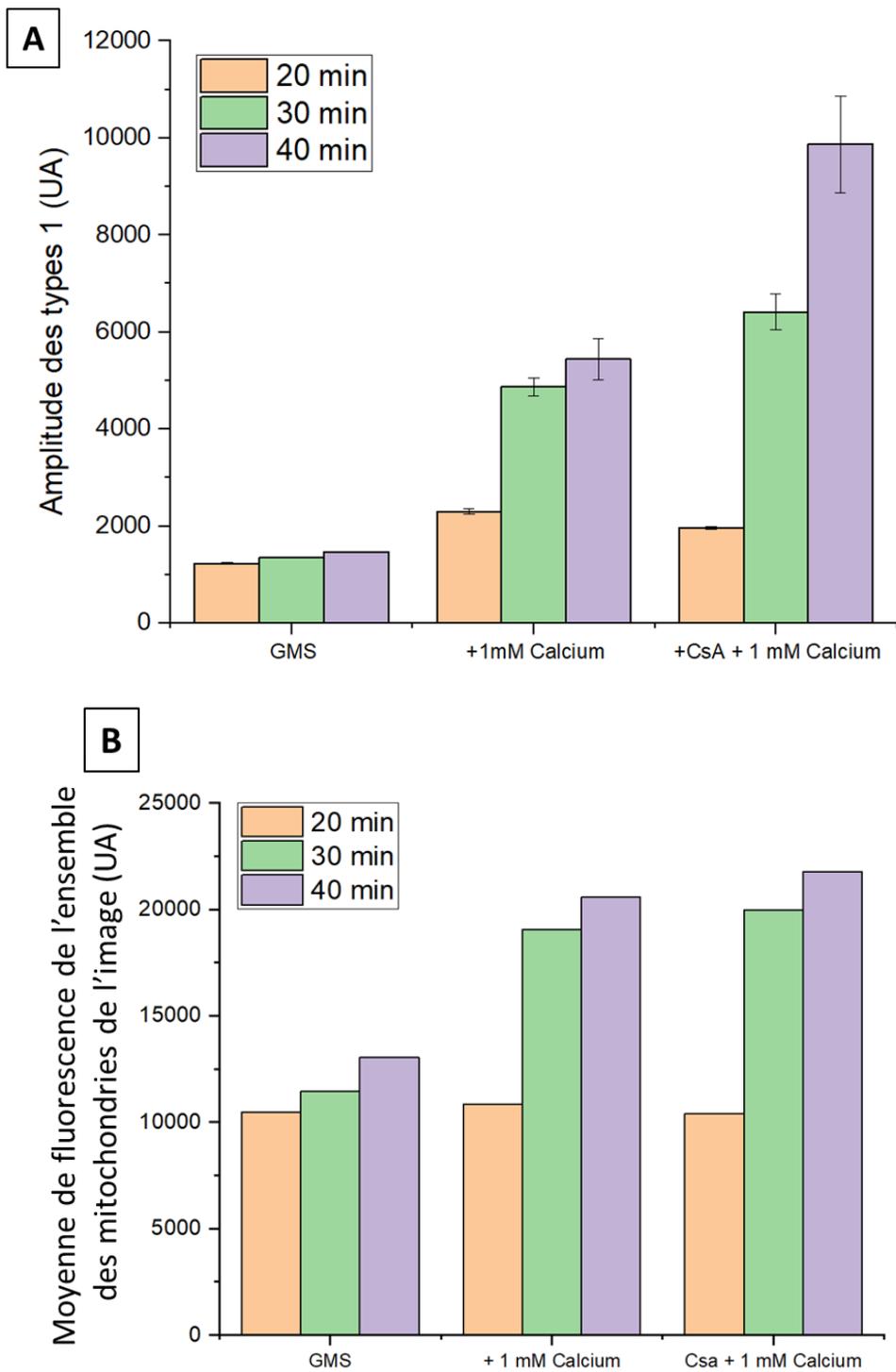


Figure 29 : Première caractérisation des dépolarisations transitoires de type-1 détectées par le suivi en TMRM avec une fréquence d'acquisition élevée. A) Amplitude des dépolarisations transitoires pour chaque condition aux différents temps d'acquisition. B) Intensité moyenne de l'ensemble des mitochondries au début de chaque acquisition : à 20, 30 et 40 minutes après dépôt des mitochondries sur la lamelle de verre.

Un autre problème potentiel lié à ce rééquilibrage est que si la quantité de sonde ajoutée est présente au sein des mitochondries, cela peut provoquer plus de photo stimulation du TMRM sur le mPTP, d'autant plus qu'ici l'acquisition est très rapide amplifiant ce phénomène, cela peut mettre à mal l'équilibre entre les systèmes antioxydants (SOD, catalase, peroxydases, peroxyredoxines) de la mitochondrie et la production de ROS.

ii. Première caractérisation des amplitudes des dépolarisations (de type-1) pour la condition contrôle

Si la présence de calcium modifie trop profondément le système d'analyse, dans cette partie je me suis intéressé à comparer les résultats de la condition contrôle uniquement. Pour cela j'ai comparé l'amplitude moyenne et la largeur à mi-hauteur pour les expériences avec des acquisitions longue et courte.

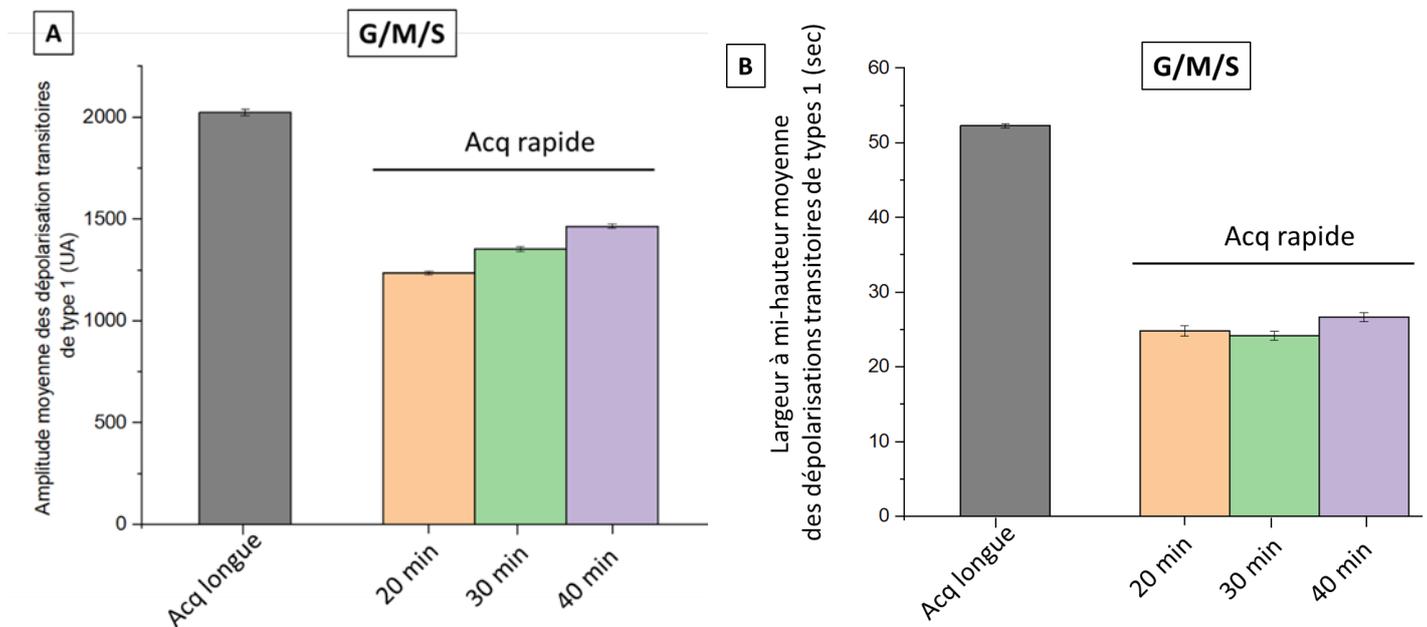


Figure 30 : Première caractérisation des type-1 détectés par le suivi en TMRM des mitochondries individuelles pour une acquisition longue (en gris) et une acquisition courte (en orange, vert et violet). A) Comparaison de l'amplitude moyenne. B) Comparaison des largeurs à mi-hauteur.

Pour ces deux paramètres, la tendance est la même, avec une valeur pour l'analyse en acquisition longue qui est plus importante que celle mesurée avec une acquisition courte. Cela semble montrer également une corrélation entre l'amplitude des dépolarisations et leur largeur à mi-hauteur. Mais surtout, cela montre que l'augmentation de la vitesse de prise d'images a un réel impact sur le phénomène, car cela diminue son amplitude et sa largeur à mi-hauteur tout en augmentant sa fréquence d'un facteur 4 environ, à savoir : 0,15 nombre de type1/mitochondrie/min pour l'acquisition courte à 20 minutes contre 0,04 en acquisition longue.

iii. Effet photo toxique d'une acquisition courte

Si on a pu voir dans la partie précédente que l'illumination a un effet sur les événements de type-1, il est normal de considérer que cela va impacter d'autres paramètres comme les type-3 et donc le nombre de mitochondries. Dans la figure 31A est représentée l'évolution relative du nombre de mitochondries pour la condition contrôle aux différents temps d'acquisition rapides comparé avec l'expérience en acquisition longue pour la même période de temps. On peut ainsi voir la baisse très rapide du nombre relatif de mitochondries lié à l'acquisition rapide en comparaison avec l'acquisition longue. La figure 31B indique le temps qu'il a été nécessaire pour perdre 35% de la population mitochondriale.

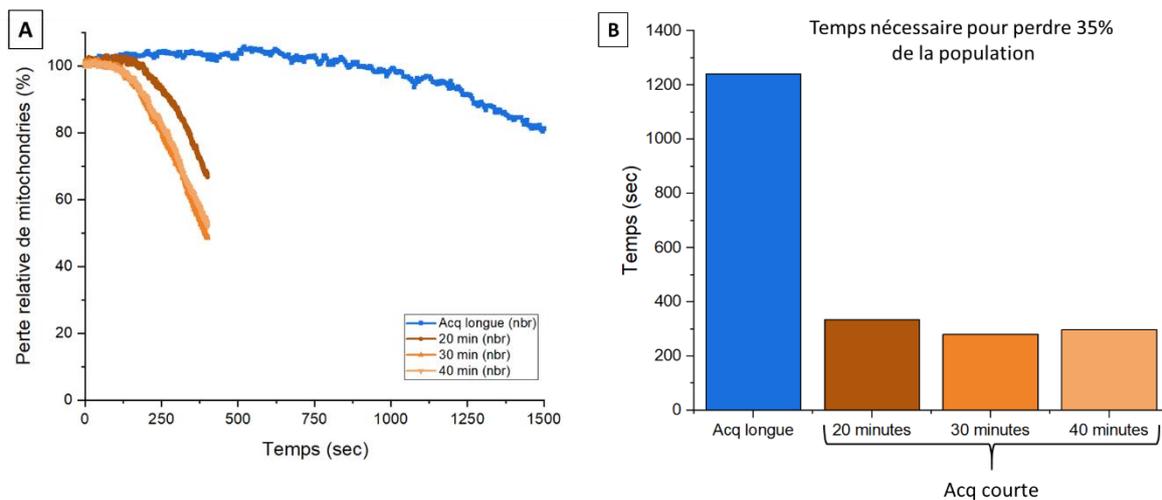


Figure 31 : Effet photo-toxique lié au temps d'acquisition avec la sonde TMRM (10 nM) sur le suivi du nombre de mitochondries détectées. A) Perte relative du nombre de mitochondries détectées en TMRM au cours du temps pour une acquisition courte (une image toutes les 400 msec) et une acquisition longue (une image toutes les 5 sec). B) Temps nécessaire pour perdre 35% de la population mitochondriale pour les deux conditions mentionnées.

Cette analyse préliminaire d'une expérience avec une acquisition courte montre des effets très importants sur les mitochondries, car cela affecte la cinétique d'apparition des type-1 et leur fréquence mais également les type-3, conduisant plus de mitochondries vers une ouverture pathologique du mPTP. Tout ceci montre la complexité de trouver de bonnes conditions pour observer et essayer de caractériser les ouvertures du mPTP puisqu'il est sensible à de nombreux facteurs.

c) Conclusions et perspectives

Pour conclure ce chapitre je souhaite dans un premier temps discuter de la méthode d'analyse développée avant de discuter des conclusions biologiques. A travers ce chapitre nous avons pu voir une autre application de cette méthode décrite dans le chapitre I, qui a permis ici de suivre finement les variations globales de la population mitochondriale mais également les variations individuelles répondant ainsi aux objectifs fixés. Cette même méthode pourrait être utilisée à la suite de cette étude pour caractériser notamment d'autres régulateurs que le calcium ou la CsA. L'approche informatique pourrait également être implémentée d'autres fonctions par exemple en facilitant la reconnaissance d'une même mitochondrie pour plusieurs longueurs d'ondes car si nous avons ici travaillé presque exclusivement avec le suivi du TMRM, il semble évident pour répondre aux questions soulevées dans cette étude qu'il faille suivre d'autres paramètres comme les flux de calcium.

En revanche, cette méthode présente des biais dont il faut être conscient pour mieux les appréhender. Tout d'abord, le choix de la concentration en TMRM est le premier paramètre à définir. Même si nous avons fait le choix d'une concentration faible (10 nM) cela semble suffisant pour « photo-induire » des ROS sur des échelles de temps longues, et potentiellement activer l'ouverture transitoire du mPTP. Des essais avec une concentration plus faible seraient à faire mais seulement pour un suivi des mitochondries en présence des substrats, car l'ajout de calcium modifie le nombre de mitochondries polarisées et modifie potentiellement l'équilibrage de la sonde entre la solution et la matrice des mitochondries restantes, et plus la concentration en TMRM sera faible, plus nous détecterons ce phénomène. Le choix de la concentration en calcium est aussi important et si nous avons essayé la concentration de 1 mM dans cette étude, d'autres essais seraient à réaliser pour trouver le seuil limitant les effets néfastes sur les mitochondries, à savoir une activation forte des ouvertures pathologiques (type-3), tout en observant des ouvertures transitoires.

Pour visualiser les effets du calcium, je préconiserais d'augmenter la concentration en TMRM voire même d'essayer sa mise en œuvre en mode « quenching ». Cependant, il faut que la vitesse d'acquisition soit lente. En effet ce paramètre est très important car plus la vitesse d'acquisition est élevée, plus cela risque de « photo-induire » des ROS, d'autant plus si la concentration en TMRM est importante. Des expériences avec une incubation des

mitochondries avec des anti-radicalaires comme le « MitoTempo » ou le « Trolox » seraient intéressantes à réaliser. Une autre solution serait de préconiser les substrats du complexe I (glutamate et malate) qui induisent la plus faible production physiologique de ROS, mesurée pour 0.1 nmol/min/mg à l'état substrat GM.

En ce qui concerne le mPTP, de nombreuses conclusions sont à faire : le premier objectif était de confirmer les résultats trouvés dans la littérature concernant l'ouverture pathologique ou dépolarisations définitives (type-3), la méthode présentée ici a permis de les détecter au niveau de la population entière ou de la mitochondrie individuelle. Cette approche constitue donc une alternative aux autres méthodes classiques de détection. Pour ce qui est de sa modulation, nous avons pu confirmer que ce mode d'ouverture du mPTP est activé par le calcium, soit au moment de son ajout, soit étonnamment 10 minutes après en provoquant une deuxième vague d'ouvertures pathologiques « synchronisées ». Ce mode d'ouverture est inhibé par la CsA, car son incubation permet de protéger les mitochondries de l'effet lié à l'ajout de calcium, en revanche la CsA n'inhibe pas la deuxième vague d'ouverture observée. Une hypothèse pour expliquer cela étant que l'exposition trop longue des mitochondries au calcium fini par dépasser l'effet protecteur de la cyclosporine A et déclencher l'ouverture du pore.

En revanche, l'originalité du travail présenté ici est que nous avons observé des dépolarisations transitoires, ce qui était l'objectif principal de cette étude, et que nous avons commencé à caractériser. Pour cela, nous avons créé de nouveaux outils de détection et avons détecté deux types de dépolarisations transitoires, qui diffèrent par leur forme et leur amplitude. Pour l'instant, nous n'avons pas assez de résultats expérimentaux qui permettent de conclure si un même mécanisme est en jeu pour ces deux types ou si ce sont deux phénomènes différents. Cependant, leur temporalité d'apparition est différente, le type-1 apparaissant avant le type-2. Leur modulation par le calcium diffère également, le type-1 est très peu détecté après injection du calcium au contraire du type-2. Tout ceci peut suggérer que ce sont deux mécanismes différents. En revanche, certaines dépolarisations transitoires ont une forme qui se rapproche des type-1 et 2 (faux-positif), ce qui peut suggérer qu'un seul mécanisme est en jeu.

Pour ce qui est de leur temps moyen de dépolarisation, les deux types de dépolarisations transitoires présentent un temps supérieur à celui d'un battement cardiaque, les rendant difficilement compatibles avec le modèle 2 présenté dans l'introduction générale et notre hypothèse de travail. La présence en continu du calcium et l'absence d'une « vague » calcique peut modifier la cinétique d'ouverture. Au même titre, l'absence de l'environnement cellulaire peut également influencer. Un point important est que dans les deux cas l'incubation avec de la CsA n'a montré aucun pouvoir inhibant, ce qui suggère que ces ouvertures transitoires correspondent à un mécanisme différent de celui impliqué dans les ouvertures

pathologiques. Au contraire, en inhibant les ouvertures pathologiques, la CsA permet de détecter plus de dépolarisation transitoire. Les résultats obtenus dans ce chapitre sont préliminaires et d'autres études seraient à réaliser pour aller plus loin dans la caractérisation de ces évènements. Notamment, de nouveaux modulateurs du mPTP pourraient être testés, comme le C-ATR ou encore une exposition à des ROS comme le peroxyde d'hydrogène.

De nombreuses perspectives de ce travail existent, mais selon moi la prochaine étape indispensable à la suite de ce projet est de pouvoir suivre les flux de calcium en microscopie notamment avec la sonde « Fura-4 » pour pouvoir corrélérer les cinétiques des flux de calcium avec ceux des dépolarisations transitoires par le TMRM. Cela permettrait de discriminer les dépolarisations transitoires après injection, qui sont liées à l'entrée de calcium dans la mitochondrie, et celles liées aux ouvertures transitoires du mPTP. Une contrainte technique existe pour réaliser cette double mesure, il y a un chevauchement des spectres d'excitation de ces deux sondes. Il faut donc être très prudent quant aux choix des filtres utilisés. Une solution serait de passer en microscopie confocale, qui par le biais des lasers permet d'exciter à une longueur d'onde précise, mais dont la sensibilité est plus faible. Une perspective à plus long terme serait de travailler sur cellule entière, un cardiomyocyte, comme dans l'étude de Xiyuan Lu et al 2016.

Bibliographie

Baines, Christopher P., et al. « Voltage-Dependent Anion Channels Are Dispensable for Mitochondrial-Dependent Cell Death ». *Nature Cell Biology*, vol. 9, n° 5, mai 2007, p. 550-55. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/ncb1575.

Bonora, Massimo, et Paolo Pinton. « The Mitochondrial Permeability Transition Pore and Cancer: Molecular Mechanisms Involved in Cell Death ». *Frontiers in Oncology*, vol. 4, novembre 2014. DOI.org (Crossref), doi:10.3389/fonc.2014.00302.

Chinopoulos, Christos. « Mitochondrial Permeability Transition Pore: Back to the Drawing Board ». *Neurochemistry International*, vol. 117, juillet 2018, p. 49-54. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.neuint.2017.06.010.

Crofts, Ar, et Jb Chappell. « CALCIUM ION ACCUMULATION AND VOLUME CHANGES OF ISOLATED LIVER MITOCHONDRIA. REVERSAL OF CALCIUM ION-INDUCED SWELLING ». *Biochemical Journal*, vol. 95, n° 2, mai 1965, p. 387-92. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj0950387.

Elrod, John W., et al. « Cyclophilin D Controls Mitochondrial Pore-Dependent Ca²⁺ Exchange, Metabolic Flexibility, and Propensity for Heart Failure in Mice ». *Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, n° 10, octobre 2010, p. 3680-87. DOI.org (Crossref), doi:10.1172/JCI43171.

Elrod, John W., et Jeffery D. Molkenin. « Physiologic Functions of Cyclophilin D and the Mitochondrial Permeability Transition Pore ». *Circulation Journal*, vol. 77, n° 5, 2013, p. 1111-22. DOI.org (Crossref), doi:10.1253/circj.CJ-13-0321.

Orban, J., Fontaine, E., Cassuto, E. et al. Effects of cyclosporine A pretreatment of deceased organ donors on kidney graft function (Cis-A-rein): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 19, 231 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13063-018-2597-4>.

Giorgio, Valentina, et al. « Cyclophilin D Modulates Mitochondrial F₀F₁-ATP Synthase by Interacting with the Lateral Stalk of the Complex ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, n° 49, décembre 2009, p. 33982-88. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.M109.020115.

Giorgio, V., et al. « Dimers of Mitochondrial ATP Synthase Form the Permeability Transition Pore ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 110, n° 15, avril 2013, p. 5887-92. DOI.org (Crossref), doi:10.1073/pnas.1217823110.

Griffiths, Elinor J. « Species Dependence of Mitochondrial Calcium Transients during Excitation-Contraction Coupling in Isolated Cardiomyocytes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 263, n° 2, septembre 1999, p. 554-59. DOI.org (Crossref), doi:10.1006/bbrc.1999.1311.

Hackenbrock, Charles R., et Arnold I. Caplan. « ION-INDUCED ULTRASTRUCTURAL TRANSFORMATIONS IN ISOLATED MITOCHONDRIA ». *The Journal of Cell Biology*, vol. 42, n° 1, juillet 1969, p. 221-34. DOI.org (Crossref), doi:10.1083/jcb.42.1.221.

Halestrap, Andrew P. « A Pore Way to Die: The Role of Mitochondria in Reperfusion Injury and Cardioprotection ». *Biochemical Society Transactions*, vol. 38, n° 4, août 2010, p. 841-60. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/BST0380841.

He, Jiuya, et al. « Persistence of the Mitochondrial Permeability Transition in the Absence of Subunit c of Human ATP Synthase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, n° 13, mars 2017, p. 3409-14. DOI.org (Crossref), doi:10.1073/pnas.1702357114.

Hunter, Douglas Ralph et al. "Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria." *The Journal of biological chemistry* 251 16 (1976): 5069-77.

Hurst, Stephen, et al. « Mitochondrial Ca²⁺ and Regulation of the Permeability Transition Pore ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 49, n° 1, février 2017, p. 27-47. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s10863-016-9672-x.

HÜSER, J., & BLATTER, L. A. (1999). Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochemical Journal*, 343(2), 311–317. doi:10.1042/bj3430311

- Ichas, François, et al. « Mitochondria Are Excitable Organelles Capable of Generating and Conveying Electrical and Calcium Signals ». *Cell*, vol. 89, n° 7, juin 1997, p. 1145-53. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0092-8674(00)80301-3.
- Izzo, Valentina, et al. « Mitochondrial Permeability Transition: New Findings and Persisting Uncertainties ». *Trends in Cell Biology*, vol. 26, n° 9, septembre 2016, p. 655-67. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.tcb.2016.04.006.
- Javadov, Sabzali, et Morris Karmazyn. « Mitochondrial Permeability Transition Pore Opening as an Endpoint to Initiate Cell Death and as a Putative Target for Cardioprotection ». *Cellular Physiology and Biochemistry*, vol. 20, n° 1-4, 2007, p. 1-22. DOI.org (Crossref), doi:10.1159/000103747.
- Jonas, Elizabeth A., et al. « Cell Death Disguised: The Mitochondrial Permeability Transition Pore as the c-Subunit of the F1FO ATP Synthase ». *Pharmacological Research*, vol. 99, septembre 2015, p. 382-92. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.phrs.2015.04.013.
- Kinnally, Kathleen W., et al. « Is MPTP the Gatekeeper for Necrosis, Apoptosis, or Both? » *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, vol. 1813, n° 4, avril 2011, p. 616-22. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbamcr.2010.09.013.
- Kokoszka, Jason E., et al. « The ADP/ATP Translocator Is Not Essential for the Mitochondrial Permeability Transition Pore ». *Nature*, vol. 427, n° 6973, janvier 2004, p. 461-65. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nature02229.
- Korge, Paavo, et al. « Protective Role of Transient Pore Openings in Calcium Handling by Cardiac Mitochondria ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, n° 40, octobre 2011, p. 34851-57. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.M111.239921.
- Leducq, Nathalie, et al. « Mitochondrial Permeability Transition during Hypothermic to Normothermic Reperfusion in Rat Liver Demonstrated by the Protective Effect of Cyclosporin A ». *Biochemical Journal*, vol. 336, n° 2, décembre 1998, p. 501-06. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj3360501.
- Leducq, N., et al. « Mitochondrial and Energetic Dysfunctions of the Liver during Normothermic Reperfusion: Protective Effect of Cyclosporine and Role of the Mitochondrial Permeability Transition Pore ». *Transplantation Proceedings*, vol. 32, n° 2, mars 2000, p. 479-80. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0041-1345(00)00822-8.
- Leung, Anna W. C., et al. « The Mitochondrial Phosphate Carrier Interacts with Cyclophilin D and May Play a Key Role in the Permeability Transition ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, n° 39, septembre 2008, p. 26312-23. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.M805235200.
- Lesnefsky, Edward J., et al. « Mitochondrial Dysfunction in Cardiac Disease: Ischemia–Reperfusion, Aging, and Heart Failure ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 33, n° 6, juin 2001, p. 1065-89. DOI.org (Crossref), doi:10.1006/jmcc.2001.1378.
- Lu, Xiyuan, et al. « Individual Cardiac Mitochondria Undergo Rare Transient Permeability Transition Pore Openings Novelty and Significance ». *Circulation research*, vol. 118, n° 5, 2016, p. 834–841.
- Miyata, H., et al. « Measurement of Mitochondrial Free Ca²⁺ Concentration in Living Single Rat Cardiac Myocytes ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 261, n° 4, octobre 1991, p. H1123-34. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpheart.1991.261.4.H1123.
- Mnatsakanyan, Nelli, et al. « Physiological Roles of the Mitochondrial Permeability Transition Pore ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 49, n° 1, février 2017, p. 13-25. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s10863-016-9652-1.
- Nakagawa, Takashi, et al. « Cyclophilin D-Dependent Mitochondrial Permeability Transition Regulates Some Necrotic but Not Apoptotic Cell Death ». *Nature*, vol. 434, n° 7033, mars 2005, p. 652-58. DOI.org (Crossref), doi:10.1038/nature03317.
- Paradies, Giuseppe, et al. « Mitochondrial Bioenergetics and Cardiolipin Alterations in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury: Implications for Pharmacological Cardioprotection ». *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 315, n° 5, novembre 2018, p. H1341-52. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpheart.00028.2018.

Partownavid, Parisa, et al. « Fatty-Acid Oxidation and Calcium Homeostasis Are Involved in the Rescue of Bupivacaine-Induced Cardiotoxicity by Lipid Emulsion in Rats* »: *Critical Care Medicine*, vol. 40, n° 8, août 2012, p. 2431-37. DOI.org (Crossref), doi:10.1097/CCM.0b013e3182544f48.

Petit, Patrice X., et al. « Disruption of the Outer Mitochondrial Membrane as a Result of Large Amplitude Swelling: The Impact of Irreversible Permeability Transition ». *FEBS Letters*, vol. 426, n° 1, avril 1998, p. 111-16. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0014-5793(98)00318-4.

Rao, Valasani Koteswara, et al. « Mitochondrial Permeability Transition Pore Is a Potential Drug Target for Neurodegeneration ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1842, n° 8, août 2014, p. 1267-72. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbadis.2013.09.003.

Ruprecht, Jonathan J et al. "The Molecular Mechanism of Transport by the Mitochondrial ADP/ATP Carrier." *Cell* vol. 176,3 (2019): 435-447.e15. doi:10.1016/j.cell.2018.11.025.

Sokolova, Niina, et al. « ADP Protects Cardiac Mitochondria under Severe Oxidative Stress ». *PLoS ONE*, édité par Salvatore V Pizzo, vol. 8, n° 12, décembre 2013, p. e83214. DOI.org (Crossref), doi:10.1371/journal.pone.0083214.

Wei-LaPierre, Lan, et Robert T. Dirksen. « Isolating a Reverse-Mode ATP Synthase–Dependent Mechanism of Mitoflash Activation ». *Journal of General Physiology*, vol. 151, n° 6, juin 2019, p. 708-13. DOI.org (Crossref), doi:10.1085/jgp.201912358.

Xia, Z., et al. « Myocardial Ischaemia Reperfusion Injury: The Challenge of Translating Ischaemic and Anaesthetic Protection from Animal Models to Humans ». *British Journal of Anaesthesia*, vol. 117, 2016, p. ii44-62. DOI.org (Crossref), doi:10.1093/bja/aew267.

|

CHAPITRE III : SUIVI DU TAUX DE
REDUCTION DES QUINONES PAR
ELECTROCHIMIE, EN ASSOCIATION
AVEC L'OXYGRAPHIE

CHAPITRE III

I. Introduction : Les quinones mitochondriales

a) Définition et différents types

Si j'ai déjà pu parler de la chaîne respiratoire dans l'introduction générale, je vais dans ce chapitre m'intéresser particulièrement aux quinones (ou benzoquinones) qui servent de médiateur rédox dans la CR. D'un point de vue chimique, une quinone est définie comme : « une structure aromatique de type diène dans laquelle deux atomes d'hydrogène du noyau sont remplacés par deux atomes d'oxygène ». On retrouve principalement deux grands types de quinones : la 1,2- benzoquinone et la 1,4- benzoquinone (figure 1). C'est cette dernière qui va nous intéresser car c'est sous cette forme que l'on va le plus les retrouver dans les mitochondries (mammifères et mitochondries de plantes) et la bactérie (figure 2).

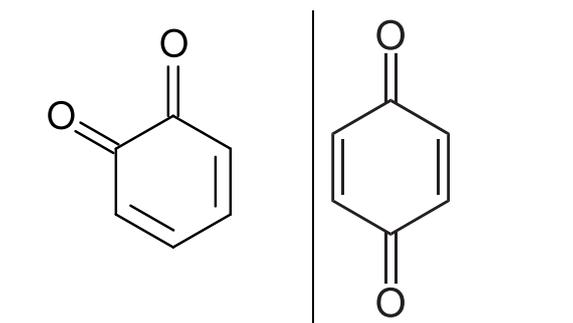


Figure 1 : Schéma des principales formes de benzoquinones naturelles.

En fonction des règnes on retrouve différentes formes de ces benzoquinones, chez les mammifères c'est principalement l'ubiquinone alors que dans le règne végétal, c'est majoritairement la plastoquinone associée à la photosynthèse. Celle-ci va différer de l'ubiquinone par la longueur de la chaîne latérale isoprénoïde, le remplacement des groupes méthoxy par des groupes méthyle et l'élimination du groupe méthyle en position 2. Dans les bactéries on peut trouver des menaquinones, notamment dans les bactéries intestinales chez l'homme (qui est une quinone dérivant du naphthalène, figure 2).

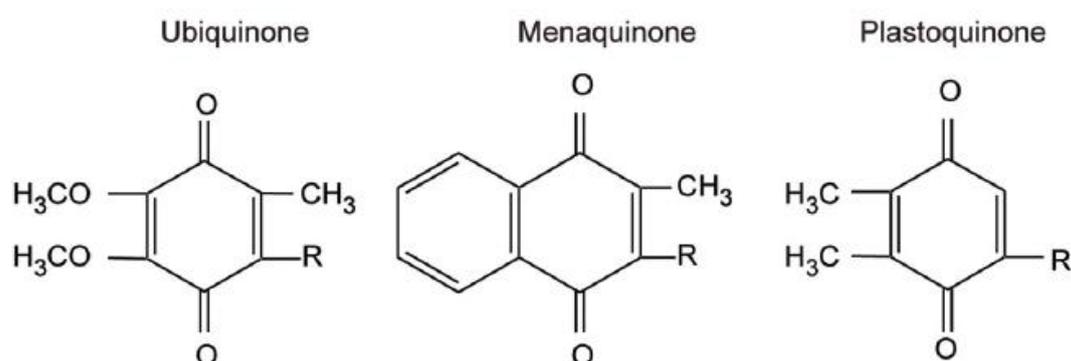


Figure 2 : Schéma des différentes formules de quinones retrouvées dans les différents règnes. Nicholls, David G., et Stuart J. Ferguson. Bioenergetics. 2013.

En fonction des mammifères on va là encore retrouver différentes formes d'ubiquinone (ou co-enzyme) qui vont varier selon la longueur de leurs chaînes latérales. C'est la co-enzyme Q10 que l'on retrouve majoritairement chez l'homme (Achim Lass et al 1997) avec une chaîne latérale contenant 10 unités isoprénoides (figure 3). Chez le rat et la souris, c'est principalement la co-enzyme Q₉ qui est présente au sein des mitochondries, et qui va être notre cible ici (Achim Lass et al 1999, table 1). Nous allons également dans ce chapitre porter un intérêt particulier à la co-enzyme Q₂.

Species	Coenzyme Q		
	CoQ ₉	CoQ ₁₀	CoQ ₉ + CoQ ₁₀
	<i>nmol/mg mitochondrial protein</i>		
Mouse	6.0 ± .04	0.72 ± .04	6.72
Rat	5.2 ± .11	0.63 ± .02	5.83
Guinea pig	1.9 ± .006	1.7 ± .02	3.6
Rabbit	0.11 ± .01	4.8 ± .10	4.91
Pig	0.19 ± .007	4.8 ± .04	4.99
Goat	0.25 ± .03	6.2 ± .05	6.45
Sheep	0.15 ± .01	6.3 ± .11	6.45
Cow	0.11 ± .006	6.5 ± .18	6.51
Horse	0.17 ± .01	6.6 ± .08	6.77

Values are average ± S.E. of three determinations.

Tableau 1 : Comparaison de la quantité de coenzyme Q₉ et Q₁₀ extraite de mitochondries cardiaques de neuf mammifères. Résultats issus de Achim Lass et al 1999.

Cette longueur variable de chaîne a un véritable impact sur les propriétés physico-chimiques des quinones car plus cette chaîne est longue, plus cela la rend hydrophobe. Pour comparaison, la Q_{10} a un coefficient du Logarithme de partition eau/membrane de $\log P=10$ (Lucangioli S et al 2012) contre $\log P=4$ pour la Q_2 (Fato et al 1996). La Q_{10} est donc très hydrophobe là où la Q_2 l'est moins. De par cette hydrophobicité les quinones peuvent se retrouver sous trois formes dans une solution aqueuse : sous forme d'agrégats formant des micelles, dissous dans une membrane lipidique et/ou liée à des protéines. Cependant, dans une cellule, seules les deux dernières formes sont retrouvées.

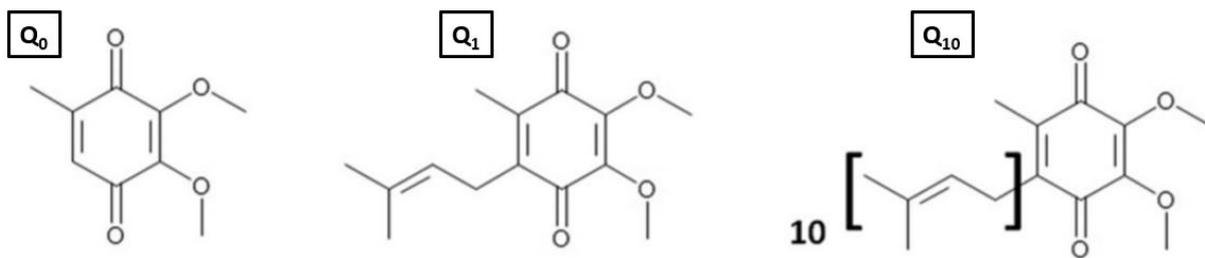


Figure 3 : Différentes formes de co-enzymes Q (Q_0 , Q_1 et Q_{10} respectivement) qui varient en fonction de la longueur de leur chaîne isoprénoïde. Schéma issu de Rubin Gulaboski et al 2016.

b) Rôle dans la CR

Comme je l'ai mentionné dans l'introduction générale, les quinones sont localisées dans la phase lipidique de la membrane interne mitochondriale et servent de médiateur rédox entre les complexes I, II et d'autres déshydrogénases (G3PDH mitochondriale, l'ETFQ etc...), qui vont les réduire, et le complexe III qui va les oxyder (cf introduction générale). De par le transfert d'électrons, de nombreuses études montrent l'implication des quinones dans la production mitochondriale des ROS (Turrens Julio F et al 1985) mais également comme antioxydants (Takayanagi R et al 1980, James Andrew M et al 2004).

Les quinones au sein de la CR peuvent exister sous trois formes rédox : une forme oxydée (« ubiquinone »), une forme semi-réduite (« ubisemiquinone ») et une forme réduite (« quinol »). Pour passer de la forme oxydée à la forme réduite, cela va nécessiter le transfert de deux électrons et de deux protons, ayant lieu en deux étapes (figure 4).

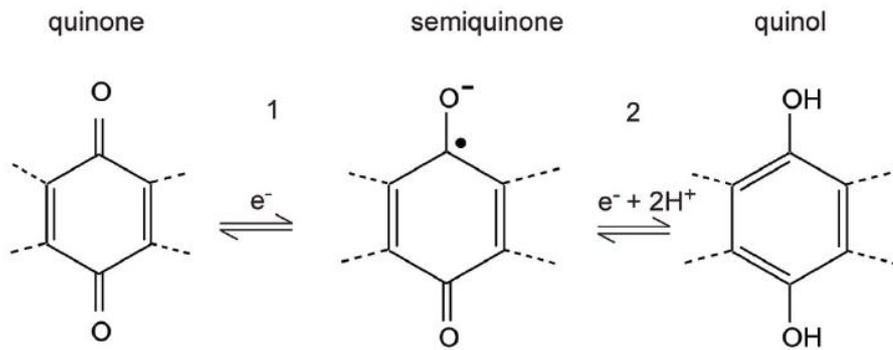


Figure 4 : Processus en deux étapes d'oxydo-réduction d'une quinone, par exemple au sein de la chaîne respiratoire. Figure issue de Nicholls David G et Stuart J Ferguson Bioenergetics 2013.

Une étude réalisée (Achim Lass et al 1999) sur des cœurs de cinq mammifères a montré que c'était principalement la forme libre de la quinone qui était majoritairement détectée, que ce soit pour la Q_9 ou la Q_{10} avec au maximum 20% des quinones liées à des protéines (chez le bœuf). Les quantités totales de quinones, par exemple de Q_{10} dans le cœur de bœuf, sont estimées entre 3,4 et 6,5 nmoles de Q_{10} /mg de protéines totales (tableau 1, Blair et al 1963).

Par ailleurs si on considère une stoechiométrie 1:1 de liaison entre une quinone et le complexe III de la CR cela représente un total de 0,35 nmol/mg (Lenaz et al 2007), la quantité totale de quinone étant au minimum supérieure à 3 nmol/mg cela veut dire que plus de 80% des quinones sont sous la forme libre (Battino Maurizio, et al 1990) et donc qu'une faible fraction de ces quinones est liée aux protéines mitochondriales (dont les différents complexes), les quinones sont donc en large excès vis-à-vis des autres complexes de la CR et peuvent donc servir de médiateur chimique dans la CR.

		Quinone	Log P	Qt Quinones	% quinones liées	Qt CI	Qt CII	Qt CIII	Références
Rat	Muscle	Q9		2480 ± 184	/	/	32 ± 2,6	121 ± 8,5	G Benard et al 2008
	Foie			1877 ± 97	/	/	16 ± 1,9	43 ± 2,4	G Benard et al 2008
				/	/	14	27	41	Hackenbrock Cr et al 1986
				/	/	/	/	78	Schwerzmann K et al 1986
	Cœur			5180 ± 100	12,3 ± 5	/	/	/	A Lass et al 1999
Bœuf	Cœur	Q10	10	6510 ± 200	23,8 ± 0,5	/	/	/	A Lass et al 1999
				[6000-8000]	/	[6-13]	190	[250-530]	Capaldi RA et al 1982
				/	/	80	110	300	Takemori, S., et T. E. King, 1964
				[3400-4000]	/	/	200	340	Green DE et al 1966

Table 2 : Tableau récapitulatif du type de quinone majoritaire, de son coefficient de partition et des quantités des différents complexes retrouvées dans les mitochondries issues de différents tissus du rat et du bœuf. Quantités données en pmol/mg.

c) Théories du transport d'électrons dans la chaîne respiratoire

Historiquement, deux modèles ont été avancés par la communauté scientifique pour le transport des électrons via les quinones entre les différents éléments de la CR : le premier modèle dit diffusionnel (« random collision »), et le deuxième modèle des supercomplexes (« solid state electron channeling »).

i. *Modèle diffusionnel*

Dans cette première théorie, les quinones sont libres et diffusent dans la membrane interne mitochondriale pour interagir avec les différents complexes de la CR, où elles seront réduites par les complexes I et II et oxydées par le complexe III. Leur déplacement (sous la forme oxydée ou réduite) au sein de la membrane interne serait donc aléatoire (diffusion).

Ce modèle est soutenu par plusieurs arguments comme la vitesse de diffusion de Q₁₀ qui est estimée à 10⁻⁶ cm²/s par les travaux de Fato et al 1986. La même équipe estime d'ailleurs que cette vitesse est suffisamment rapide pour que la quinone ne soit pas limitante cinétiquement (Lenaz et al 1999). Autre argument, un marquage avec des anticorps dirigés contre les complexes III et IV ne montre pas leur colocalisation, ce qui sous-entend une distribution aléatoire des complexes dans la membrane interne (Hochli and Hackenbrock 1975).

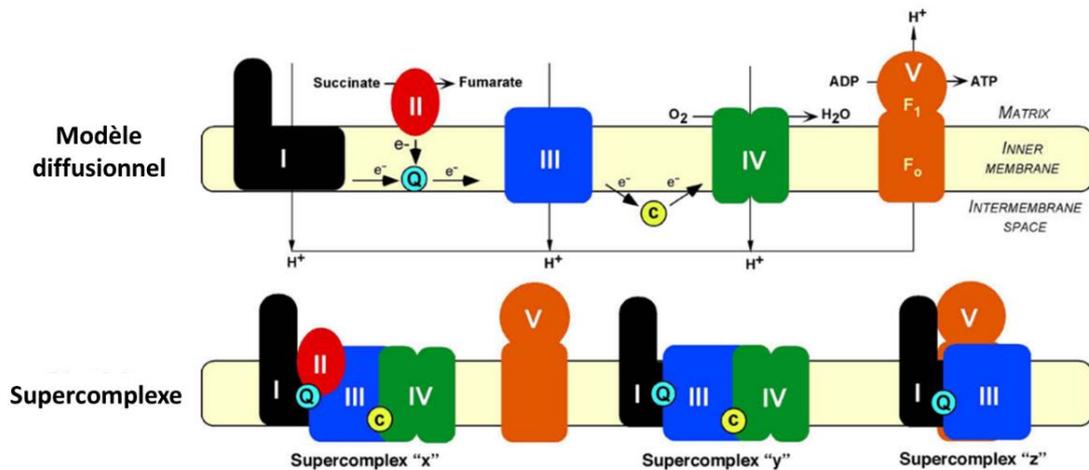


Figure 5 : Schémas des différents modèles de transport des électrons dans la chaîne respiratoire. Schéma issu de Eric A Schon et al 2009.

ii. Supercomplexes

Ce deuxième modèle est apparu avec la démonstration dans les années 2000 que des supercomplexes de la CR existent (Cruciat et al 2000, Schägger 2001), c'est-à-dire un assemblage de différents complexes qui peut comprendre également les médiateurs rédox. Le supercomplexe le plus représenté au niveau cardiaque est le « respiratosome » qui est composé au minimum du complexe I (85% de celui-ci étant lié à un supercomplexe, Schägger H et al 2001), d'un dimère du complexe III avec en son centre une quinone (Judy Hirst, 2018), et du complexe IV. Ce « blocage spatial » de la quinone change le transport d'électron qui peut ici avoir lieu par échange direct et non plus de façon diffusionnelle.

En revanche de nombreuses autres formes de ce même supercomplexe existent, elles peuvent comprendre : l'ATP synthétase, les complexes II etc ... D'autres types de supercomplexes ont été également décrits à partir des complexes II et III etc ... (Yu et Yu 1974 ; Zhang et al 2002).

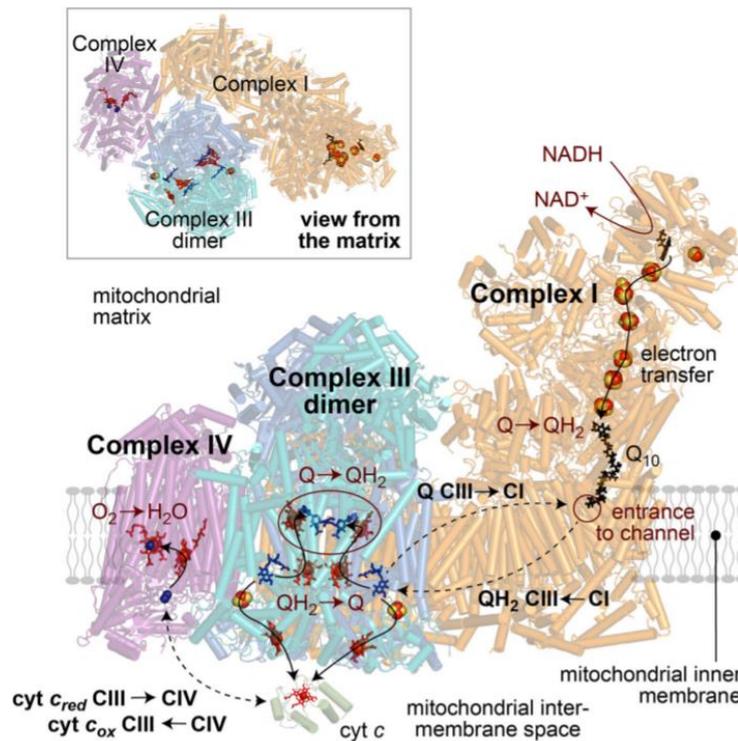


Figure 6 : Représentation de la structure du respiratosome et du transport d'électrons par les quinones en son sein. Image issue de Judy Hirst, 2018.

Il n'est donc pas exclu que les deux modèles cités plus haut fonctionnent simultanément dans la mitochondrie notamment d'origine cardiaque ; pour le complexe I, il y aurait un transport d'électron direct au sein du supercomplexe là où pour le complexe II, le transport d'électron serait plus lié à la diffusion des quinones (Acin-Perez et al 2014, Lenaz et al 2018).

iii. Différents réservoirs de quinones

Avec l'existence des supercomplexes et du modèle diffusionnel, nous pouvons nous poser la question si différents réservoirs de quinone existent, avec une partie des quinones bloquées au sein des supercomplexes et une autre partie qui serait libre dans la membrane. L'étude de Benard et al en 2008 semble montrer l'existence de trois réservoirs de quinone dans les mitochondries de muscle et de foie de rat. Pour cela, ils ont inhibé progressivement les complexes III avec une concentration croissante de myxothiazole, ce qui a eu pour effet d'augmenter le taux de réduction des quinones. Ils ont ainsi observé qu'une première partie des quinones est utilisée dans la CR physiologiquement (8% dans le muscle et 23% dans le foie) ; une deuxième partie sert de réserve en cas de dérégulation (observée après inhibition maximale des complexes III) et une troisième partie est inaccessible (79% dans le muscle contre 21% dans le foie), car elle n'est pas réduite même après inhibition totale. Ces résultats ont été trouvés en utilisant le succinate comme substrat et n'ont pas été réalisés pour le NADH.

Substrate as electron donor	Rate of cytochrome c reduction ^a
NADH	0.356 ± 0.031 (5)
Succinate	0.591 ± 0.060 (5)
NADH + Succinate	0.883 ± 0.071 (5)

Figure 7 : Etude cinétique de la réduction du cytochrome c exogène en fonction du substrat utilisé. Résultat issu de Lenaz et al 2016.

Dans l'étude plus récente de Lenaz et al 2016, les auteurs ont réalisé un suivi cinétique de l'oxydation du succinate et du NADH dans des mitochondries inhibées par du KCN et dans lesquelles ils ont ajouté du cytochrome c exogène en excès. Ils ont ainsi montré que l'oxydation

simultanée de ces deux substrats à un effet cumulatif suggérant l'existence de deux compartiments de quinones, chacun étant attribué à un type de complexe.

d) Analyses de l'état rédox des quinones

Ce qui va principalement nous intéresser dans ce chapitre est de caractériser expérimentalement les proportions de quinones réduites/oxydées, afin de connaître leur état rédox général au sein de la CR des mitochondries cardiaques au cours de modulations bioénergétiques. Pour ce faire, deux techniques ont été principalement reportées dans la littérature : une quantification par extraction ou un suivi relatif dynamique par

chronoampérométrie. C'est cette dernière technique qui sera au cœur de ce chapitre et dont je parlerai principalement.

i. Analyse statistique par extraction

Les techniques d'extraction des quinones de la CR mitochondriale sont réalisées par HPLC (high performance liquid chromatography), ce qui veut dire que pour connaître la quantité de quinones, il faut « figer » les mitochondries à un instant précis. Ces techniques ont été utilisées pour pouvoir mesurer les ratios des différents composants de la chaîne respiratoire, comme réalisé dans l'étude de Benard et al 2008. Les auteurs ont ainsi extrait les différents composant de la CR de mitochondries de muscle et de foie de rat et ont trouvé les ratios suivants : 0,8 : 61 : 3 : 12 : 6,8 dans le muscle pour le complexe II, la coenzyme Q₉, le complexe III, le cytochrome c et le complexe IV respectivement, contre 1 : 131 : 3 : 9 : 6,5 dans le foie. Les valeurs n'ont pas été données pour le complexe I, mais ces résultats permettent de mettre en avant une certaine spécificité tissulaire vis-à-vis des quinones. En effet, dans le muscle et plus particulièrement dans le cœur, les mitochondries sont dédiées principalement à la production d'ATP. Si cette technique permet de calculer précisément le contenu des différents composants, cela ne permet que de mesurer à un instant et ne permet donc pas le suivi dynamique du taux de réduction des quinones a contrario de la technique de chronoampérométrie.

ii. Analyse dynamique électrochimique

Cette technique mise en œuvre pour la première fois par Anthony L Moore dans les années 1980-90, a pour but de suivre dynamiquement le taux de réduction par électrochimie selon le principe suivant : une quinone externe suffisamment hydrosoluble, la coenzyme Q₁, est ajoutée sous sa forme oxydée à la préparation mitochondriale, celle-ci va après diffusion dans la mitochondrie se mettre à l'équilibre électrochimique avec les quinones membranaires de la CR. A l'aide d'une électrode de carbone, les auteurs ont suivi les changements du taux de réduction de ce médiateur rédox, reflet des quinones mitochondriales (je reviendrai plus en détail sur le fonctionnement de l'expérience). Le grand avantage de cette technique est que les mitochondries n'ont pas besoin d'être « figées » à un instant, ce qui permet de visualiser les changements d'états de manière dynamique, cinétique notamment le passage de l'état 3 à l'état 4.

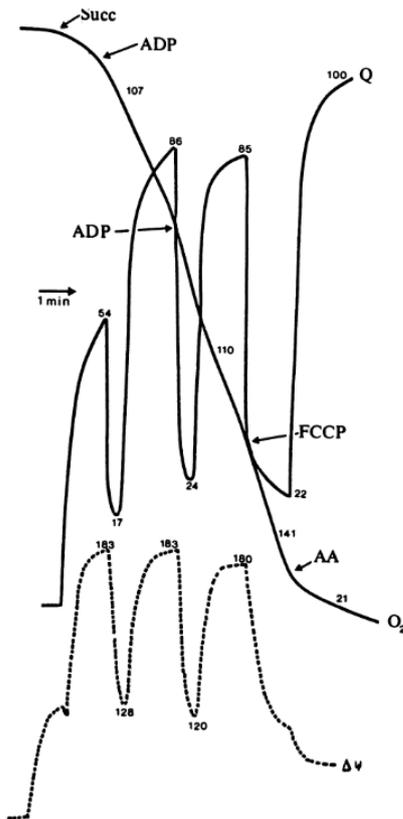


Figure 8 : Suivi électrochimique de trois paramètres mitochondriaux : l'intensité respiratoire, le taux de réduction des quinones et le potentiel de membrane. Figure issue de Anthony L Moore et al 1991.

Anthony L Moore a principalement utilisé cette technique pour des mitochondries du règne végétal, en travaillant notamment sur la feuille de pois (Anthony L Moore et al 1991). Il a cherché ainsi à mettre en place une méthode de suivi multiparamétrique (figure 8), regroupant : le suivi du potentiel de membrane (avec une électrode TPP⁺), la consommation d'oxygène mitochondriale (avec une électrode de Clark) et le suivi du taux de réduction des quinones. Cette méthode l'a aidé à mettre en évidence que l'équilibre rédox des quinones joue un rôle central dans la répartition des flux d'électrons dans les différentes voies de la respiration mitochondriale des plantes (Anthony L Moore et al 1991 ; Affourtit, Charles, et al 2001).

Si cette technique permet de sonder indirectement l'évolution du taux de réduction des quinones mitochondriales, cela ne permet pas de savoir quel réservoir de quinones est interrogé, ni si l'ajout de quinone externe modifie ou non la réponse mesurée.

Après les années 1990, cette technique a été « oubliée » par la communauté scientifique avant d'être redécouverte à l'heure actuelle avec un certain intérêt, notamment avec les travaux de Adnan Sayegh et al 2019. Dans cette étude, ce système est utilisé pour récupérer les électrons d'une algue unicellulaire « *Chlamydomonas reinhardtii* » dans l'idée d'utiliser leurs systèmes de photosynthèse comme pile.

Nous nous sommes également intéressés à cette approche car celle-ci a un historique au sein du laboratoire. En effet, mon directeur de thèse Stéphane ARBAULT, s'est intéressé à cette technique et a travaillé dessus en amont de ma thèse notamment au sein de la levure (Ben-Amor Salem et al. 2014, Suraniti Emmanuel et al. 2014).

e) Objectifs

L'objectif de ce travail a été de mettre en œuvre la technique proposée initialement par Moore et al 1991 dans une approche multi-paramétrique, pour étudier le taux de réduction des quinones de mitochondries de mammifère. En effet, cette approche n'a pas été reportée sur mitochondries cardiaques et permettrait pourtant d'apporter un paramètre supplémentaire du control/suivi de l'activité bioénergétique mitochondriale. Pour mettre en place cette approche, nous avons suivi le taux de réduction des quinones dans les différents états énergétiques décrits dans le chapitre I. En simultanée de cette mesure, comme le montre le schéma ci-dessus, nous avons suivi la consommation mitochondriale d'oxygène par une électrode de Clark. Ce dernier paramètre est un contrôle important de la viabilité mitochondriale mais également permet de connaître la vitesse d'oxydation globale.

Si à travers ce travail le but recherché était de développer cette technique, ces résultats s'inscrivent dans un projet plus global de caractérisation, à travers l'état rédox des quinones, des conditions de production des ROS (les quinones participant à la production des ROS mais également comme antioxydant) afin d'accéder à cet autre activateur important du mPTP et ainsi compléter l'approche développée dans le chapitre précédent.

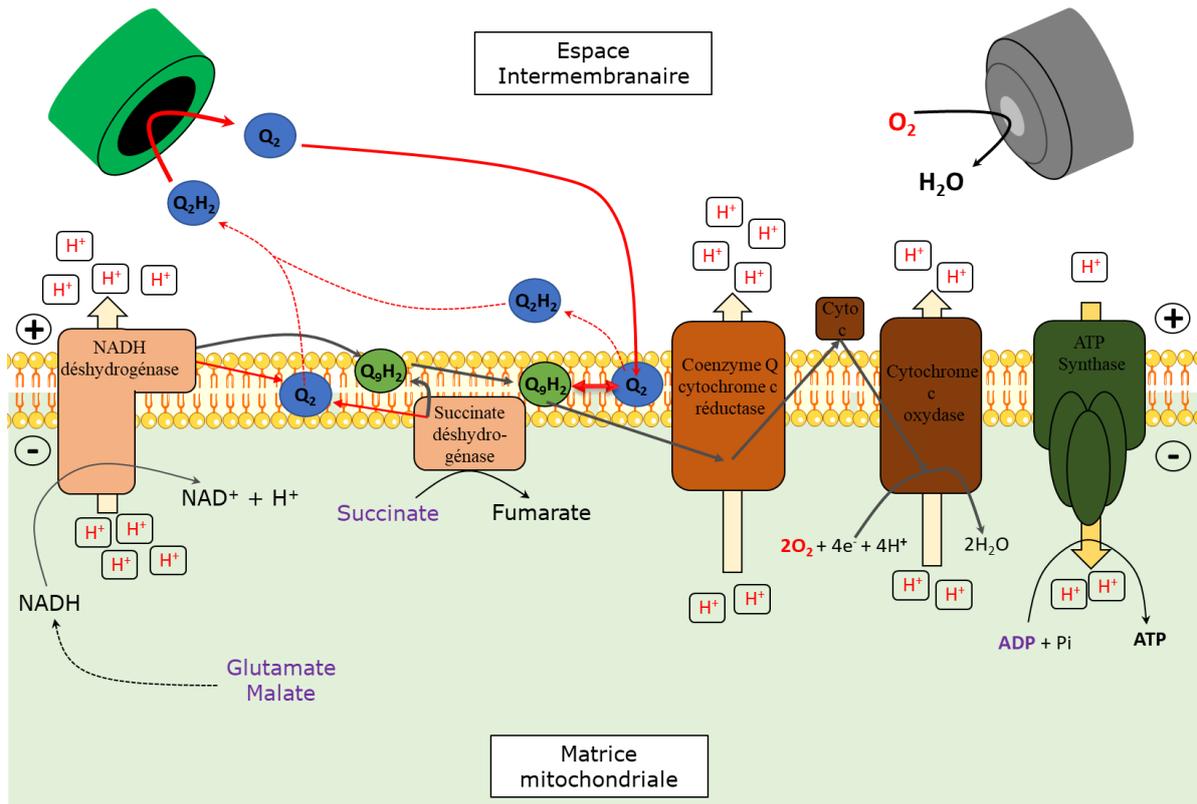


Figure 9 : Schéma du principe d'expérience réalisé sur mitochondrie cardiaque combinant la détection de l'état rédox des quinones et de la consommation d'oxygène. L'état rédox des quinones de la CR est sondé via la quinone exogène Q₂. Ce schéma reprend les deux interactions possibles entre Q₂ et la mitochondrie (interaction Q₂-Q₉ ou interaction directe Q₂-complexe I et II de la CR). Dans les deux cas la quinone nouvellement réduite diffuse ensuite à l'électrode de carbone vitreux (en haut à gauche) pour être oxydée ce qui va donner une variation de courant détectée par chronoampérométrie. En haut à droite est représentée l'électrode de Clark qui permet de réduire l'oxygène présent dans la solution pour déterminer sa concentration. Pour un souci de clarté la membrane externe mitochondriale n'est pas représentée et les électrodes utilisées ne sont pas situées dans l'espace intermembraire mais bien seulement dans la solution.

f) Principe du système d'analyse

i. Matériels expérimentaux

Afin de comprendre le principe des mesures réalisées que j'expliquerai dans les parties suivantes, il est important de connaître le système de mesure électrochimique que nous avons utilisé, et qui se compose de trois électrodes pour le suivi des quinones (photo ci-dessous) et de deux électrodes dans le cas de l'électrode de Clark.

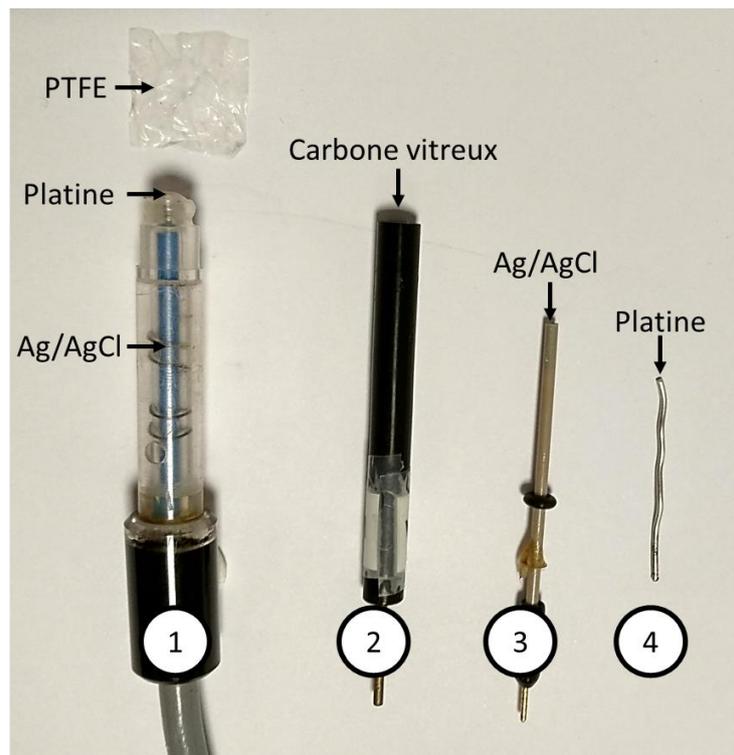


Figure 10 : Photographie des électrodes utilisées pour le système de mesure électrochimique pour le suivi du taux de réduction des quinones et le suivi de la consommation d'oxygène mitochondriale. 1) Electrode de Clark (électrode de platine et référence Ag/AgCl) avec au-dessus la membrane en PTFE. 2) Electrode de carbone vitreux (électrode de travail). 3) Electrode de référence Ag/AgCl. 4) Contre électrode de platine.

Une cellule électrochimique comprend donc 1) Une électrode de travail, qui sera ici une électrode carbone vitreux (oxydation des quinones) ou une électrode de platine (réduction de l'oxygène). 2) Une électrode de référence qui sera toujours composée du couple Ag/AgCl et pour finir, 3) une contre électrode en platine.

Nous travaillons en phase aqueuse, donc ce système est immergé dans une solution contenant les mitochondries à analyser. L'électrode de travail est au centre de cette cellule électrochimique car c'est au niveau de son interface que la réaction à étudier va se réaliser en imposant un potentiel électrique défini ultérieurement. Cependant pour que son potentiel ne varie pas au cours du temps et en fonction des réactions, il est nécessaire d'avoir une électrode de référence. Celle-ci ne verra pas son potentiel changer durant l'expérience, ce qui permet d'ajuster et de maintenir le potentiel au niveau de l'électrode de travail. Pour finir la contre électrode a pour but de fermer le circuit électrique et au niveau de son interface une réaction opposée de celle que l'on mesure va se réaliser.

Pour réaliser simultanément les deux mesures décrites précédemment, une cuve d'oxygraphie spéciale a été réalisée (figure 11), qui possède quatre entrées permettant de placer toutes les électrodes nécessaires (seules trois des entrées sont utilisées, la dernière est fermée à l'aide d'un bouchon). Cette cuve abritera la solution mitochondriale d'une concentration de 0,2 à 0,4 mg.prot.mL⁻¹. Le choix de la concentration a été dicté au vu des réponses obtenues en oxygraphie. Un bouchon peut être utilisé pour fermer la cuve et empêcher la solution de se réoxygéner. La cuve comprend une double paroi qui est reliée à un bain thermostaté qui permet le passage d'eau chaude maintenant la solution mitochondriale à température (ici nous avons travaillé à 28°C). Dernier point : la cuve est placée sur un agitateur magnétique qui permet grâce à un barreau aimanté situé dans la cuve d'homogénéiser la solution mitochondriale (ici en rotation à 800 rpm). La convection est un paramètre important pour la mesure électrochimique car cela permet un apport rapide et constant des espèces aux électrodes ; et d'assurer une homogénéité de la solution et de la réponse mitochondriale vis à vis des différents effecteurs.

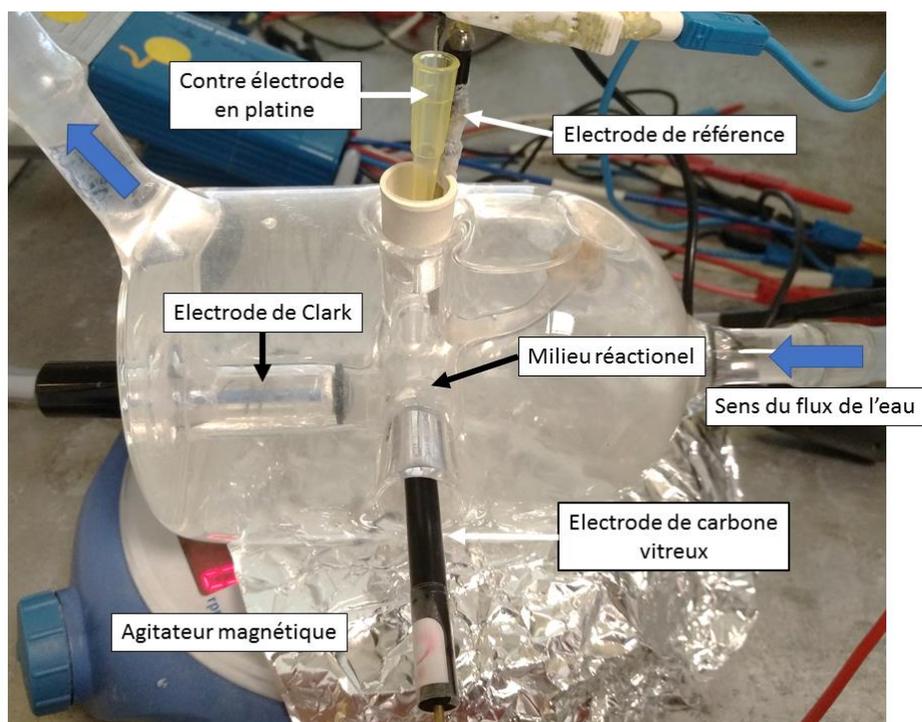


Figure 11 : Photographie de la cuve d'oxygraphie de volume 3 mL, comprenant quatre entrées principales permettant d'installer : l'électrode de Clark (à gauche) ; l'électrode de carbone vitreux (en bas) et la contre électrode (fil de platine de 1 mm) plus l'électrode de référence (au-dessus, 3 mm de diamètre).

ii. Chronoampérométrie

Dans ce chapitre, nous avons travaillé uniquement avec la technique d'électrochimie utilisée par Moore, qui est la chronoampérométrie. Cette technique est utilisée à la fois pour le suivi du taux de réduction des quinones et le suivi de la consommation d'oxygène. Cela consiste à appliquer un potentiel électrochimique au niveau de l'électrode de travail (soit d'oxydation ou de réduction) et à le maintenir au cours du temps. Une fois le potentiel appliqué, nous allons alors suivre les variations d'intensité du courant (de quelques nA pour les quinones et de plusieurs centaines de nA pour l'oxygraphie) en fonction du temps, qui correspondent aux variations de concentration des molécules d'intérêt.

La réponse obtenue, quel que soit le potentiel appliqué, peut être divisée en deux parties. Dans la première partie : à $T=0$, le courant mesuré est fort, cela correspond en majorité à du courant capacitif. Celui-ci est défini comme un courant mesuré non issu de la réaction électrochimique à étudier, et qui est ici principalement dû à l'équilibrage des charges présentes au niveau de l'interface de l'électrode de travail avec la solution et fonction du potentiel appliqué. L'intérêt majeur de cette technique est que très vite (en quelques secondes) ce courant capacitif va chuter car le potentiel est maintenu fixe. Par la suite, il y a

une stabilisation du courant de base dans la solution jusqu'à atteindre une phase plateau où seul le courant faradique contribuera au signal mesuré.

Une fois cette phase atteinte, les mitochondries et les quinones vont être ajoutées, le courant mesuré est alors uniquement du courant faradique, c'est-à-dire issu de la réaction électrochimique d'intérêt. L'intensité du courant est alors proportionnelle à la concentration en quinone exogène pour le suivi du taux de réduction des quinones, et les différents plateaux de courant dépendent des conditions expérimentales (substrats/effecteurs utilisés). Pour le suivi de la respiration mitochondriale, le courant sera proportionnel à la concentration en oxygène dissous et, dans ce cas, ce qui va nous intéresser ce sont les pentes qui vont après conversion correspondre aux vitesses de consommation du substrat O₂.

iii. Suivi de la respiration mitochondriale

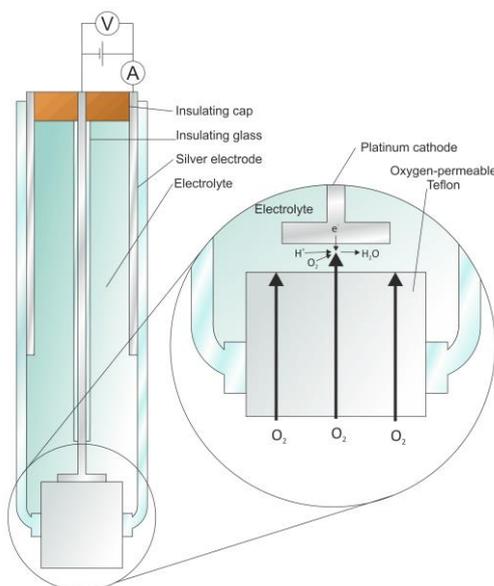


Figure 12 : Schéma d'une électrode de Clark. (By Larry O'Connell), licence : CC BY-SA 3.0.

L'électrode de Clark est un système combiné composé, de seulement deux électrodes, à savoir d'un disque de platine constituant l'électrode de travail et d'une électrode de référence composée du couple AgCl/Ag, qui va également servir de contre électrode dans le montage

L'électrode de platine est recouverte d'une membrane, souvent en téflon, qui a pour propriété physique d'être perméable uniquement aux gaz, cela a pour but de séparer physiquement cette électrode de la solution où sont les mitochondries et ainsi de prévenir d'une interaction non spécifique tout en laissant l'oxygène diffuser vers l'électrode (figure 12).

Une fois le système en place, un potentiel de réduction de -0,8V est appliqué à l'électrode de platine ce qui permet de suivre la réduction de l'oxygène en eau selon l'équation suivante :



La solution (avant ajout des mitochondries) étant constamment agitée, sa concentration en oxygène dissous est proche de la valeur théorique pour une solution aqueuse à 25°C à pression atmosphérique, à savoir 240 μM (O₂). Le plateau de courant mesuré par l'électrode de Clark à ce moment-là correspond donc à cette concentration en oxygène

c'est le niveau 100% en O₂. En laissant les mitochondries consommer tout l'oxygène, le courant obtenu (proche de 0) définit alors le 0% d'oxygène dans la solution. Cela permet de définir la gamme des niveaux de courant détectables pour les concentrations possibles en oxygène, et ainsi de calculer la respiration mitochondriale à chaque instant en convertissant l'intensité du courant en concentration d'oxygène.

La mesure réalisée par l'électrode de Clark est très importante car elle permet de calculer le contrôle respiratoire qui consiste à diviser l'intensité respiratoire de l'état 3 par celui de l'état 4 (cf introduction générale), cette valeur qui doit être la plus forte possible permet d'évaluer la viabilité des mitochondries.

iv. Suivi du taux de réduction des quinones

Pour le suivi de ce paramètre, nous avons repris les conditions expérimentales décrites par Moore et al 1991. C'est-à-dire par chronoampérométrie, nous avons appliqué un potentiel d'oxydation fixe de +0,35 V (vs Ag/AgCl) sur l'électrode de carbone vitreux, la cellule électrochimique contient également une contre électrode en platine et une référence Ag/AgCl de type « leakless ».

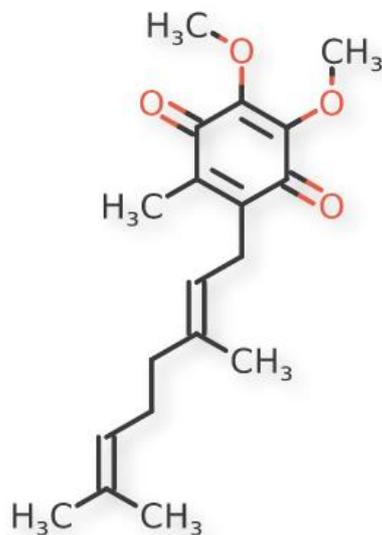
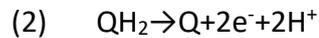


Figure 13 Structure 2D de la coenzyme Q2

Dans la solution au sein de la cuve, nous ajoutons en début d'expérience une quinone externe (ici la Q₂) qui va servir de médiateur rédox entre les mitochondries et l'électrode (figure 13). Les Q₂ solubles (qui sont majoritairement sous forme oxydée à l'injection) vont diffuser au sein de la mitochondrie et interagir en se mettant à l'équilibre rédox avec les quinones accessibles de la chaîne respiratoire. Cette expérience n'est pas possible avec toutes les quinones, il faut que celle-ci possède, comme la Q₂, un coefficient de partition faible (Q₂ a un log P = 4), qui lui permet d'être aussi présente en solution mais aussi de s'insérer facilement dans la membrane mitochondriale.

Les mécanismes d'interaction entre la quinone externe et la CR (figure 9) ne sont à l'heure actuelle pas parfaitement connues, et nous ne pouvons qu'émettre des hypothèses sur le fonctionnement. Deux types d'interactions sont envisagées : 1) Une interaction directe entre les Q₂ solubles et les quinones membranaires à savoir la Q₉. Dans ce cas le transfert d'électron serait direct entre les quinones. 2) Une interaction entre les complexes de la chaîne respiratoire (complexe I ou II) et la Q₂ soluble. Dans cette hypothèse la Q₂ jouerait le rôle d'une

quinone membranaire en venant se loger au sein des complexes, un électron à la fois serait alors transféré à la Q_2 (cf introduction). Rien n'exclut que ces deux types d'interactions puissent également se produire simultanément. En tout cas, quelle que soit l'interaction en jeu, au final la Q_2 va être réduite par la CR et oxydée au niveau de l'électrode de travail selon la réaction suivante :



Si dans la CR le transfert d'électron-proton est en deux étapes, à l'interface de notre électrode de carbone vitreux et dans nos conditions de travail (en milieu aqueux à pH 7,2) c'est un transfert à deux électrons qui est attendu (Quan May, et al 2007). Le potentiel de 0,35 V (vs AgCl/Ag) appliqué à l'électrode de travail a été choisi car nous voulons pouvoir oxyder le nombre total de molécules de quinone réduites par la CR, et le maximum de courant d'oxydation de la QH_2 est attendu autour de 0,3 V. Pour déterminer le taux de réduction des quinones de la CR, nous avons comme pour l'oxygraphie estimé la gamme de courants possibles en estimant le 0% et le 100%. Le 0% réduit correspond au courant obtenu après stabilisation du courant suite à l'ajout des quinones dans la cuve (en absence de mitochondries). Le 100% réduit a été estimé dans deux conditions : soit par le courant mesuré après l'ajout d'antimycine A (inhibiteur du complexe III) qui permet d'arrêter la respiration mitochondriale soit par le courant mesuré en hypoxie quand les mitochondries ont consommé l'intégralité de l'oxygène dissout de la solution.

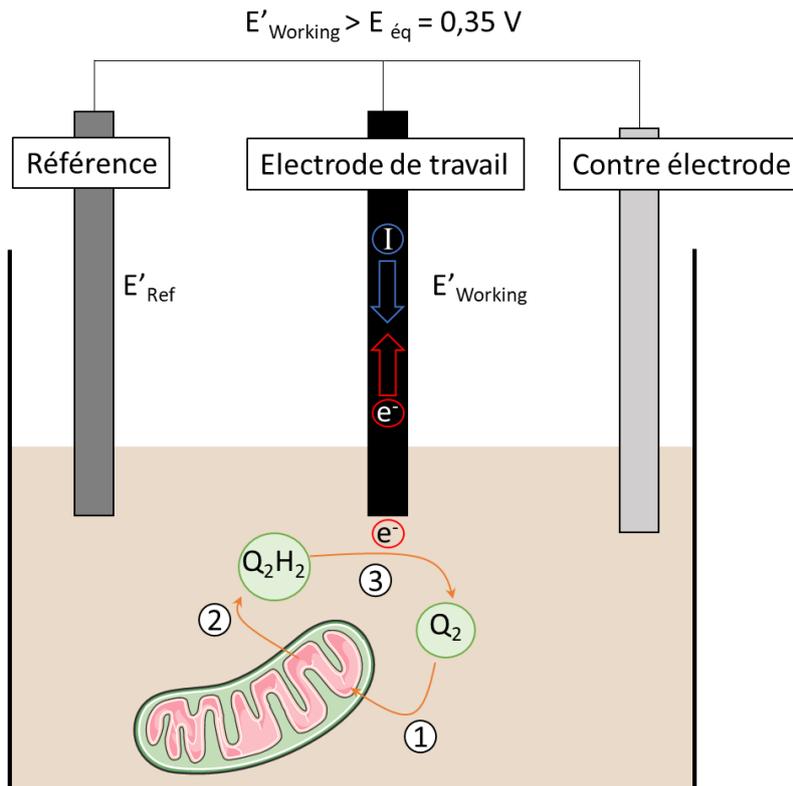


Figure 14 Schéma simplifié de la détection électrochimique du taux de réduction du médiateur rédox Q_2 par les mitochondries. Trois grandes étapes de fonctionnement sont identifiées : En 1) le médiateur rédox Q_2 va interagir avec la mitochondrie, 2) Q_2 va être réduit et devenir Q_2H_2 au sein de la mitochondrie en fonction de son activité, en 3) La forme réduite va être oxydée par l'électrode de travail qui est à un potentiel de 0,35 V pour fournir un courant relié au taux de réduction des quinones mitochondriales.

II. Résultats et discussion

Avant de commencer cette partie j'aimerais apporter quelques précisions quant à la réalisation des expériences donnant les résultats que je vais présenter. En effet ces travaux ont été menés de concert avec le post-doctorant Emmanuel Suraniti et une partie des résultats de ce chapitre est issue de son travail. Mon implication dans ce projet a été différente des chapitres précédents puisqu'ici j'ai principalement aidé à la mise en place de cette technique au sein du laboratoire, ainsi qu'aux premières expériences de caractérisation. J'ai notamment aidé à la résolution des nombreux problèmes techniques auxquels nous avons été confrontés.

a) Premiers essais du suivi du taux de réduction des quinones en présence de succinate et de roténone

Pour ce premier essai, nous avons repris l'analyse des états stationnaires bioénergétiques utilisés lors du chapitre I, le protocole utilisé est d'ailleurs similaire. Les quinones externes sont ajoutées en premier, ou ajoutées au tampon en amont de l'expérience. Puis sont injectés la roténone (inhibiteur du complexe I) et le succinate ; les mitochondries sont ajoutées ensuite. Pour finir, de l'ADP en excès est ajouté (état 3) jusqu'à consommation de tout l'oxygène dissout et obtention de l'hypoxie. Dans la figure 15 est représentée cette expérience avec simultanément le suivi du taux de réduction des quinones (en noir) et le suivi de la consommation d'oxygène mitochondriale (en rouge). Cette superposition permet d'aider à visualiser les effets des différentes injections et le passage d'un état à un autre. Le « pic » observé en oxygraphie peu après 200 secondes correspond à un arrêt et à une reprise de l'agitation de la solution afin de contrôler la sensibilité de l'électrode de Clark.

Dans les études bioénergétiques, le suivi de la respiration mitochondriale est généralement représenté à l'inverse (avec des valeurs positives) de ce qui est fait en électrochimie (valeurs négatives), car nous suivons une baisse de la concentration en oxygène au cours du temps (positif) grâce à un courant de réduction d'oxygène (négatif). Cependant j'ai choisi de respecter la représentation internationale en électrochimie, où les intensités de courant issues des processus de réduction sont représentées en négatif (pour un apport de charges négatives).

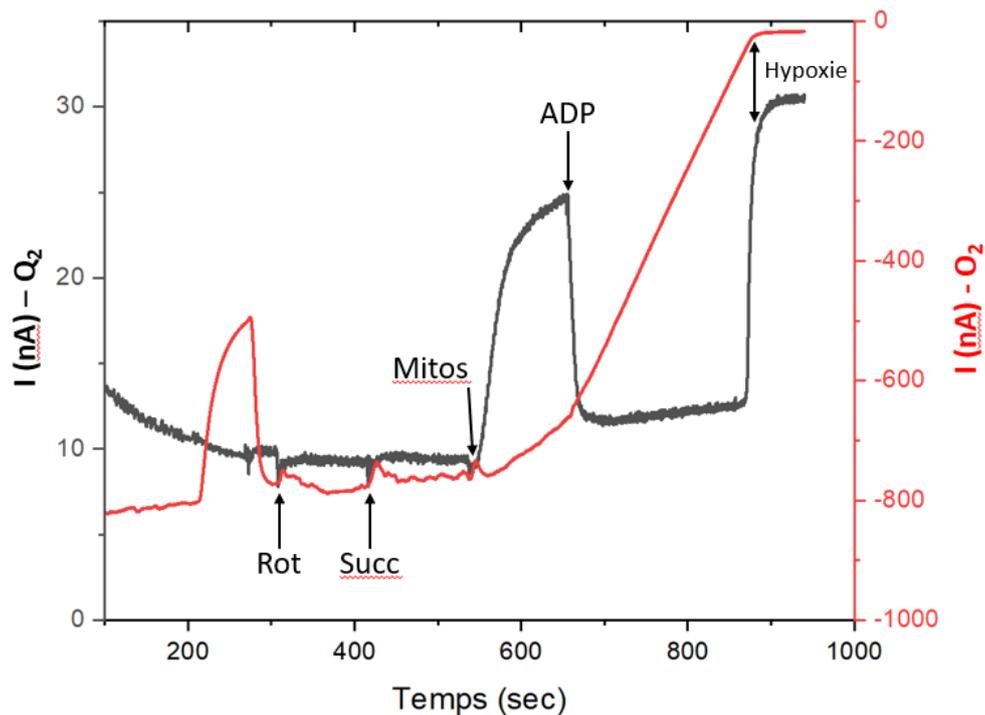


Figure 15 : Suivis des intensités de courant en fonction du temps par chronoampérométrie pour le taux de réduction des quinones (courbe noire) et en oxygraphie (courbe rouge). Les flèches rouges correspondent aux différentes injections dans l'ordre : 1) Roténone à $2\mu\text{M}$, 2) Succinate à 5 mM , 3) Mitochondries à $0,2\text{ mg.prot.mL}^{-1}$, 4) ADP à 1 mM . La quinone externe (Q_2) à $5\mu\text{M}$ est injectée en amont.

Après injection des mitochondries, on peut voir une augmentation rapide du taux de réduction des quinones en moins d'une minute, qui va tendre ensuite vers un plateau d'une valeur de 25 nA (ce qui représente un taux de réduction de 83%). Cette augmentation est concomitante avec une baisse régulière de la concentration en oxygène dissout, les mitochondries sont à l'état substrat. Après l'injection d' 1 mM d'ADP, il y a une brusque diminution du signal pour le taux de réduction des quinones qui revient presque à son niveau avant l'ajout des mitochondries. Cette diminution est simultanée à la rupture de pente pour la consommation d'oxygène, les mitochondries sont alors à l'état 3 (état phosphorylant). Le contrôle respiratoire pour cette expérience est de $2,9$; les mitochondries sont donc viables. Pour finir, vers 900 secondes, on observe que le taux de réduction des quinones augmente rapidement pour un plateau d'une valeur de 30 nA . En parallèle la concentration en oxygène dissout est proche de zéro, l'hypoxie est atteinte. Dans notre configuration expérimentale nous n'utilisons pas de bouchon pour fermer la cuve. Une réoxygénation de la solution est possible, notamment favorisée par l'agitation, cependant cet oxygène est consommé

directement par les mitochondries présentes à l'interface et grâce au volume de la cuve et de la concentration de mitochondrie utilisée.

Si un exemple type est montré ici, j'ai répété cette expérience de nombreuses fois et on verra par la suite que les résultats obtenus sont reproductibles. Cette figure montre que l'on est capable de reproduire le protocole expérimental développé par Anthony L Moore pour des mitochondries de mammifère, et que l'on peut suivre de façon dynamique les modulations du taux de réduction des quinones par celles-ci. Les réponses mesurées sont rapides, de l'ordre de la minute, et ce système expérimental confère une bonne résolution temporelle aux analyses de l'état redox mitochondrial. Malgré une intensité du courant faible (pour le suivi du taux de réduction), le rapport signal-sur-bruit, souvent >10 , est suffisamment élevé pour distinguer les différents états bioénergétiques.

b) Points expérimentaux

i. *Choix de la concentration du médiateur redox et impact sur la respiration*

1) *Concentration en Q_2 et courants mesurés*

Avant d'aller plus loin dans l'étude du taux de réduction des quinones à différents états bioénergétiques, un des paramètres à déterminer est la concentration adéquate en Q_2 à utiliser, qui doit a priori faire croître le courant mesuré de manière proportionnelle. Pour cela, Dans la figure 16 nous avons testé différentes concentrations de Q_2 allant de 0,3 à 7,5 μM . Nous avons ensuite mesuré le courant dans 3 conditions : 1) à l'état substrat ; 2) après l'ajout de l'ADP (état 3) ; 3) à l'arrivée en hypoxie. Ces mesures ont été réalisées sur des mitochondries en présence de succinate et de roténone.

Pour ces trois états on peut voir une augmentation de l'intensité du courant de façon linéaire avec la concentration de quinones. Pour chaque concentration, l'intensité du courant mesurée est plus importante pour l'hypoxie que pour l'état substrat, qui est elle-même plus importante que celle à l'état phosphorylant. Si le rapport entre ces trois états ne change pas avec la concentration en Q_2 augmentant, le courant mesuré lui augmente ce qui facilite la distinction de ces trois états.

Un point important à noter est que cette augmentation linéaire des courants semble indiquer que la concentration en Q_2 n'affecte pas les taux de réduction des quinones de la CR. L'absence de plateau, montre qu'en tout point de cette gamme de concentrations, la Q_2 n'est pas en excès.

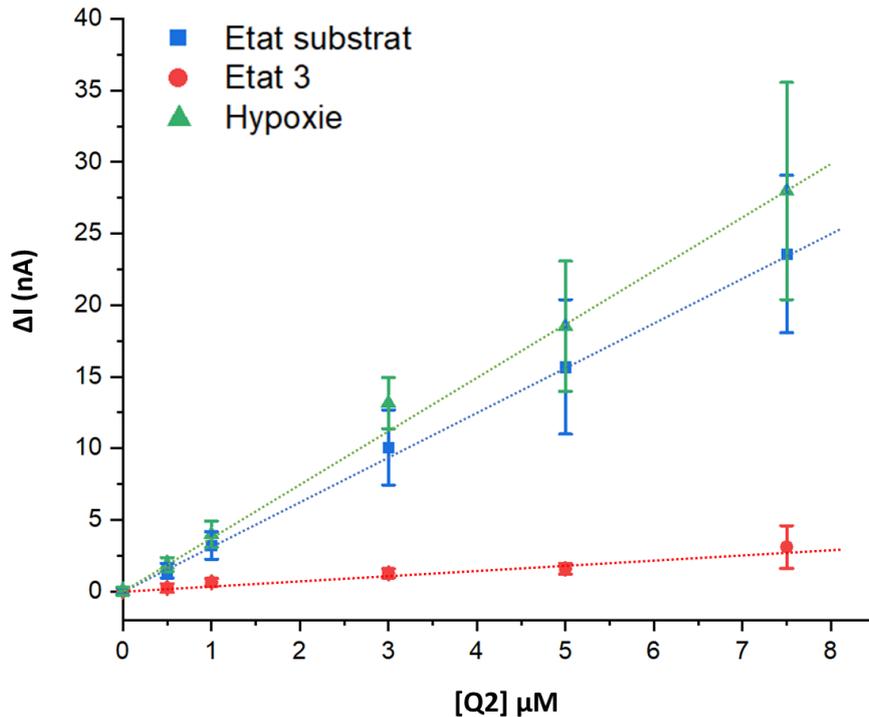


Figure 16 : Intensité du courant mesurée en fonction de la concentration en quinone Q2 ajoutée. Cette intensité a été mesurée à trois moments successifs : A l'état substrat, (carrés rouges) après ajout du succinate (complexe II) et de la roténone, (bloque le transport reverse). A l'état 3 (carrés bleus) après l'injection d'ADP. A l'hypoxie (triangles vert) quand la concentration en oxygène est proche de zéro. Pour chaque concentration testée, les expériences ont été réalisées au moins cinq fois.

Au début de la mise en place de cette technique nous avons travaillé à 5 μM (figure 15), ce qui représente une gamme de courant de 20nA. Nous avons par la suite fait le choix de prendre la concentration la plus faible possible tout en gardant une bonne distinction des états stationnaires de la mitochondrie, l'idée étant de sonder le système sans pour autant le modifier. Pour cela nous avons choisi la concentration de 1 μM , avec laquelle les 3 états sur le graphique semblent difficiles à distinguer, de par l'échelle mais qui n'est pas le cas dans les mesures cinétiques (figure 18). Ce choix a été également confirmé par le protocole expérimental utilisé par le Dr Moore qui travaillait lui aussi à 1 μM .

2) Ajout successif de quinone

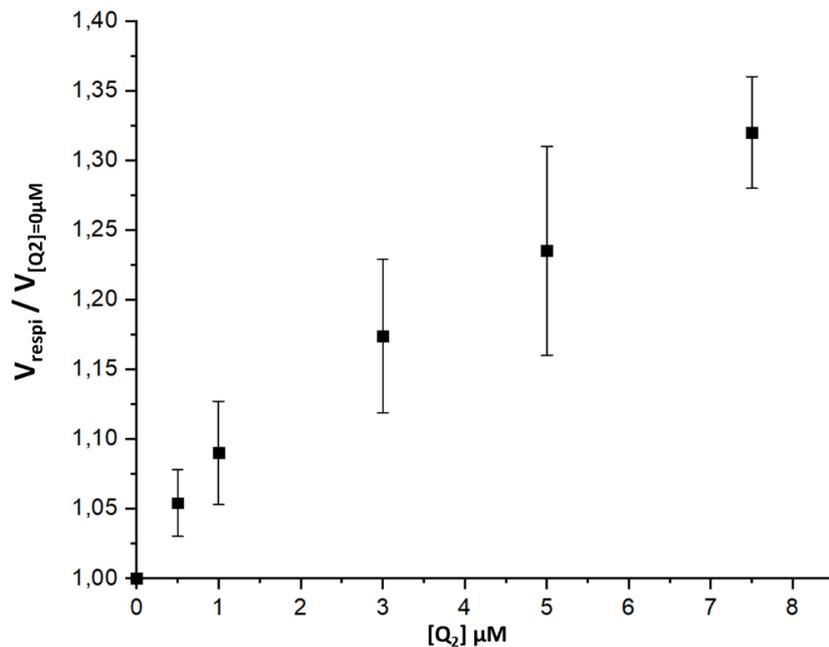


Figure 17 : Effet de la concentration en quinone sur l'intensité respiratoire à l'état substrat pour le complexe II (succinate et roténone). Pour l'intensité respiratoire, la valeur avant ajout des quinones est divisée par la nouvelle valeur après ajout.

Si la figure précédente a permis de montrer l'importance du choix de la concentration en Q₂, il était important de vérifier que cela n'a pas d'effet sur la respiration mitochondriale. Pour cela, les mitochondries ont été mises en présence de succinate et de roténone (état substrat, activation du complexe II), puis des doses croissantes de Q₂ ont été ajoutées. La respiration a été alors mesurée après chaque ajout et divisée par la respiration en absence de quinone.

On observe ainsi, que plus la concentration en quinone est importante et plus la respiration mitochondriale comparée à celle sans quinone augmente. Cette hausse est conséquente car à 7,5 µM de Q₂ la respiration est augmentée de plus de 30%. Au début de la mise en place de cette technique nous avons travaillé à 5µM de Q₂ ce qui représente une augmentation de la respiration dans ces conditions de 22%. Pour une concentration de 1µM qui est notre concentration de travail usuelle, l'augmentation est de 9%. L'ajout d'une quinone externe, n'est donc pas sans conséquence sur la respiration mitochondriale et malgré le choix d'une concentration en Q₂ faible dans la suite de ces travaux (1 µM), il faut garder à l'esprit que cela a un effet sur la respiration dans ces conditions. En revanche, aucune augmentation de la respiration mitochondriale n'a été observée quand les mitochondries sont en présence du substrat du complexe I uniquement, ce qui sous-entend un contrôle biologique différent en fonction des complexes impliqués.

La raison biologique qui explique cette augmentation de l'intensité respiratoire pour seulement le complexe II, n'est pour l'instant pas connue, plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce phénomène : l'ajout de quinone externe comme la Q_2 , qui possède un coefficient de partition faible, lui permettrait ici d'agir comme un découplant de la CR et ainsi d'abaisser la force proto-motrice, augmentant par voie de conséquence la respiration mitochondriale. En revanche, cela n'explique pas pourquoi cela n'a pas d'effet quand seul le complexe I est utilisé. Une autre hypothèse est que l'ajout de quinone pourrait selon un modèle diffusionnel augmenter le transport d'électrons, autrement dit cela pourrait augmenter la probabilité de rencontre des quinones avec les complexes de la CR, ce qui est en accord avec le fait que le complexe II est majoritairement sous la forme libre, alors que le complexe I est majoritairement sous la forme de supercomplexes et sera donc moins sensible à cette augmentation de la concentration de quinone. Cependant, comme décrit dans l'introduction plusieurs études montrent que les quinones au sein de la CR sont en large excès vis-à-vis des complexes et ne sont donc pas limitantes cinétiquement, l'augmentation de leur concentration ne devrait a priori pas avoir d'effet.

ii. Reproductibilité de l'expérience

1) Répétabilité au sein d'une même expérience

Pour la bonne caractérisation de cette méthode, un autre point essentiel à vérifier a été de connaître la reproductibilité de ces expériences. Pour cela, dans la figure 18A nous avons mesuré la réponse mitochondriale à trois injections successives d'ADP de même concentration (0,17 mM). Nous avons travaillé dans une condition où tous les substrats sont présents (G/M/S). La figure 18B est l'analyse de la transition réalisée après l'injection de l'ADP pour le taux de réduction des quinones et la respiration mitochondriale correspondantes.

Comme on peut le voir, après les différentes injections d'ADP le pourcentage de quinone réduite et l'intensité respiratoire varient simultanément et les réponses sont très reproductibles. Le taux de réduction des quinones diminue tout d'abord (40%) avant de remonter rapidement vers (80%) en parallèle la respiration mitochondriale va d'abord augmenter avant de ralentir. Cela est dû à la consommation rapide de la quantité limitante d'ADP ajoutée. Une hypothèse pour expliquer la légère différence du taux de réduction des quinones avant la première injection et après consommation de l'ADP, est due à la différence entre l'état substrat et l'état 4, où dans le premier état il y a peu ou pas d'activité de l'ATP synthétase alors qu'à l'état 4 une petite quantité ATP a été créée et va être retransformé en l'AMP et ADP par l'Adenylate kinase. Le point important ici est qu'on puisse suivre des cycles d'activités puisque la forme de ces trois courbes est quasiment identique. Cela permet de mettre en évidence que malgré la faiblesse de l'intensité des courants mesurés (quelques nanoampères) pour la mesure des quinones réduites, on est capable de voir de façon

reproductible des évènements fins et répétés pouvant se passer au niveau de la CR mitochondriale.

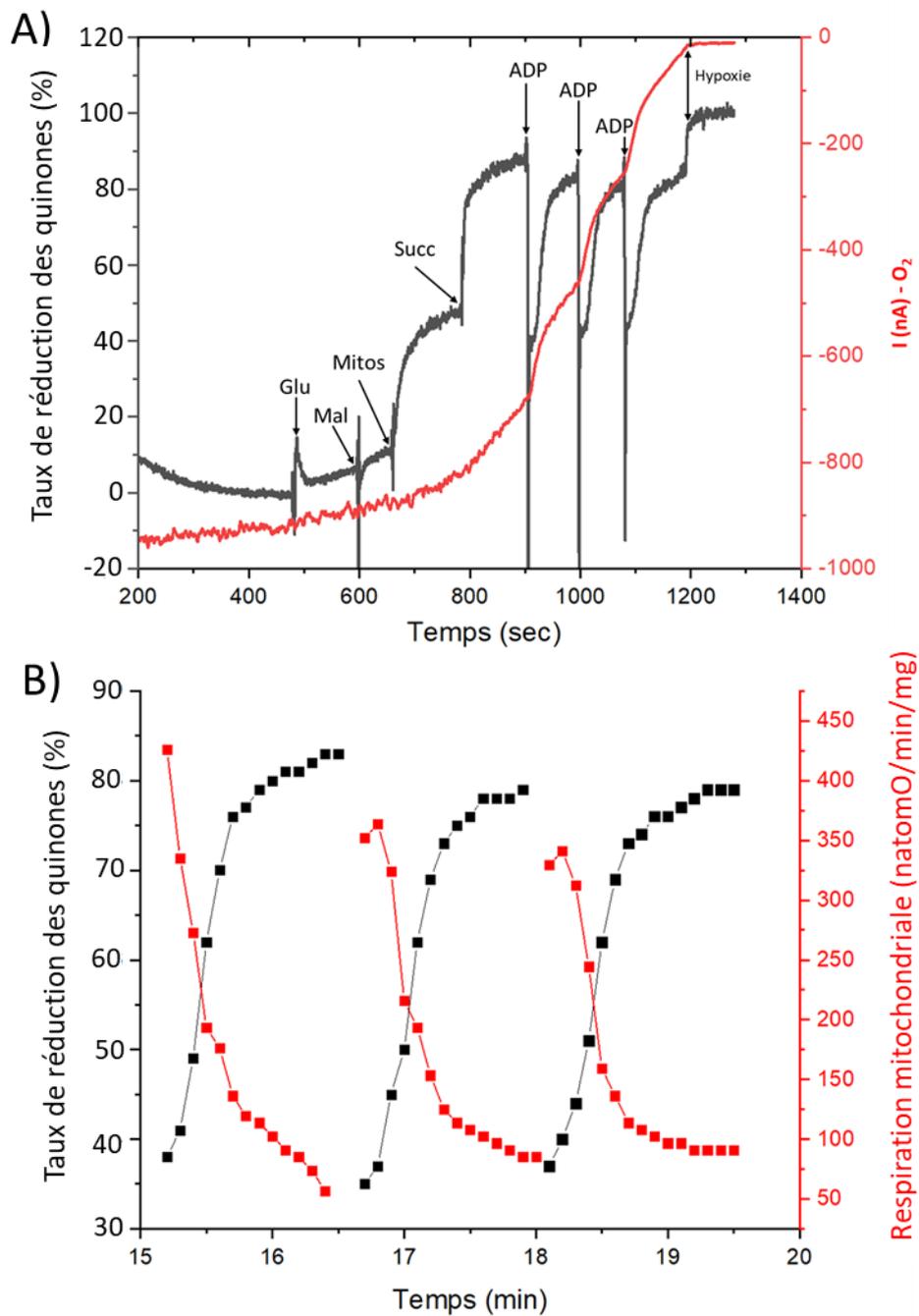


Figure 18 : A) Suivi par chronoampérométrie du taux de réduction des quinones (courbe noire) et en oxygraphie (courbe rouge). Les flèches rouges correspondent aux injections dans l'ordre : 1) Glutamate 2) Malate 3) Mitochondries à 0,2 mg.prot.mL⁻¹ 4) Succinate 5) ADP à 0,17 mM 6) ADP à 0,33 mM 7) ADP à 0,33 mM. B) Analyse des trois moments où l'ADP est injecté.

2) Reproductibilité inter-expérience

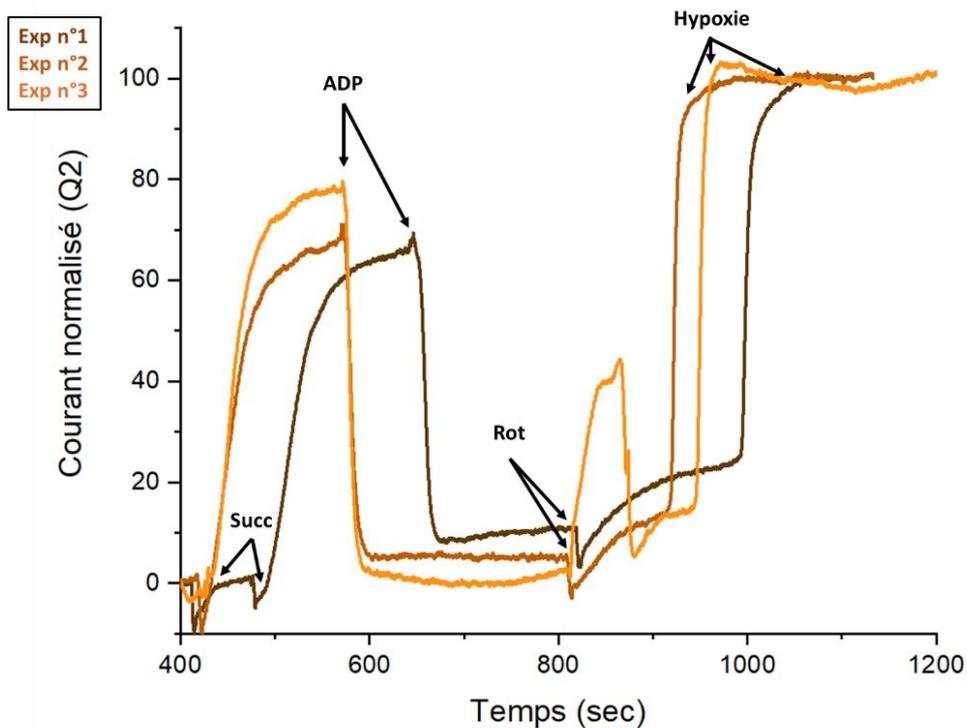


Figure 19 : Suivi de l'intensité du courant en fonction du temps par chronoampérométrie pour le taux de réduction des quinones de trois mêmes expériences réalisées les unes après les autres. La courbe la plus sombre est la première réalisée, la courbe la plus claire est celle réalisée en dernier. Les flèches correspondent aux injections dans l'ordre 1) Succinate à 5 mM, 2) ADP à 1 mM, 3) Roténone à 2 μ M. Sont ajoutés en amont les quinones à 5 μ M ainsi que les mitochondries à 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Par la suite, nous avons caractérisé la reproductibilité inter-expériences pour le taux de réduction des quinones. Pour cela, la même expérience a été répétée trois fois de suite sur une même préparation mitochondriale (figure 19) et avec une même électrode de carbone vitreux. Dans l'ensemble les trois courbes répondent de la même façon aux différents ajouts, sauf l'expérience 3 à l'ajout de la roténone qui montre un courant qui augmente. Si on regarde de plus près on voit que la première expérience et la deuxième présentent des taux de réduction à l'état substrat et à l'état 3 très similaires par contre la troisième expérience montre des taux de réduction légèrement différents pour ces deux états.

Si cela montre la bonne reproductibilité de cette technique au cours du temps, on peut voir aussi de légères différences apparaître avec le temps. Cela pose la question de l'évolution de la surface de l'électrode au cours du temps. Entre chaque expérience la cuve est nettoyée en la rinçant avec de l'eau et du méthanol et si de l'antimycine A, de la roténone ou du CCCP ont été utilisés, un rinçage avec des levures est également réalisé car ces molécules peuvent adhérer au verre de la cuve et les levures permettent efficacement de les piéger. Cependant

par voltamétrie cyclique nous avons pu observer qu'une partie des quinones externes ajoutées s'adsorbe à la surface de l'électrode au cours du temps, ce même phénomène a été observé dans l'étude de Turkowicz, Monika Joanna, et Joanna Karpińska 2013. Nous travaillons en effet dans une solution aqueuse et malgré le faible coefficient de partition de la Q_2 (log P de 4), celle-ci reste tout même essentiellement hydrophobe et peut s'adsorber à la surface de carbone dont la chimie évolue au cours du temps (contaminations). Ce phénomène est dépendant de la concentration en quinone : si à $1\mu\text{M}$ l'influence de cette adsorption sur le signal est négligeable, en revanche à $5\mu\text{M}$ (concentration utilisée dans la figure 19) cela va avoir une influence plus importante sur le courant et peut expliquer les différences obtenues pour l'expérience n°3. Pour éviter une contamination de l'électrode entre deux journées d'expériences, une étape de nettoyage/activation de l'électrode de carbone vitreux est réalisée en amont en l'exposant à un plasma oxygène de faible puissance. Cela va avoir pour effet de décontaminer la surface en éliminant toute molécule organique restante, et au même titre que la lamelle de verre (cf chapitre I), cela va rendre sa surface plus hydrophile.

c) Comparaison des différents substrats

i. Glutamate et malate

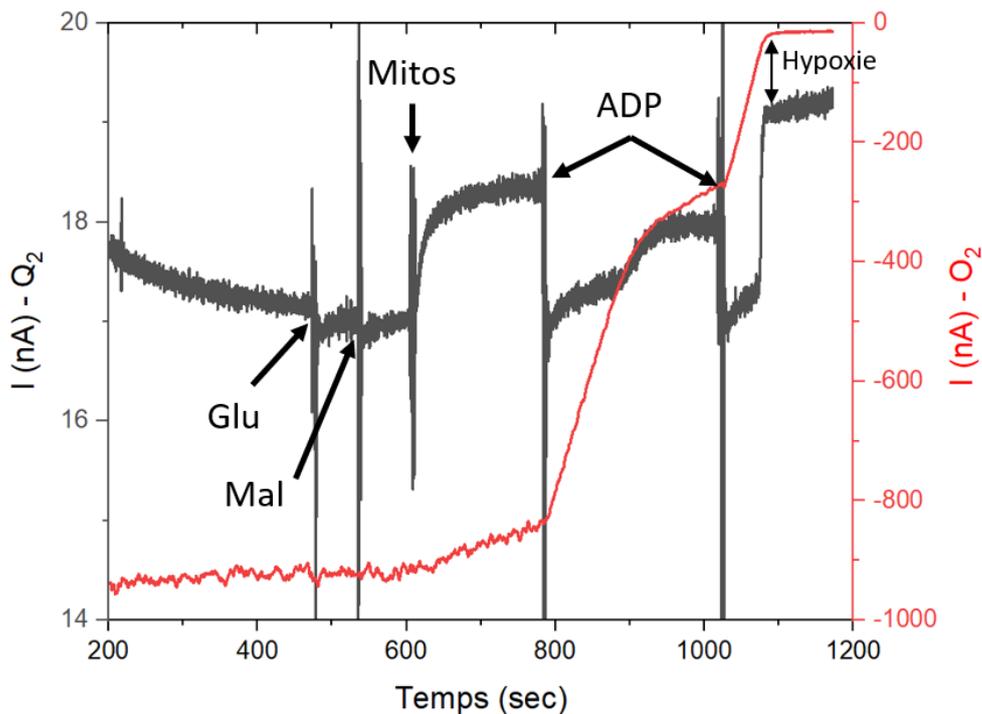


Figure 20 : Suivi des intensités de courant en fonction du temps par chronoampérométrie pour le taux de réduction des quinones (courbe noire) et en oxygraphie (courbe rouge). Les flèches rouges correspondent aux différentes injections dans l'ordre : 1) Glutamate à 5 mM, 2) Malate à 5 mM, 3) Mitochondries à $0,2\text{ mg prot.mL}^{-1}$ 4) ADP à $0,66\text{ mM}$, 5) ADP à 1 mM . La quinone externe (Q_2) à $1\mu\text{M}$ est injectée en amont.

Après avoir caractérisé la réponse des mitochondries cardiaques vis-à-vis des substrats du complexe II (figure 15), nous avons voulu faire de même pour le complexe I (figure 20). Dans l'ensemble les réponses en oxygraphie et pour le suivi du taux de réduction des quinones sont identiques à celle observées pour le succinate. Jusqu'à 450 secondes, il y a stabilisation du signal électrochimique pour l'électrode de carbone vitreux. Après ajout des mitochondries, on peut observer là encore une réponse pour les deux paramètres, cependant ces réponses sont plus faibles que celles mesurées avec le succinate: pour le suivi des quinones la variation d'intensité est de 1 nA ici contre 15 nA précédemment et pour l'oxygraphie la vitesse à l'état substrat est de 0,42 nA/sec contre 1nA/sec pour succinate et roténone, ce qui représente en moyenne une vitesse de 108,9 contre 37,6 natomO.min.mg⁻¹ respectivement. Si une différence de concentration des quinones est à noter entre ces deux expériences, nous verrons par la suite que cette différence dans l'intensité du courant est liée au complexe mis en jeu. La fin des courbes est identique à précédemment, l'ajout de deux quantités d'ADP entraîne une baisse du courant mesurée pour le suivi des quinones et entraîne une augmentation de la respiration mitochondriale. Le RCR est ici de 9,5, les mitochondries sont donc viables. Au moment de l'hypoxie la respiration mitochondriale s'arrête et le taux de quinone réduite augmente fortement, pour atteindre sa valeur maximale. Un autre avantage de cette technique est sa bonne sensibilité puisque l'on est capable de mesurer de vraies différences de réponse en fonction du complexe impliqué et de pouvoir les comparer.

ii. *Glutamate, malate et succinate*

Le dernier état bioénergétique que nous avons suivi est celui dans lequel les substrats des complexes I et II sont présents simultanément. C'est l'état que j'ai le plus caractérisé durant ma thèse (cf chapitre II) et le plus physiologique. L'objectif ici était de voir la participation des différents complexes (figure 18) dans la modulation rédox de la CR. Pour cela est injecté en premier le glutamate puis le substrat du complexe I, le malate. Les mitochondries sont injectées juste après, on retrouve alors les mêmes réponses pour l'oxygraphie et le taux de réduction des quinones que pour la figure 20. Cependant avant d'injecter l'ADP, on ajoute du succinate. Pour l'oxygraphie, on observe une rupture de pente avec une vitesse de consommation de l'oxygène qui accélère. Pour le taux de réduction de Q₂ après ajout du succinate un nouveau plateau s'établit passant de 5,4 nA à 6,8 nA. La dernière partie de la courbe est équivalente aux figures précédentes, le contrôle respiratoire étant de 3,15 pour le complexe I et II.

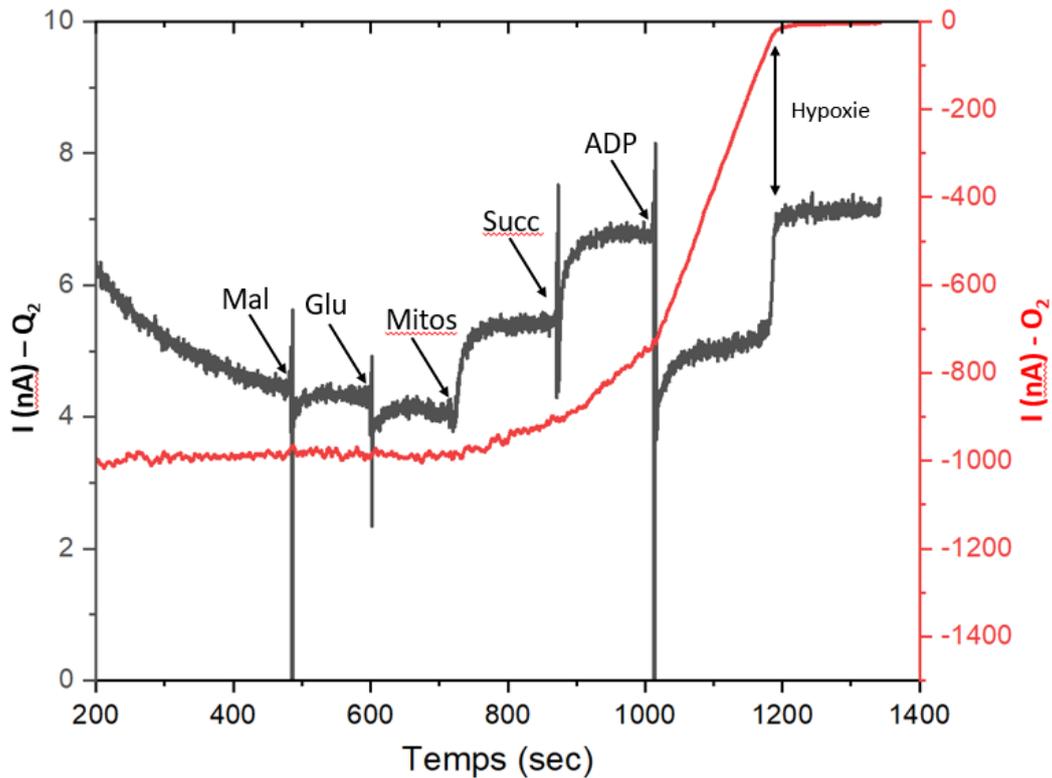


Figure 21 : Suivi de l'intensité du courant en fonction du temps par chronoampérométrie pour le taux de réduction des quinones (courbe noire) et en oxygraphie (courbe rouge). Les flèches rouges correspondent aux différentes injections, dans l'ordre : 1) Malate à 5 mM, 2) Glutamate à 5 mM, 3) Mitochondries à $0,2 \text{ mg.prot.mL}^{-1}$ 4) Succinate à 5 mM, 5) ADP à 1 mM. La quinone externe (Q_2) est ici à $1 \mu\text{M}$ et est injectée en amont.

Le point très intéressant de cette figure est l'effet différentiel observé en fonction du complexe de la CR impliqué. A l'état substrat, le complexe I induit un taux de réduction des quinones plus faible que le complexe II. Les mitochondries en présence de tous les substrats adoptent un taux de réduction proche de celui induit par le complexe II. On peut émettre l'hypothèse que le complexe II a un pouvoir de réduction plus important sur les quinones que le complexe I. Les mesures en oxygraphie vont dans le même sens puisque la vitesse de respiration après ajout du glutamate-malate et succinate ($1,3 \text{ nA/sec}$) est proche de celle mesurée pour le succinate seul ($1,1 \text{ nA sec}$). En revanche, à l'état 3 en GMS, la vitesse de respiration est plus forte ($4,7 \text{ nA/sec}$) que celle due au succinate seul (3 nA/sec) ou du glutamate/malate ($2,7 \text{ nA/sec}$), ce qui semble indiquer qu'à l'état 3 le signal mesuré est dû à la contribution des deux complexes.

iii. Comparaison des conditions

Les trois conditions précédentes ont mis en évidence des différences de l'état redox des quinones en fonction des complexes de la CR impliqués. Pour bien les caractériser, nous avons comparé les valeurs d'oxygraphie et de taux de réduction des quinones d'une dizaine d'expériences (pour ces trois conditions) pour l'état substrat et l'état 3 (figure 22).

Pour les valeurs du taux de réduction des quinones, les variations de courant ont été normalisées ; à savoir que le courant mesuré avant l'ajout des mitochondries correspond au 0% et le courant mesuré à l'hypoxie correspond au 100%. A l'état substrat, les résultats montrent ce que l'on a pu voir dans la dernière expérience, à savoir un taux de réduction plus faible avec le substrat du complexe I ($0,5 \pm 0,05$) que le substrat du complexe II seul ($0,85 \pm 0,05$) et en présence des deux substrats ensemble ($0,9 \pm 0,03$). Pour cette dernière condition le niveau est proche de celui observé en présence de succinate. Cela permet de confirmer le phénomène observé dans la figure 21. Pour l'oxygraphie les mêmes tendances sont observées : la respiration mitochondriale est plus faible pour le complexe I que le complexe II ou pour les deux complexes ensemble.

Les résultats à l'état 3 (ADP en excès pour toutes les mesures) sont aussi très intéressants car ils montrent des tendances différentes de l'état substrat. En présence du substrat du complexe I, la respiration mitochondriale est de 360 ± 60 natom O_2 /min/mg contre (340 ± 70) pour le succinate. En présence des trois substrats l'intensité respiratoire augmente avec une valeur de 420 ± 120 .

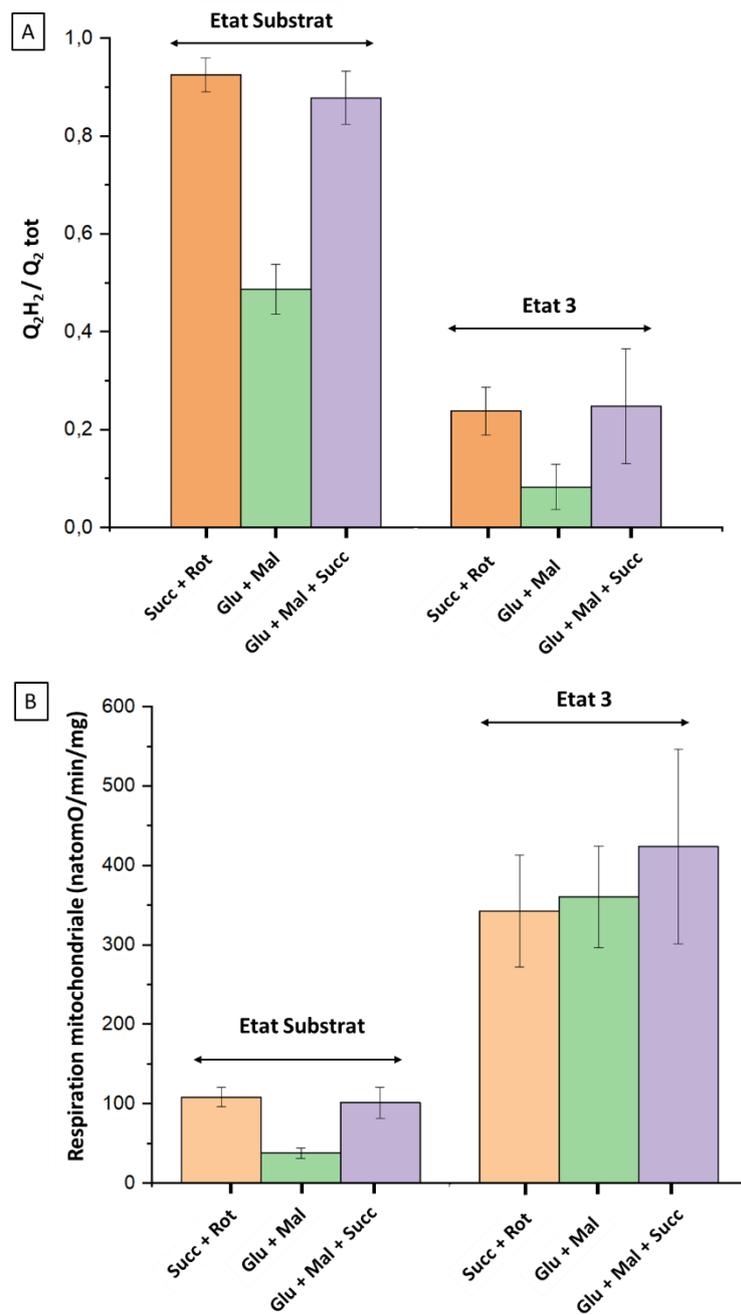


Figure 22 : Histogramme du degré de réduction des quinones pour trois conditions : 1) En présence de glutamate (5 mM) malate (5 mM) ou 2) Succinate (5 mM) et roténone (2 μ M) ou 3) En présence de glutamate malate et succinate. Ces mesures ont été réalisées à l'état substrat et à l'état 3 avec de l'ADP en excès (1 mM). Chaque expérience a été réalisée au moins huit fois. B) Respiration mitochondriale pour les trois conditions.

iv. Relation entre le taux de réduction des quinones et l'activité de la CR

Si je viens de décrire les résultats dans le paragraphe précédent, il est important de comprendre ce qui se passe au niveau de la chaîne respiratoire et pourquoi le taux de réduction des quinones varie. Pour bien comprendre ce dernier point, il faut garder à l'esprit les différentes forces mises en jeu. A l'état substrat (quelle que soit la condition) la force proto-motrice est importante, car il y a peu d'activité de l'ATP synthétase (le potentiel de membrane est de l'ordre de -180 mV), le flux d'électrons est faible (respiration mitochondriale faible), due à la pression de retour des protons qui ralentit la chaîne respiratoire lorsque le potentiel de membrane est élevé. Tout ceci a pour conséquence de maintenir un niveau de quinones réduites important. Ce parallèle avec la force proto-motrice est retrouvé dans l'allure des courbes qui sont similaires pour le suivi des états stationnaires bioénergétiques en microscopie avec le TMRM et le taux de réduction des quinones analysé ici.

En revanche, on voit que ce taux de réduction des quinones à l'état substrat est différent pour le complexe I (50%) et II (90%). Le complexe I pompant des protons depuis la matrice dans l'espace inter-membranaire, est plus sensible à la force proto-motrice que le complexe II qui n'en transporte pas. Cette différence dans la stœchiométrie d'éjection des protons explique pourquoi l'intensité respiratoire est plus faible pour le complexe I que le complexe II.

A l'état 3, l'apport d'une concentration d'ADP en excès entraîne une activité importante de l'ATP synthétase et donc l'entrée de protons dans la matrice mitochondriale, ce qui a pour conséquence de baisser la force proto-motrice et de libérer le flux d'électrons à travers la CR, le taux de réduction des quinones diminue donc drastiquement. Pour bien caractériser ce phénomène une mesure en parallèle du potentiel de membrane serait à réaliser, notamment comme l'a réalisé Anthony I Moore (voir figure 8 ; cf introduction).

De plus à l'hypoxie, il n'y a plus de réduction de l'oxygène, la force proto-motrice collapse, il y a un arrêt du flux d'électrons vers l'oxygène entraînant le taux de réduction des quinones maximal (le complexe III n'oxydant plus les quinones), on est au 100% réduit qui nous permet finalement de comparer les taux de réductions aux différentes étapes.

d) Conclusion

L'objectif de mon travail dans ce chapitre a été de participer à la mise en place d'une expérience du suivi par électrochimie du taux de réduction des quinones mitochondriales. Pour ce faire nous avons utilisé le même protocole que celui du chapitre I qui permettait de suivre les états stationnaires bioénergétiques. Un point innovant de cette étude est d'avoir pu travailler sur mitochondries cardiaques de rat, car aucune étude avec cette technique n'a été réalisée sur des mitochondries de mammifères.

Les résultats obtenus montrent que cette technique est non invasive pour la mitochondrie pour des concentrations faibles en médiateur rédox, comme 1 μM , mais qu'à plus forte concentration cela peut modifier la respiration mitochondriale, bien que cela ne soit pas vrai pour toutes les conditions ; dans ce contexte, des mesures à l'état 3 devront également être réalisées. Nous avons vu que l'intensité du courant est proportionnelle à la concentration en quinone, et bien qu'à 1 μM le courant mesuré soit faible (<5 nA), cette technique profite d'un bon rapport signal-sur-bruit qui permet de suivre sans problème l'évolution du taux de réduction. D'autant plus que le signal est finalement peu sensible au bruit environnant et aux potentielles perturbations. L'autre avantage est la bonne reproductibilité des mesures, même si une adsorption des quinones à la surface de l'électrode est à noter au fur et à mesure des expériences. Comme on a pu le voir avec la figure 22, les valeurs des taux de réduction, quels que soient les états, présentent un écart-type relativement faible qui permet une comparaison facilitée et fiable entre les différentes expériences. Cette reproductibilité se retrouve également au sein même de l'expérience, comme on a pu le voir avec la figure 20 où trois injections d'ADP de même concentration montrent des courbes quasi identiques.

Les résultats montrent également que l'on peut grâce à cette méthodologie suivre de façon dynamique des changements majeurs au niveau de l'état redox mitochondrial, comme le passage à l'état substrat ou à l'état 3 et inversement. On peut d'ailleurs observer et suivre des changements fins du degré de réduction des quinones en injectant différents effecteurs et inhibiteurs à des concentrations faibles, qui induisent des variations transitoires d'activité des complexes de la CR. Autre point, la résolution temporelle des réponses est suffisante pour corrélérer ces mesures avec un suivi en oxygraphie en simultané, cela permet au final de réaliser un suivi multiparamétrique où l'on pourrait même implémenter d'autres mesures avec d'autres capteurs ou méthodes.

III. Perspectives d'études et expériences préliminaires

a) Séquences multi-étapes d'activation-inhibition de la CR

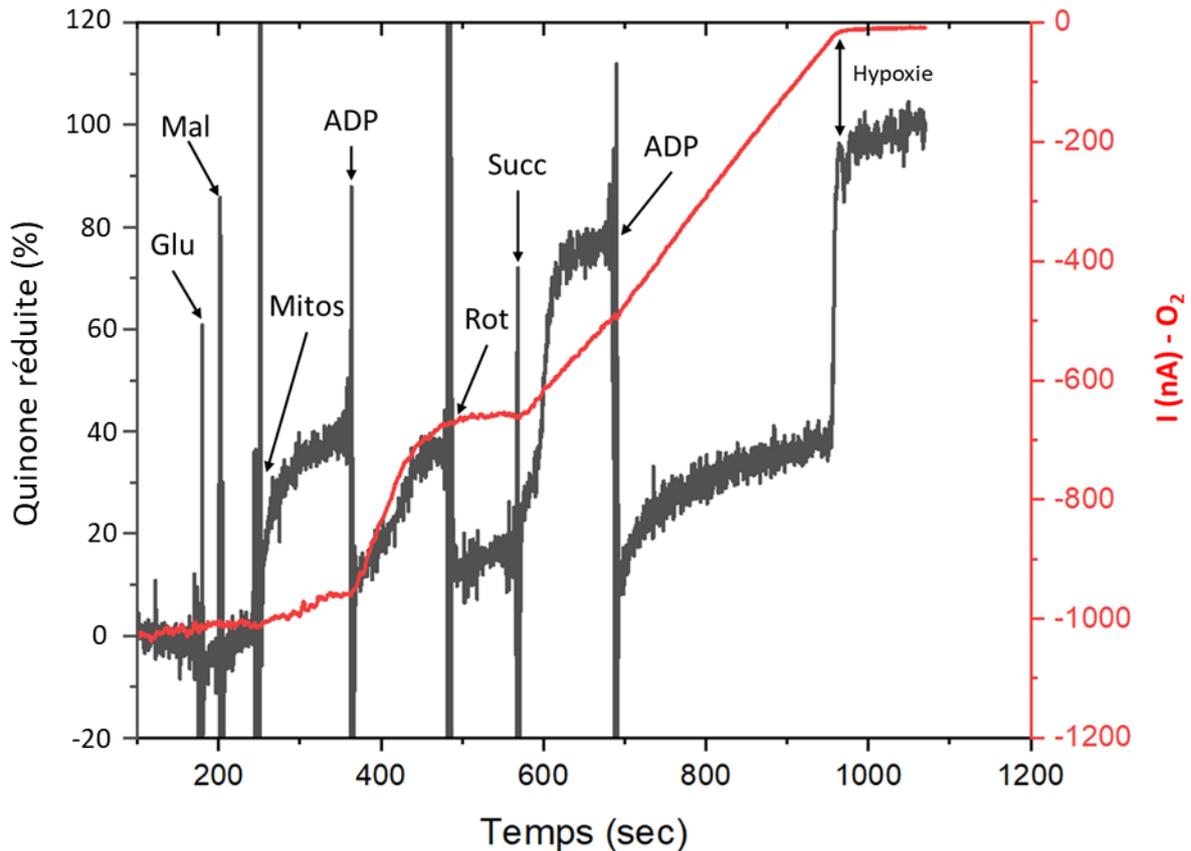


Figure 23 : Suivi de l'intensité du courant en fonction du temps par chronoampérométrie pour le taux de réduction des quinones (courbe noire) et en oxygraphie (courbe rouge). Les flèches correspondent aux injections dans l'ordre : 1) Glutamate à 5 mM, 2) Malate à 5 mM, 3) Mitochondries à 0,4 mg.prot.mL⁻¹ 4) ADP à 0,33 mM, 5) Roténone à 2 μM, 6) Succinate à 5 mM, 7) ADP à 1 mM.

Une première perspective des travaux présentés auparavant a été testée en essayant de moduler de façon plus complexe la CR au sein d'une même expérience. Pour ce faire, nous avons d'abord injecté du glutamate et du malate (la quinone ayant été ajoutée au tampon de respiration en amont de l'expérience) puis ont été injectées les mitochondries. Le taux de réduction augmente alors jusqu'à un plateau à 40%, valeur classique pour ce substrat. Puis on injecte de l'ADP en quantité limitante (0,33 mM) qui induit une baisse transitoire du taux de réduction, couplée à une augmentation de la respiration mitochondriale, pour revenir ensuite à sa valeur initiale. Jusqu'ici le protocole est assez simple, mais au vu de la bonne sensibilité et reproductibilité de cette expérience, nous avons ensuite injecté de la roténone pour inhiber complètement le complexe I, puis du succinate pour activer le complexe II et faire remonter

le taux de réduction jusqu'à 80%. Pour finir, nous avons injecté de l'ADP en excès qui conduit à consommer tout l'oxygène de la solution et permet d'atteindre l'hypoxie.

Si ce protocole n'est que la combinaison des deux premiers protocoles reportés ci-dessus, cela permet de montrer que l'on peut agir de façon séquentielle sur les différents complexes de la chaîne respiratoire. On aurait pu même imaginer aller encore plus loin en inhibant le complexe II avant l'hypoxie avec du malonate, ou le complexe III avec de l'Aa et ainsi continuer le fonctionnement rédox de la chaîne respiratoire.

b) Suivi à l'échelle microscopique du taux de réduction des quinones

Bien d'autres applications sont possibles grâce à la technique développée, comme un couplage de cette approche électrochimique avec l'approche en microscopie développée dans les chapitres I et II. L'objectif à plus long terme de ce travail est d'implémenter cette mesure de quinones à d'autres méthodes afin de réaliser un suivi multiparamétrique plus complet du fonctionnement de la mitochondrie cardiaque.

La figure 25 montre une expérience préliminaire dans laquelle nous avons essayé de coupler cette mesure du taux de réduction des quinones avec l'approche en microscopie. Pour ce faire, nous avons repris le protocole expérimental du chapitre I dans lequel nous avons ajoutés dans la solution mitochondriale les trois électrodes du système de mesure en électrochimie. L'absence d'agitation dans la goutte nous a contraint ici à augmenter la concentration de quinone à 10 μM pour obtenir des courants suffisamment élevés. A la vue du faible volume de solution employée (900 μL) l'ajout d'une électrode de Clark dans cette configuration n'est pas possible ; au même titre, nous ne pouvions utiliser une électrode de carbone vitreux classique car ses dimensions sont trop importantes. Nous avons donc utilisé une microélectrode, celle-ci présente un disque de carbone de 10 microns de diamètre contre plusieurs millimètres pour une électrode classique. Les microélectrodes ont l'avantage de présenter un courant capacitif faible (ainsi qu'un temps de réponse rapide) et l'établissement du régime de diffusion stationnaire à l'échelle de la seconde.

Au final, une fois le système mis en place, cela nous permet de suivre de façon multiparamétrique : les intensités moyennes de fluorescence du TMRM (en rouge) et du NADH (en bleu) pour la population mitochondriale, couplées au suivi du taux de réduction des quinones (en noir). Les photos sous les courbes représentent l'intensité de fluorescence des mitochondries après chaque injection de la séquence.

Les mitochondries (à 0,1 mg.prot.ml⁻¹) ont été ajoutées à T=0 (non montré sur le graphique pour faciliter la lecture des variations). A l'exemple du protocole utilisé dans le chapitre I, un certain temps a été respecté avant la première injection pour laisser le temps aux mitochondries de sédimenter, ici environ 15 minutes. Par la suite les quinones (10 μM)

ont été injectées. Après 19 minutes les substrats glutamate, malate et succinate ont été injectés en une fois. On observe alors pour tous les paramètres une augmentation, que ce soit de l'intensité de fluorescence ou du taux de réduction. Par la suite 1 mM d'ADP a été injecté cela a permis de faire diminuer tous les paramètres ($\Delta\Psi_m$, NADH, Q_2H_2), et, comme mentionné dans le chapitre I, certaines mitochondries ont même « disparu » du suivi en fluorescence, leurs intensités de fluorescence étant devenues trop faibles. Du C-ATR est alors injecté dans la solution, pour faire l'analogie avec le chapitre I. Cependant leurs inhibitions s'effectuent à différents endroits, l'oligomycine inhibe les ATP synthétases en activité alors que le C-ATR va quant à lui inhiber le translocateur des adénines nucléotides (ANT), ce qui va empêcher l'entrée de l'ADP dans la matrice mitochondriale et la sortie de l'ATP. La dernière étape a été l'ajout d'antimycine A qui permet de réduire les quinones en inhibant le complexe III. Les quinones ne peuvent plus dans cette configuration être oxydées par la chaîne respiratoire. Cette inhibition était nécessaire car dans cette configuration en goutte la réoxygénation est importante et l'hypoxie n'est pas atteignable. En présence d'AA le taux de réduction est alors le plus élevé et pour le suivi en fluorescence, cela a permis de collapser le potentiel de membrane, la fluorescence du TMRM n'est plus visible, cependant en NADH, la fluorescence est toujours visible. Cette dernière étant une molécule fluorescente, l'arrêt de la chaîne respiratoire a « figé » l'état rédox du NADH au sein de la mitochondrie qui est toujours visible (cf chapitre II).

Si les résultats présentés ici sont identiques à ceux présentés dans le chapitre I et III séparément, cette expérience préliminaire avait surtout pour objectif de nous permettre de réaliser la preuve de concept que ce suivi multiparamétrique est possible en combinant les approches de microscopie et d'électrochimie.

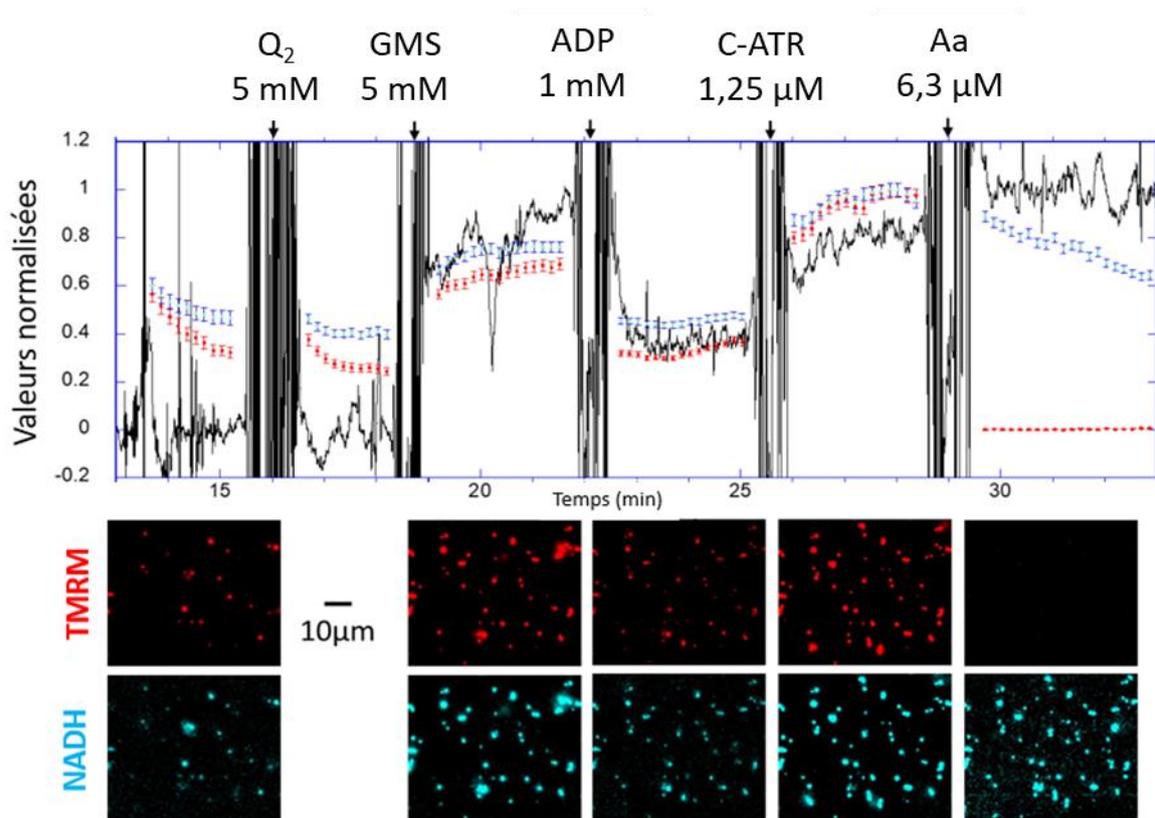


Figure 24 : Suivi du taux de réduction des quinones par chronoampérométrie (en noir) à l'aide d'une microélectrode de carbone, en présence du médiateur rédox Q₂ à 10 μM. L'intensité du courant ici est normalisée vis-à-vis des valeurs en présence d'antimycine A (100%) et avant injection des quinones (0%). En bleu et en rouge sont représentées les courbes du suivi de la moyenne de fluorescence du NADH et du TMRM respectivement de l'ensemble des mitochondries avec les intervalles de confiance sur la moyenne de 95%. La séquence d'injection est la suivante : Q₂ (10 μM), glutamate, malate et succinate (mélangé ensemble avant l'injection à 5 mM), ADP (1 mM), C-ATR (1,25 μM), et l'antimycine A (6,3 μM). Dans les parties inférieures sont montrées les images de fluorescence des mitochondries après chaque injection.

Bibliographie

- Acin-Perez, Rebeca, et Jose A. Enriquez. « The Function of the Respiratory Supercomplexes: The Plasticity Model ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1837, n° 4, avril 2014, p. 444-50. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbabi.2013.12.009.
- Affourtit, Charles, et al. « Control of Plant Mitochondrial Respiration ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1504, n° 1, mars 2001, p. 58-69. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0005-2728(00)00239-5.
- Battino, Maurizio, et al. « Natural Distribution and Occurrence of Coenzyme Q Homologues ». *Membrane Biochemistry*, vol. 9, n° 3, janvier 1990, p. 179-90. DOI.org (Crossref), doi:10.3109/09687689009025839.
- Benard, G., et al. « Functional Dynamic Compartmentalization of Respiratory Chain Intermediate Substrates: Implications for the Control of Energy Production and Mitochondrial Diseases ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 40, n° 8, 2008, p. 1543-54. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.biocel.2007.11.023.
- Ben-Amor, Salem, et al. « Enhanced Detection of Hydrogen Peroxide with Platinized Microelectrode Arrays for Analyses of Mitochondria Activities ». *Electrochimica Acta*, vol. 126, avril 2014, p. 171-78. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.electacta.2013.11.104.
- Blair, P. V., et al. « Studies on the Electron Transfer System. LIV. Isolation of the Unit of Electron Transfer * ». *Biochemistry*, vol. 2, n° 4, juillet 1963, p. 756-64. DOI.org (Crossref), doi:10.1021/bi00904a023.
- Capaldi, R. A., et al. « Structural and Functional Features of the Interaction of Cytochrome c with Complex III and Cytochrome c Oxidase ». *FEBS Letters*, vol. 138, n° 1, février 1982, p. 1-7. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/0014-5793(82)80382-7.
- Cruciat, Cristina-Maria, et al. « The Cytochrome Bc 1 and Cytochrome c Oxidase Complexes Associate to Form a Single Supracomplex in Yeast Mitochondria ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, n° 24, juin 2000, p. 18093-98. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.M001901200.
- Fato, Romana, et al. « Determination of partition and lateral diffusion coefficients of ubiquinones by fluorescence quenching of n-(9-anthroyloxy)stearic acids in phospholipid vesicles and mitochondrial membranes ». *Biochemistry*, vol. 25, n° 11, American Chemical Society, juin 1986, p. 3378-90, doi:10.1021/bi00359a043.
- Fato et al. « Steady-State Kinetics of the Reduction of Coenzyme Q Analogs by Complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase) in Bovine Heart Mitochondria and Submitochondrial Particles † ». *Biochemistry*, vol. 35, n° 8, janvier 1996, p. 2705-16. DOI.org (Crossref), doi:10.1021/bi9516034.
- Gulaboski, Rubin, et al. « Redox Chemistry of Coenzyme Q—a Short Overview of the Voltammetric Features ». *Journal of Solid State Electrochemistry*, vol. 20, n° 12, décembre 2016, p. 3229-38. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s10008-016-3230-7.
- Hackenbrock, Charles R., et al. « The Random Collision Model and a Critical Assessment of Diffusion and Collision in Mitochondrial Electron Transport ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 18, n° 5, octobre 1986, p. 331-68. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/BF00743010.
- Hirst, Judy. « Open Questions: Respiratory Chain Supercomplexes—Why Are They There and What Do They Do? » *BMC Biology*, vol. 16, n° 1, décembre 2018, p. 111. DOI.org (Crossref), doi:10.1186/s12915-018-0577-5.
- Hochli, Luzia, et Charles R. Hackenbrock. « Cytochrome c Oxidase from Rat Liver Mitochondria: Purification and Characterization ». *Biochemistry*, vol. 17, n° 18, septembre 1978, p. 3712-19. DOI.org (Crossref), doi:10.1021/bi00611a006.
- James, Andrew M., et al. « Antioxidant and Prooxidant Properties of Mitochondrial Coenzyme Q ». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 423, n° 1, mars 2004, p. 47-56. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.abb.2003.12.025.

Lass, Achim, et al. « Mitochondrial Ubiquinone Homologues, Superoxide Radical Generation, and Longevity in Different Mammalian Species ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, n° 31, août 1997, p. 19199-204. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.272.31.19199.

Lass, Achim, et Rajindar S. Sohal. « Comparisons of Coenzyme Q Bound to Mitochondrial Membrane Proteins among Different Mammalian Species ». *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 27, n° 1-2, juillet 1999, p. 220-26. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/S0891-5849(99)00085-4.

Lenaz, Giorgio, et al. « Localization and Mobility of Coenzyme Q in Lipid Bilayers and Membranes ». *BioFactors*, vol. 9, n° 2-4, 1999, p. 87-93. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/biof.5520090202.

Lenaz, Giorgio, et Maria Luisa Genova. « Kinetics of Integrated Electron Transfer in the Mitochondrial Respiratory Chain: Random Collisions vs. Solid State Electron Channeling ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 292, n° 4, avril 2007, p. C1221-39. DOI.org (Crossref), doi:10.1152/ajpcell.00263.2006.

Lenaz, Giorgio. « Complex I Function in Mitochondrial Supercomplexes ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, vol. 1857, n° 7, juillet 2016, p. 991-1000. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.bbabi.2016.01.013.

Lenaz, Giorgio. « Coenzyme Q and Respiratory Supercomplexes: Physiological and Pathological Implications ». *Rendiconti Lincei. Scienze Fisiche e Naturali*, vol. 29, n° 2, juin 2018, p. 383-95. DOI.org (Crossref), doi:10.1007/s12210-018-0689-4.

Lucangioli S, et Tripodi V. «The importance of the formulation in the effectiveness of Coenzyme Q10 supplementation in mitochondrial disease therapy». *Der Pharmacia Sinica*, 2012, 3 (4):406-407.

Neergheen, Viruna, et al. "Coenzyme Q10 in the Treatment of Mitochondrial Disease." *Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening*, Jan. 2017, doi:10.1177/2326409817707771.

Milenkovic, Dusanka, et al. « The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex ». *Cell Metabolism*, vol. 25, n° 4, avril 2017, p. 765-76. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.cmet.2017.03.009.

Moore, Anthony L., et al. « Regulation of Electron Transport in Plant Mitochondria under State 4 Conditions ». *Plant Physiology*, vol. 95, n° 1, janvier 1991, p. 34-40. DOI.org (Crossref), doi:10.1104/pp.95.1.34.

Moore, Anthony L., et al. « The Regulation of Oxidative Phosphorylation in Plant Mitochondria: The Roles of the Quinone-Oxidizing and -Reducing Pathways ». *Biochemical Society Transactions*, vol. 21, n° 3, août 1993, p. 765-69. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bst0210765.

Nicholls, David G., et Stuart J. Ferguson. *Bioenergetics*. Fourth edition, Academic Press, Elsevier, 2013.

Quan, May, et al. « Voltammetry of Quinones in Unbuffered Aqueous Solution: Reassessing the Roles of Proton Transfer and Hydrogen Bonding in the Aqueous Electrochemistry of Quinones ». *Journal of the American Chemical Society*, vol. 129, n° 42, octobre 2007, p. 12847-56. DOI.org (Crossref), doi:10.1021/ja0743083.

Sayegh, Adnan, et al. « Diverting Photosynthetic Electrons from Suspensions of *Chlamydomonas Reinhardtii* Algae - New Insights Using an Electrochemical Well Device ». *Electrochimica Acta*, vol. 304, mai 2019, p. 465-73. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.electacta.2019.02.105.

Schägger, Hermann. « Respiratory Chain Supercomplexes ». *IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)*, vol. 52, n° 3-5, septembre 2001, p. 119-28. DOI.org (Crossref), doi:10.1080/15216540152845911.

Schon, Eric A., et Norbert A. Dencher. « Heavy Breathing: Energy Conversion by Mitochondrial Respiratory Supercomplexes ». *Cell Metabolism*, vol. 9, n° 1, janvier 2009, p. 1-3. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/j.cmet.2008.12.011.

Schwerzmann, K., et al. « Molecular Architecture of the Inner Membrane of Mitochondria from Rat Liver: A Combined Biochemical and Stereological Study. » *The Journal of Cell Biology*, vol. 102, n° 1, janvier 1986, p. 97-103. DOI.org (Crossref), doi:10.1083/jcb.102.1.97.

Suraniti, Emmanuel, et al. « Electrochemical Monitoring of the Early Events of Hydrogen Peroxide Production by Mitochondria ». *Angewandte Chemie*, vol. 126, n° 26, juin 2014, p. 6773-76. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/ange.201403096.

Takayanagi, R., et al. « NADH- and NADPH-Dependent Lipid Peroxidation in Bovine Heart Submitochondrial Particles. Dependence on the Rate of Electron Flow in the Respiratory Chain and an Antioxidant Role of Ubiquinol ». *Biochemical Journal*, vol. 192, n° 3, décembre 1980, p. 853-60. DOI.org (Crossref), doi:10.1042/bj1920853.

Takemori, S., et T. E. King. « Coenzyme Q: Reversal of Inhibition of Succinate Cytochrome c Reductase by Lipophilic Compounds ». *Science*, vol. 144, n° 3620, mai 1964, p. 852-53. DOI.org (Crossref), doi:10.1126/science.144.3620.852.

Turkowicz, Monika Joanna, et Joanna Karpińska. « Analytical Problems with the Determination of Coenzyme Q 10 in Biological Samples ». *BioFactors*, vol. 39, n° 2, mars 2013, p. 176-85. DOI.org (Crossref), doi:10.1002/biof.1058.

Turrens, Julio F., et al. « Ubisemiquinone Is the Electron Donor for Superoxide Formation by Complex III of Heart Mitochondria ». *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 237, n° 2, mars 1985, p. 408-14. DOI.org (Crossref), doi:10.1016/0003-9861(85)90293-0.

Yu, C. A., et al. « Soluble Cytochrome b-c1 Complex and the Reconstitution of Succinate-Cytochrome c Reductase ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 249, n° 15, août 1974, p. 4905-10.

Zhang, Mei, et al. « Gluing the Respiratory Chain Together: CARDIOLIPIN IS REQUIRED FOR SUPERCOMPLEX FORMATION IN THE INNER MITOCHONDRIAL MEMBRANE ». *Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, n° 46, novembre 2002, p. 43553-56. DOI.org (Crossref), doi:10.1074/jbc.C200551200.

CONCLUSIONS GENERALES

Les objectifs de ma thèse étaient à la fois de réaliser des développements analytiques et de les mettre en oeuvre pour caractériser des activités et mécanismes impliquant les mitochondries dans la contraction-relaxation cardiaque. J'ai donc tout d'abord développé deux types d'approches méthodologiques. La première, celle principalement utilisée dans mes travaux, consiste en une méthode semi-automatique d'analyse par microscopie de fluorescence de paramètres bioénergétiques essentiels, à savoir le potentiel de membrane (via le TMRM) et le taux de NADH endogène, sur de petites populations de mitochondries isolées. Cette méthode présente de nombreux avantages, comme celui d'augmenter de façon significative le rapport signal/bruit grâce au traitement multi-étapes des images de microscopie, et ensuite de pouvoir travailler à différentes échelles d'analyse simultanément : sur une population de plusieurs milliers de mitochondries, représentative statistiquement, mais avec une résolution individuelle. Nous avons également pu suivre les déplacements des mitochondries sur différents supports de mesure, et avons observé l'effet important de leur hydrophilie de surface pour aider à l'immobilisation (et non pas l'attachement) des mitochondries afin de favoriser leur suivi au cours du temps. Nous avons ainsi analysé pour chaque expérience un grand nombre d'objets, pour lesquels nous avons suivi des variations dynamiques et quantitatives de leurs paramètres au cours d'états bioénergétiques de référence (cf chapitre I). Nous avons ainsi à la fois confirmé les résultats trouvés par les techniques classiques comme le spectrofluorimètre, mais surtout, nous avons pu les transposer et les réaliser à l'échelle de la mitochondrie individuelle. Nous avons ainsi caractérisé de façon dynamique l'hétérogénéité des réponses des mitochondries et avons discriminé des sous-populations. Nous avons par exemple retrouvé dans nos échantillons deux populations d'objets qui se distinguent par leur taille (800 nm et 1400 nm) et qui semblent correspondre à la distinction des mitochondries intra-fibrillaires et sub-sarcolemmales des cardiomyocytes. Si dans notre étude, nous avons suivi la fluorescence du TMRM et du NADH, une force de cette approche est que l'on peut appliquer les protocoles développés pour différents types de sondes et ce, en simultané. Une des perspectives à court terme serait donc de tester une sonde pour suivre les flux de calcium, comme Fura-2 ou Fura-4, ou une sonde pour la détection des ROS comme MitoSOX, à l'échelle de mitochondries uniques.

Si à travers le chapitre I, nous avons caractérisé cette méthode d'analyse, celle-ci a été créée avec pour objectif final d'aider à répondre à l'hypothèse de travail du projet ANR « MITOCARD » : mesurer des dépolarisations transitoires du potentiel de membrane mitochondrial, relatives à l'ouverture du mPTP dans le contexte de la contraction cardiaque. Pour cela, des scripts informatiques ont été développés pour séparer chaque réponse mitochondriale au sein d'une population, et ensuite pour détecter des pics de fluorescence et les caractériser finement. Grâce à ces protocoles automatisés, nous avons pu détecter deux grands types de dépolarisations que nous relierons à des modes d'ouverture du mPTP : celles définitives et celles transitoires. Ces deux types de réponses existent pour toutes les

mitochondries et sont sensibles aux mêmes inducteurs : le calcium et/ou la photo-illumination ; en revanche, ils ne sont pas sensibles au même inhibiteur puisque l'utilisation de la Cyclosporine A (CsA, inhibiteur spécifique du mPTP) permet d'inhiber l'ouverture définitive ou pathologique du pore, mais pas les ouvertures transitoires. A contrario, en empêchant les mitochondries de « mourir », la CsA augmente la quantité d'évènements transitoires observés, tout ceci suggère des mécanismes, au moins en partie, différents entre ces deux modes d'ouvertures. Si nous avons travaillé avec les régulateurs principaux du mPTP, il en existe bien d'autres et il serait intéressant pour poursuivre cette étude d'en tester : par exemple en ajoutant de l'oligomycine comme inhibiteur de l'ATP Synthétase, qui serait d'après une hypothèse le constituant du pore, ou encore utiliser de l'atractyloside (ATR) qui serait un sensibilisateur du mPTP.

Concernant les caractéristiques des dépolarisations transitoires, nous avons pu en observer deux types principaux, nommés type-1 et type-2, qui diffèrent par leur profil cinétique et leur intensité de dépolarisation, sans pour l'instant savoir si cela correspond à deux mécanismes différents ou à un même mécanisme, avec d'intensités plus ou moins fortes. Si les scripts informatiques mis en place permettent dorénavant leur détection plus facilement, par la suite de nombreux paramètres pourront être améliorés, comme notamment être capable de mesurer la vitesse de repolarisation pour discriminer les faux positifs, ou encore faciliter l'identification des mêmes mitochondries sur deux jeux d'images différents, réalisés simultanément. Par ailleurs, à la vue de la sensibilité des événements à la photo-illumination, le choix des conditions d'acquisition est très important car cela peut profondément modifier l'apparition des ouvertures pathologiques du mPTP et cela semble également changer les cinétiques des ouvertures transitoires. Une des perspectives de cette étude serait de tester divers antioxydants, comme par exemple le MITO-TEMPO qui pourrait limiter cette photo-toxicité, ou au contraire faire varier la concentration en sonde TMRM afin d'évaluer son effet direct sur les caractérisations du mPTP. Cependant, la perspective expérimentale la plus directe de cette étude, serait de suivre les flux de calcium mitochondriaux en parallèle du potentiel de membrane. Comme on a pu l'observer dans le chapitre II, toute dépolarisation n'est pas forcément liée au mPTP, mais pourrait correspondre comme au moment de l'ajout du calcium, à l'entrée de ce cation dans la matrice mitochondriale allant à l'encontre du potentiel de membrane. Or, notre hypothèse de travail est de suivre les ouvertures transitoires du pore comme système rapide d'efflux du calcium, il est donc primordial par la suite de pouvoir comprendre les flux calciques. A plus long terme nous pourrions utiliser cette technique pour caractériser si des altérations de ces mécanismes d'ouvertures transitoires existent entre des cardiomyocytes sains et pathologiques comme après une ischémie-reperfusion par exemple.

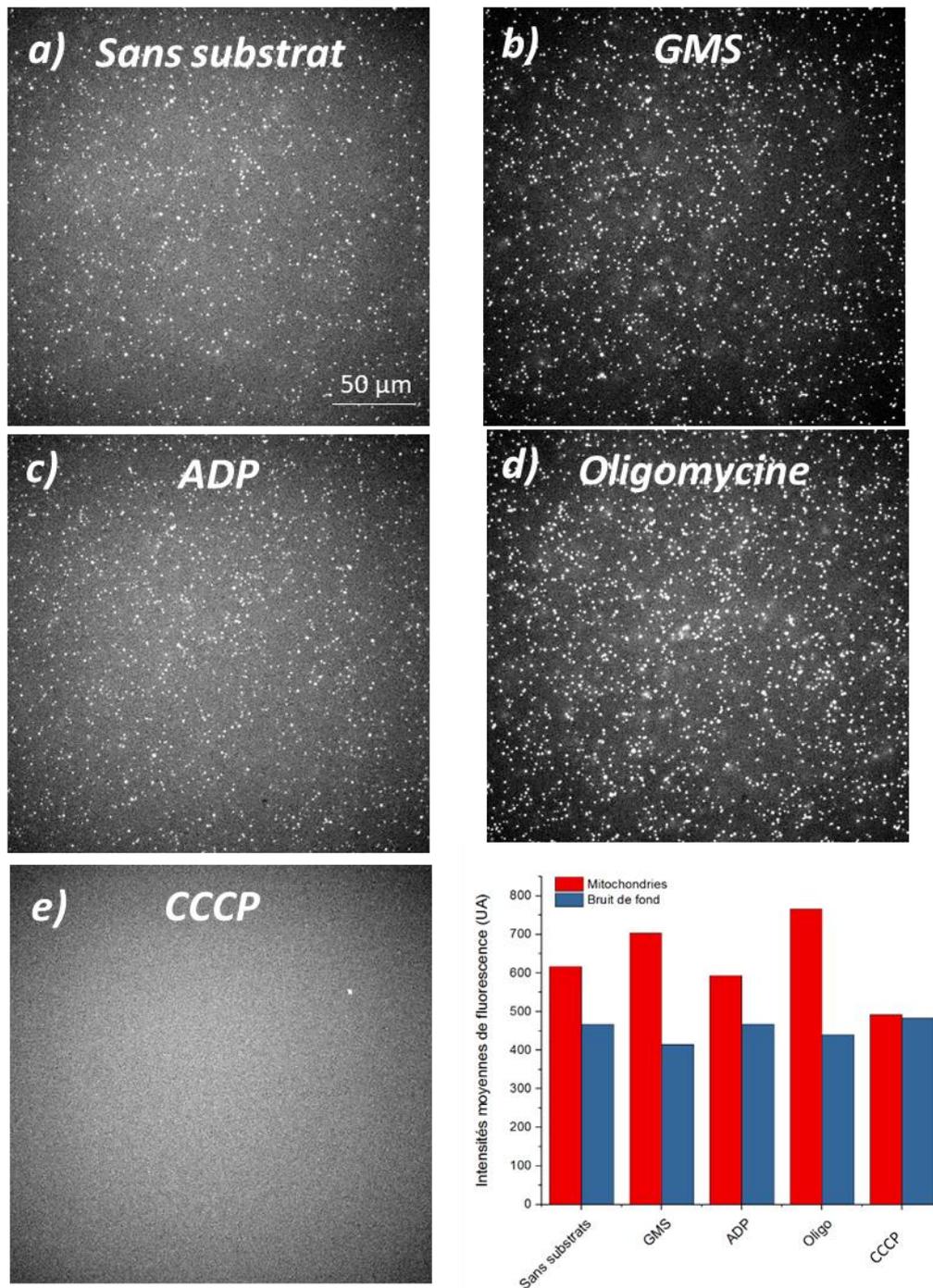
Le dernier objectif de ma thèse a été de mettre en œuvre des méthodes électrochimiques pour réaliser le suivi d'autres paramètres mitochondriaux importants et différents de ceux mesurés par fluorescence. J'ai participé à la mise en place et à la caractérisation d'un suivi électrochimique simultané de la consommation d'oxygène et du taux de réduction des quinones mitochondriales, ce qui n'a jamais été reporté jusqu'à présent pour des mitochondries de mammifères. Ces paramètres sont très importants car intimement liés à la production des ROS qui est un activateur fort du mPTP. Ainsi, à travers le chapitre III, nous avons pu observer que le taux de réduction des quinones est différent en fonction du complexe actif de la chaîne respiratoire ; le complexe II induisant un taux de réduction plus important que le complexe I, ce qui sous-entend un contrôle fin des différentes forces mises en place dans la CR. Pour aller plus loin, il faudrait implémenter ce système notamment par un suivi quantitatif du potentiel de membrane, car, en fonction du potentiel, la pression de retour des protons sur la CR n'est pas la même et c'est un paramètre important de la régulation des complexes. Nous avons également observé que l'ajout de quinones externes, nécessaire à la mesure puisqu'elle est indirecte, peut avoir un impact sur la respiration mitochondriale, cet effet est notable sur le complexe II à l'état substrat, mais pas sur le complexe I. Il faudra donc compléter cette étude en réalisant notamment des analyses de l'effet du médiateur rédox exogène sur l'état 3 ou encore sur la production des radicaux libres. Une étude a été initiée au laboratoire afin de répondre à ces questions, qui consiste à suivre simultanément la consommation d'oxygène mitochondriale, le taux de réduction des quinones ainsi que la production de radicaux libres (peroxyde d'hydrogène essentiellement) grâce au système de détection indirecte par fluorescence HRP/Amplex red. De nombreuses questions sont soulevées par les résultats de cette étude, comme par exemple de savoir quelle réserve de quinones de la CR on sonde au cours de ce suivi indirect. Comme détaillé dans le chapitre III, de nombreuses études semblent montrer l'existence de divers types de réserves de quinones, avec une partie accessible et une autre non. Cette question se complexifie d'autant plus avec l'existence des supercomplexes, et notamment le respiratosome dans lequel des quinones semblent « piégées ». Pour cela, des analyses réalisées par extraction à chaque étape de la séquence d'activation-inhibition utilisée seraient intéressantes à réaliser afin d'approfondir nos résultats. Une des perspectives méthodologiques de ce travail, et dont les résultats préliminaires sont montrés à la fin du chapitre III, serait d'implémenter cette méthode avec celle développée en microscopie afin d'avoir une méthode multiparamétrique qui permet le suivi le plus complet des activités mitochondriales. De par la résolution de mitochondries uniques offerte par la microscopie, et aussi la possibilité de réaliser une détection électrochimique sur des volumes équivalents à quelques mitochondries avec les ultramicroélectrodes, nous pouvons espérer à terme réaliser des mesures couplées sur objets uniques par les deux approches.

Conclusions générales

A plus long terme ces méthodes électrochimiques pourraient être utilisées pour caractériser l'état redox des quinones dans le cancer, car dans cette pathologie, il y a un changement métabolique important (effet Warburg) avec la mise en place d'une fermentation lactique plutôt que la phosphorylation oxydative. Ce qui veut dire qu'au niveau mitochondrial, il y a une très faible activité de la CR, et donc un redox des quinones qui doit être différent d'une cellule saine. Nous pourrions ainsi mieux comprendre et caractériser les processus sous-jacents.

ANNEXES

I. Annexes :



Annexe 1 : images brutes (sans traitement) de la fluorescence de mitochondries isolées marquées à l'aide du TMRM à 10 nM, après chaque étape de la séquence suivante : A) Mitochondrie après 20 minutes de sédimentation. B) Après injection de glutamate/malate et succinate. C) Après injection d'ADP. D) Après injection de CCCP. E) Comparaison des intensités moyennes de fluorescence pour les mitochondries et le bruit de fond à chaque étape.

```

import matplotlib.pyplot as plt
import pandas as pd
import numpy

# Selectionne le dossier contenant le fichier
import os
os.getcwd()
os.chdir("D:\\Chapitre MIMB\\N2.1")

# lecture du fichier "Spots in tracks statistics"
df = pd.read_csv("Spots in tracks statistics.csv", delimiter = ',')

#Classe les données par 'Track ID'
ID=df.groupby('TRACK_ID')
plt.rcParams.update({'figure.max_open_warning': 0})
plt.figure()

# Création d'une boucle pour les TRACK_ID
for i, (ID_name, ID_gdf) in enumerate(ID):
    # Filtre du mouvements
    if ID_gdf['POSITION_Y'].max() - ID_gdf['POSITION_Y'].min()<20\
    and ID_gdf['POSITION_X'].max() - ID_gdf['POSITION_X'].min()<20\
    # Filtre de temps
    and ID_gdf['TRACK_ID'].count()>5:
        list1=list(ID_gdf['FRAME'])
        list2=list(ID_gdf['TOTAL_INTENSITY'])
        df = pd.DataFrame(list(zip(*[list1, list2]))).add_prefix('Col')

        # Création d'un fichier tableur avec les mitochondries sélectionnées
        df.to_csv('Nombre après filtre.csv', header=None, mode='a', index=False)

df = pd.read_csv("Nombre après filtre.csv", delimiter = ',')

# Classe les données par images
ID2=df.groupby(df.columns[0])
for i, (FRAME_name, FRAME_gdf) in enumerate(ID2):
    y=numpy.array(list(FRAME_gdf[df.columns[1]])).astype(numpy.float)

    # Calcul de la fluorescence moyenne
    MEAN=numpy.mean(y)
    # Calcul de l'écart-type
    Std=numpy.std(y)
    # Calcul du nombre de mitochondries par image
    Nb=len(y)

# Création du tableur contenant les données
with open(r'mean after filter.csv','a')as Nnb:
    print(i,FRAME_name, Nb, MEAN,Std ,sep=',', file=Nnb)

```

Annexe 2 : Script python pour le calcul de la fluorescence moyenne, de l'écart-type et du nombre de mitochondries individuelles pour chaque image.

```
# Importer les librairies nécessaire
```

```
import matplotlib.pyplot as plt  
import pandas as pd
```

```
# Lire le tableur
```

```
df = pd.read_csv("Spots in tracks statistics.csv", delimiter = ',')  
# Classer les données par 'TRACK_ID'  
ID=df.groupby('TRACK_ID')  
plt.rcParams.update({'figure.max_open_warning': 0})
```

```
plt.figure()
```

```
# Création d'une boucle des données
```

```
for i, (ID_name, ID_gdf) in enumerate(ID):  
    # Filtre du mouvements  
    if ID_gdf['POSITION_Y'].max() - ID_gdf['POSITION_Y'].min()<25\  
    and ID_gdf['POSITION_X'].max() - ID_gdf['POSITION_X'].min()<25\  
    # Filtre de temps  
    and ID_gdf['TRACK_ID'].count()>150 :
```

```
    a=list(ID_gdf['FRAME'])[1:])
```

```
# Création d'une boucle sur le numéro d'image
```

```
for l, x in enumerate(a):  
    # Soustraction des numéros d'images  
    y=[x - a[l - 1]]  
    ly = ["y"]  
    T_I1=list(ID_gdf['TOTAL_INTENSITY'])[l: l+1])
```

```
# Création du tableur contenant les données
```

```
with open(r'mPTP_transient Total.csv','a') as fd:  
    print(i,a[l - 1],T_I1[0],x,y[0],E_D[0],sep=',', file=fd)
```

Annexe 3 : Script python pour la détection des dépolarisations transitoires de type 2

```
# importer les librairies nécessaire
import pandas as pd
import numpy

# lire le fichier csv
df = pd.read_csv("Spots in tracks statistics.csv",delimiter = ',')
ID=df.groupby('TRACK_ID')

# Création d'une boucle sur le "TRACK_ID"
for i, (ID_name, ID_gdf) in enumerate(ID):
    # Filtre du mouvement
    if ID_gdf['POSITION_Y'].max() - ID_gdf['POSITION_Y'].min()<25\
    and ID_gdf['POSITION_X'].max() - ID_gdf['POSITION_X'].min()<25\
    # Filtre de temps
    and ID_gdf['TRACK_ID'].count()>150:

        # Récupérer la dernière intensité de fluorescence de la mitochondrie
        LastElementY= list(ID_gdf['TOTAL_INTENSITY'])[-1]
        # Récupérer le dernier numéro d'image où apparaît la mitochondrie
        LastElementX= list(ID_gdf['FRAME'])[-1]

        X2=numpy.array(LastElementX)
        Y2=numpy.array(LastElementY)

        y=numpy.array(list(ID_gdf['TOTAL_INTENSITY']))
        ymean=numpy.median(y)

        # Comparer le dernier numéro d'image au temps total de l'acquisition
        if X2 < 495 :
            # Sauvegarder les données
            with open(r'mPTP_patho.csv','a') as fd:
                print(i,X2,Y2,ymean,sep=',', file=fd)
```

Annexe 4 : Script python pour la détection des dépolarisations transitoires de type 3

```

# importer les librairies nécessaires
import matplotlib.pyplot as plt
import pandas as pd
import numpy
import numpy.ma as ma
from scipy.signal import find_peaks, peak_prominences
from scipy.signal import peak_widths
from scipy.optimize import curve_fit

#lecture du fichier csv
df = pd.read_csv("Spots in tracks statistics.csv",delimiter = ',')

#grouper les données par 'Track ID'
ID=df.groupby('TRACK_ID')
plt.rcParams.update({'figure.max_open_warning': 0})
plt.figure()

# Création d'une boucle pour les "TRACK_ID"
for i, (ID_name, ID_gdf) in enumerate(ID):
    # filtre du mouvements
    if ID_gdf['POSITION_Y'].max() - ID_gdf['POSITION_Y'].min()<25\
    and ID_gdf['POSITION_X'].max() - ID_gdf['POSITION_X'].min()<25\
    # filtre de temps
    and ID_gdf['TRACK_ID'].count()>200 :

        #méthode de lissage des courbes (moyenne mobile)
        rolling_mean=ID_gdf['TOTAL_INTENSITY'].rolling(2).mean()
        mean2=rolling_mean.fillna(value=ID_gdf['TOTAL_INTENSITY'])

        #création d'un sous tableau pour x et y
        ybase=numpy.array(list(ID_gdf['TOTAL_INTENSITY']))
        #y est multiplié par -1 pour la détection des pics
        y=numpy.array(list(ID_gdf['TOTAL_INTENSITY']))*-1
        x=numpy.array(list(ID_gdf['FRAME']))

        #création de la ligne de base sous la forme d'une exponentiel décroissante
        def funct(x,a,b,c):
            return a * numpy.exp(-b * x) + c
        popt, pocv = curve_fit(funct, x, mean2,p0 = numpy.array([10,0.1,10]), maxfev = 5000)

        #soustraction de la ligne de base
        y2=y+funct(x,*popt)
        baseline_values=funct(x,*popt)

        #courbe corrigée + moyenne mobile de 2
        s=pd.DataFrame(y2)
        y3=s.rolling(2).median()
        y4=y3.fillna(value=s)
        y2_mean=numpy.array(y4[0])

```

#calcul de la déviation standard mobile

```
s2=s.rolling(100).std()
s3=s2.fillna(value=s2.mean())
s5=numpy.array(s3[0])
min_std=s5.min()
```

#coefficient de multiplication du minimum de la déviation standard mobile

```
s6=min_std*4
AA=numpy.mean(y2_mean)
Mean_y2=numpy.mean(ma.masked_less_equal(AA,AA*2))
Height=(min_std*1)-Mean_y2
```

#méthode de détection des pics

```
peaks, _ = find_peaks(y2_mean, height=(1500,None),prominence=(s6,None)\
,wlen=(40),width=(5,25), distance=None)
```

#hauteurs des pics

```
prominences,left_bases, right_bases = peak_prominences(y2_mean, peaks, wlen=(40))
contour_heights = prominences- y2_mean[peaks]
```

#largeur des pics à mi-hauteur (50%)

```
results_full = peak_widths(y2_mean, peaks, rel_height=0.5,prominence_data=None,
wlen=(40))
```

#largeur des pics à 20% et à 90%

```
ninety = peak_widths(y2_mean, peaks, rel_height=0.9,prominence_data=None, wlen=(40))
twenty = peak_widths(y2_mean, peaks, rel_height=0.2,prominence_data=None, wlen=(40))
with open (r'DeltaT.csv','a') as DeltaT:
    print(i, ninety, '\\',twenty,sep=',', file=DeltaT)
```

#aire sous la courbe

```
area_under_peak = numpy.trapz(y2_mean, x) - numpy.trapz(baseline_values, x)
```

#sauvegarde des données

```
with open (r'Baseline.csv','a') as Baseline:
    print(i, baseline_values,sep=',', file=Baseline)
```

```
with open (r'Area under peak.csv','a') as Area:
    print(i, area_under_peak, sep=',', file=Area)
```

```
with open (r'Prominences.csv','a') as Prominences:
    print(i, prominences,left_bases,right_bases, sep=',',file=Prominences)
```

```
with open (r'Height.csv','a') as Heights:
    print(i, Height, sep=',',file=Heights)
```

```
with open (r'Half widths.csv','a') as Widths:
    myList2 = (" , ").join(map(str,results_full))
    print(i, myList2, sep=',',file=Widths)
```

```
with open (r'Peak2.csv','a') as Peak2:
    print(i,peaks,left_bases,sep=',',file=Peak2)
```

```
with open (r'All data.csv','a') as All:  
    print(i,_sep=',',file=All)
```

```
with open (r'min stdv.csv','a') as min_stdv:  
    print(i,min_std, s6,sep=',',file=min_stdv)
```

```
# création des graphiques de la détection des pics
```

```
fig, ax = plt.subplots(figsize=(15,15))  
y2_mean*=-1  
s5*=-1  
plt.plot(x,y2_mean,marker='o',markersize=12, label="Courbe de Fluo corr")  
plt.plot(x[peaks], y2_mean[peaks], "ro",markersize=12, label="Peak")  
plt.vlines(x=peaks, ymin=contour_heights, ymax=y2_mean[peaks])  
plt.hlines(*results_full[1:], color="C3")  
ax.legend()  
ax.set_ylabel('Intensity of fluorescence (UA)')  
ax.set_xlabel('Time (Frame)')  
plt.title(ID_name)  
plt.savefig('ExpoPeaks'+str(i)+'.png')
```

Annexe 5 : Script python pour la détection des dépolarisations transitoires de type 1