



THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Etude de la réponse apoptotique de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial

ROMMELAERE, Guillaume

Award date:
2005

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**ETUDE DE LA REPONSE APOPTOTIQUE DE CELLULES PRESENTANT
UN DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Guillaume ROMMELAERE

Juin 2005

Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur
Téléphone : + 32(0)81.72.44 – Téléfax= + 32(0)81.72.4420
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be
<http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

Etude de la réponse apoptotique de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial

ROMMELAERE Guillaume

Résumé

De nombreuses pathologies neurodégénératives et neuromusculaires sont sous-tendues par un dysfonctionnement du métabolisme bioénergétique des mitochondries. C'est notamment le cas du syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy Ragged Red Fibers) provoqué par des mutations ponctuelles dans le gène mitochondrial codant pour des ARNt^{Lys}. Les cellules cybrides provenant de cellules déplétées en ADN mitochondrial (ρ^0) repeuplées avec des mitochondries de patients sains ou portant la mutation A8344G à l'état hétéroplasmique sont souvent utilisées comme modèle d'étude du dysfonctionnement mitochondrial. Les pathologies dégénératives sont souvent associées à une mortalité cellulaire par apoptose. Cependant, les quelques études réalisées sur la réponse apoptotique de ces cellules sont controversées et les résultats contradictoires obtenus semblent être fonction du type cellulaire étudié, du stimulus pro-apoptotique considéré et de la nature du dysfonctionnement mitochondrial. Cette étude a été réalisée dans le but de mieux caractériser la sensibilité de cellules cybrides MERRF mutées (A8344G) à l'apoptose induite par la staurosporine.

Dans un premier temps, l'utilisation d'un microarray à ADN (Human General Chip) a indiqué une sous-expression, dans les cellules cybrides mutées, de plusieurs transcrits de gènes codant des protéines pro- (Bid, les caspases,...) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L,...).

Dans un deuxième temps, nous avons montré que les cellules cybrides MERRF mutées sont plus sensibles que les cellules parentales à la mortalité induite par la staurosporine, en dosant l'activité de la caspase-3 (une protéase effectrice de l'apoptose) et la fragmentation de l'ADN génomique, un marqueur terminal de la mort cellulaire programmée. Le niveau d'expression et/ou la localisation de plusieurs acteurs apoptotiques (Bax, Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 et du cytochrome c) dans ces cellules en réponse à la staurosporine a également été étudié par Western blotting à partir de fractions subcellulaires et par des marquages en immunofluorescence. Nous observons que la staurosporine induit une augmentation de l'abondance de la protéine pro-apoptotique Bax dans les fractions mitochondriales des deux lignées cellulaires et une diminution d'abondance de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 plus importante dans les cellules cybrides mutées. Finalement, nous avons utilisé un microarray (DualChipTM Human Apoptosis) permettant une analyse plus ciblée des modifications d'expression de gènes codant des protéines pro- et anti-apoptotiques induites par un traitement à la staurosporine.

Dans ce travail, nous avons donc contribué à caractériser la réponse de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial à un stimulus pro-apoptotique dans un modèle relevant de pathologie mitochondriale. Les résultats obtenus devraient ouvrir la voie à des études plus fonctionnelles permettant de comprendre les mécanismes responsables de l'augmentation de la sensibilité des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial à l'apoptose.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2004

Promoteur : P. Renard

Co-promoteur : T. Arnould

Remerciements

Je souhaiterais remercier plusieurs personnes sans qui le travail qui suit n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie premièrement Monsieur José Remacle et Madame Martine Raes de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Merci à toi Patsy pour ta patience, pour la confiance que tu as eu en moi et pour tout le boulot que tu as fait pour moi. Pourvu que ça dure.... Merci à Thierry, ce scientifique passionné et rigoureux qui est parvenu à me rendre en peu de force et de courage avant d'amorcer la longue et fatigante dernière ligne droite. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout le boulot que vous avez fourni pour moi, et Dieu (pas Marc...) sais que ça n'a pas du être évident tous les jours...(j'espère que thierry ne s'est pas trop arracher les cheveux...).

Merci à mes compagnons de cellules avec qui il fut agréable de partager les bons et les mauvais moments, merci Dams, Julien, Chapo, et Guillaume. Un Merci particulier au flamant des Gattes ... c'est plus motivant de passer de longues soirées devant son PC quand on est pas le seul...

Merci à toi, Laeti de m'avoir suivi lors de mes premiers pas au labo, d'être toujours disponible et souriante. Sans ta micropipette je ne rendrais pas ce travail aujourd'hui...

Merci au Bureau du fond à droite,... Merci à Ludo pour l'aide précieuse qu'il m'a apportée pour la conception de mes figures, merci à JPP, Monsieur Apoptose, toujours disponible pour répondre aux questions quelles qu'elles soient, et MERCI à toi Maitre VaNKO pour tous les conseils éclairés dont tu m'as fait part, pour tes discours sur le devenir de la planète, et pour tout le reste,... tu sais de quoi je parle !!

Merci aux filles d'en face également... (je ne sais toujours pas si « mes résultats me satisfont »,... n'est-ce pas Marianne...).

Merci aux techniciens toujours présents quand il faut et un grand merci à Andrée plus particulièrement.

Merci à M-C, Merci à Yeliz pour les pauses STRESS,...

Merci au Bureau des demoiselles qui m'ont accueilli sur leurs Macs « Blancs », j'espère ne pas vous avoir trop déranger. Merci à Cindy pour l'orthographe.

Je remercie également la Familia, tout le monde m'a toujours soutenu avec une foi aveugle ... merci énormément pour le soutien que vous m'apporté.

Merci aussi à tous ceux que j'oublie et qui ont participé de près ou de loin à la réussite de ce travail.

Et enfin, je remercie les membres de mon jury d'avoir accepté de porter un regard critique sur ce travail. D'emblée, je vous souhaite à tous une agréable lecture...

Abréviations

ADPRT	ADP RibosylTransferase
AIF	Apoptosis Inducing Factor
ANT	Adenine Nucleotide Translocator
API	Activator Protein 1
Apaf-1	Apoptosis Protease Activating Factor
APS	Ammonium Persulfate
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
BH domain	Bcl-2 Homology domain
BIR	Baculovirus IAP Repeats
BIRC	BIR domain Containing protein
BSA	Bovine Serum Albumine
CAD	Caspase Activated Dnase
CaMKIV	Calcium-Calmoduline Kinase IV
CARD	Caspase-Recruitment Domain
CPEO	Chronic Progressive External Ophthalmopelia
CREB	cAMP Responsive Element Binding protein
Cs A	Cycloporine A
Cyc D	Cyclophilin D
DD	Death Domain
DED	Death Effector Domain
DHG	Dulbecco Modified Eagle's Medium-High Glucose
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
FADD	Fas Associated Death Domain
Gpx	Glutathion Peroxydase
GR	Glutathion Réductase
GST	Glutathion S Transférase
IAP	Inhibitor of Apoptose Protein
iCAD	Inhibitor of CAD
JNK	Jun N terminal Kinase
KSS	Kearnes-Sayre Syndrome
MELAS	Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers
MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NLS	Nuclear Localization Sequence
NRF1	Nuclear Respiratory Factor-1
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBR	Peripheral Benzodiazepine Receptor
PBS	Phosphate Buffer Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Pi3K	PhosphoInositide-3 Kinase
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protease Inhibitor Cocktail
PKA	Protéine Kinase A
PKB	Protéine Kinase B

PKC	Protéine Kinase C
PPARalpha	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha
PTP	Permeability Transition Pore
ROS	Reactive Oxygen Species
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOD	Superoxide Dismutase
STS	Staurosporine
SVF	Sérum de Veau Foetal
TBP	TATA-box Binding Protein
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR1	TNF Receptor 1
TOM 20	Transporter of Outer Membrane
TRADD	TNFR-1 Associated Death Domain
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
UV	Ultra Violets
VDAC	Voltage Dependent Anion Channel
XIAP	X-linked Inhibitor of Apoptose Protein

TABLE DES MATIERES

1. INTRODUCTION.....	1
1.1. LA MITOCHONDRIE : UN ORGANITE MULTIFONCTIONNEL	1
1.1.1. L'origine de la mitochondrie.....	1
1.1.2. Contenu et évolution du génome mitochondrial.....	1
1.1.3. La respiration cellulaire.....	2
1.1.4. La mitochondrie et les dérivés radicalaires de l'oxygène.....	3
1.1.5. La mitochondrie et le calcium.....	4
1.2. LES DYSFONCTIONNEMENTS MITOCHONDRIAUX.....	5
1.2.1. Maladies mitochondriales : généralités (Graeber et al., 1998; Jiang et al., 1999; Schon, 2000).....	5
1.2.2. LE SYNDROME MERRF (MYOCLONIC EPILEPSY AND RAGGED-RED FIBER).....	6
1.3. LES MODÈLES CELLULAIRES ET LES CELLULES CYBRIDES MERRF.....	7
1.3.1. Les cellules déplétées en ADN mitochondrial.....	7
1.3.2. Les cellules cybrides.....	8
1.4. CARACTÉRISTIQUES DE CELLULES PRÉSENTANT UN DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL.....	9
1.4.1. Variation de l'expression de gènes nucléaires suite à la déplétion de l'ADNmt.....	9
1.4.2. La chaîne de phosphorylation oxydative et le potentiel de membrane mitochondrial.....	10
1.4.3. Equilibre rédox.....	11
1.4.5. L'homéostasie calcique.....	12
1.5. L' APOPTOSE.....	12
1.5.1. Les caspases.....	13
1.5.3. Les inhibiteurs de caspases (Zimmermann et al., 2001).....	13
1.5.4. La voie intrinsèque (mitochondriale) d'activation de l'apoptose.....	14
1.5.5. La voie extrinsèque.....	16
1.5.6. Le facteur de transcription c-Myc.....	17
1.5.7. Le facteur de transcription p53.....	18
1.5.8. L'apoptose induite par la staurosporine.....	18
1.6. CELLULES AFFECTÉES PAR UN DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAL: RÉSISTANCE OU HYPERSENSIBILITÉ FACE AUX INDUCTEURS DE L' APOPTOSE ?	19
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	23
2.1. CULTURE CELLULAIRE	23
2.2. ANALYSE DE L' EXPRESSION DE GÈNES PAR LES DAMIERS À ADN.....	24
2.2.1. Extraction d'ARN total.....	24
2.2.2. Rétrotranscription des ARNm en ADNc.....	24
2.3. HYBRIDATION DES ADNc SUR DAMIERS.....	25
2.3.1. Présentation des damiers.....	25
2.3.2. Les contrôles.....	26
2.3.3. Hybridation des ADN complémentaires sur les damiers.....	27
2.3.4. Quantification et normalisation de l'expression génique.....	27
2.3. MARQUAGES EN IMMUNOFLOUORESCENCE ET VISUALISATION EN MICROSCOPIE CONFOCALE	28
2.3.1. Matériel.....	28
2.3.2. Marquage:.....	29
2.4. FRACTIONNEMENT CELLULAIRE ET PRÉPARATION DES LYSATS.....	29
2.4.1. Matériel utilisé :.....	30
2.4.2. Méthode.....	30
2.5. DOSAGE DE PROTÉINES PAR LA MÉTHODE DE BRADFORD.....	31
2.6. WESTERN BLOT	31
2.6.1. Matériel et Tampons.....	31
2.6.2. Méthode.....	32
2.7. VISUALISATION ET DOSAGE DE LA FRAGMENTATION DE L' ADN INDUIT PAR LA STAUROSPORINE.....	33
2.7.1. Extraction d'ADN et visualisation sur gel d'agarose.....	33
2.7.2. Dosage de la fragmentation de l'ADN par un kit ELISA.....	34
2.8. DOSAGE DE L' ACTIVITÉ DE LA CASPASE-3.....	35
2.8.1. Réactifs :.....	35
2.8.2. Lyse cellulaire.....	36
2.8.3. Dosage.....	36

3. RÉSULTATS ET DISCUSSIONS	37
3.1. EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE GÈNES DANS LES CELLULES CYBRIDES MUTÉES	37
3.2. EFFET DE LA STAUROSPORINE SUR LA MORPHOLOGIE DES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES.....	40
3.3. ANALYSE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN INDUITE PAR LA STAUROSPORINE DANS LES CELLULES 143 B.	40
3.4. RECHERCHE DE L'EFFET DE LA STAUROSPORINE SUR LA FRAGMENTATION DE L'ADN DANS LES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES.....	41
3.5. EFFET DE LA CYCLOSPORINE A ET DE L'ACIDE BONGKRÉMIQUE SUR LA FRAGMENTATION DE L'ADN GÉNOMIQUE INDUITE PAR LA STAUROSPORINE DANS LES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES.....	42
3.6. EFFET DU ZVAD-FMK SUR LA FRAGMENTATION DE L'ADN INDUITE PAR LA STAUROSPORINE DANS DES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES.....	43
3.7. RECHERCHE DE L'ABONDANCE ET DE LA LOCALISATION DE LA CASPASE-3 DANS LES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES : EFFET DE LA STAUROSPORINE.....	44
3.8. ETUDE DE L'ACTIVATION DE LA CASPASE-3 DANS LES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES EN RÉPONSE À LA STAUROSPORINE.....	45
3.8.1. <i>Abondance et localisation de la caspase-3 active dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.</i>	45
3.8.2. <i>Dosage de l'activité caspase-3 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.</i>	45
3.8.3. <i>Visualisation du clivage d'un substrat endogène de la caspase-3 : PARP-1</i>	46
3.9. EFFETS DE L'IONOMYCINE ET DU BAPTA/AM SUR L'ACTIVATION DE LA CASPASE-3 INDUITE PAR LA STAUROSPORINE DANS LES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES RESPECTIVEMENT.....	47
3.10. ANALYSE DE L'ABONDANCE ET DE LA LOCALISATION DE PROTÉINES À ACTION PRO- ET ANTI- APOPTOTIQUES DANS LES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES EN RÉPONSE À UN TRAITEMENT À LA STAUROSPORINE.....	49
3.10.1. <i>Analyse de l'abondance et de la localisation du cytochrome c dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.</i>	49
3.10.2. <i>Abondance et localisation de la protéine pro-apoptotique Bax dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.</i>	50
3.10.3. <i>Abondance et localisation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.</i>	51
3.10.4. <i>Abondance et localisation de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.</i>	52
3.10.5. <i>Abondance et localisation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.</i>	53
3.10.6. <i>L'abondance des facteurs pro- et anti-apoptotiques dans les cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine, essai de synthèse.</i>	54
3.11. ANALYSE DE L'EXPRESSION DIFFÉRENTIELLE DE GÈNES DANS DES CELLULES CYBRIDES SAUVAGES ET MUTÉES EN RÉPONSE À LA STAUROSPORINE	55
4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	58
5. BIBLIOGRAPHIE.....	63
6. ANNEXES	

1. Introduction

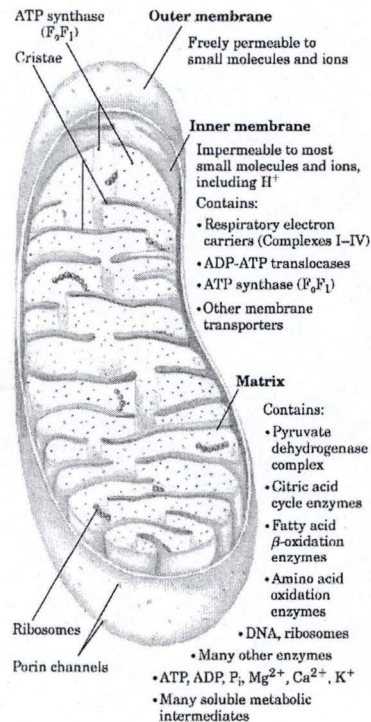


Figure 1.1.: Structure de la mitochondrie. La mitochondrie est délimitée par une double membrane. La membrane externe est très perméable. Par contre, la membrane interne, très imperméable, forme des crêtes mitochondriales, ce qui lui permet d'étaler une plus grande surface. Elle est composée de nombreuses protéines dont les protéines de la chaîne de phosphorylation oxydative qui permet la synthèse d'ATP à partir d'ADP. Les membranes mitochondriales renferment la matrice, substance aqueuse dans laquelle se situe l'ADN mitochondrial, des ribosomes, mais également de nombreuses enzymes. La matrice est le lieu de plusieurs voies métaboliques importantes telles que le cycle de Krebs ou la β-oxydation des acides gras (David L. Neslon et Michael M. Cox, 2000).

Respiratory Proteins Encoded by the Human Mitochondrial Chromosome		
Complex	Total number of subunits	Number of subunits encoded by mitochondrial DNA
I NADH dehydrogenase	>25	7
II Succinate dehydrogenase	4	0
III Ubiquinone:cytochrome c oxidoreductase	9	1
IV Cytochrome oxidase	13	3
V ATP synthase	12	2

Figure 1.2.: Les protéines codées par le génome mitochondrial. Le génome mitochondrial humain code pour 13 protéines dont 7 interviennent dans le complexe I de la chaîne de phosphorylation oxydative, 1 dans le complexe III et 3 dans le complexe IV. Enfin, 2 protéines interviennent dans la formation de la F₁-F₀ ATP synthase. Le complexe II n'est composé que de protéines codées par le génome nucléaire (David L. Neslon et Michael M. Cox, 2000).

1. Introduction

1.1. La mitochondrie : un organe multifonctionnel

1.1.1. L'origine de la mitochondrie.

La mitochondrie est un organe des cellules eucaryotes possédant son propre génome, résultant de l'endosymbiose d'une α -protéobactérie, ce qui la différencie d'autres organites tels que les lysosomes, les peroxyosomes, et l'appareil de Golgi. Les génomes mitochondriaux varient énormément en fonction de la cellule eucaryote considérée par leur taille, le nombre et la nature des gènes qu'ils contiennent, et la proportion des séquences codant pour l'information. Cependant, les mitochondries semblent toutes issues d'un ancêtre commun, une α -protéobactérie du genre *Rickettsia*, qui aurait fusionné avec une archéobactérie suivant un phénomène d'endosymbiose. Les gènes présents dans le génome mitochondrial, l'assemblage de ceux-ci, la présence d'une double membrane sont autant de caractéristiques qui attestent de l'origine bactérienne de la mitochondrie (Gray et al., 1999).

Au niveau structural, la membrane mitochondriale interne (MMI), pratiquement imperméable, délimite la matrice, substance aqueuse riche en protéines, ribosomes et ADN (voir figure 1.1). La membrane mitochondriale externe (MME) est, quant à elle, perméable à de nombreux ions et molécules de petites tailles. L'espace contenu entre ces deux membranes constitue l'espace intermembranaire, riche en protéines délocalisables dont nous reparlerons plus loin. Ajoutons encore que la MMI présente une plus grande surface que la MME et forme des crêtes mitochondriales permettant l'ancrage de nombreuses protéines comme les complexes d'importation des protéines matricielles (TIM : Transporter of Inner Membrane), les complexes (I,II,III, IV) de la chaîne de transporteurs d'électrons et le complexe V (Fo-F1-ATPsynthase) assurant les phosphorylations oxydatives et donc la production d'ATP, et de nombreux transporteurs comme l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator) assurant les échanges ADP/ATP (Nelson et al., 2000).

1.1.2. Contenu et évolution du génome mitochondrial

Le génome mitochondrial peut, en fonction des espèces considérées, coder pour un nombre très variable de protéines de la chaîne respiratoire, des sous-unités ribosomiques ou encore pour des ARN de transfert et ribosomiques. Cependant, le contenu du génome mitochondrial n'est jamais suffisant à produire une mitochondrie fonctionnelle et de nombreuses protéines doivent être importées du cytosol. De plus, au cours de l'évolution, la plupart des gènes nécessaires à la synthèse protéique et à la biogenèse mitochondriales ont migré dans le génome nucléaire. Ainsi, le génome mitochondrial humain ne contient plus que 13 gènes codant pour des polypeptides intervenant dans la chaîne de phosphorylation oxydative (voir figure 1.2). La mitochondrie étant constituée de plus d'un millier de protéines, le noyau code donc pour plus de 95 % des protéines mitochondriales (Mootha et al., 2003). L'ADN mitochondrial code également pour 2 ARNr et 22 ARNt. Ces ARN sont indispensables à la synthèse protéique mitochondriale puisque ne pouvant pas être importés

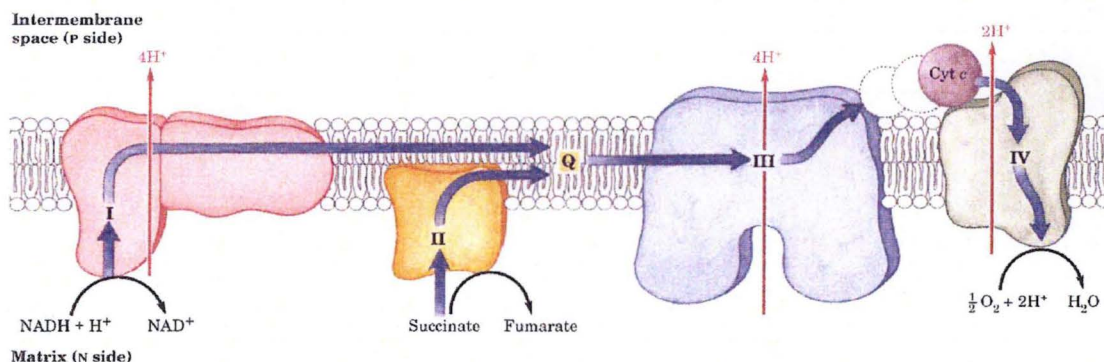


Figure 1.3.: La respiration cellulaire. La respiration cellulaire est un processus par lequel des électrons transitent dans des complexes protéiques en membrane mitochondriale interne. Ainsi, les électrons sont initialement cédés par le NADH au niveau du complexe I (NADH Oxydase) ou par le succinate au niveau du complexe II. Ensuite, par des réactions d'oxydo-réduction, ils passent au complexe III via la coenzyme Q puis au complexe IV via le cytochrome c, protéine navette localisée dans l'espace intermembranaire. Au niveau du complexe IV, ils sont cédés à une molécule d' O_2 pour former, avec 2 protons, une molécule d'eau. Les électrons entrant dans la chaîne de phosphorylation oxydative vont perdre de l'énergie au cours de leur transit. Celle-ci est récupérée pour générer un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne et ce via les complexes I, III et IV. Les électrons transmis par le succinate permettent donc un transport moindre de protons que ceux cédés par le NADH (David L. Neslon et Michael M. Cox, 2000).

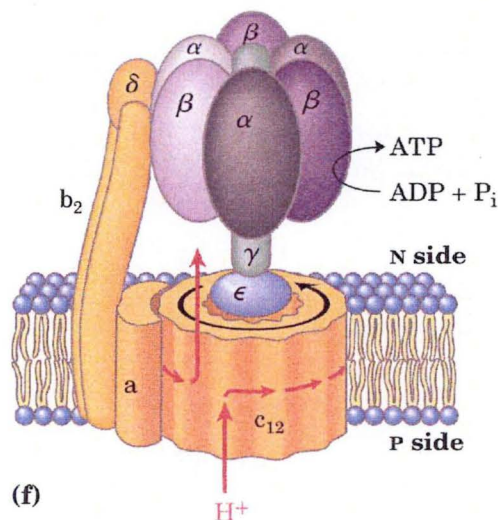


Figure 1.4.: La F1-Fo ATP synthase. Le gradient de protons généré lors du transport dans la chaîne de phosphorylation oxydative va permettre la synthèse d'ATP à partir d'ADP. En membrane interne se situe la F1-Fo ATP synthase qui va catalyser la réaction. La sous-unité Fo, en orange permet le retour des protons depuis l'espace intermembranaire mitochondrial (en bas, « P side ») vers la matrice (« N side ») où leur concentration est moindre. Le passage des protons à travers cette sous-unité engendre la rotation de celle-ci. Ceci permet à la deuxième sous-unité, la sous-unité F1 (en bleu) de catalyser la réaction de phosphorylation de l'ADP en ATP (David L. Neslon et Michael M. Cox, 2000).

(Gray et al., 1999). Le génome mitochondrial est également multicopies puisque 2 à 10 copies d'ADN circulaire de 16,6 kb (chez l'homme) sont retrouvées par mitochondrie.

L'expression des gènes nucléaires codant pour les protéines mitochondriales est régulée par des facteurs de transcription tels que PPARalpha (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor-alpha) et gamma ou encore NRF-1 (Nuclear Respiratory Factor-1) (Butow et al., 2004).

1.1.3. La respiration cellulaire.

La mitochondrie est un organite où s'opèrent beaucoup de réactions vitales pour la cellule : le cycle de Krebs, le cycle de l'urée, la synthèse des stéroïdes et des groupements porphyriques des clusters Fe-S, la β -oxydation des acides gras, ou encore la respiration cellulaire. Nous ne détaillerons que cette dernière fonction dans ce document.

La respiration cellulaire est un processus par lequel la mitochondrie va produire de l'énergie sous forme d'ATP. Le NADH produit lors du cycle de Krebs dans la matrice apporte deux électrons au complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) de la chaîne de phosphorylation oxydative en membrane interne mitochondriale (figure 1.3). Les électrons vont alors être transportés vers le complexe III (ubiquinone : cytochrome c oxydoréductase) via le coenzyme Q10 (ubiquinone). Ensuite, ils sont transportés vers le complexe IV (cytochrome oxydase) via le cytochrome c, protéine localisée dans l'espace intermembranaire. Enfin, ce dernier complexe transfère les électrons sur une molécule d' O_2 , ce qui formera, pour 4 électrons et avec l'ajout de 4 protons, une molécule d' H_2O . Outre les électrons apportés par le NADH, des électrons peuvent également être apportés à la chaîne directement au niveau du complexe II (succinate déshydrogénase) par le succinate puis rejoindre le complexe III.

Au cours de leur transport dans cette chaîne de protéines, les électrons vont perdre progressivement une partie de leur énergie ce qui va permettre un transport de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire au niveau des complexes I, III et IV (figure 1.3).

Il y a donc génération d'un gradient de protons et par la même occasion d'un gradient électrochimique (les protons étant chargés positivement) qui vont fournir l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP à partir d'ADP. C'est la F1-Fo ATPsynthase (Complexe V) présente en membrane interne qui va catalyser cette réaction en permettant le retour des protons dans la matrice. L'énergie libérée est utilisée pour former de l'ATP à partir d'ADP. L'ATPsynthase est formée de 2 sous-unités : la sous-unité Fo est intégrée en membrane et permet le transport des protons, tandis que la sous-unité F1 est responsable de la réaction de phosphorylation (voir figure 1.4).

Enfin, l'ATP matriciel est transféré dans le cytosol via l'ANT qui permet l'échange entre un ATP matriciel et un ADP cytosolique. Ainsi, l'ATP néoformé est exporté ce qui permet à la réaction de se poursuivre. Notons que l'ANT en échangeant un ATP porteur de 4 charges négatives contre un ADP porteur de 3 charges négatives est électrogène c'est-à-dire qu'elle contribue, avec le gradient de protons, à la création d'un potentiel de membrane mitochondrial.

1.1.4. La mitochondrie et les dérivés radicalaires de l'oxygène.

Lors de la phosphorylation oxydative, nous avons vu que des électrons transitaient dans une chaîne formée de 4 complexes protéiques. Au cours de ce transport, ils perdent de l'énergie qui est utilisée pour générer de l'ATP à partir d'ADP, et sont finalement cédés à de l'oxygène pour former de l' H_2O . Cependant, même en conditions normales, il arrive que des électrons soient libérés avant de parvenir au complexe IV de la chaîne de phosphorylation. Ainsi, dans 0,2 à 4% des cas, les électrons sont libérés avant de parvenir au complexe IV de la chaîne de phosphorylation et participent à la réduction partielle de l'oxygène moléculaire, générant de ce fait des « Reactive Oxygen Species » (ROS) (Vergani et al., 2004). Les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont les principaux sites de production de ROS au niveau de la mitochondrie. Ainsi, la première molécule formée est le radical superoxyde $O_2^{\cdot -}$. Celle-ci, très instable ($t_{1/2}$ vie : 10^{-9} s) et très réactive, sera transformée en H_2O_2 par dismutation spontanée ou catalysée qui formera, en présence de fer (réaction de Fenton), le radical hydroxyle OH^{\cdot} , entité encore plus réactionnelle. Ces trois molécules, à fortes concentrations, sont toxiques pour la cellule car elles attaquent, par des réactions d'oxydation les biomolécules de hauts poids moléculaires possédant des doubles liaisons et/ou des groupements thiols (-SH), que sont les protéines, les lipides ou encore les acides nucléiques, générant par là des molécules radicalaires qui elles mêmes vont engendrer la formation d'autres molécules radicalaires.... Ces réactions en chaîne peuvent mener à la mort cellulaire.

En conditions basales, le taux de production des ROS est très faible, puisque la majorité des électrons parviennent jusqu'au complexe IV de la chaîne de phosphorylation oxydative. Par contre, cette production est augmentée par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire comme l'antimycine A (complexe III) ou la roténone (complexe I). De plus, la réelle source de stress oxydatif n'est pas la génération de ROS *per se*, mais bien le déséquilibre spatiotemporel entre la production et la détoxification des ROS. Trois enzymes antioxydantes ont une importance cruciale dans la cellule : la superoxyde dismutase (SOD) ; la glutathion peroxydase (Gpx) et la catalase ((Harris, 1992) ; voir figure 1.5.)

La SOD existe sous plusieurs formes qui sont localisées dans la matrice mitochondriale (MnSOD) ou dans le cytosol (CuSOD ; ZnSOD) et qui catalysent la réaction de dismutation qui permet la transformation de l' $O_2^{\cdot -}$ produit par la chaîne de phosphorylation oxydative en H_2O_2 .

La Gpx utilise le glutathion sous forme réduite (GSH) dans les cellules pour permettre la conversion de peroxydes (ROOH, dont H_2O_2) en oxydes (ROH) avec la libération d' H_2O . Lors de la réaction, le glutathion est oxydé (GSSG), mais une enzyme, la glutathion réductase (GR) permet sa réduction. Le glutathion réduit peut également « scavenger » les radicaux superoxydes et hydroxyles directement. Le couple glutathion réduit (GSH) / glutathion oxydé (GSSG) constitue un véritable « tampon rédox » indicateur de l'état d'oxydo-réduction de la cellule. Il est présent à haute concentration (de 1 à 10 mM) dans les divers compartiments cellulaires.

Enfin, la catalase, enzyme très efficace, permet la conversion de H_2O_2 en H_2O et est localisée notamment dans le cytosol, dans la mitochondrie, mais aussi dans les peroxysomes. Notons que la catalase et la Gpx catalysent des réactions similaires, mais que la catalase est surtout active lors de stress oxydatifs intenses, tandis que la Gpx permet le contrôle de stress plus faibles (Harris, 1992; Mates, 2000).

Ajoutons encore que si le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi_m$) est capable de moduler la production de ROS par les mitochondries (= le découplage diminue la production), la production de ROS peut aussi stimuler le découplage et ainsi modifier le potentiel de membrane (= boucle de rétroaction). Notons enfin que si à fortes concentrations, les ROS peuvent devenir toxiques, il semble qu'ils puissent également avoir, souvent à faibles

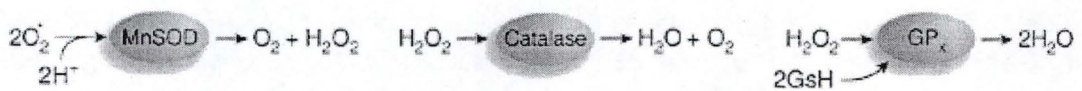


Figure 1.5.: Enzymes permettant la neutralisation des ROS produits au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale. L' H_2O_2 généré par la MnSOD à partir de $\text{O}_2^{\cdot-}$ est transformée en H_2O par la catalase ou par la glutathion peroxydase (Gpx) qui consomme du glutathion réduit (GSH) (d'après Beal, 2005).

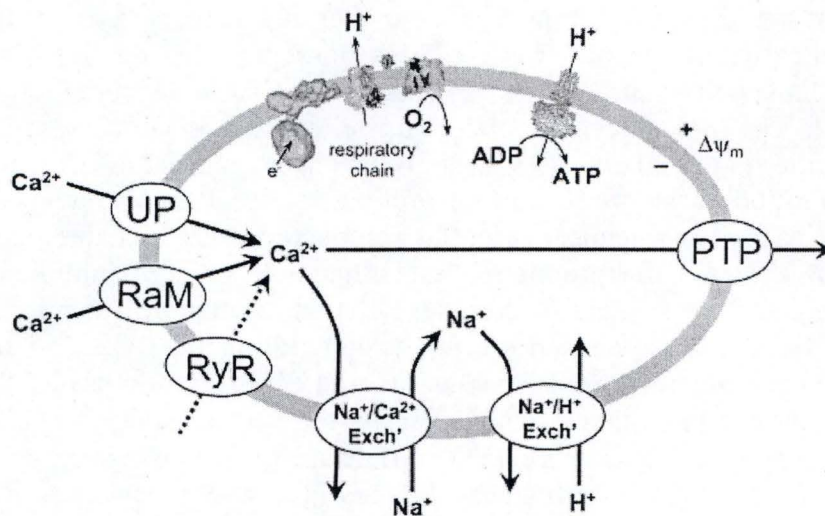


Figure 1.6.: Transport du calcium à travers la membrane mitochondriale interne. L'entrée de calcium dans la mitochondrie se fait par un transport unipore (UP) et par le RaM (Rapid Mode) qui permet l'entrée rapide du calcium mitochondrial suite à des modifications de la concentration cytosolique. Le troisième canal RyR (Ryanodine Receptor) intervient dans le transport du calcium dans des cellules excitables. La sortie du calcium se fait par l'entremise de canaux antiports, couplée à l'entrée de sodium dans la cellule. Le calcium peut également sortir via le PTP (Permeability Transition Pore), canal aspécifique constitué de plusieurs protéines mitochondriales (Brookes *et al.* 2004).

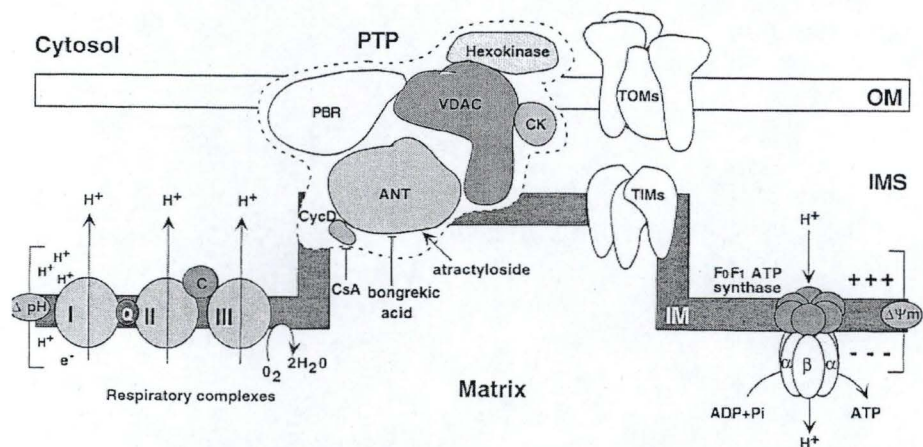


Figure 1.7.: Le « Permeability transition pore » (PTP). Le PTP est un pore aspécifique traversant la double membrane mitochondriale. Il est formé par l'assemblage de protéines mitochondriales qui sont représentées ci-dessus: l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator), VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), une hexokinase, la créatine kinase (CK), le « peripheral benzodiazepine receptor » (PBR) et la protéine matricielle Cyclophiline D (CycD). Il permet le passage de molécules de poids moléculaire inférieur à 1,500 kDa. Les actions de molécules modulatrices de l'ouverture du PTP comme la cyclosporine A (CsA), l'acide bongkréique et l'atractyloside sont également représentées. Sur le schéma, en membrane interne sont représentés les complexes respiratoire et la F₀F₁ ATP synthase. Enfin, TOM (Transporter of Outer Membrane) et TIM (Transporter of Inner Membrane) sont des complexes protéiques permettant l'importation de protéines destinées à la mitochondrie (Brookes *et al*, 2004).

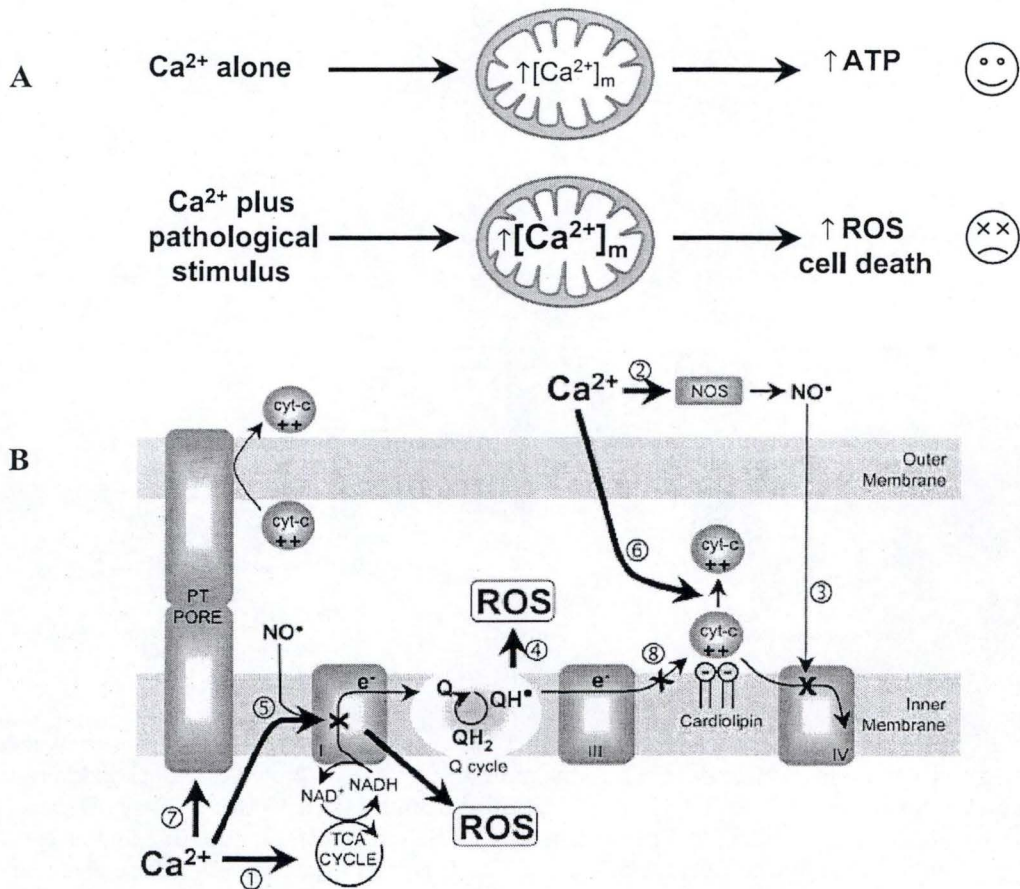


Figure 1.8.: A. Effets positifs et négatifs de la concentration calcique mitochondriale sur la cellule. En conditions physiologiques, une légère augmentation de la concentration calcique mitochondriale active des enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, le complexe V et l'ANT, ce qui augmente la production d'ATP. En condition pathologique, une augmentation trop importante de la concentration calcique mitochondriale entraîne la mort cellulaire par la production de ROS.

B. Mécanismes de stimulation de la production de ROS par le calcium mitochondrial: Le calcium active le cycle de Krebs (TCA cycle), ce qui augmente le nombre d'électrons entrant dans la chaîne de respiration (1), il active la NO synthase (NOS) (2) et le NO produit inhibe le complexe IV (3). Cela provoque la production de ROS au niveau de la coenzyme Q (4). Ensemble, le calcium et le NO peuvent inhiber le complexe I de la chaîne et entraîner la production de ROS à ce niveau (5). Le calcium peut également rompre les interactions entre cardiolipine et cytochrome c en membrane interne mitochondriale (6), et à forte concentration, engendrer l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore) (7), ce qui permet la libération du cytochrome c, ce qui bloque donc le complexe III (8), et augmente la production de ROS au niveau de la coenzyme Q (Paul S. Brookes *et al.* 2004).

concentrations, des fonctions dans la signalisation et des processus cellulaires tels que l'apoptose, la division cellulaire,... (Brookes et al., 2004).

1.1.5. La mitochondrie et le calcium

La mitochondrie est un organite important de l'homéostasie du calcium intracellulaire. En effet, elle est capable de stocker le calcium dans la matrice et ainsi de moduler la concentration en calcium cytosolique. Notons que les ions Ca^{2+} entrent et sortent sans cesse de la mitochondrie (= cycle mitochondrial du calcium) (Chakraborti et al., 1999) (figure 1.6). L'entrée du calcium en condition basale ($[\text{Ca}^{2+}]_c = \pm 100 \text{ nM}$) est permise par un canal unipore et médiée par le potentiel de membrane mitochondrial. En cas d'une augmentation rapide en calcium cytosolique, le calcium peut être stocké dans la mitochondrie, et un autre canal, appelé « Rapid-Mode » (RaM), permet l'entrée rapide de calcium (de l'ordre de la milliseconde) dans la matrice mitochondriale. Le calcium sort ensuite de la mitochondrie par deux systèmes. Premièrement, par des canaux antiports impliquant l'entrée de sodium dans l'organite et deuxièmement via le Permeability Transition Pore (PTP, voir figure 1.7). Le PTP est un canal aspécifique constitué de l'ANT, de VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), mais également d'un ensemble d'autres protéines telles qu'une hexokinase, la créatine kinase, le récepteur périphérique aux benzodiazépines (PBR) et la protéine matricielle Cyclophiline D (CycD). Il permet le passage de molécules et ions de poids moléculaires inférieurs à 1,500 kDa.

La concentration calcique mitochondriale est importante, car le calcium intervient positivement et négativement dans la régulation des différentes voies métaboliques mitochondriales (figure 1.8) Ainsi, de brèves augmentations de faibles amplitudes de la concentration en ions Ca^{2+} dans cet organite engendrent une diminution du potentiel de membrane mitochondrial et une activation de la phosphorylation oxydative. Le calcium active en effet les enzymes telles que la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et l' α -cétoglutarate déshydrogénase, qui produisent toutes du $\text{NADH} + \text{H}^+$. Il active également la F1Fo-ATPsynthase ainsi que l'ANT (Brookes et al., 2004; Gunter et al., 2004).

Cependant, une accumulation trop importante de calcium dans la matrice mitochondriale, faisant souvent suite à une augmentation de la concentration cytosolique, peut devenir néfaste pour la cellule. La chute du potentiel de membrane qui en résulte et l'activation du cycle de Krebs et de la chaîne de phosphorylation vont engendrer une production importante de ROS qui vont concourir à l'ouverture du PTP suite à son oxydation. Cette ouverture peut provoquer la sortie des enzymes antioxydantes mitochondriales vers le cytosol et augmenter les risques d'oxydation des molécules mitochondriales. De plus, l'ouverture du PTP et la libération du cytochrome c (dissocié des cardiolipines par le calcium) sont également impliquées dans l'initiation du processus de mort cellulaire par apoptose (voir point 1.5.4 : la voie apoptotique mitochondriale). Ainsi, si le calcium est indispensable à de nombreuses fonctions mitochondriales, une surcharge en cet ion dans la mitochondrie peut provoquer la mort cellulaire (figure 1.8).

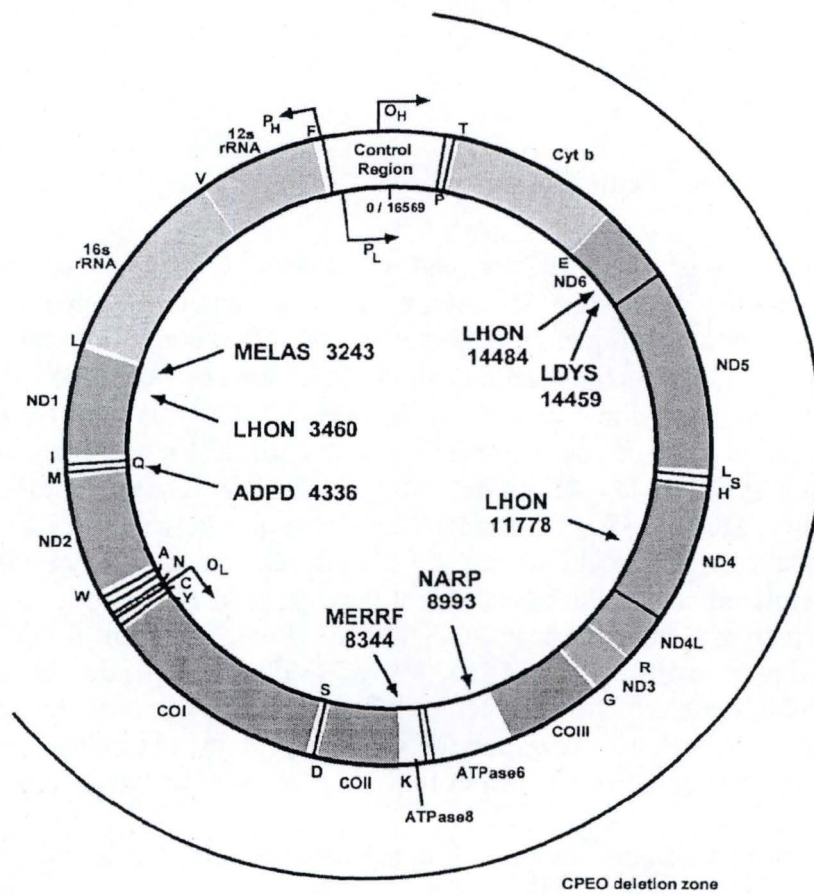


Figure 1.9.: Carte du génome mitochondrial humain et principales mutations induisant des dysfonctionnements mitochondriaux responsables de syndromes ou pathologies mitochondriales. Cette carte du génome mitochondrial reprend les mutations les mieux caractérisées engendrant un dysfonctionnement mitochondrial et les pathologies qui en découlent. La mutation MERRF en position 8344 (A8344G) touchant un ARN de transfert pour la lysine est celle qui retiendra plus particulièrement notre attention au cours de ce travail (Wallace, 1999).

1.2. Les dysfonctionnements mitochondriaux

1.2.1. Maladies mitochondriales : généralités (Graeber et al., 1998; Jiang et al., 1999; Schon, 2000)

De nombreuses pathologies humaines sont causées par un dysfonctionnement de la mitochondrie. Les causes ainsi que les phénotypes associés peuvent être nombreux. D'un point de vue génétique, les pathologies trouvent leur origine dans une altération directement du génome mitochondrial ou dans une altération de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales.

Au niveau mitochondrial, une centaine de mutations et d'innombrables réarrangements de l'ADN mitochondrial sont connus pour être responsables de pathologies (voir figure 1.9). Les tissus et organes les plus sensibles sont ceux qui consomment le plus d'énergie tels que les muscles et le cœur. L'analyse des maladies et des phénotypes associés est très complexe. En effet, une mutation peut engendrer une grande diversité de phénotypes et à l'inverse, un phénotype particulier peut être associé à de nombreuses mutations différentes. De plus, une autre difficulté provient du fait que la plupart des mutations sont hétéroplasmiques, c'est-à-dire que dans une cellule, les mitochondries porteront aussi bien l'ADN sauvage que l'ADN muté en proportions variables selon la cellule ou selon le tissu considéré.

Plusieurs mutations dans l'ADN mitochondrial touchent les ARN de transfert et altèrent par là la synthèse protéique mitochondriale dans son ensemble. Citons par exemple les mutations responsables de la pathologie MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy With Lactic Acidosis and Stroke-like episodes) au niveau des nucléotides 3243 et 3271 de l'ARNt portant la leucine. Cliniquement, la pathologie est caractérisée par des myopathies, des anomalies cardiaques, des migraines, de la démence et est associée au diabète mellitus... Dans la même catégorie, la pathologie MERRF (Myoclonus Epilepsy with Ragged-Red Fibers) est due à une mutation au niveau d'un ARN de transfert codant pour une lysine. Cette pathologie sera détaillée plus loin dans l'introduction.

Des maladies mitochondriales peuvent également être dues à une mutation au niveau des gènes codant des protéines mitochondriales. Le syndrome LHON (Leber's Hereditary Optic Neuropathy) en fait partie. Ce dernier est dû à plusieurs mutations au niveau d'une des sous-unités de la NADH déshydrogénase. Les patients atteints de ce syndrome (principalement les hommes) perdent la vue suite à la mort du nerf optique, présentent des problèmes moteurs, des difficultés à parler,...

Une autre mutation se situe au niveau du nucléotide 8993 dans le gène codant pour une des sous-unités de la F1-Fo ATPsynthase et est responsable de syndromes différents en fonction de la proportion à laquelle elle est présente dans un tissu. Ainsi, à un taux inférieur à 75 %, cette mutation engendre des faiblesses musculaires, des ataxies,... à des taux supérieurs, elle est responsable de la maladie de Leigh, souvent mortelle.

Mis à part les mutations, des réarrangements du génome mitochondrial peuvent aussi être responsables de pathologies. Ainsi des délétions sont responsables des syndromes que sont les « Chronic Progressive External Ophthalmopelia » (CPEO) et le « Kearns-Sayre Syndrome » (KSS) caractérisés par des ataxies, des problèmes de conduction cardiaque, de la démence et des problèmes rénaux.

Comme expliqué plus haut, le noyau code pour de nombreuses protéines mitochondriales, et des maladies mitochondriales sont également associées à des mutations dans des gènes nucléaires. Ces mutations ne sont plus hétéroplasmiques et présentent une ségrégation de type mendélienne. Ainsi, des gènes codant pour des protéines de la chaîne de phosphorylation oxydative peuvent être mutés. C'est le cas de mutations dans plusieurs sous-

unités du complexe I codées par le génome nucléaire. Celles-ci peuvent être responsables de la maladie de Leigh, citée ci-dessus. Il existe aussi des syndromes liés à des mutations au niveau du coenzyme Q10 ou ubiquinone, qui est chargée de transmettre les électrons depuis le complexe II vers le complexe III de la chaîne de phosphorylation oxydative.

Enfin, des déficiences mitochondriales interviennent également dans des maladies neurodégénératives telles que les maladies de Parkinson et d'Alzheimer. Dans ces pathologies, bien qu'un dysfonctionnement mitochondrial soit souvent observé, il est difficile d'établir si l'altération de l'activité mitochondriale est une cause ou une conséquence de la pathologie. Cependant, des mutations dans le génome et autres déficiences dans les complexes de la chaîne de phosphorylation oxydative pourraient être des éléments qui sensibilisent une personne à la maladie.

1.2.2. Le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fiber)

Le syndrome MERRF est caractérisé par une accumulation de mitochondries sous le sarcolemme des cellules musculaires squelettiques. Il est provoqué par plusieurs mutations touchant un ARN de transfert mitochondrial qui lie la lysine (Masucci et al., 1995). La mutation la mieux caractérisée est une mutation au niveau de la base 8344, où une guanine remplace une adénine (A8344G) (Chomyn, 1998). Cliniquement, le syndrome MERRF est une encéphalomyopathie caractérisée par des épilepsies myocloniques, des ataxies et des myopathies mitochondriales. Les organes les plus consommateurs en ATP tels que les muscles et le cerveau sont majoritairement touchés mais ne sont pas les seuls affectés. La mutation provoquant le syndrome est hétéroplasmique, ce qui permet d'expliquer, en partie, que la même mutation puisse donner lieu à des symptômes divers (Chomyn, 1998).

La mutation dans l'ARNt pour la lysine engendre dans la cellule une série de modifications qui vont perturber le fonctionnement cellulaire. Ainsi, des fibroblastes de patients atteints du syndrome MERRF ont été mis en culture et analysés à différents niveaux. La synthèse protéique mitochondriale est diminuée dans ces cellules, et des déficiences de l'activité de la chaîne respiratoire ont été mises en évidence, plus particulièrement au niveau des complexes I et IV, les autres complexes ne montrant guère de variation. Suite à ces altérations, le potentiel de membrane mitochondrial diminue dans les cellules atteintes de la mutation (James et al., 1996).

De plus, la lactate déshydrogénase montre une activité accrue dans ces cellules. Ceci s'explique par le fait que les cellules ne possédant plus de chaîne de phosphorylation oxydative fonctionnelle vont produire leur ATP par la voie de la glycolyse. Celle-ci aboutit à la formation de pyruvate, qui va par l'action de la lactate déshydrogénase être transformé en lactate. Cette réaction permet l'oxydation du NADH qui ne peut plus transférer ses électrons au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire.

Ces cellules produisent donc leur ATP par la voie de la glycolyse, qui offre un rendement bien moindre que celui de la respiration. Ainsi, il est compréhensible que le cerveau et les muscles squelettiques, organes les plus consommateurs en ATP, subissent des dysfonctionnements chez les patients atteints de la mutation.

En réponse à la déficience mitochondriale le nombre de mitochondries et la taille de ces organites augmente dans les cellules porteuses de la mutation et plus particulièrement dans les cellules des muscles squelettiques (Wallace, 1999). Ce phénomène est probablement le résultat d'une activation compensatrice de la biogenèse mitochondriale en réponse au dysfonctionnement de l'organite impliquant la surexpression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative. De plus, les lysosomes secondaires

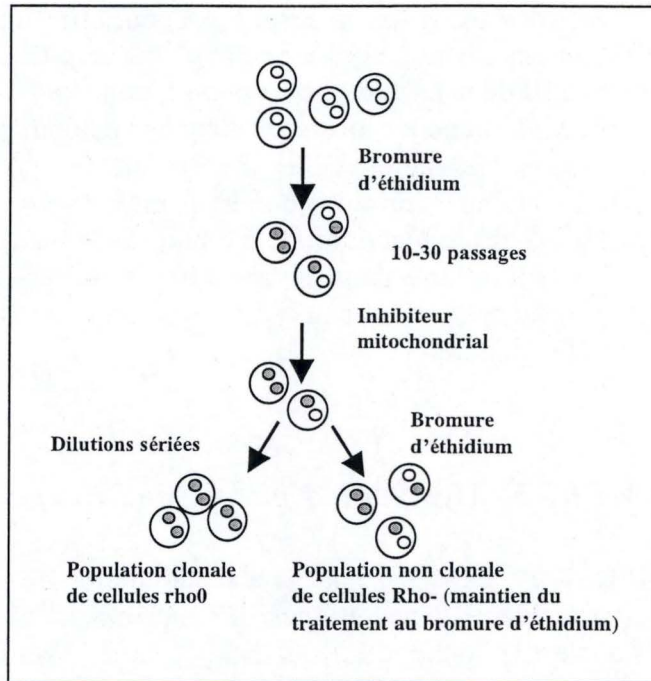


Figure 1.10.: Etapes menant à l'obtention de lignées cellulaires clonales ou non déplétées respectivement complètement ou partiellement en ADN mitochondrial par un traitement au bromure d'éthidium. Ces étapes comportent un traitement au bromure d'éthidium pendant 10 à 30 passages, et une sélection des cellules indépendante du processus de phosphorylation oxydative pour la production d'ATP. En blanc, les mitochondries possédant de l'ADN sauvage, en gris, les mitochondries déplétées en ADN mitochondrial.

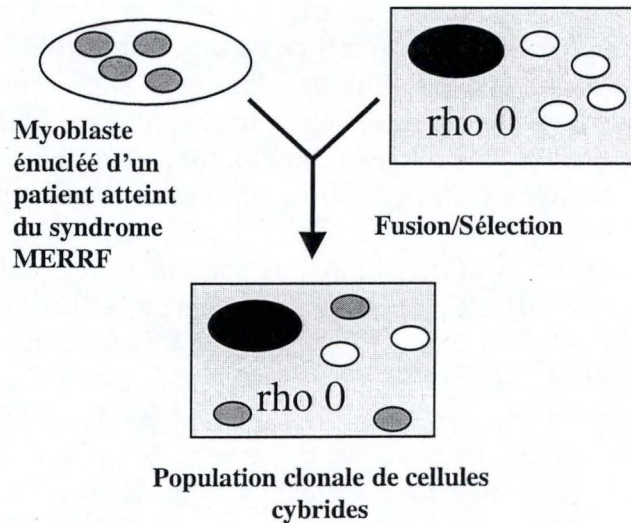


Figure 1.11.: Etapes menant à l'obtention de cellules cybrides possédant la mutation MERRF. Les cellules cybrides sont obtenues par fusion d'un myoblaste  nucl e possédant la mutation responsable du syndrome MERRF avec une cellule rho0 d pl t e en ADN mitochondrial.

sont plus volumineux dans ces cellules. Ceci peut s'expliquer par un turnover plus rapide des mitochondries dans ces cellules, les organites étant dégradés par les lysosomes par un processus d'autophagie (James et al., 1996).

1.3. Les modèles cellulaires et les cellules cybrides MERRF

En raison de la faible disponibilité des cellules de patients atteints du syndrome MERRF et de leur nombre limité de passages en culture, d'autres outils cellulaires ont été générés, comme les cellules cybrides. Celles-ci provenant de la fusion de cellules énucléées issues de patients porteurs de la mutation d'intérêt avec des cellules déplétées en ADN mitochondrial. Il est donc important d'introduire maintenant la notion de cellules déplétées en ADN mitochondrial.

1.3.1. Les cellules déplétées en ADN mitochondrial

Les cellules déplétées en ADN mitochondrial sont obtenues à partir de cellules, souvent transformées, qui ont été traitées de manière chronique avec du bromure d'éthidium. Cette molécule, en faible concentration a pour caractéristique d'inhiber la polymérase gamma et donc la synthèse de l'ADN mitochondrial sans interférer avec la synthèse de l'ADN génomique. Ainsi, après une division cellulaire en présence de bromure d'éthidium, le nombre de molécules d'ADN mitochondrial diminue de moitié. Une cellule contenant en moyenne 10000 molécules d'ADN mitochondrial, il suffit théoriquement de 14 générations pour ramener ce nombre à 0,6, mais une seule molécule d'ADN mitochondrial suffit à repeupler la cellule en absence de bromure d'éthidium (= réversion de phénotype). Les cellules sont ensuite sélectionnées en présence d'un inhibiteur de la chaîne respiratoire mitochondriale afin de ne conserver que les cellules qui ont subi un « shift glycolytique », qui sont donc indépendantes de la présence de mitochondries fonctionnelles pour leur production d'ATP. A ce stade, deux types de populations cellulaires peuvent être générés (voir figure 1.10). Premièrement, des populations de cellules non clonales (ρ^-) qui doivent être continuellement traitées au bromure d'éthidium pour empêcher le repeuplement des cellules par de l'ADN mitochondrial. Dans cette population, la quantité d'ADN mitochondrial peut varier d'une cellule à l'autre.

Deuxièmement, en opérant par dilutions sériées, il est possible d'obtenir une population clonale de cellules ne possédant plus une seule molécule d'ADN mitochondrial et caractérisées par l'absence d'amplicon obtenue lors de PCR (Polymerase Chain reaction) réalisées sur de l'ADN mitochondrial. Ces cellules appelées ρ^0 ne doivent plus être traitées au bromure d'éthidium dont le rôle devient inutile. Au laboratoire, nous travaillons également sur des cellules 143B dérivées d'un ostéosarcome humain (crl-8303, American type Culture collection, Rockville, USA), ainsi qu'une lignée dérivée appelée 143 ρ^0 , déplétées en ADN mitochondrial. Ces cellules ont été générées et offertes généreusement par G. Attardi (California Institute of Technology, USA) (King et al., 1996).

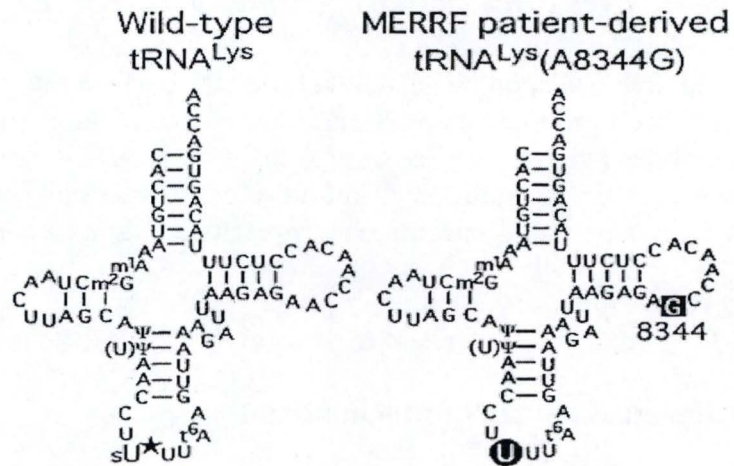


Figure 1.12.: La mutation MERRF en position 8344 sur l'ADN mt. A gauche, l'ARNt mitochondrial codant pour la lysine, à droite, le même ARNt touché par la mutation MERRF (A8344G) : une guanine remplace une adénine en position 8344. L'uridine entourée d'un rond noir ne subit pas de modification post-transcriptionnelle contrairement à la même uridine dans l'ARNt sauvage, ce qui engendre des problèmes de reconnaissance codon-anticodon lors de la traduction des protéines mitochondriales (Yasukawa *et al.* 2001).

1.3.2. Les cellules cybrides

Dans le cadre de ce travail, ce sont des cellules cybrides MERRF qui ont été utilisées. Elles proviennent de la fusion de myoblastes énucléés de patients atteints du syndrome MERRF causé par la mutation A8344G avec des cellules déplétées en ADN mitochondrial, les 143 rho⁰ (figure 1.11). Ainsi, le phénomène consiste à repeupler les 143 rho⁰ avec des mitochondries présentant la mutation responsable du syndrome. Ces modèles permettent d'étudier l'effet de la mutation dans un contexte nucléaire constant. Ces cellules ont également été offertes par G. Attardi.

Ces cellules cybrides présentent des caractéristiques identiques à celles observées sur des fibroblastes de patients (voir 1.2.2). Ainsi, il a été montré que la synthèse de protéines à partir du génome mitochondrial était diminuée d'environ 70 % par rapport à des cellules possédant l'ADNmt sauvage (Masucci et al., 1995).

L'activité respiratoire, mesurée par la consommation d'oxygène, diminue également d'un facteur 10 dans de telles cellules cybrides par rapport à des cellules contrôles (cellules rho⁰ repeuplées avec des mitochondries d'un individu sain). Ceci s'explique aisément par le fait que la synthèse protéique mitochondriale étant diminuée, la chaîne de phosphorylation oxydative est découplée, et la cellule produit principalement son énergie par la voie de la glycolyse (Masucci et al., 1995), ce qui s'accompagne d'une augmentation de la production de lactate et de pyruvate observée dans les cellules touchées par la mutation MERRF. De plus, une diminution de la production d'ATP était corrélée à l'augmentation de la concentration en lactate et en pyruvate (Pallotti et al., 2004).

Notons que si la synthèse protéique mitochondriale est altérée dans les cellules cybrides mutées, des protéines codées par le génome nucléaire peuvent également être soumises à une variation d'abondance dans le sens d'une augmentation (c'est le cas de la pyruvate déshydrogénase, par exemple) ou d'une diminution (c'est le cas de sous-unités du complexe IV de la chaîne respiratoire) (Tryoen-Toth et al., 2003).

Comment l'ARNt muté engendre-t-il tous ces effets ? Plusieurs hypothèses ont été proposées. L'équipe de G. Attardi a montré, sur des cellules cybrides obtenues à partir de cellules 143 rho⁰, que le nombre d'ARNt liés à une lysine diminue dans des cellules présentant la mutation MERRF. Ceci expliquerait le fait que la synthèse protéique diminue, d'autant plus que la mutation en position 8344 intervient au niveau d'une boucle très conservée dans la séquence de l'ARNt^{Lys}, impliquée dans des interactions avec la machinerie de traduction (figure 1.12) (Enriquez et al., 1995). De plus, le processus de traduction s'arrête fréquemment de manière prématurée à proximité des codons lysine, générant des polypeptides tronqués.

En 2001, Yasukawa et collaborateurs, ont montré que des cellules cybrides dérivées de cellules HeLa ne présentaient pas de diminution d'abondance en ARNt amino acétylés (liés à une lysine), et que les interactions avec la machinerie de traduction ne sont pas altérées (Yasukawa et al., 2001). Par contre, ils expliquent la diminution de la synthèse protéique mitochondriale par une modification post-transcriptionnelle au niveau d'une uridine intervenant dans la reconnaissance codon-anticodon (figure 1.12). Cette modification n'ayant pas lieu dans les cellules possédant la mutation A8334G, la reconnaissance codon-anticodon est biaisée.

Mentionnons enfin que Masucci et collaborateurs (1995) ont montré que tous les produits de la traduction mitochondriale sont affectés dans des cellules cybrides 143B rho⁰, indépendamment du nombre de lysines que contiennent ces protéines. Plusieurs mécanismes peuvent être proposés pour expliquer ce phénomène. Tout d'abord, un mécanisme de type « réponse stringente », décrit chez les bactéries. Si un acide aminé vient à diminuer (ici la lysine), tous les autres acides aminés vont être produits en moindre quantité dans un souci de

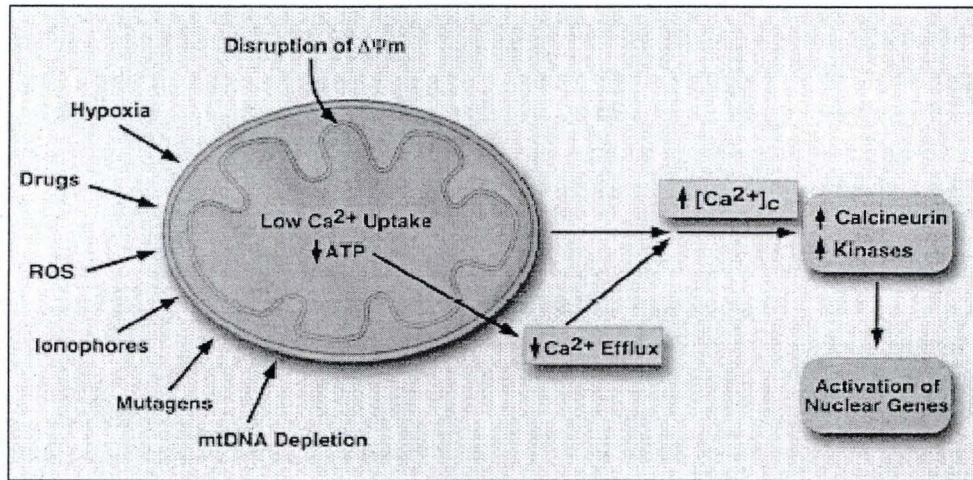


Figure 1.13.: La communication rétrograde. Suite à un stress touchant directement la mitochondrie, une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol est observée. Ceci engendre l'activation de kinases et de phosphatases provoquant l'activation de facteurs de transcription tels que CREB qui modifient l'expression de gènes nucléaires (Butow et al. 2004).

limiter la dépense d'énergie. Ensuite, il est possible qu'au niveau des codons lysine, il y ait un « frameshift », c'est-à-dire que le ribosome change de phase de lecture en arrivant à proximité d'une séquence consensus de 7 paires de bases. Cette dernière hypothèse permet d'expliquer que les cellules atteintes de la mutation synthétisent des polypeptides tronqués que l'on ne rencontre pas dans les cellules sauvages. Enfin, il est possible également que les ribosomes « restent bloqués » sur l'ARNm au niveau des codons lysine et que ceci engendre une diminution du pool de ribosomes libres et donc de la synthèse protéique sans influence du nombre de lysines dans la séquence polypeptidique. Notons qu'un argument de taille en faveur de cette hypothèse est le fait qu'un des 13 polypeptides encodés par l'ADN mitochondrial ne possède pas de lysines dans sa séquence primaire et que pourtant, son abondance diminue également lorsque la mutation MERRF est présente (Masucci et al., 1995).

1.4. Caractéristiques de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial

1.4.1. Variation de l'expression de gènes nucléaires suite à la déplétion de l'ADNmt.

Ce processus, initialement décrit chez la levure, est aujourd'hui étudié dans plusieurs modèles de cellules de mammifères sous le nom de « communication rétrograde ». Celle-ci se définit de manière large par les réponses cellulaires fournies à un changement de l'état fonctionnel de la mitochondrie, ces réponses englobant les modifications de l'expression des gènes nucléaires (Butow et al., 2004). Au moins une des voies de communication rétrograde dépend du calcium intracellulaire. Par exemple, dans les cellules 143 rho⁰ déplétées en ADN mitochondrial, ou dans des cellules cybrides touchées par la mutation MERRF (A8344G), le potentiel de membrane mitochondrial est plus faible que dans les cellules parentales, et la concentration en calcium libre augmente dans le cytosol (Arnould et al., 2002). Ceci engendre l'activation du facteur CREB (cAMP-Responsive Element Binding protein) par l'entremise de la CaMKIV (calcium/calmoduline kinase IV) (voir figure 1.13.), activée par l'augmentation de la concentration calcique. Le facteur CREB phosphorylé peut alors recruter p53, qui inhibe le cycle cellulaire, ce qui explique que les cellules déplétées en ADN mitochondrial font preuve d'une croissance moins rapide que les cellules parentales.

D'autres facteurs de transcription sont également impliqués dans la communication entre la mitochondrie non fonctionnelle et le noyau. Ainsi, en 1999, Biswas et collaborateurs ont montré que, dans des myoblastes déplétés en ADN mitochondrial (C2C12 rho⁰), l'élévation de la concentration en calcium cytosolique, pouvait modifier l'expression de gènes nucléaires en provoquant l'activation des facteurs de transcription ATF2 (Activated Transcription Factor 2) et NFAT (Nuclear Factor Activated T-cell) par respectivement, les Jun N-terminal Kinases (JNK) et par la calcineurine, et en inhibant l'activité du facteur de transcription NF-kappaB (Biswas et al., 1999).

Si la compréhension des mécanismes par lesquels l'expression des gènes nucléaires est modifiée suite à un dysfonctionnement mitochondrial fait l'objet d'études, il est surtout intéressant d'analyser en quoi cette expression est modifiée, quels sont les gènes dont l'expression varie, ... Deux études transcriptomiques à l'aide de microarrays à haute densité ont été réalisées afin de mettre en évidence les différences d'expression génique entre des cellules rho⁰ et les cellules parentales correspondantes. Ces études portent sur une lignée issue

d'un cancer du sein (MDA-MB-435) (Delsite et al., 2002), la lignée cellulaire 143B déjà présentée, une lignée de cellules épithéliales (ARPE19) et une lignée fibroblastique issue d'un patient atteint du syndrome de Kearns-Sayre (GMO6225) (Miceli et al., 2005). Bien que bon nombre de modifications soient propres à chaque lignée cellulaire, et donc fonction du background génétique nucléaire exprimé dans ces cellules, on peut néanmoins dégager certaines tendances de variations d'expression de gènes induites par le dysfonctionnement mitochondrial (Miceli et al., 2005) :

- Gènes impliqués dans le métabolisme énergétique : plusieurs gènes codant pour des enzymes de la glycolyse sont surexprimés dans les cellules rho⁰ (glucokinase, lactate déshydrogénase, ...), tandis que celui codant pour la fructose-1,6-biphosphatase intervenant dans la néoglucogenèse est sous-exprimé. Ces résultats ne sont pas surprenants dans des cellules ne pouvant plus fournir d'ATP à partir de la phosphorylation oxydative.
- Gènes codant pour des constituants mitochondriaux, dont la sous-unité Vb de la cytochrome oxydase, l'ANT, la créatine kinase mitochondriale, ... qui sont surexprimés dans les cellules rho⁰. La surexpression de ces protéines mitochondriales atteste d'une biogenèse mitochondriale active, dans des cellules dépourvues d'ADN mitochondrial.
- Gènes codant pour des protéines impliquées dans la réponse aux stress oxydatifs, généralement surexprimés dans les cellules rho⁰ (MnSOD, Gpx, Hème oxygénase 1, ...). Comme nous le verrons plus loin, les cellules déplétées en ADNmt sont le lieu d'une production mitochondriale importante de ROS.
- Gènes codant pour des protéines impliquées dans la transduction du signal et pour des facteurs de transcription comme PPARgamma ou c-myc. Ce dernier est surexprimé dans chacune de trois lignées rho⁰ testées. Les auteurs ont montré, par une approche basée sur l'ARN interférence, que l'induction de l'expression de c-myc dans les cellules rho⁰ est importante pour l'augmentation de l'activité glycolytique.

Les cellules présentant la mutation MERRF n'ont pas encore fait l'objet d'étude transcriptomique à haute densité, mais une autre étude à large spectre a été conduite, au niveau protéique cette fois. Une étude protéomique sur des mitochondries purifiées a révélé la sous-expression dans les cellules présentant la mutation A8344G de sous-unités composant les complexes I et IV de la chaîne respiratoire codées par le génome nucléaire, alors que plusieurs sous-unités de la pyruvate déshydrogénase sont surexprimées dans ces cellules. Celle-ci permet de transformer le pyruvate, produit de la glycolyse, en acétyl-CoA, destiné à rentrer dans le cycle de Krebs. Des différences dans les modifications post-traductionnelles de la pyruvate déshydrogénase ont également été mises en évidence (Tryoen-Toth et al., 2003).

On peut corrélérer certains résultats obtenus par ces approches dites « sans a priori » avec des études biochimiques qui ont été menées dans des cellules rho⁰ et/ou dans des cellules présentant la mutation MERRF, notamment dans le domaine du métabolisme énergétique, de l'équilibre rédox, et de l'homéostasie calcique que nous allons détailler aux points suivants.

1.4.2. La chaîne de phosphorylation oxydative et le potentiel de membrane mitochondrial

Dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial, les 13 polypeptides intervenant dans la chaîne de phosphorylation oxydative et codés par le génome mitochondrial ne sont pas exprimés. Notons que les complexes incomplets se forment néanmoins dans la membrane

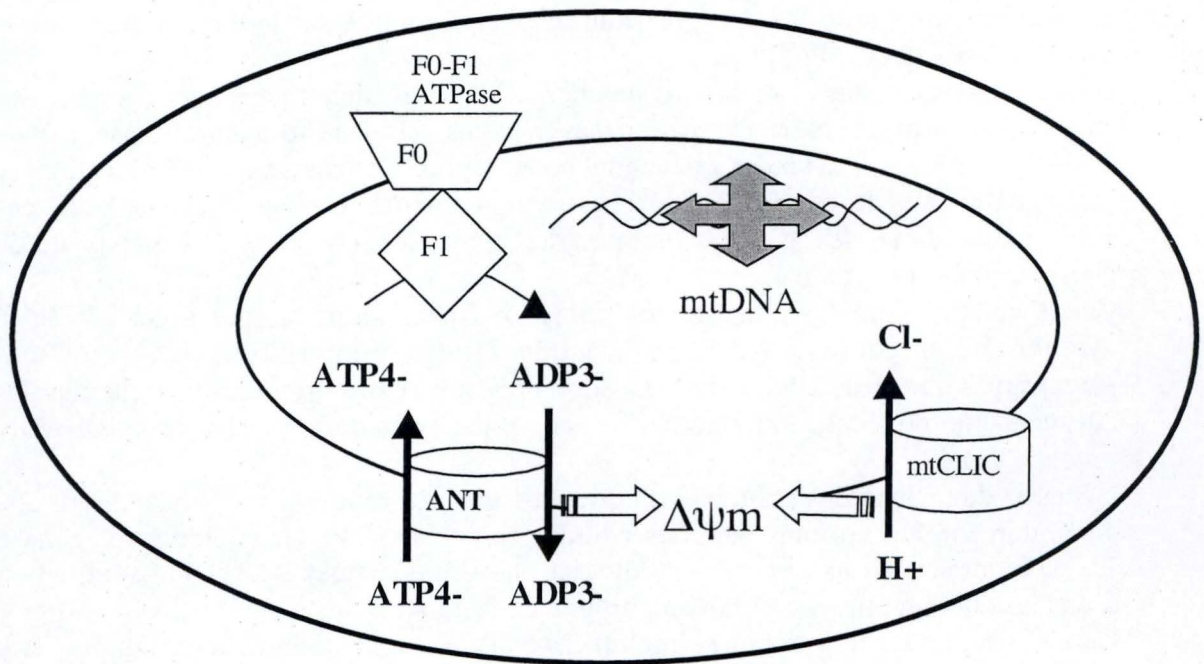


Figure 1.14.: Hypothèses émises quant au maintien du potentiel de membrane mitochondrial dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. A gauche, la F₁F₀ déficiente catalyse la réaction de déphosphorylation de l'ATP⁴⁻ en ADP³⁻, entraînant le fonctionnement inverse de l'ANT ce qui génère un potentiel de membrane. A droite, la surexpression du canal à chlore mtCLIC dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial permet le transport d'ions Cl⁻ dans la matrice mitochondriale (d'après Arnould et al., 2003).

mitochondriale avec les sous-unités codées par le génome nucléaire, sans toutefois permettre le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Marusich et al., 1997).

Ainsi, la phosphorylation oxydative étant non fonctionnelle, les cellules produisent de l'ATP par la voie de la glycolyse. Cette dernière a un rendement beaucoup plus faible que la respiration cellulaire, et les cellules déplétées consomment donc une quantité de glucose plus importante que les cellules parentales. Dans le cas des cybrides mutées, la synthèse des 13 polypeptides mitochondriaux est diminuée, et ces cellules survivent aussi grâce à la glycolyse, la respiration n'étant plus suffisante. Elles consomment donc également une plus grande quantité de glucose (Marusich et al., 1997).

Une autre conséquence du dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale est une diminution du potentiel de membrane, décrite dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial (Buchet et al., 1998) ainsi que dans des fibroblastes provenant de patients atteints de la mutation MERRF (James et al., 1996). Plusieurs hypothèses illustrées à la figure 1.14 ont été proposées quant à l'origine de ce potentiel de membrane résiduel dans les cellules présentant un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire. Tout d'abord, dans les cellules Rho⁰, la F1-ATPase est dissociée de la Fo-ATPase dont plusieurs sous-unités sont codées par l'ADN mitochondrial. Dans cette situation, la F1-ATPase hydrolyse l'ATP, produisant de l'ADP³⁻ dans la matrice mitochondriale (Buchet et al., 1998). L'ANT fonctionne alors dans un mode inverse de son activité normale et permet l'échange d'un ADP³⁻ depuis la matrice mitochondriale contre un ATP⁴⁻ cytosolique. L'ANT permet donc, par son activité antiport inverse, le maintien d'un certain potentiel de membrane mitochondrial (Buchet et al., 1998).

Une seconde hypothèse a été proposée au laboratoire suite à la mise en évidence de la surexpression de la protéine mtCLIC, un canal à chlore mitochondrial, dans plusieurs modèles cellulaires présentant un dysfonctionnement mitochondrial, dont les cybrides MERRF. La modulation de l'expression et/ou de l'activité de mtCLIC entraîne des modifications du potentiel de membrane mitochondrial, suggérant que le transport des ions Cl⁻ dans la matrice mitochondriale contribue au maintien du potentiel de membrane mitochondrial en absence de respiration active (Arnould et al., 2003).

1.4.3. Equilibre rédox

La chaîne respiratoire mitochondriale est un lieu important de la production de ROS, comme nous l'avons vu au point 1.1.4. Lorsque la chaîne respiratoire est défectueuse, comme c'est le cas des cellules rho⁰ ou porteuses de la mutation MERRF, la mitochondrie génère davantage de ROS (Wei et al, Chin J Physiol 2001). Toutefois, l'équilibre rédox de la cellule dépend également du niveau de défenses antioxydantes, qui peuvent varier dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial

Ainsi, dans des cellules SK-Hep 1 dérivées d'un hépatome, la production d'O₂⁻ est augmentée dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial, mais la concentration en ROS est identique à celle observée dans les cellules parentales car. La MnSOD et la Gpx sont surexprimées suite au dysfonctionnement mitochondrial, ce qui permet à la cellule de neutraliser l'O₂⁻ produit (Park et al., 2004).

Par contre, dans les cellules 143 rho⁰, la concentration intracellulaire des ROS est augmentée par rapport aux cellules 143B parentales. Dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial, l'activité de la MnSOD diminue, l'activité de la catalase est inchangée. De plus, les défenses antioxydantes dépendantes du glutathion sont modifiées : la concentration en GSH et l'activité de la glutathion réductase diminuent, provoquant une baisse du rapport GSH/GSSG, indicateur de l'état d'oxydation de la cellule. (Vergani et al., 2004). Signalons

que la production de ROS et les niveaux d'activité et d'expression des enzymes anti-oxydantes varient dans les cellules déplétées en ADN mitochondrial en fonction de la lignée cellulaire.

Enfin, dans le cas de patients atteints du syndrome MERRF, la production de ROS (O_2^- , H_2O_2) est augmentée et l'abondance des transcrits et de la protéine MnSOD ainsi que l'activité de cette enzyme sont à la baisse (Wei et al., 2001), ce qui semble correspondre, au moins en partie, aux variations observées dans les cellules 143 rho⁰.

1.4.5. L'homéostasie calcique

Plusieurs études font état d'une élévation de la concentration cytosolique en calcium dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial par rapport aux cellules possédant de l'ADN mitochondrial sauvage, notamment dans les cellules murines L929 rho⁻ (Arnould et al., 2002), ainsi que dans des cellules cancéreuses de poumons, les A459 (Amuthan et al., 2002). Dans les cellules A459 rho⁰, l'abondance d'un canal au calcium, le canal RyR1 (Ryanodine Receptor-1), spécifique de cellules musculaires squelettiques, est augmentée aussi bien au niveau du transcrit qu'au niveau protéique. Ceci pourrait expliquer l'augmentation de la concentration calcique. De plus, une inhibition mitochondriale par des inhibiteurs métaboliques de la mitochondrie (antimycine, carbonyl cyanide m-chlorenphenylhydrazone (ccc), valinomycine, azide) provoque également une augmentation de la concentration en calcium (Biswas et al., 1999). Rappelons que le calcium joue un rôle dans le phénomène de communication rétrograde au niveau des cellules déplétées en ADN mitochondrial (voir 1.4.1.).

Cependant, des données contradictoires sur la concentration en calcium dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial existent dans la littérature. En effet, Sherer et al. (1999) ont montré que dans des cellules de neuroblastome déplétées en ADN mitochondrial, la concentration en calcium cytosolique était légèrement mais significativement à la baisse (Sherer et al., 2000). Plusieurs arguments dans la littérature montrent que les pathologies mitochondriales conduisent à des processus dégénératifs qui pourraient résulter de modifications de la sensibilité des cellules présentant une altération de l'activité mitochondriale à l'apoptose (Mroczek-Tonska et al., 2003).

Le but principal de notre travail étant d'étudier la réponse à un stimulus pro-apoptotique de cellules cybrides présentant une mutation ponctuelle dans le génome mitochondrial, nous allons donc poursuivre cette introduction en développant succinctement le phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose.

1.5. L'apoptose

L'apoptose est un processus physiologique par lequel la cellule va se donner la mort. C'est un moyen pour l'organisme de contrôler le nombre de ses cellules au sein de nombreux tissus (homéostasie tissulaire). Il intervient notamment lors du développement embryonnaire, mais également dans la maturation des systèmes immunitaire et nerveux. Une dérégulation de ce processus peut engendrer des pathologies telles que des cancers, des maladies neuro-dégénératives, cardiovasculaires ou encore immunologiques.

L'apoptose présente des caractéristiques morphologiques et biochimiques qui lui sont propres. Le phénomène s'achève par la formation de corps apoptotiques, mais la membrane

Nécrose	Apoptose
<p><u>Caractéristiques morphologiques</u> Gonflement cellulaire Perte de l'intégrité membranaire Pas de formation de vésicules Désintégration des organites Se termine par la lyse complète de la cellule</p>	<p><u>Caractéristiques morphologiques</u> Condensation du cytoplasme et de la chromatine Aggrégation de la chromatine au niveau de la membrane nucléaire Pas de perte de l'intégrité membranaire Se termine par la fragmentation de la cellule en petites vésicules délimitées par une membrane intacte appelées corps apoptotiques</p>
<p><u>Caractéristiques biochimiques</u> Perte de la régulation de l'homéostasie ionique Processus passif (ne requiert pas d'ATP) Digestion aléatoire de l'ADN</p>	<p><u>Caractéristiques biochimiques</u> Processus étroitement régulé Processus nécessitant de l'ATP Fragmentation non-aléatoire de l'ADN Activation d'une cascade de protéases (caspases) Altération dans l'architecture membranaire (translocation de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe de la membrane plasmique)</p>
<p><u>Signification physiologique</u> Affecte des groupes de cellules contigües Induite par des stimuli non-physiologiques (attaque du complément, virus lytiques, hypothermie...) Induit une réponse inflammatoire</p>	<p><u>Signification physiologique</u> Affecte des cellules individuelles Induite par des stimuli physiologiques (absence de facteurs de croissance, changements dans l'environnement hormonal) Corps apoptotiques phagocytés par les macrophages ou les cellules voisines N'induit pas de réponse inflammatoire</p>

Figure 1.15.: Principales différences morphologiques, biochimiques et physiologiques entre la mort cellulaire par nécrose et la mort cellulaire par apoptose (Piret, 2005).

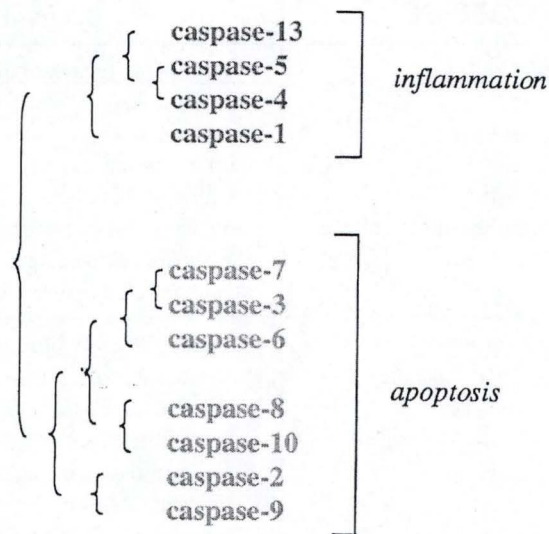


Figure 1.16.: Les caspases chez l'homme. Les caspases sont des cystéines-aspartate protéases dont 11 membres sont connus chez l'homme. Certaines interviennent dans le processus inflammatoires, mais la grande majorité a un rôle à jouer dans l'apoptose. Parmi ces dernières, on distingue les caspases initiatrices (2, 8, 9, 10), et les caspases effectrices (3, 6, 7) (d'après Zimmermann et al., 2001).

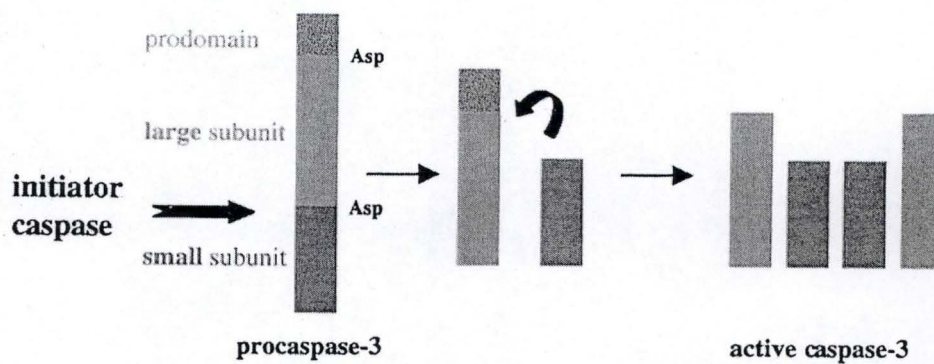


Figure 1.17.: Schéma reprenant le mode d'activation des caspases illustré pour la caspase-3. L'activation des caspases s'effectue en plusieurs étapes à partir d'une pro-caspase inactive. D'abord deux clivages protéolytiques successifs après un aspartate (représentés par des flèches en gras) séparent les sous-unités du prodomaine. Ensuite, les caspases s'assemblent en tétramères composés de deux petites et deux grandes sous-unités (d'après Zimmermann et al., 2001).

plasmique reste intègre durant l'entièreté du processus et n'engendre pas de réponse inflammatoire associée, ce qui le différencie de la mort cellulaire par nécrose (figure 1.15).

1.5.1. Les caspases

Les acteurs principaux intervenant dans l'apoptose sont des « Cysteine-ASpartate ProteASES » ou caspases (revues dans (Philchenkov, 2004; Shi, 2004; Zimmermann et al., 2001).) A l'heure actuelle, 14 caspases ont été décrites chez les mammifères, et on en retrouve 11 chez l'homme. On distingue les caspases intervenant dans l'apoptose des caspases intervenant dans l'inflammation, que nous ne détaillerons pas dans cette introduction (voir figure 1.16).

Les caspases apoptotiques sont exprimées sous la forme de proenzymes inactives contenant trois domaines : le prodomaine en N-terminal, suivi de la large sous-unité contenant le site actif et le domaine en C-terminal, plus petit. Ces protéases clivent leurs substrats après un résidu aspartate (Asp). Les procaspases sont activées par deux événements de clivage protéolytiques. Tout d'abord, un premier clivage sépare la grosse et la petite sous-unité, ensuite, un second enlève le prodomaine. Notons que les caspases possèdent dans leur séquence primaire des aspartates entre les différents domaines, ce qui peut expliquer les phénomènes d'activation en cascades et d'auto-activation si les procaspases sont à proximité l'une de l'autre.

Si les deux clivages successifs sont nécessaires à l'activation des procaspases en caspases, ils ne sont pas suffisants. En effet, les caspases sont actives sous forme de tétramères composés de 2 petites et 2 grosses sous-unités et contenant donc 2 sites actifs (figure 1.17).

Les caspases sont subdivisées en 2 catégories principales basées sur leur ordre d'intervention dans la réponse apoptotique. Premièrement, les caspases initiatrices (caspase-2 ; -8 ; -9) possèdent un long prodomaine leur permettant d'interagir avec d'autres protéines et d'intégrer et de propager les stimuli apoptotiques. Ces interactions se font par des domaines nommés CARD (caspase-recruitment domain) et DED (death effector domain). Cette première classe de caspases n'induit pas directement la mort cellulaire mais agit en amont de la deuxième classe de caspases, possédant des prodomaines plus courts : les caspases dites effectrices (caspase-3 ; -6 ; -7). Parmi celles-ci, la caspase-3 a certainement un rôle prédominant dans l'apoptose. Elle active par exemple la « Caspase Activated DNase » (CAD), qui fragmente l'ADN. Au repos, CAD est liée à iCAD (« inhibitor of CAD ») qui l'inhibe. iCAD est clivée par la caspase-3 activée, ce qui déclenche l'activation de CAD (Zimmermann et al., 2001).

En plus de la variation de longueur du prodomaine, les 2 classes de caspases diffèrent par leur spécificité de substrats, chacune d'entre elle reconnaissant préférentiellement une séquence particulière comprenant un résidu aspartate. Cette spécificité de reconnaissance est en corrélation avec la fonction de la caspase.

1.5.3. Les inhibiteurs de caspases (Zimmermann et al., 2001).

Bien que les caspases soient exprimées sous forme de procaspases inactives, on retrouve également des inhibiteurs endogènes de caspases capables de réprimer leur activation dans la cellule. Ceux-ci empêchent une activation accidentelle des protéases menant à une

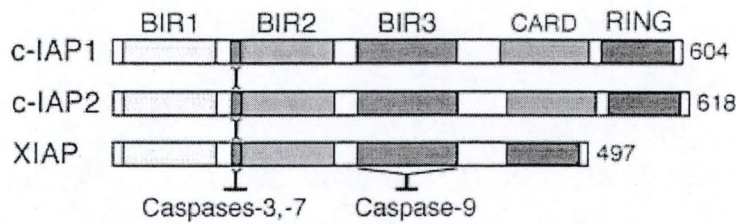


Figure 1.18.: Schéma topologique des domaines protéiques présents dans les inhibiteurs de caspases chez l'homme. Les IAPs, « Inhibitors of Apoptosis Protein », possèdent des domaines BIR permettant l'interaction avec les caspases, tandis que le domaine RING a une fonction d'ubiquitine ligase. Ainsi, en se liant aux caspases, ces inhibiteurs engendrent leur dégradation par le protéasome. Les c-IAPs1 et 2 possèdent également un domaine CARD (caspase-recruitment domain) (Yigong Shi, 2004).

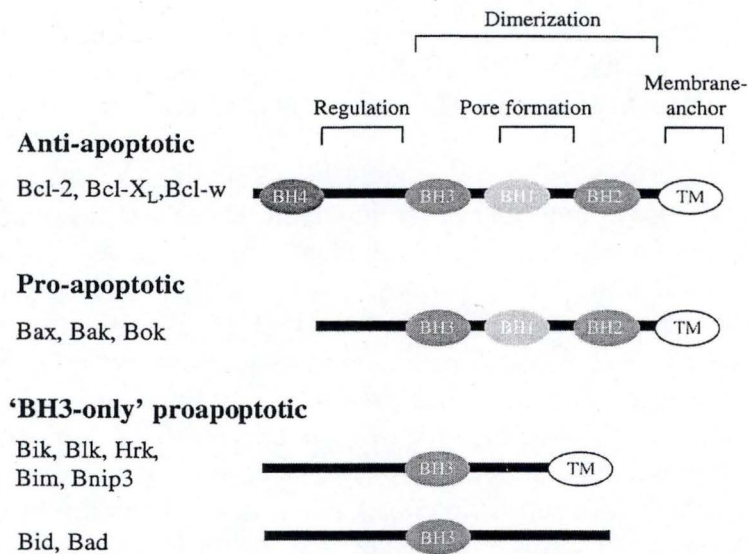


Figure 1.19.: Les protéines de la famille Bcl-2. Les protéines de la famille Bcl-2 sont subdivisées en 3 catégories : les anti-apoptotiques, les pro-apoptotiques, les protéines pro-apoptotiques dites BH3-only, ne présentant que le domaine BH3. Les protéines de cette famille possèdent éventuellement un domaine d'intégration en membrane (TM), des domaines permettant la formation de pores dans les membranes et des domaines de régulation (d'après Zimmermann et al., 2001).

apoptose non nécessaire. Parmi les principaux inhibiteurs naturels connus chez les mammifères et qui comptent actuellement 8 membres, on peut citer : c-IAP1, cIAP2 (« Inhibitor of Apoptose Protein »), XIAP (« X-linked IAP »), le neuronal IAP et la survivine. Ces différentes protéines ont toutes une action anti-apoptotique mais exercent leur effet par des mécanismes différents. Elles peuvent inhiber le recrutement des caspases comme la caspase-8 aux récepteurs de mort de la famille du TNFalpha, mais peuvent également séquestrer des protéines de la famille Bcl-2 ou encore inhiber la libération du cytochrome c mitochondrial dans le cytosol (voir points suivants).

Dans la famille des inhibiteurs de caspases, XIAP paraît être l'inhibiteur le plus efficace. En effet, cet inhibiteur, tout comme les c-IAP1 et 2 peuvent inhiber directement les caspases 3, 7 et 9. Mécanistiquement, les IAPs interagissent avec les caspases par des domaines appelés BIR (Baculovirus IAP Repeats), le premier inhibiteur de caspase ayant été découvert chez ce virus (figure 1.18). Toutes les IAPs possèdent 3 domaines BIR d'environ 70 acides aminés riche en cystéines et histidines, exceptée la survivine qui n'en possède qu'un (figure 1.18). Les inhibiteurs de caspases XIAP, c-IAP1 et 2 possèdent également un domaine RING, ayant une fonction E3 ubiquitine ligase. Ce domaine permet d'expliquer le mode d'action principal des IAPs. En effet, les inhibiteurs de caspases se lient à leur substrat par leur(s) domaine(s) BIR et sont ubiquitinés. Cette ubiquitination engendre leur propre dégradation par le protéasome, mais également la dégradation des caspases qui leurs sont associées (Zimmermann et al., 2001). Les protéines c-IAP1 et c-IAP2 possèdent également un domaine de recrutement des caspases (CARD) localisé entre les domaines BIR et RING. Les IAPs bloquent l'activation des caspases en aval des protéines susceptibles de permettre la libération du cytochrome c mitochondrial comme Bax, Bid et Bak.

1.5.4. La voie intrinsèque (mitochondriale) d'activation de l'apoptose.

L'apoptose peut se dérouler selon deux grandes modalités, soit par l'activation de récepteurs membranaires de mort de la superfamille de récepteurs au TNFalpha et via la transduction du signal qui en découle (voie extrinsèque), soit par l'intégration d'un signal de danger au niveau de la mitochondrie et régulée par les membres de la famille Bcl-2 (voie intrinsèque). Même si ces deux voies sont activées par des stimuli différents, elles aboutissent à l'activation des caspases

Au niveau mitochondrial, les protéines de la famille Bcl-2 vont jouer un rôle prédominant. Cette famille de protéines contient 19 membres connus chez les mammifères et ayant toutes comme caractéristique commune de posséder au minimum un domaine BH (Bcl-2 homology domain) (figure 1.19).

La famille des protéines Bcl-2 est subdivisée en trois sous-familles. On distingue les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 et Bcl-w qui sont les mieux caractérisées; les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, Bak et Bok et les protéines « BH3-only » à fonction également pro-apoptotique dont les membres les plus connus sont Bid et Bad. Le rapport d'abondance entre les facteurs pro- et anti-apoptotiques est donc déterminant la décision d'entrer en apoptose ou de maintenir la survie cellulaire.

Bcl-2 est une protéine qui a été découverte dans l'étude d'un lymphome folliculaire à cellules B dans lequel il jouait le rôle de proto-oncogène. Depuis, de nombreuses études ont démontré le rôle significatif de Bcl-2 dans le processus apoptotique (Adams et al., 1998); (Adams, 2003; Zimmermann et al., 2001)

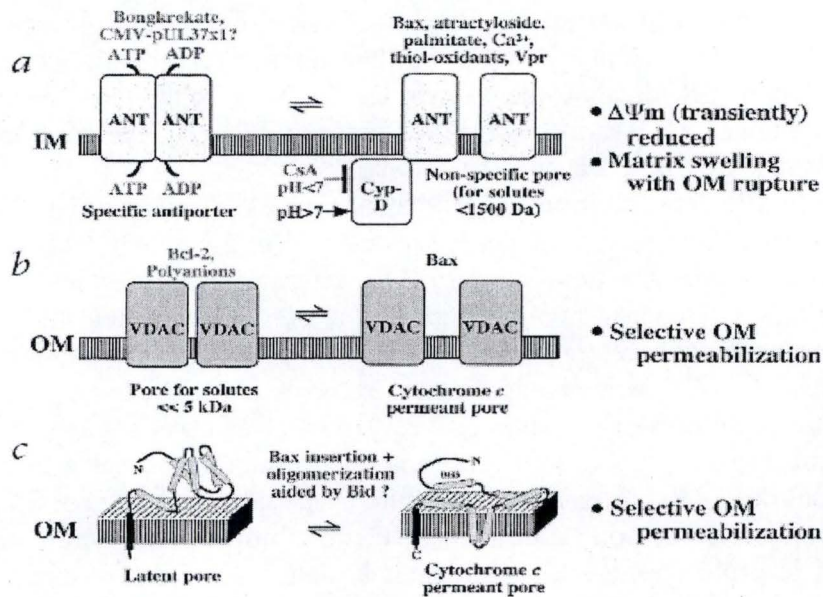


Figure 1.20.: La perméabilisation des membranes mitochondriales. a) formation d'un pore non spécifique en membrane mitochondriale interne à partir de l'ANT suite à des interactions avec les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. b) perméabilisation de la membrane mitochondriale externe par l'ouverture de VDAC en réponse à son interaction avec Bax. c) formation d'un pore en membrane externe directement par des protéines de la famille Bcl-2 telles que Bax (Atan Gross et al., 2000).

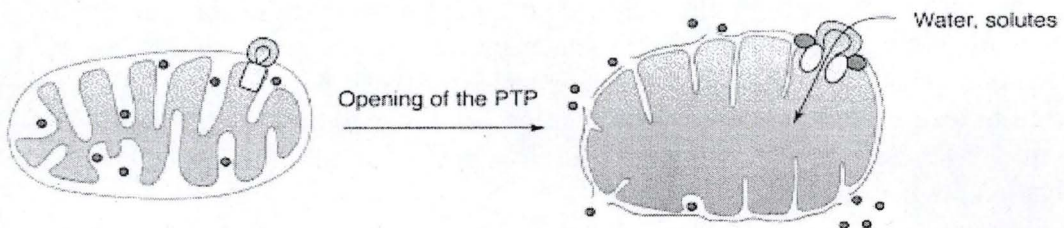


Figure 1.21.: Hypothèse permettant d'expliquer la libération du cytochrome c suite à l'ouverture du PTP. L'ouverture du PTP permet l'entrée d'eau et de solutés dans la matrice mitochondriale. Le volume de la matrice augmente, et la membrane interne, présentant une surface plus importante que la membrane externe, se « déploie » et entraîne la rupture de cette dernière, permettant ainsi la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire dans le cytosol (d'après Desagher and Martinou, 2000).

Au repos, les facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 et Bcl-X_L se retrouvent insérés, sous forme monomérique, en membrane mitochondriale externe où ils assurent l'intégrité mitochondriale en formant des hétérodimères avec des partenaires protéiques pro-apoptotiques comme Bax, Bad, Bak et Bid, empêchant l'oligomérisation de ces facteurs qui, si elle est initiée permet la libération de facteurs apoptogènes mitochondriaux.

Par contre, les facteurs pro-apoptotiques, présentent une localisation multiple et se retrouvent dans la membrane mitochondriale externe, la membrane du réticulum endoplasmique ou nucléaire et le cytosol. Cependant, une activation de la voie apoptotique, induite par exemple par des dommages dans l'ADN nucléaire, va conduire à une translocation de certains de ces facteurs dans la membrane externe de la mitochondrie (Adams et al., 1998). Ce phénomène est provoqué par un changement de conformation permettant l'exposition du domaine BH3, domaine pro-apoptotique par excellence. Ces changements de conformation et de localisation des facteurs peuvent être déclenchés par différents mécanismes post-traductionnels. Ainsi, Bax par exemple, une protéine pro-apoptotique cytosolique sera transloquée dans la mitochondrie suite à une oligomérisation. La protéine Bad, quant à elle, est phosphorylée au niveau basal sur les sérines 112 (par la Protéine Kinase A) et 136 (par Akt) ce qui engendre sa séquestration cytosolique par la protéine adaptatrice 14-3-3. La déphosphorylation de Bad par la calcineurine activée par une augmentation de la concentration en Ca⁺⁺ cytosolique permet sa translocation dans la membrane mitochondriale externe. Un dernier processus d'activation et de translocation peut être le clivage. Ainsi, la protéine Bid cytosolique est clivée par la caspase-8 en une forme tronquée et active (tBid), qui migre dans la membrane mitochondriale externe (Gross et al., 1999).

L'accumulation des facteurs pro-apoptotiques dans la membrane mitochondriale externe modifie la balance entre les facteurs anti- et pro-apoptotiques et leur oligomérisation engendre une perméabilisation de la membrane de cet organe et la libération des facteurs apoptogènes mitochondriaux comme le cytochrome c. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer ce phénomène.

Une première hypothèse suggère que les protéines pro-apoptotiques telles que Bax, en interagissant avec l'ANT, engendrent la formation d'un pore non spécifique en membrane interne (fig 1.20.A). Une seconde hypothèse, illustrée à la figure 1.20.B, propose l'ouverture du canal anionique VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel), suite à l'interaction avec Bax. VDAC est un canal ionique situé en membrane mitochondriale externe où il est très abondant. Au repos, l'ouverture de ce pore est inhibée par des interactions avec des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2. Un troisième modèle propose que les protéines anti-apoptotiques, en s'insérant en membrane mitochondriale, forment elles-mêmes des pores. Ainsi, l'insertion de Bax en membrane, son oligomérisation et l'interaction éventuelle avec tBid engendreraient la formation d'un pore, augmentant la perméabilité de la membrane mitochondriale externe (figure 1.20.C) (Kroemer et al., 2000).

Enfin, un dernier modèle décrit un complexe protéique en membrane interne et externe, appelé le « permeability transition pore » (PTP ; voir 1.1.5.). L'ouverture de ce pore pourrait résulter de l'interaction de Bax avec VDAC et engendrer la dépolarisation de la membrane mitochondriale et le découplage de la phosphorylation oxydative. L'ouverture de ce pore permettrait l'entrée de solutés et d'eau dans la mitochondrie. Le gonflement de la membrane interne qui en résulte conduirait au démantèlement de la membrane externe, augmentant ainsi la perméabilité de cette membrane (figure 1.21, (Gross et al., 1999; Kroemer et al., 2000; Loeffler et al., 2000)).

La perméabilisation de la MME mène à la libération de nombreux facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire dans le cytosol. Parmi ces facteurs, citons le cytochrome c, AIF (Apoptosis Inducing Factor, une flavoprotéine capable d'induire la fragmentation de l'ADN en fragments de hauts poids moléculaires (50 Kpb),

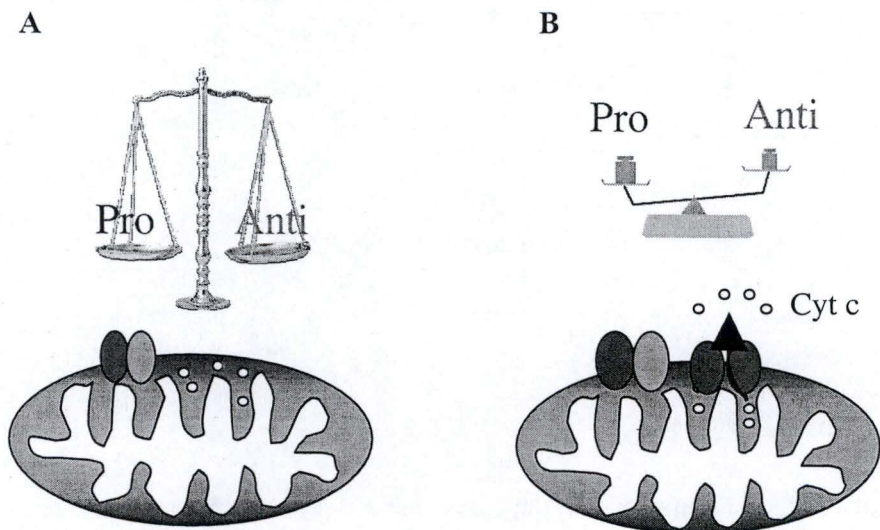


Figure 1.22.: La balance des facteurs pro- et anti apoptotiques conditionne la libération de facteurs mitochondriaux apoptogènes comme le cytochrome c. La libération des facteurs pro-apoptotiques depuis l'espace intermembranaire mitochondrial vers le cytosol est fonction de l'abondance relative de facteurs pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2. La perméabilité membranaire augmente lorsque l'abondance des protéines pro-apoptotiques telles que Bax augmente (B) et surpassent la capacité de séquestration par les protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2 (A).

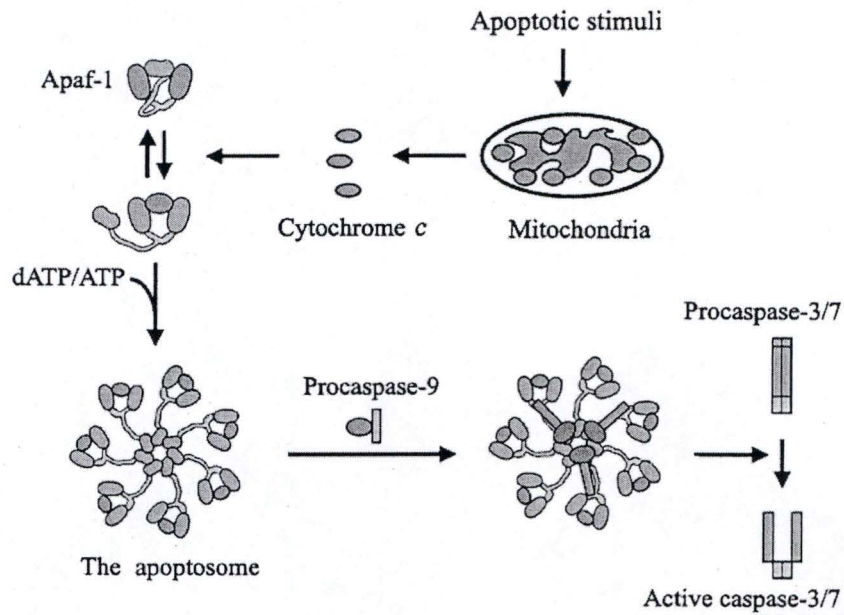


Figure 1.23.: Formation de l'apoptosome. Le cytochrome c libéré de la mitochondrie va interagir en présence d'ATP avec la protéine Apaf-1 et former l'apoptosome. Cela engendre le recrutement de la procaspase-9 et son activation par auto-clivage protéolytique permettant l'activation des caspases effectrices en aval. Ce processus consomme donc de l'énergie sous forme d'ATP (X. Jiang et al. 2004).

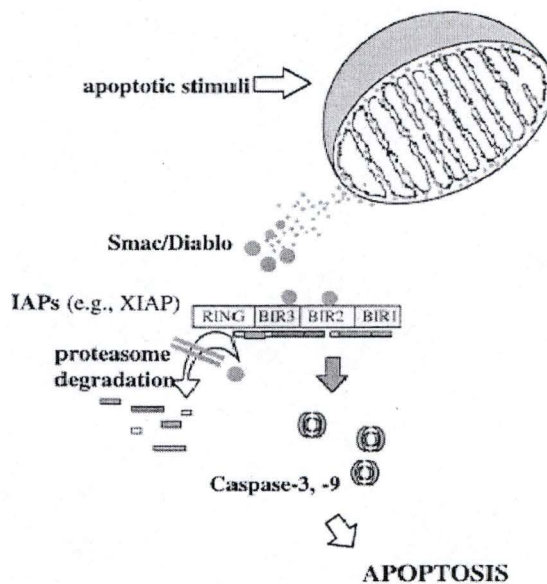


Figure 1.24.: Schéma reprenant l'action pro-apoptotique des protéines Smac/Diablo. Les facteurs pro-apoptotiques Smac/Diablo sont libérés de l'espace intermembranaire mitochondrial tout comme le cytochrome c. Ce sont des inhibiteurs des IAPs. Leur action est donc de lever l'inhibition des caspases exercée par les IAPs en conditions basales (d'après Zimmermann et al., 2001).

indépendamment de l'activation des caspases) et Smac/DIABLO, un inhibiteur des IAPs et donc un activateur de caspases (Loeffler et al., 2000).

Le cytochrome c est une protéine codée par un gène nucléaire et qui, après avoir été synthétisée, est importé dans l'espace intermembranaire mitochondrial, où elle se lie à un groupement hème. Là, le cytochrome c joue un rôle dans la chaîne respiratoire de transport des électrons, où il permet le passage des électrons du complexe III au complexe IV.

La libération du cytochrome c dans le cytosol va dépendre de l'abondance relative des facteurs pro-apoptotiques et anti-apoptotiques (figure 1.22). Les facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2 vont inhiber cette libération tandis que les facteurs pro-apoptotiques tels que Bax, vont la favoriser.

Une fois dans le cytosol, le cytochrome c participe, avec la procaspase 9 et Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor), protéines cytosoliques, à la formation de l'apoptosome (figure 1.23). Le cytochrome c va permettre l'oligomérisation d'Apaf-1 puis de la procaspase-9. L'autoactivation des procaspases-9 en caspases actives qui s'en suit permet alors l'activation des caspases effectrices 3 et 7 qui et donc la mort cellulaire.

Le cytochrome c n'est cependant pas le seul facteur libéré dans le processus apoptotique. La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe engendrée par les facteurs pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 permet également la sortie d'autres facteurs pro-apoptotiques, comme par exemple Smac/Diablo qui eux vont lier les IAPs et lever ainsi l'inhibition des caspases par ces facteurs (figure 1.24).

L'AIF libéré par la mitochondrie, peut également transloquer dans le noyau où il va exercer son activité en activant l'endonucléase G conduisant à la condensation de la chromatine et à la dégradation de l'ADN selon un pattern différent du clivage internucléosomal. Noxa et Puma sont deux protéines mitochondriales de la sous-famille « BH3-Only » de la famille Bcl-2 qui sont également libérées dans le cytosol. Puma aide à la translocation et à l'oligomérisation de la protéine Bax (Haupt et al., 2003), tandis que le mécanisme par lequel Noxa agit est moins bien compris, mais pourrait faire intervenir la libération du cytochrome c médiée par le PTP (Seo et al., 2003).

Un autre effet de la perméabilisation membranaire mitochondriale est la chute du potentiel membranaire et le découplage de la phosphorylation oxydative. Ceci va engendrer une augmentation de production des ROS (reactive oxygen species), perturbant l'équilibre d'oxydo-réduction. Les quantités de glutathion réduit vont diminuer dans la mitochondrie, et les radicaux libres produits vont contribuer à l'apoptose (Adams, 2003; Jiang et al., 2004; Zimmermann et al., 2001).

Un résumé schématique de la voie apoptotique intrinsèque est repris en figure 1.25.

1.5.5. La voie extrinsèque

L'apoptose peut également être déclenchée par l'activation de récepteurs de la famille du TNF en membrane plasmique. Parmi ces récepteurs, les plus importants sont le récepteur au TNF (TNFR1), Fas (CD95), DRE3/WSL ou encore le récepteur au TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). Ces récepteurs sont caractérisés par la présence de domaines extracellulaires riches en cystéines, et d'un domaine intracellulaire nommé « death domain » (DD). La liaison d'un ligand spécifique à un de ces récepteurs va engendrer des voies de signalisation menant à la mort cellulaire par apoptose avec ou sans intervention de la mitochondrie et ce, en fonction du type cellulaire (figure 1.26) (Zimmermann et al., 2001).

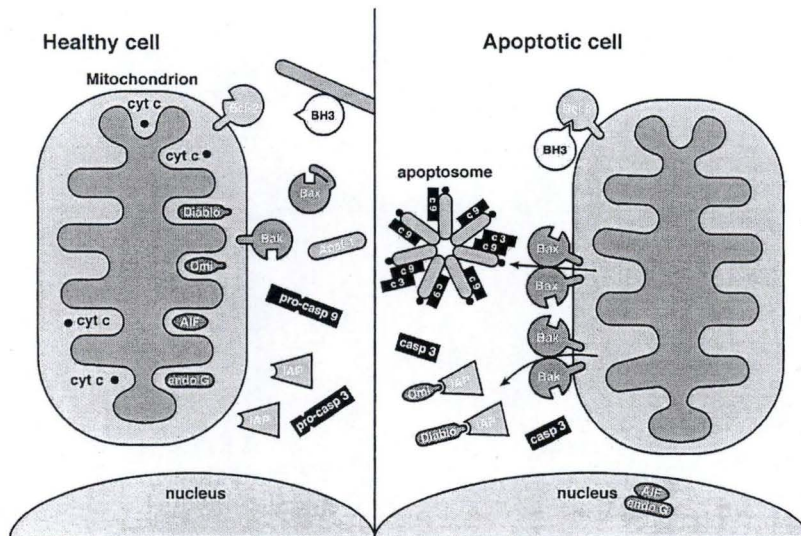


Figure 1.25.: La voie apoptotique intrinsèque. La voie apoptotique mitochondriale est initiée suite à un déséquilibre entre facteurs pro- et anti-apoptotiques. Lorsque les facteurs pro-apoptotiques tels que Bax sont plus abondants que les facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2, ils oligomérisent et provoquent une augmentation de la perméabilité membranaire suivie d'une libération de facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol. Ainsi, le cytochrome c participera à la formation de l'apoptosome responsable de l'activation des caspases. Smac/Diablo inhibera les inhibiteurs de caspases et l'AIF s'associera à l'endonuclease G pour dégrader l'ADN (Jerry M. ADAMS *et al.*, 2003)

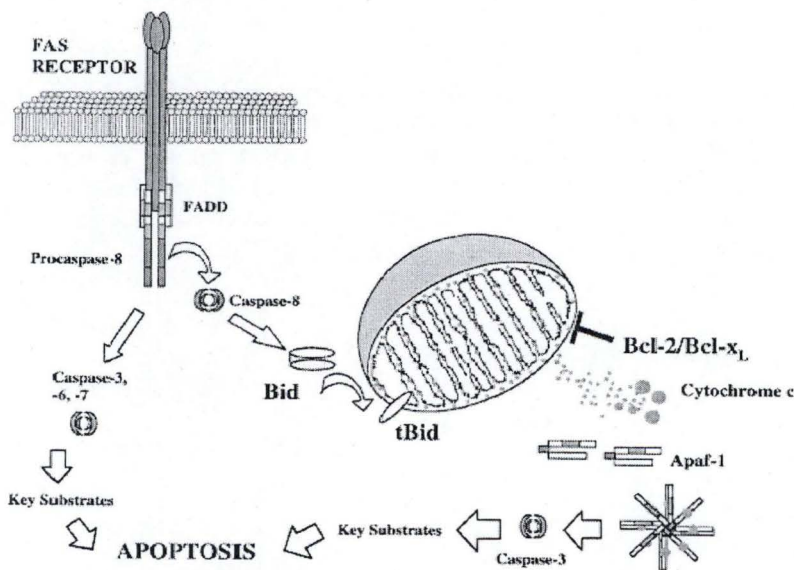


Figure 1.26.: La voie apoptotique extrinsèque médiée par les récepteurs de mort de la superfamille du TNF, illustrée ici pour Fas. L'activation d'un récepteur comme Fas par son ligand engendre le recrutement de la protéine adaptatrice FADD, par des interactions entre « death domains ». La protéine FADD recrute alors les procaspases-8 qui s'auto-activent par clivage protéolytique. Ensuite, celles-ci peuvent cliver et activer des caspases effectrices comme la caspase-3 ou cliver d'autres protéines comme par exemple, la protéine Bid qui assure un lien avec la voie mitochondriale d'induction de l'apoptose. En effet, après translocation, tBid provoque une augmentation de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, la libération du cytochrome c,...L'activation finale des caspases effectrices permet l'accomplissement de l'apoptose (Zimmermann *et al.*, 2001).

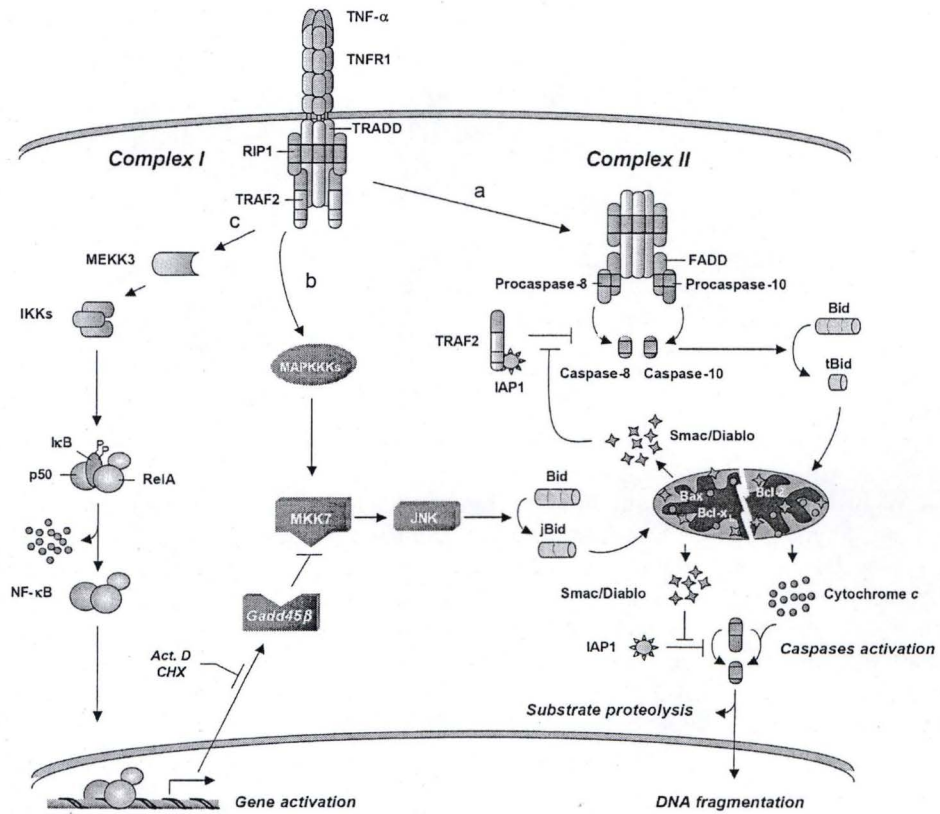


Figure 1.27.: Multiples voies de signalisation induites par l'activation du récepteur au TNF- α . Le TNF- α en se liant à son récepteur peut activer trois voies de signalisation. a. La première permet l'activation directe des caspases-8 et 10 initiatrices et le déclenchement de l'apoptose. b. La seconde permet la libération de Smac/Diablo, l'inhibition des IAPs et implique les JNK. c. La troisième voie entraîne la translocation nucléaire de NF- κ B qui joue un rôle anti-apoptotique en inhibant la seconde voie (Salvatore Papa *et al.* 2004).

Le récepteur Fas, par exemple, est exprimé dans de nombreuses lignées cellulaires et son ligand, le Fas Ligand (FasL) est synthétisé, entre autres par les cellules du système immunitaire que sont les lymphocytes T et B. L'activation des récepteurs va engendrer leur oligomérisation et la formation d'un « death-inducing signaling complex » (DISC). Les domaines de mort (DD) rapprochés vont permettre le recrutement et l'interaction physique avec une protéine possédant également un domaine de mort comme la « Fas-associated death domain » (FADD). De plus, FADD possède également un domaine effecteur de mort cellulaire (Death Effector Domain-DED) permettant le recrutement des procaspases-8. Suite à un changement conformationnel, celles-ci vont s'auto-activer. Les caspases-8 actives activeront à leur tour la caspase-3 (Andrikoula et al., 2001).

Notons également que la caspase-8 active peut cliver Bid en tBid, ce qui, comme expliqué précédemment va engendrer, après translocation, une perméabilisation de la MME suite à la formation d'un pore résultant de l'interaction de tBid avec la protéine Bad et donc une libération des facteurs pro-apoptotiques mitochondriaux dans le cytosol. De cette manière, l'apoptose médiée par voie de récepteurs est également reliée à la voie mitochondriale.

Dans le cas du TNFR1, l'activation du récepteur passe par le recrutement de la protéine TRADD (TNFR-1 Associated Death Domain) par une interaction entre les domaines de mort portés par ces protéines. TRADD recrute alors FADD, et l'activation de la caspase-8 permet la suite des événements.

Ajoutons encore que la liaison d'un ligand à un récepteur de mort n'engendre pas uniquement l'activation de la caspase-8. En effet, l'activation du récepteur-1 au TNFalpha (TNFR-1) peut conduire à l'activation d'une voie de signalisation aboutissant à la Jun N-terminal Kinase (JNK) qui engendre l'apoptose en provoquant le clivage de la protéine Bid. La forme tronquée jBid, résultant du clivage, va permettre la libération de la protéine Smac/Diablo et donc lever l'inhibition des IAPs sur les caspases (voir figure 1.27). Parallèlement, le TNFalpha peut engendrer l'activation de NF- κ B, qui lui induira l'expression de TRAF-1 et -2 (« TNFR-1 associated factors ») et de XIAP (voir 1.5.2.). Une fois liés au TNFR-1, les TRAFs recrutent les c-IAPs au niveau du complexe déjà formé, ce qui est un moyen d'inhiber l'apoptose. De plus, l'activation de NF- κ B par le TNF- α induit une inhibition de l'apoptose médiée par les JNK. Il semble que cette inhibition se déroule via Gadd45 qui est une protéine également impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Ainsi, le TNFalpha peut avoir deux effets totalement différents sur une cellule. Il peut la protéger de la mort cellulaire par l'activation de NF- κ B ou induire l'apoptose par l'activation directe de la caspase-8 effectrice ou par l'activation des JNK (Franzoso et al., 2003; Papa et al., 2004).

1.5.6. Le facteur de transcription c-Myc

c-Myc est une protéine qui, sous forme d'hétérodimère formé par interaction avec la protéine Max, joue le rôle de facteur de transcription. Il induit l'expression de gènes intervenant dans la croissance, la division, le métabolisme cellulaire et l'apoptose (Fuhrmann et al., 1999). Il joue notamment un rôle crucial dans la synthèse des ribosomes puisqu'il régule la transcription de gènes codant pour des ARN et des protéines ribosomiques, en interagissant avec les 3 polymérases nucléaires impliquées dans cette synthèse (Arabi et al., 2005; Grandori et al., 2005; Grewal et al., 2005; Oskarsson et al., 2005). c-Myc est également capable de se lier sur le promoteur de gènes régulés par la protéine NRF-1 (Nuclear

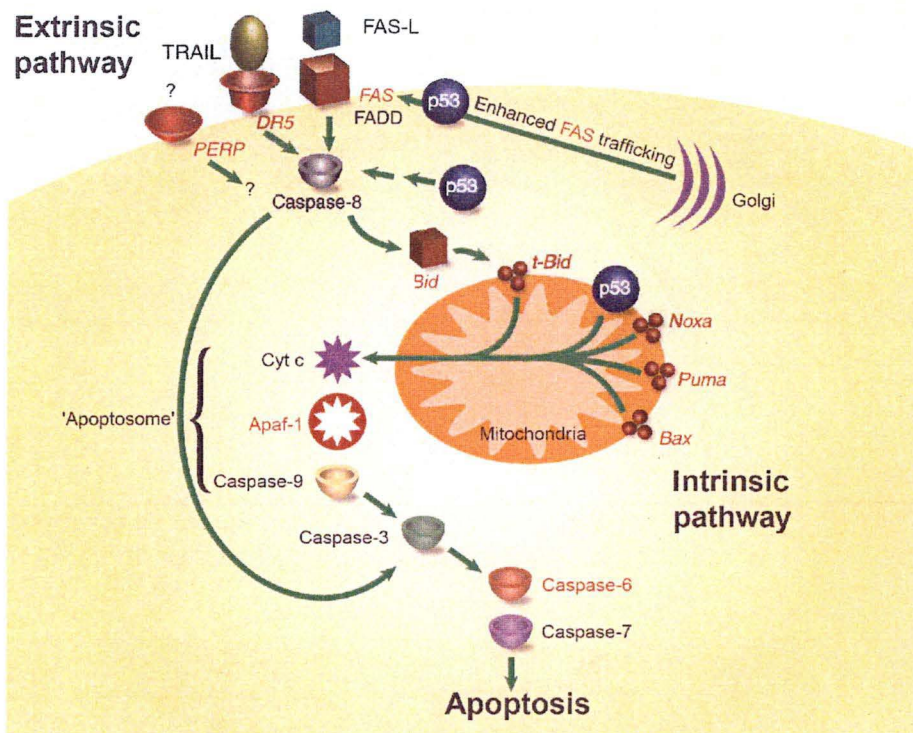
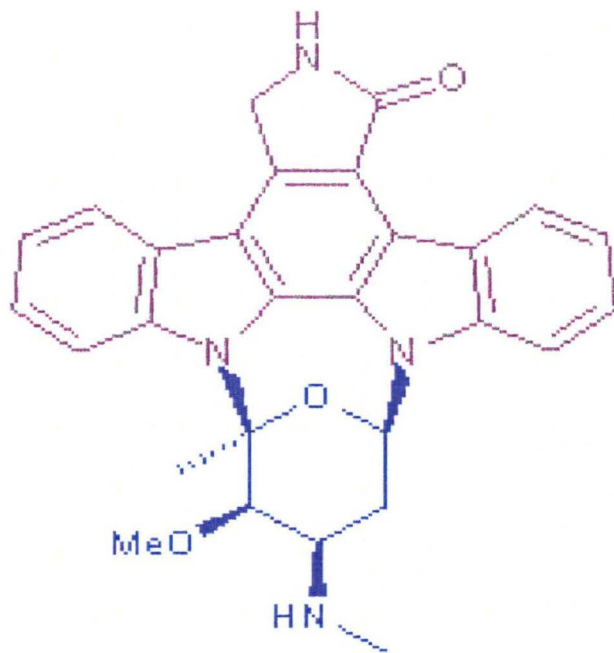


Figure 1.28.: Intervention de p53 dans le processus apoptotique. La protéine p53 est un facteur de transcription intervenant dans l'apoptose en induisant l'expression de gènes intervenant dans ce processus. Les protéines en rouge sont des protéines dont l'expression est contrôlée par ce facteur. Les gènes cibles interviennent aussi bien dans la voie intrinsèque (Noxa, Puma, Bax) que dans la voie extrinsèque (Fas, Bid,...) (Haupt *et al.*, 2003).

A.



B.

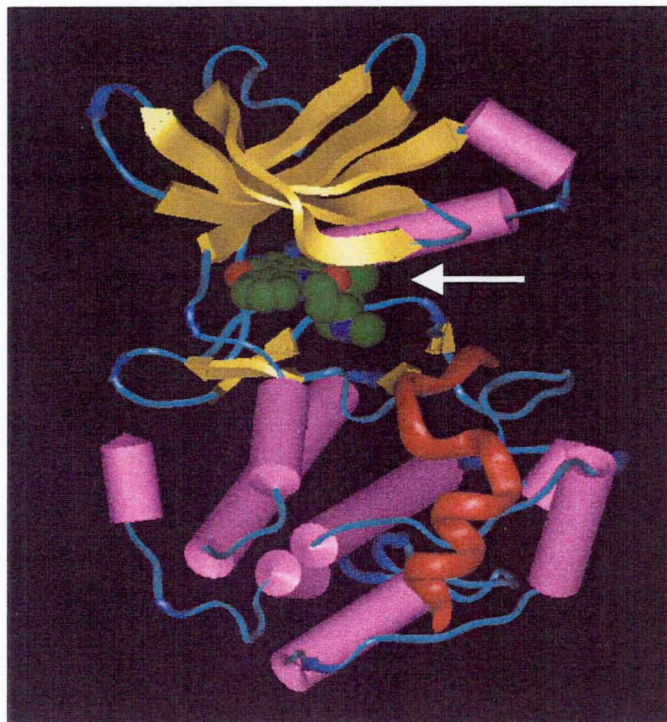


Figure 1.29 : A. Structure de la staurosporine contenant deux unités : une molécule de sucre (bleu) et un groupement constitué d' hétérocycles plans. B. Modélisation de la liaison à « haute affinité » de la staurosporine (flèche) au domaine de fixation de l'ATP d'une kinase réalisée à partir de données cristallographiques obtenues par diffraction aux rayons-X (<http://freespace.virgin.net/clive.walker1/staurosporine/staurosporine2.html#ref9>).

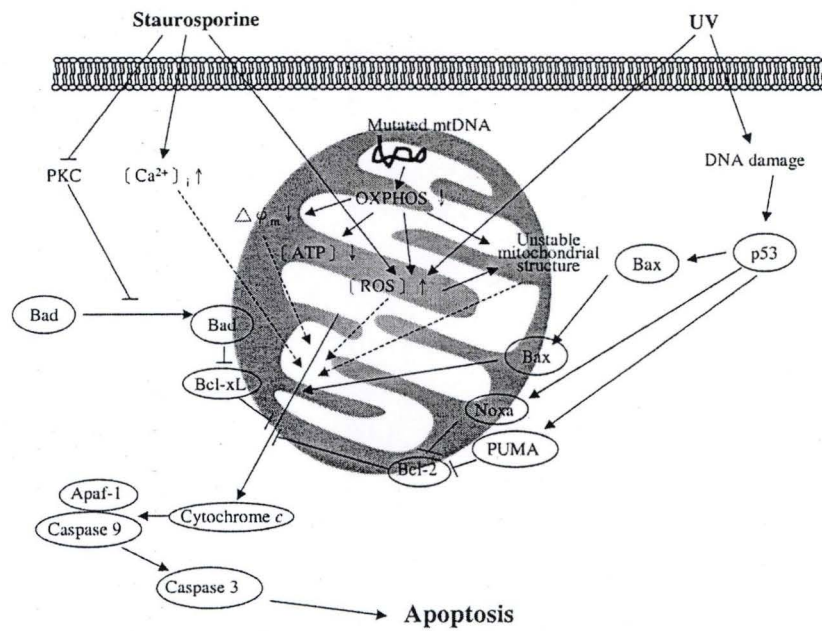


Figure 1.30.: Mécanismes d'induction de l'apoptose par la staurosporine. La staurosporine est un inhibiteur de kinases qui induit l'apoptose par trois voies principales. a. La staurosporine inhibe les PKCs qui en phosphorylant Bad empêchent sa translocation dans la membrane mitochondriale externe. b. Le staurosporine induit une augmentation de la concentration en calcium dans le cytosol, ce qui facilite la libération du cytochrome c dans le cytosol. c. La staurosporine provoque également une augmentation de la production de ROS, ce qui facilite la sortie du cytochrome c dans le cytosol (Chun-Yi Liu *et al*, 2004) .

Respiratory Factor-1) qui régule la transcription de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire.

Lorsque c-Myc est surexprimé, la perméabilité membranaire mitochondriale augmente, et le cytochrome c est libéré dans le cytosol, ce qui sensibilise les cellules face à l'apoptose. Le mécanisme par lequel c-Myc induit cette perméabilité n'est pas clair, mais il semble que son action dépende de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax et Bid (Juin et al., 2002; Klefstrom et al., 2002; You et al., 2002). C-Myc pourrait également agir en inhibant NF- κ B qui a une action anti-apoptotique (You et al., 2002).

1.5.7. Le facteur de transcription p53.

p53 est un facteur de transcription dont le rôle est très important pour la survie de la cellule. Lors de dommages à l'ADN par exemple, il va permettre de bloquer le cycle cellulaire en induisant l'expression de p21 et de réparer l'ADN, en déclenchant l'expression de protéines de réparation de l'ADN. Si les dommages générés sont trop importants, p53 engendrera la mort cellulaire par apoptose. Ces caractéristiques lui confèrent la propriété de suppresseur de tumeur. Les voies par lesquelles ce facteur agit sont nombreuses et synthétisées à la figure 1.28. p53 permet notamment l'expression de Puma, Noxa et de Bax, trois protéines pro-apoptotiques agissant au niveau de la mitochondrie (voir 1.5.4). Il agit également au niveau de la voie extrinsèque, en permettant l'expression de Bid, mais également de récepteurs membranaires tels que Fas (Haupt et al., 2003).

Signalons que p53 est une protéine aux fonctions multiples et responsable de l'activation de l'expression de nombreux gènes. Elle est soumise à une étroite régulation à de multiples niveaux (localisation subcellulaire, stabilité de la protéine, multiples modifications post-traductionnelles, ...). La description de ces régulations complexes dépasse le cadre de cette introduction, d'autant plus que la molécule que nous avons utilisé dans ce travail pour induire une réponse apoptotique, la staurosporine, ne fait pas intervenir p53.

Après avoir présenté les principaux acteurs du processus apoptotique déclenché classiquement par la voie intrinsèque ou la voie extrinsèque, examinons par quels mécanismes la staurosporine peut déclencher une réponse apoptotique.

1.5.8. L'apoptose induite par la staurosporine.

La staurosporine est un alcaloïde naturel initialement isolé à partir de la bactérie *Streptomyces staurosporeus* (Omura et al., 1977). Sa structure chimique comprend une molécule de sucre et un groupe d'hétérocycles plan (figure 1.29), qui s'insère dans le site de liaison à l'ATP de protéines kinases, inhibant leur activité. L'intérêt pour cette molécule et surtout pour certains de ces dérivés plus spécifiques réside dans leur action potentielle anticancéreuse.

La staurosporine est fréquemment utilisée expérimentalement pour induire la mort cellulaire par apoptose. Les mécanismes d'action connus par lesquels elle agit sont au nombre de trois (figure 1.30) (Liu et al., 2004).

Premièrement, la staurosporine induit l'apoptose en inhibant les Protéines Kinases C (PKC). Ces kinases sont décrites pour protéger la cellule de la mort par apoptose en phosphorylant la protéine Bad au niveau de la sérine 112 (Bertolotto et al., 2000). Une deuxième phosphorylation de Bad par Akt au niveau de la sérine 136 entraîne alors sa séquestration

cytosolique par la protéine 14-3-3 (Gross et al., 1999). Bad est une protéine pro-apoptotique dont la fonction est d'inhiber Bcl-X_L au niveau de la membrane mitochondriale externe et de permettre la perméabilisation de cette membrane. Ainsi, la staurosporine en inhibant les PKCs empêche la séquestration de Bad et permet à cette protéine d'exercer sa fonction pro-apoptotique.

Deuxièmement, la staurosporine induit une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, ce qui provoque l'activation d'une série d'enzymes dépendantes du calcium. Ainsi, la calpaïne, une protéase activée par le calcium, va cliver les protéines Bid et Bcl-2 ce qui facilitera la perméabilisation de la MME et la libération des facteurs pro-apoptotiques situés dans l'espace intermembranaire. De plus, la calcineurine, une phosphatase également activée par une augmentation de la concentration en calcium cytosolique engendrera la déphosphorylation de Bad et favorisera ainsi sa translocation (Hajnoczky et al., 2003). Lors du processus apoptotique, les phosphatidylsérines présentes normalement dans le feuillet interne de la membrane plasmique vont être transloquées dans le feuillet externe, ce qui permet la reconnaissance et la dégradation des corps apoptotiques par les macrophages. Ce phénomène dépend également du calcium (McConkey et al., 1997). Enfin, l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique se traduit également par une augmentation de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale. Or, nous avons vu que le calcium en excès au niveau de cet organite devient toxique pour la cellule (voir point 1.1.5.), car il diminue le potentiel de membrane mitochondrial et engendre la production accrue de ROS. Il permettrait également l'ouverture du PTP et une augmentation de la perméabilité membranaire (Brookes et al., 2004; Hajnoczky et al., 2003).

La staurosporine entraîne également l'apoptose par des mécanismes impliquant les ROS puisqu'elle provoque une augmentation de la concentration cytosolique et mitochondriale de ces molécules, qui interviennent dans le processus apoptotique en facilitant la libération du cytochrome c dans le cytosol (Gil et al., 2003).

En conclusion, la staurosporine, que ce soit par l'inhibition des PKCs, par l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique ou par la production de ROS, entraîne la libération du cytochrome c vers le cytosol et l'activation des caspases suite à la formation de l'apoptosome. Même si la staurosporine agit principalement au niveau de la voie intrinsèque pour déclencher l'apoptose, Feng et collaborateurs (2002) ont montré que cette molécule pouvait également sensibiliser des hépatocytes murins à l'apoptose induite par le TNF α (Feng et al., 2002).

1.6. Cellules affectées par un dysfonctionnement mitochondrial: résistance ou hypersensibilité face aux inducteurs de l'apoptose ?

Il est logique de penser qu'un dysfonctionnement mitochondrial ou qu'une mutation dans l'ADN mitochondrial puisse avoir un impact sur la sensibilité que peut avoir une cellule en réponse à un inducteur de l'apoptose. En effet, nous avons vu que l'apoptose est un processus dans lequel la mitochondrie joue un rôle très important puisque l'entrée d'une cellule en apoptose peut survenir suite à une perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, suite à l'augmentation de la production de ROS, ou par une augmentation de la concentration en calcium mitochondrial.

Or, les cellules déplétées en ADNmt présentent un découplage de la phosphorylation oxydative mitochondriale, un plus faible potentiel de membrane, une concentration en calcium cytosolique élevée, et un déséquilibre rédox en faveur des espèces oxydantes. On peut donc s'attendre à ce que leur réponse face à un processus de stress ciblant la mitochondrie soit différente de la réponse obtenue pour des cellules parentales.

Dans la littérature, l'induction de l'apoptose a été étudiée dans plusieurs modèles cellulaires caractérisés par un dysfonctionnement mitochondrial. Il semble que les avis soient partagés quant à une éventuelle résistance ou hypersensibilité de ces cellules face à l'apoptose. De plus, les mécanismes moléculaires mis en évidence pour expliquer les différences de réponses ne font pas l'unanimité. Ces résultats contradictoires et la controverse qu'ils soulèvent pourraient résulter du type cellulaire considéré, de la nature (qualitative et quantitative) de l'altération mitochondriale et du stimulus utilisé pour induire l'apoptose.

Ainsi, Jiyang Cai et collaborateurs (2000) en étudiant l'apoptose induite par la staurosporine ont montré que des cellules d'une lignée lymphoïde (WI-L2) déplétées en ADNmt ne montrent pas de sensibilité accrue ou de résistance face à l'apoptose par rapport aux cellules parentales (Cai et al., 2000). Le phénomène s'y déroule apparemment de la même manière et selon la même cinétique. Par contre, l'analyse de l'état d'oxydation de ces cellules déplétées en ADN, révèle un maintien du potentiel rédox suite à la libération du cytochrome c, alors que dans les cellules parentales, la libération de ce facteur pro-apoptotique engendre une chute du potentiel redox, suite à une augmentation de la production des ROS et à une diminution du pool de GSH dans la mitochondrie. Cette oxydation cellulaire lors de l'apoptose permettrait également, lors des phases tardives du processus, d'inactiver les caspases.

Dans le même ordre d'idées, Sun Young Parks et collaborateurs ont travaillé sur des cellules SK-Hep1 déplétées ou non en ADN mitochondrial et ont montré que les ρ^0 étaient plus résistantes que les cellules parentales à une apoptose induite par H_2O_2 . Dans les cellules ρ^0 , la MnSOD ainsi que la Gpx sont plus abondantes, ce qui pourrait expliquer que l'oxydation observée dans les cellules parentales ne se déroule pas dans les cellules déplétées (Lee et al., 2004).

Des cellules HeLa déplétées en ADN mitochondrial, appelées EB8, montrent elles une surexpression du récepteur Fas en membrane, ce qui augmente leur susceptibilité face à l'apoptose induite par un anticorps dirigé contre ce récepteur. De plus, dans ces cellules il semble que Bcl-2 ait un rôle important dans le phénomène de blocage de l'apoptose médiée par le récepteur Fas (Asoh et al., 1997).

Une autre lignée cellulaire, dérivée d'un tératocarcinome, les NT2 et les cellules dérivées, les NT2 ρ^0 ne montrent une sensibilité différente à l'apoptose que lorsque celle-ci est déclenchée par certaines molécules. Ainsi, une induction de l'apoptose par la staurosporine se déroule sans aucune différence entre les 2 types de cellules. Dans les deux cas on observe suite au traitement une augmentation de la mortalité, une diminution de la production d'ATP, une libération du cytochrome c dans le cytosol, une activation des caspases et une production accrue de ROS, ainsi qu'une diminution du pool de GSH. Par contre, si l'apoptose est induite par le peptide β -amyloïd, qui joue un rôle dans la maladie d'Alzheimer, les cellules déplétées en ADN mitochondrial montrent un comportement différent des cellules parentales face à ce peptide. Les cellules parentales traitées présentent en effet toutes les caractéristiques de l'apoptose observées lors du traitement à la staurosporine (libération du cytochrome c, activation des caspases,...), ce qui n'est pas le cas des cellules déplétées en ADN mt, qui semblent résister totalement au peptide β -amyloïd. Ceci suggère que le peptide β -amyloïd nécessite une mitochondrie intègre pour pouvoir provoquer la mort cellulaire par apoptose (Cardoso et al., 2001).

Un troisième inducteur, l' H_2O_2 , a été récemment utilisé par le même groupe sur les cellules NT2 déplétées ou non en ADNmt (Cardoso et al., 2004). Les résultats de cette étude montrent que les cellules ρ^0 sont légèrement plus sensibles à H_2O_2 que les cellules parentales. L' H_2O_2 induit l'apoptose notamment par une production élevée de ROS. Dans le cas présent, un traitement de 24 heures avec de l' H_2O_2 à une concentration de 100 μ M induit une diminution du potentiel de membrane mitochondrial ainsi qu'une libération du

cytochrome c, suivie par une activation des caspases effectrices et d'une dégradation de l'ADN. Le fait que la production de ROS par la mitochondrie dépende (Dumont et al., 1999) ou non (Sipos et al., 2003) du potentiel de membrane est controversé. Cependant, il est certain que l'apoptose ne dépend pas d'une chaîne respiratoire fonctionnelle, puisque les cellules Rho⁰ peuvent entrer en apoptose et semblent même plus sensibles à l' H₂O₂.

Ainsi, l'ensemble des études réalisées par Cardoso et collaborateurs sur les cellules NT2 déplétées en ADN mitochondrial montrent que le comportement de ces cellules dépend de la molécule induisant l'apoptose : si les cellules déplétées ne montrent pas de différence de sensibilité par rapport aux cellules parentales lorsque l'apoptose est induite par la staurosporine, elles sont plus sensibles lorsqu'il s'agit de l'H₂O₂ et plus résistantes dans le cas du peptide β -amyloid.

Le but du mémoire est de comparer la réponse à la staurosporine de cellules cybrides possédant la mutation MERRF (A8344G) dans l'ADN mitochondrial par rapport à des cellules cybrides porteuses de l'ADN mitochondrial sauvage. Le comportement en réponse à la staurosporine des cellules 143 B et rho⁰ ainsi que celui des cellules cybrides possédant la mutation MERRF a déjà été étudié. Chun-Yi Liu et collaborateurs (2004) ont ainsi montré une hypersensibilité de ces cellules modifiées (Liu et al., 2004). Ils ont notamment démontré que l'activité caspase-3 dans des cellules cybrides MERRF était plus importante que dans des cellules parentales lors d'un traitement à la staurosporine. Néanmoins, ils n'ont pas analysé les mécanismes pouvant expliquer cette sensibilité différente des cellules cybrides mutées en réponse à la staurosporine. C'est ce que nous avons tenté de faire dans ce travail préliminaire.

Objectifs de ce mémoire

Les objectifs de ce travail sont au nombre de quatre :

- 1) Premièrement, continuer un travail entrepris au laboratoire par Ludovic Mercy dans le cadre de sa thèse de doctorat visant à rechercher des changements d'expression de gènes induits par un dysfonctionnement mitochondrial. La stratégie choisie a été de comparer les profils d'expression de gènes dans des cellules 143B rho0 (cellules d'ostéosarcome humaines déplétées totalement en ADNmt), repeuplées avec des mitochondries de patients sains (= cellules cybrides sauvages) et des cellules 143B rho⁰ repeuplées avec des mitochondries possédant une mutation ponctuelle (A8344G) à l'état hétéroplasmique dans l'ADN mitochondrial codant pour l'ARNt^{Lys} (= cellules cybrides mutées), cette mutation étant responsable du syndrome MERRF. Cette étude a été réalisée au niveau transcriptomique en utilisant un microdamier à ADN généraliste « Human General Chip » (Eppendorf) permettant l'analyse de l'expression de 202 gènes répartis dans plusieurs catégories fonctionnelles et qui sont par exemple impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire, la mort cellulaire, la prolifération ... (voir liste des gènes et « design » du damier en annexes I et II).
- 2) Vu la controverse actuellement soulevée dans la littérature quant à la sensibilité à l'apoptose des cellules déplétées en ADN_{mt} ou mutées au niveau de celui-ci, nous avons étudié la sensibilité de ces lignées cellulaires à l'apoptose induite par la staurosporine. Dans ce contexte, nous avons comparé la fragmentation de l'ADN et l'activation de la caspase-3 dans les lignées de cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à une incubation en présence de staurosporine.
- 3) A partir des données obtenues, nous avons cherché à mettre en évidence des caractéristiques propres à chacune des deux lignées, susceptibles d'expliquer un comportement différentiel de celles-ci en réponse à la staurosporine. Nous sommes particulièrement intéressés au niveau d'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'apoptose. Pour quelques candidats décrits comme des acteurs importants de l'apoptose que sont Bcl-2, Bax, Bcl-X_L, Mcl-1 et le cytochrome c, nous avons confronté les résultats obtenus au niveau transcriptomique à l'abondance de la protéine déterminée par des analyses en Western blotting. La localisation subcellulaire de ces facteurs a également été recherchée par des Western blotting réalisés sur des fractions subcellulaires obtenues par centrifugations différentielles générant des fractions enrichies (mais non pures) mitochondriales, nucléaires et cytosoliques. Des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale ont également été réalisés pour confirmer certains résultats. Le but était de dresser une cartographie de l'abondance et de la localisation de plusieurs acteurs pro- et antiapoptotiques dans des cellules présentant une déficience de l'activité mitochondriale induite par la mutation responsable du syndrome MERRF, en réponse à la staurosporine.
- 4) Finalement, dans une analyse préliminaire, nous avons comparé le profil d'expression de gènes impliqués dans l'apoptose dans ces cellules répondant à la staurosporine en utilisant un damier à ADN ciblé sur l'apoptose « DualChip™ Human Apoptosis » (Eppendorf) (voir liste des gènes et « design » du damier en annexes IV et V).

2. Matériel et méthodes

2. Matériel et Méthodes

2.1. Culture cellulaire

Matériel :

Au cours de ce travail, nous avons utilisé deux lignées cellulaires cybrides, provenant de la fusion de cellules 143B rho⁰ (issues d'un ostéosarcome humain et totalement déplétées en ADN mitochondrial) avec des myoblastes énucléés provenant de patients atteints du syndrome MERRF et caractérisés par la présence de la mutation A8344G à l'état hétéroplasmique dans l'ADN mitochondrial ou des myoblastes énucléés provenant d'individus sains. Ces lignées cellulaires seront respectivement appelées cellules cybrides mutées et sauvages dans la suite de ce travail. Ces cellules ont été généreusement offertes par le Prof. G. Attardi (Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, USA).

Les lignées cellulaires sont cultivées dans des boîtes de 75 cm² (Costard) en présence de 15 ml de milieu DHG (Dulbecco Modified Eagle's Medium-High Glucose : 4,5 g/l) contenant 10 % de sérum de veau foetal (SVF). Le milieu des cellules cybrides mutées est également supplémenté par de l'uridine (50 µg/ml ; Sigma, U-3003) ainsi que par du pyruvate (1 mM ; Sigma P-2256). Les cellules sont maintenues dans une étuve humide à 37 °C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂.

Maintien des cultures et repiquages :

Les cellules sont sous-cultivées deux à trois fois par semaine selon leur état de confluence. Les milieux de culture sont décantés et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS (phosphate buffer saline : 150 mM NaCl, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄ ; pH 7,4) préchauffé à 37 °C. Elles sont ensuite trypsinisées à l'aide de 2 ml de trypsine 0,25 % (Gibco, 25050-014) puis resuspendues dans du milieu DHG + 10 % SVF. La suspension cellulaire est répartie dans de nouvelles boîtes de culture à une dilution de 1/10 ou de 1/6 pour les cellules cybrides sauvages et mutées respectivement. Le volume est finalement porté à 15 ml par addition de milieu DHG + 10% SVF contenant ou pas l'uridine et le pyruvate selon la souche ensemencée.

Mise au point d'un modèle d'apoptose à la staurosporine

Au cours de ce travail, les cellules ont été incubées en présence de staurosporine utilisée pour induire l'apoptose et de nombreuses molécules susceptibles de moduler la réponse cellulaire à cet inducteur (voir table 2.1). Ces molécules ont été ajoutées dans le milieu de culture DHG contenant 10 % SVF à des concentrations et pendant des temps donnés dans la légende des figures de la partie résultat.

Molécule	Action	Référence	Stock	Concentration finale
Staurosporine	Inducteur d'apoptose	Sigma S-4400	1 mM dans DMSO	100 - 500 nM
Z-VAD-FMK	Inhibiteur général de caspases	BD Biosciences # 550377	1 mM dans DMSO	5 μ M
Cyclosporine A	Inhibiteur du PTP (cyclophiline D)	Sigma C-3662	1 mM dans éthanol	100 nM
Acide bongkréique	Inhibiteur du PTP (ANT)	Calbiochem # 203671	10 mM dans H ₂ O	10 μ M
BAPTA-AM	Chélateur de calcium intracellulaire	Molecular Probes B-1205	100 mM dans DMSO	20 μ M
Ionomycine	Ionophore calcique	Sigma I-0634	1 mM dans DMSO	1 μ M

Table 2.1. Molécules chimiques modulatrices de la réponse cellulaire apoptotique utilisées au cours de ce travail.

2.2. Analyse de l'expression de gènes par les damiers à ADN.

Principe

Le principe de l'hybridation et la procédure de préparation du matériel biologique sont les suivants : après avoir extrait l'ARN total des cellules, l'ARNm est rétrotranscrit en présence de nucléotides marqués à la biotine, puis l'ADN complémentaire (ADNc) est hybridé sur un damier, rincé et révélé par un anticorps dirigé contre la biotine et couplé à la cyanine 3, les lames sont scannées, et la fluorescence est quantifiée.

2.2.1. Extraction d'ARN total.

L'extraction d'ARN total s'effectue à partir de 2 boîtes de 75 cm² contenant des cellules à confluence en utilisant le kit « RNAagents Total RNA Isolation System » de la firme Promega. Il est important, lors de l'extraction d'ARN, de travailler en conditions « RNase Free » de manière à ne pas dégrader l'ARN. Ces conditions comportent notamment le port de gants, l'utilisation de tips autoclavés, et le traitement de l'endroit de travail au SDS.

Le principe de l'extraction de l'ARN total est le suivant : les cellules sont rincées une fois au PBS stérile à 4 °C, puis raclées et lysées dans une solution dénaturante contenant des sels et du détergent. Les lysats sont récupérés dans un tube de 50 ml et homogénéisés en vortexant, par un passage à la seringue et en vortexant à nouveau pour obtenir une lyse efficace des cellules. De l'acétate de sodium 2M (pH 4,0) puis de l'alcool isoamyl : chloroforme : phénol (Promega) sont ajoutés à raison de respectivement 60 et 600 µl. Cette dernière solution permettra de récupérer les phases aqueuses et organiques. Les tubes sont mélangés vigoureusement par inversion puis placés sur glace pendant 15 minutes. Les lysats sont transférés en microtubes stériles et centrifugés 20 minutes à 10000 g à 4°C. La phase aqueuse supérieure contient alors l'ARN et la phase organique contient les protéines précipitées. La phase aqueuse est récupérée en prenant garde de ne pas toucher l'interface où se situe l'ADN génomique.

A la phase aqueuse est ajouté un volume équivalent d'isopropanol, et la solution est incubée pendant 5 minutes minimum à -20°C pour permettre la précipitation de l'ARN total qui est alors sédimenté par une centrifugation de 10 minutes à 10000 g à 4 °C puis resuspendu dans de la solution dénaturante et vortexé jusqu'à dissolution. De nouveau, un volume d'isopropanol est ajouté pour précipiter l'ARN total et celui-ci est finalement récupéré par une centrifugation de 10 minutes à 10000 g et à 4°C. Le culot d'ARN total est ensuite lavé par resuspension dans de l'éthanol 75 % (4 °C). Après une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 10000 g et à 4°C, l'éthanol est décanté et le culot est séché à température ambiante. L'ARN est enfin resuspendu dans de l'eau « RNase free » puis dosé en lisant l'absorbance à 260 nm au GeneQuant. La qualité de l'ARN total ainsi récupéré est ensuite analysée à l'aide d'un système Bioanalyseur 2100 (Agilent Technologies) permettant d'obtenir un profil électrophorétique qui renseigne sur son intégrité. Un rapport ARNr28S/ARNr18S proche de 2 reflète une bonne qualité de l'ARN total qui est ensuite aliquoté et conservé à -20 °C .

2.2.2. Rétrotranscription des ARNm en ADNc

En fonction de la concentration en ARN total obtenue, un volume correspondant à 20 µg d'ARN total est prélevé et centrifugé sous vide pour concentrer l'échantillon. Un volume de 2 µl d'une solution contenant un mélange de 6 standards internes à différentes concentrations (ARN synthétique de séquence connue et différente du génome humain) est ajouté ainsi que, 2 µl d'oligo-dT à 500 ng/µl (Invitrogen) et 5,5 µl d'H₂O « RNase free ». Le standard interne introduit interviendra dans le processus de normalisation. Le mélange est alors incubé pendant 10 min à 70°C pour permettre à l'oligo-dT de s'hybrider sur la queue poly-A des ARNm puis est placé 5 minutes sur glace. Le mix de réaction est alors ajouté. Il contient 4 µl de tampon de rétrotranscription 5x (Invitrogen), 2 µl de DTT (Dithiothreitol à 0,1 M, Invitrogen), 1 µl d'un inhibiteur de ribonucléase (RNAsine 40 U/µl, Promega) et 2 µl d'un mélange de dNTP (100 mM dATP, 100 mM dTTP, 100 mM dGTP et 16 mM dCTP, Roche), et de 1 mM en dCTP marqués à la biotine (Perkin Elmer). Après une incubation de 5 minutes à température ambiante, 1,5 µl de transcriptase inverse (Superscript RII, 200 U/µl Invitrogen) sont ajoutés et le mélange réactionnel est incubé à 42 °C pendant 90 min pour permettre la rétrotranscription des ARNm en ADNc biotinylés. Pour assurer une plus grande efficacité de la rétrotranscription, on rajoute ensuite 1,5 µl de Superscript RII et le mélange est réincubé pendant 90 minutes à 42 °C. Les microtubes sont alors placés à 70°C pendant 15 minutes et deux unités de RNase H (2U/µl) (Invitrogen) sont ajoutées. La mixture est alors incubée à 37 °C pendant 20 minutes de manière à dégrader l'ARNr et ARNt double brins et les hybrides ADNc/ARNm. Enfin, un passage 3 minutes à 95°C permet de dénaturer les ADNc qui sont ensuite stockés à -20 °C.

2.3. Hybridation des ADNc sur damiers.

2.3.1. Présentation des damiers

L'analyse de l'expression de gènes a été effectuée sur deux damiers. Premièrement, le « Dual Chip Human General » (Eppendorf) est un damier comportant 202 sondes de capture pour des transcrits de gènes classés en différentes familles selon leur fonction. Ce damier a été utilisé dans le but d'analyser et de quantifier des différences d'expression de gènes entre des cellules cybrides sauvages (référence) et mutées (test) non traitées. La liste des gènes analysables par ce damier et le « design » de la chip contenant 3 « subarrays » correspondant à des dépôts de sondes en triplicats sont respectivement présentés dans les Annexes I et II. Le deuxième damier utilisé dans ce travail est le « Dual Chip Human Apoptosis » (Eppendorf) qui contient 135 sondes de capture pour des gènes intervenant dans le processus apoptotique (voir liste de gènes analysables et design du damier en Annexes IV et V. Les annexes III et VI sont réservées aux tableaux de résultats complets). Il a été utilisé pour analyser les différences d'expression de gènes entre des cellules cybrides sauvages ou mutées non traitées (référence) et respectivement des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de staurosporine à 100 nM pendant 6 heures (test). Sur chaque damier, les sondes de capture pour chaque ADNc sont présentes en trois exemplaires formant ainsi des « subarrays ».

L'ARN total des cellules est extrait et sa qualité est contrôlée avant que les ARNm soient rétrotranscrits en ADNc et hybridés sur les damiers. L'abondance des ADNc hybridés est détectée par un anticorps anti-biotine couplé à la cyanine-3 et l'intensité de fluorescence

est mesurée par un scanner confocal. L'intensité des spots, directement proportionnelle à l'abondance des transcrits de départ dans la zone linéaire, est quantifiée et l'expression de gènes est déterminée après normalisation.

Les deux types de damier, en plus de contenir des sondes de captures pour des ADNc de gènes d'intérêt, contiennent également des sondes pour des contrôles d'hybridation positifs et négatifs, des contrôles de fixation positifs et négatifs, de sondes pour des standards internes ainsi que des sondes de capture pour des ADNc de gènes dont l'expression ne doit pas varier en fonction de la condition expérimentale (« housekeeping genes »). Les signaux de fluorescence obtenus pour les standards internes et les gènes de maintenance serviront à normaliser les données obtenues pour les gènes d'intérêt.

2.3.2. Les contrôles

De nombreux contrôles sont nécessaires à une analyse d'expression de gènes utilisant des damiers à ADN et ont préalablement été décrits pour les damiers Eppendorf (de Longueville, 2003). Les différents réactifs et contrôles utilisés proviennent également de chez Eppendorf (Belgique).

Les **contrôles de fixation négatifs**, sont des spots sur le damier qui ne contiennent pas de sonde de capture, mais uniquement de la solution de fixation (« spotting buffer », Eppendorf). Ces contrôles permettent de vérifier qu'il n'y a pas de contamination lors des fixations des sondes de capture, et ne doivent donc pas s'allumer.

Les **contrôles de fixation positifs** sont des sondes de capture préalablement multi-biotinylées qui sont « spottées » en concentrations croissantes (0,5 à 300 nM), ce qui permet de vérifier que la fixation des sondes de capture sur le damier s'est bien déroulée. Ces spots doivent toujours s'allumer, et montrer des intensités de fluorescence croissantes.

Les **contrôles d'hybridation négatifs** sont constitués de séquences d'ADN complémentaires à de l'ADNc provenant d'espèces éloignées de l'espèce humaine. Ces fragments ne partagent donc aucune homologie avec des séquences d'ADN humain, et aucune cible ne doit s'y hybrider. Ces contrôles correspondent au bruit de fond présenté par des sondes de capture non biotinylées et « spottées » sur la lame du damier.

Les **contrôles d'hybridation positifs** sont constitués d'une séquence d'ADN d'un gène provenant d'une espèce éloignée et ne présentant aucune homologie de séquence avec l'ADN des échantillons à étudier (de Longueville, 2003). Une cible biotinylée du contrôle positif est ajoutée au moment de l'hybridation pour vérifier l'efficacité de l'hybridation. Les signaux obtenus pour ces contrôles doivent idéalement être comparables dans les conditions contrôle et test.

Les **standards internes** sont des ARN synthétiques de séquences connues générés à partir d'un clone d'ADN végétal contenant une extrémité-3' poly(A) qui sont ajoutés avant la rétrotranscription. Ils permettent de vérifier l'efficacité de la rétrotranscription des ARNm et donc l'incorporation des nucléotides biotinylés dans les conditions contrôle et test. Sur le damier sont « spottées » des sondes de capture de séquences complémentaires à ces standards internes. Ainsi, les ADN complémentaires correspondants vont s'y hybrider et permettre de contrôler la qualité de l'étape de rétrotranscription. Sur le damier, les standards internes sont disposés dans 6 zones différentes et à différentes concentrations.

Pour pouvoir analyser et comparer l'expression de gènes dans des cellules soumises à des conditions expérimentales différentes, il est nécessaire de sélectionner des gènes de maintenance ou « housekeeping genes » dont l'expression est inchangée dans les différentes conditions expérimentales analysées. Les signaux obtenus pour ces spots serviront de

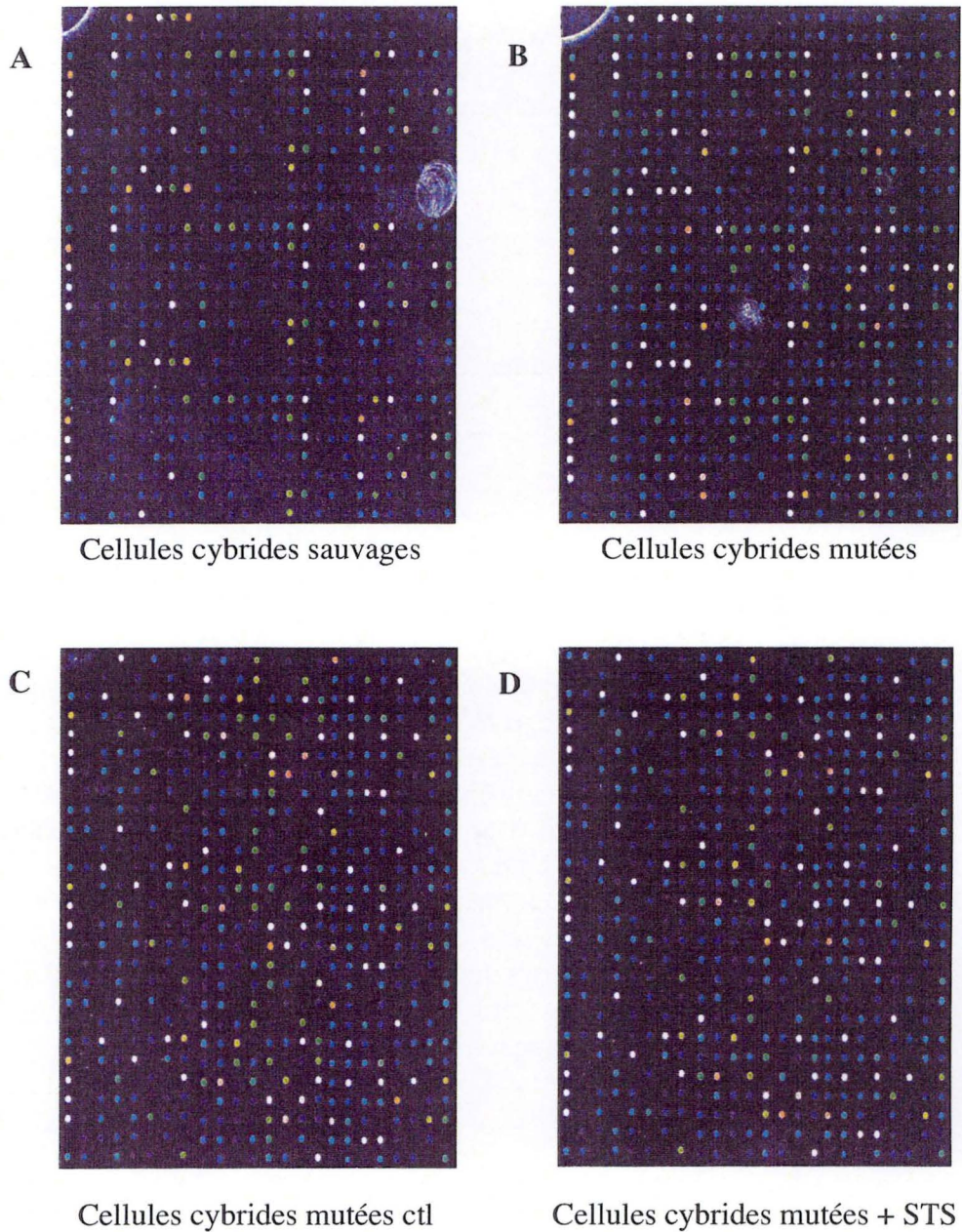


Figure 2.1. Images d'acquisition au gain 70 des intensités de fluorescence des spots du microdamier « DualChip Human General » après hybridation des ADNc obtenus par rétrotranscription à partir de 40 μg d'ARN total extrait des cellules cybrides sauvages (A) et mutées (B) et images d'acquisition au gain 70 des intensités de fluorescence des spots du microdamier « DualChip Human apoptosis » après hybridation des ADNc obtenus par rétrotranscription à partir de 20 μg d'ARN total extrait des cellules cybrides mutées traitées (D) ou non (C) à la staurosporine à 100 nM pendant 6 heures.

référence et permettront de normaliser les valeurs obtenues pour des gènes dont l'expression varie d'une condition expérimentale à l'autre.

2.3.3. Hybridation des ADN complémentaires sur les damiers.

Les hybridations des ADN complémentaires ont été effectuées à partir des deux kits suivants: « DualChip Kit Human General » et « DualChip Human Apoptosis » de la firme Eppendorf. L'hybridation est réalisée dans des chambres d'hybridation et tous les tampons et produits utilisés proviennent, sauf quand indiqué, de la firme Eppendorf.

Un mélange contenant des tampons d'hybridation A (10 μ l/chambre) et B (40 μ l/chambre), l'ADNc correspondant à 20 ou 40 μ g d'ARN total obtenu après rétrotranscription, du contrôle positif d'hybridation biotinylé et de l'eau « RNase free » (20 μ l/chambre) est préparé pour chaque condition. Un volume de 100 μ l de mélange est chauffé 1 min à 60 °C pour éviter la précipitation du SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) contenu dans le tampon B avant d'être introduit dans les chambres d'hybridation. Chaque lame, comportant deux « arrays » (test et référence) est placée dans un « thermomixeur » et l'hybridation est réalisée à l'obscurité par une incubation pendant une nuit à 60 °C et sous agitation à 1400 rpm. Le lendemain, les chambres d'hybridation sont retirées et après deux minutes, les lames sont immergées dans du tampon de lavage (Unibuffer 2,5 % contenant 0,1 % de Tween-20). Elles sont rincées 4 x 2 minutes dans ce tampon puis récupérées et retournées sur 800 μ l d'une solution de tampon de blocage contenant 5 mg/ml de lait (Gloria) et l'anticorps anti-biotine marqué à la cyanine-3 (Lucron Bioproduct) dilué 1000 fois. L'incubation à l'obscurité en présence de l'anticorps dure 45 minutes. Les lames sont ensuite rincées 4 x 2 minutes dans du tampon de rinçage puis 2 x 2 minutes dans de l'eau distillée afin d'éliminer l'excédent d'anticorps et les sels du tampon de lavage. Elles sont enfin séchées à 20 °C par une centrifugation (centrifugeuses Centra CL3R) de 5 minutes à 600 rpm puis l'abondance des ADNc hybridés sur les sondes de capture est détectée par la mesure des intensités de fluorescence des spots à l'aide d'un scanner confocal.

2.3.4. Quantification et normalisation de l'expression génique.

La cyanine-3 est un fluorochrome excité à une longueur d'onde de 550 nm et qui émet à 570 nm. L'intensité des spots est proportionnelle au nombre d'ADNc biotinylés hybridés aux sondes de capture à cet endroit et donc à la quantité d'ARN correspondant exprimé dans la cellule au moment de l'extraction. Chaque lame est scannée à 3 gains de sensibilité différents (100, 70, 50) à l'aide du programme *ScanArray Express* (Perkin Elmer). Des exemples représentatifs de damiers scannés après hybridation sont présentés à la figure 2.1 pour respectivement, des hybridations réalisées sur le « DualChip Kit Human General » à partir d'ADNc préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées ou des hybridations réalisées sur le « DualChip Human Apoptosis » à partir d'ADNc préparés à partir de cellules cybrides sauvages incubées pendant 6 heures en présence de staurosporine à 100 nM.

Les scans sont enregistrés sous le format TIFF permettant la conversion de la fluorescence en nuances de gris. Le gain 100 permet de détecter des transcrits de gènes peu exprimés, tandis que les gains plus faibles permettent de quantifier l'expression de gènes fortement exprimés pour lesquels les signaux de fluorescence saturent au gain 100. Après le

scanning des lames, l'intensité du niveau de gris sera quantifiée pour chaque spot en calculant une moyenne de la somme des pixels grâce au programme *Sylverquant Analyser*. Pour chacun des spots, la valeur d'intensité du bruit de fond environnant est déduite de la valeur mesurée. Ensuite, les valeurs sont normalisées grâce au programme informatique « Statistical Software ».

Premièrement, une moyenne des intensités des contrôles négatifs d'hybridation est réalisée pour chaque gain et est déduite de l'intensité de chaque spot des tests et des contrôles. Ensuite, des rapports sont effectués pour chaque spot, la valeur obtenue dans la condition test étant divisée par la valeur obtenue dans la condition de référence. Ces ratios d'intensité ne s'expriment pas en unité. La moyenne des ratios obtenus pour les standards internes est effectuée pour chacune des 6 zones dans lesquelles ils sont répartis. L'intensité des spots d'une zone est alors divisée par la valeur moyenne des ratios des standards internes de la zone correspondante. Enfin, parmi les gènes de maintenance, sont retenus ceux dont le rapport d'intensité (test / référence) est proche de 1. Plus le nombre de gènes de maintenance retenu est important et plus la normalisation sera fiable. La moyenne des rapports des gènes de maintenance est effectuée et les ratios d'intensité des autres spots sont divisés par la valeur obtenue. Ainsi, pour l'ensemble des sondes capture hybridées sur le damier, une valeur de surexpression ou de sous expression (test / référence) est présentée. Ces valeurs sont donc normalisées par rapport aux standards internes, aux gènes de maintenance et tiennent compte des signaux obtenus pour les contrôles négatifs d'hybridation.

Parmi les valeurs obtenues après toutes ces opérations, des distinctions peuvent être faites. Premièrement, certains gènes ne montrent pas de variation d'expression, d'autres sont déterminés comme variant de manière qualitative. Ces derniers sont des gènes pour lesquels au moins une valeur d'intensité est non quantifiable, ce qui est le cas d'une valeur non détectée ou d'une valeur saturée. Pour les gènes qui varient de manière quantitative, les valeurs d'intensité sont quantifiables, et le ratio test/référence donne une mesure de la sur- ou sous-expression de ces gènes dans la condition test par rapport à la condition référence. Ces valeurs quantitatives sont alors analysées pour leur signification statistique et seules les ratios sortant de l'intervalle de confiance (95 %) sont considérées comme significatives.

2.3. Marquages en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale

Dans le cadre de ce mémoire, différents marquages en immunofluorescence ont été réalisés pour tenter de mettre en évidence, dans des cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine, la présence, l'abondance et/ou la localisation de protéines impliquées dans la réponse apoptotique. Les protéines étudiées dans ce cadre sont : Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bax, la caspase-3 active.

2.3.1. Matériel

- PBS : 150 mM NaCl, 10 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄; pH 7,4
- PBS-Triton X-100 1% (Sigma)
- PBS-BSA 2% (PAA)
- PBS-paraformaldéhyde 4 % (Merk)

Protéine cible	Firme et numéro de référence	Espèce	Dilution (dans du PBS-BSA 2%)	Temps d'incubation
Bax	Pharmingen 554104	lapin	1/100	16 heures
Bcl2	Upstate 05-341	Souris	1/100	16 heures
Bcl-XL	Sigma B-9429	Souris	1/100	16 heures
Caspase 3 active	Promega, G-7481	lapin	1/100	16 heures
Mcl1	Santa Cruz sc-819	lapin	1/100	16 heures

Table 2.2. Caractéristiques des anticorps primaires utilisés pour les marquages en immunofluorescence.

- Mowiol : 0,1 g de mowiol (Sigma) par ml d'un tampon Tris 1,5 M ; pH 8,8 contenant 22 % de glycérol.
- Anticorps primaires : voir table 2.2
- Anticorps secondaire : anticorps de chèvre anti-IgG de lapin ou anticorps de chèvre anti-IgG de souris couplé à une sonde fluorescente Alexa 488 nm (Molecular Probes) dilué 1000 x dans du PBS-BSA 2 %.
- TOPRO-3 : TOPRO-3 (T-3605) dilué 80 x dans une solution de RNase à 2 mg/ml dans du PBS.

2.3.2. Marquage:

La veille des marquages, les cellules sontensemencées en plaques 24 puits sur des lamelles couvre-objets (Sigma-Aldrich) stérilisées. La densité cellulaire est de 50000 cellules par puits pour les cybrides sauvages et de 75000 cellules par puits pour les cybrides mutées en raison de leur plus faible capacité de prolifération. Dans certaines conditions, les cellules sont préalablement incubées en présence de staurosporine avant les marquages en immunofluorescence. Dans ces conditions, le lendemain du repiquage, le milieu DHG contenant 10 % de SVF est remplacé par du milieu DHG + 10 % SVF contenant de la staurosporine à 100 nM pendant 4 h.

Au terme des incubations, les cellules sont fixées pendant 10 minutes dans 1 ml de PBS-paraformaldéhyde (Merck) à 4 %. Elles sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de PBS puis perméabilisées 5 minutes dans du PBS triton X-100 1 %. Après trois rinçages au PBS-BSA 2 % (3 x 10 minutes), les cellules sont incubées avec 30 μ l d'anticorps primaire dilué 100 X (Table 2.2). Les cellules sont ensuite rincées 3 x 10 minutes au PBS-BSA 2 % et sont incubées, 1 heure à température ambiante et à l'obscurité (pour éviter l'excitation du fluorochrome), en présence de 30 μ l d'anticorps secondaire dilué 1000 x dans du PBS-BSA 2%. Elles sont ensuite rincées 2 fois au PBS-BSA 2 % et 1 fois au PBS. Le marquage des noyaux se fait alors par une incubation des cellules pendant 30 minutes en présence de Topro-3 dans une chambre humide et à l'obscurité. Le Topro-3 est une molécule intercalante qui devient, lorsqu'elle s'insère dans de l'ADN double brin, excitable à une longueur d'onde de 642 nm et émet à 661nm. Les cellules sont finalement rincées deux fois avec du PBS puis les lamelles couvre-objets sont montées sur lames (Memzel-Gloser) au Mowiol préchauffé à 60°C. L'observation des cellules s'effectue à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence (Leica, Allemagne).

2.4. Fractionnement cellulaire et préparation des lysats.

Dans le but de rechercher l'abondance de différents acteurs pro- et anti-apoptotiques dans différents compartiments cellulaires (noyaux, mitochondries et cytosol), un fractionnement par la technique de centrifugation différentielle suivi d'une extraction protéique sur les différentes fractions enrichies a été réalisé. Les extraits ont été utilisés pour réaliser des Western blots visant à rechercher l'abondance du cytochrome c, de Bax, Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 dans les différentes fractions. Mentionnons déjà qu'il s'agit de fractions subcellulaires enrichies mais non purifiées, ce qui engendre parfois des difficultés d'interprétation des résultats en raison de contaminations possibles.

2.4.1. Matériel utilisé :

- PBS : 150 mM NaCl, 10 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 ; pH 7,4
- Tampon sucrose/imidazole : 40 mM sucrose, imidazole 3 mM; pH 7,4
- Cocktail d'inhibiteurs de protéases 25 x concentré (PIC : « protease inhibitor cocktail », Roche # 1697498)
- Cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 25 x concentré (PIB : « phosphatase inhibitor buffer ») de composition : 25 mM Na_3VO_4 , 250 mM p-nitrophénylpyrophosphate, 250 mM β -glycérophosphate, et 125 mM NaF
- Solution Tris-ASB 14 : 10 mM Tris-HCl ; pH 8, 10 % ASB-14 (Sigma, A-1346)
- Solution Tris-Triton : 10 mM Tris-HCl ; pH 8, 2 % Triton X-100

2.4.2. Méthode

Toutes les étapes du fractionnement cellulaire s'effectuent à 4 °C et la préparation des échantillons a été réalisée à partir de 3 boîtes de culture de 75 cm² (Costar) confluentes pour les cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non en présence de staurosporine à 500 nM pendant 4 heures. Les milieux sont décantés et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS puis avec 10 ml de tampon sucrose /imidazole. Les cellules sont alors raclées dans 400 μl de sucrose/imidazole contenant 16 μl de PIC et 16 μl de PIB. Les suspensions cellulaires provenant de 3 boîtes sont alors regroupées et transférées dans un homogénéisateur de Dounce. Après 30 passages, la suspension est centrifugée à 1700 rpm à 4°C pendant 10 minutes.

- Le premier culot correspond à la fraction nucléaire (et aux cellules non homogénéisées) qui est resuspendue dans 1 ml de sucrose/imidazole et recentrifugée à 1700 rpm à 4 °C pendant 10 minutes. Le nouveau surnageant est éliminé et le culot est conservé (culot 1).
- Le surnageant de la fraction nucléaire est centrifugé à 12500 rpm à 4 °C pendant 2 minutes. Le nouveau surnageant est aliquoté et conservé à -20 °C (appelée dans ce document et par abus de langage, fraction cytosolique) alors que le culot est rincé dans 1 ml de sucrose/imidazole et recentrifugé à 12500 rpm à 4°C pendant 2 minutes. Le nouveau surnageant est éliminé et le culot, enrichi en mitochondries, est conservé (culot 2).

Le culot 1, contenant principalement les noyaux est resuspendu dans 70 μl de la solution Tris-ASB 14. Le culot 2, enrichi en mitochondries, est resuspendu dans 30 μl de la même solution. A partir de ce moment, les lysats sont maintenus à température ambiante puis soniqués 30 minutes (sans chauffer) et dilués 5 fois dans le tampon Tris-triton. Ils sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 10 minutes à température ambiante. Les surnageants sont aliquotés et conservés à -20 °C. Les surnageants correspondant aux culots 1 et 2 sont respectivement enrichis en protéines nucléaires et mitochondriales.

2.5. Dosage de protéines par la méthode de Bradford

Pour doser les protéines par la méthode de Bradford (Bradford, 1976), on ajoute 1 μl d'échantillon dilué 5 fois dans de l' H_2O à 1 ml de solution de colorant (Bio-rad Protein Assay 500-0006) et après 10 minutes d'incubation, on mesure l'absorbance à 595 nm au spectrophotomètre. Un blanc échantillon est réalisé à partir de 2 μl d'une solution Tris 10 mM ; pH 8 + 10 % ASB14 dilué 5 x dans une solution Tris 10 mM pH 8 + 2% triton X-100. Pour calculer la concentration protéique, un étalon de concentration connue est également dosé. Pour ce faire, 2,5 μl d'une solution BSA à 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ sont ajoutés à 1 ml de solution Bradford ; un blanc est également réalisé à partir de 2,5 μl d' H_2O et l'absorbance à 595 nm est lue 10 minutes plus tard. La concentration en protéines est alors calculée selon la formule :

$$\text{Conc échantillon } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{(\text{Abs éch}-\text{Abs blanc éch}) \times \text{Vol éch} \times \text{Conc étalon}}{(\text{Abs étalon}-\text{Abs blanc étalon}) \times \text{Vol éch}}$$

Avec , Abs : valeur d'absorbance ; éch : échantillon ; Vol : volume ; Conc : concentration

2.6. Western Blot

Le Western Blot est une technique semi-quantitative (dans la zone de linéarité d'exposition) permettant de séparer des protéines par électrophorèse dans un gel (ici SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) et, après transfert sur une membrane, de détecter l'abondance d'une protéine d'intérêt en utilisant un anticorps primaire spécifique et un système de révélation. Dans le cadre de notre travail, l'abondance de protéines intervenant dans l'apoptose a été recherchée sur des fractions cytosoliques et des fractions enrichies en mitochondries ou noyaux préparées à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine 500 nM pendant 4 heures (voir point 2.4).

2.6.1. Matériel et Tampons

- Acrylamide/Bisacrylamide (30/0,8) (Bio Rad 161-01-58)
- Ammonium persulfate (APS) (Amersham, 17-1311-01) 10 %
- TEMED (Amersham, 17-1312-01)
- Tampon du gel de concentration (pour 100 ml) : 5,1 g Tris ; 0,4 g SDS ; pH 6,8
- Gel de concentration (pour 24 ml) : 6 ml tampon de concentration + 4 ml Acrylamide/Bisacrylamide + 14 ml H_2O
- Tampon du gel de séparation (pour 200 ml) : 36,3 g Tris ; pH 8,9, 0,8 g SDS
- Gel de séparation : voir table 2.3
- Tampon d'électrophorèse 10 x (pour 1 l) : 63,2 g Tris ; 40 g glycine ; 10 g SDS
- Bleu de charge 5 x : 0,5M Tris-HCl ; pH 6,8, 20 % SDS ; 20 % glycérol ; 1 % bleu de bromophénol, 20 % β -mercaptoéthanol
- Tampon de transfert (pour 5 l) : 24 g Tris ; 115 g glycine ; 1 l méthanol
- TBS (Tris Buffer Saline) 10 x (pour 1 l) : 24,22 g Tris ; pH 7,6, 80,06 g NaCl

Gel mix	15 %	12 %
Gel buffer	60 ml	60 ml
Acryl/Bis (30%)	125 ml	100 ml
H ₂ O	65 ml	90 ml

Table 2.3. : Composition des « gels mix » utilisés dans la préparation des « running » gels 12 et 15% en acrylamide utilisés pour les Western blots. La table reprend les quantités de réactifs nécessaires à la préparation de 250 ml de « gel mix ».

- ECL blocking Agent (Amersham, RPN 2135)
- Solution de révélation : ECL Western Blot detection Kit (Amersham, RPN 2135)

2.6.2. Méthode

2.6.2.1. Préparations des Gels

Des gels d'acrylamide à 12 et 15 % ont été réalisés de manière à pouvoir analyser l'abondance de protéines de poids moléculaires variés. La composition de ces gels est reprise dans la table 2.3. Le gel de séparation est préparé (35 ml de « running gel mix », 175 μ l d'APS 10% et 10,5 μ l de TEMED) puis coulé entre les plaques de montage et polymérise pendant 45 min à température ambiante. Pendant ce temps, le gel aura été couvert par 1 ml d'isobutanol afin que la polymérisation s'effectue à l'abri de l'oxygène. L'isobutanol est ensuite enlevé et le dessus du gel est rincé abondamment à l'eau distillée. Le gel de concentration est alors préparé (10 ml de « stacking gel mix », 50 μ l d'APS 10 % et 3 μ l de TEMED), puis coulé jusqu'au-dessus des plaques et le peigne est introduit. La polymérisation dure environ 15 minutes. Pendant ce temps les échantillons sont préparés.

2.6.2.2. Migration des échantillons

Le gel est monté dans une cuve d'électrophorèse, le peigne est enlevé et la cuve est remplie avec du tampon d'électrophorèse. Les échantillons sont alors chargés ainsi qu'un étalon marqueur de poids moléculaire (12 μ l d'étalon See Blue, Invitrogen LC 5925). On charge un volume de 50 μ l dans chaque puits. Ces 50 μ l contiennent 30 μ g de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosoliques ou 15 μ g de protéines pour les fractions nucléaires ; 10 μ l de bleu de charge 5 x, le volume étant ajusté par du tampon dilué 4 fois. Avant la charge, les échantillons auront été dénaturés par un passage de 3 minutes à 100 °C. La migration des échantillons se fait d'abord à un ampérage de 35 mA pendant 45 min dans le gel de concentration puis à 45 mA pendant 5 heures dans le gel de séparation.

2.6.2.3. Transfert des échantillons sur une membrane de PVDF

A la fin de l'étape de migration, le gel est démoulé et les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride, Amersham) préalablement réhydratée pendant une minute dans du méthanol 100 % puis 5 minutes dans du tampon de transfert. Le gel est alors déposé sur la membrane de PVDF et un montage en « Sandwich » est réalisé avec des papiers Whatman et des éponges imbibées de tampon de transfert avant d'être placé dans une cuve permettant un électrotransfert de type « semi-dry ». Le transfert s'effectue soit 2 heures à 150 mA soit pendant 16 heures à 30 mA. La membrane est alors bloquée pendant deux heures dans du TBS-Tween 0,1 % contenant 2 % d'agent bloquant ECL (Amersham UK) ou dans du TBS-Tween 0,1 % contenant 2% de lait gloria (Nestlé) et ce, en fonction de l'anticorps utilisé (voir table 2.4).

2.6.2.4. Incubation de la membrane avec les anticorps primaires

protéine cible	firme	numéro de référence	espèce	incubation	température	dilution	agent bloquant
Bcl-XL	Sigma	B 9429	souris	16 heures	4°C	1000 x	gloria
Bcl-2	Sigma	B3170	souris	1 heure	ambiante	1000 x	gloria
Mcl-1	Santa Cruz	sc-819	lapin	1 heure	ambiante	1000 x	gloria
Bax	Upstate	06-499	lapin	16 heures	4°C	500 x	gloria
Cytochrome c	Santa Cruz	sc-7159	lapin	16 heures	4°C	2000 x	gloria
caspase-3 active	Pharmingen	556425	lapin	16 heures	4°C	5000 x	ECL
PARP	Pharmingen	556493	souris	16 heures	4°C	1000 x	gloria
TBP	Santa Cruz	SC-204	lapin	16 heures	4°C	5000 x	gloria
TOM 20	BD transduction laboratories	612278	souris	16 heures	4°C	20 000 x	ECL
tubuline	Sigma	T5168	souris	16 heures	4°C	30 000 x	gloria

Table 2.4. : Anticorps primaires utilisés pour la détection de protéines d'intérêt par la méthode du Western Blot. Dans la colonne de droite est repris pour chaque anticorps, l'agent bloquant dans lequel il est dilué. gloria : TBS-Tween 0,1% + 2% gloria. ECL : TBS-Tween + 2 % ECL advanced Blocking Agent (Amersham UK).

Les anticorps passés sur les membranes sont incubés pendant 2 heures à température ambiante ou pendant 16 h à 4 °C. Les différents anticorps et les dilutions utilisés sont repris dans la table 2.4. Notons que les anticorps sont dilués dans du TBS-Tween 0,1% contenant 2 % d'agent bloquant ECL (Amersham UK) ou dans du TBS-Tween 0,1 % contenant 2% de lait gloria. Après incubation, la membrane est rincée 3 x 15 minutes avec du TBS-tween 0,1 %.

2.6.2.5. Incubation de la membrane avec les anticorps secondaires

Des anticorps secondaires anti-IgG de souris (Amersham, NA 931 V) ou anti-IgG de lapin (Amersham, NA 934 V) couplés à la Horse Raddish Peroxidase (HRP) sont alors utilisés en fonction de l'anticorps primaire. Ils sont dilués 150000 fois dans le TBS-Tween 0,1 % contenant 2 % d'agent bloquant (ECL ou lait Gloria). L'incubation avec l'anticorps secondaire est réalisée pendant 45 minutes puis la membrane est rincée 3 x 15 minutes dans du TBS-Tween 0,1 %.

2.6.2.6. Révélation

La méthode de chémiluminescence a été utilisée pour détecter la présence des protéines. La membrane est placée 5 minutes au contact d'une solution de révélation ECL (Enhanced ChemiLuminescence) provenant d'un kit de révélation (Advanced Western Blot Detection Kit, Amersham) et contenant le substrat de la peroxydase et du luminol. La révélation s'effectue en chambre noire par impression d'un film sensible (Amersham Hyperfilms ECL). Le temps d'exposition est fonction de l'anticorps utilisé et le film est passé successivement dans une solution de révélation (Ilford), dans de l' H_2O et dans une solution de fixation (Ilford). Il est enfin rincé à l'eau, séché et scanné. La membrane peut subir plusieurs hybridations avec des anticorps différents après une nouvelle incubation dans du TBS-Tween 0,1 % contenant 2 % d'agent bloquant. Elle peut également être congelée à -20 °C.

2.7. Visualisation et dosage de la fragmentation de l'ADN induit par la staurosporine

Un des moyens d'évaluer la mort cellulaire par apoptose est de mesurer la fragmentation de l'ADN génomique, un marqueur tardif de la réponse apoptotique. En effet, lors du processus apoptotique, l'ADN est découpé en fragments de taille correspondant à des multiples de 180 pb, tailles séparant deux nucléosomes. Dans le cadre du travail, nous avons d'abord essayé de visualiser ce phénomène en suivant une méthode d'extraction d'ADN suivie d'une séparation des fragments sur gel d'agarose puis nous avons utilisé un kit de dosage basé sur la technique ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

2.7.1. Extraction d'ADN et visualisation sur gel d'agarose.

2.7.1.1. Matériel

- PBS : 150 mM NaCl, 10 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 ; pH 7,4
- Tampon de lyse : 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl ; pH 8, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS, 0,1 ng/ml de protéinase K et 1mM CaCl_2 .
- Acétate d'ammonium 2M.
- Ethanol 100 % et 70 %.
- Tampon TE : 1 mM Tris; pH 8,0, 1mM EDTA

2.7.1.2. Méthode

L'extraction s'effectue à partir de cellules cybrides sauvages confluentes ensemencées dans des boîtes de culture (Costar) de 25 cm². Avant extraction, les cellules auront été ou non (cellules contrôles) incubées en présence de staurosporine (= inducteur de l'apoptose) à des concentrations de 100, 500 et 1000 nM pendant 16 h. La méthode d'extraction utilisée est tirée du chapitre intitulé « Preparation of Genomic DNA from Mammalian Tissue » de l'ouvrage suivant : « Current Protocols In Molecular Biology ».

Le principe est le suivant : au terme des incubations, le milieu conditionné est récupéré, et les cellules adhérentes sont d'abord trypsinisées et ajoutées au milieu prélevé, puis récupérées par une centrifugation de 5 minutes à 500 x g et resuspendues dans 1 ml de PBS puis recentrifugées. Les culots sont resuspendus dans 0,3 ml de tampon de lyse, et placés pendant 2 heures à 50 °C puis sous agitation à 37 °C pendant 16 h. A chaque lysat, on ajoute alors un volume équivalent de phénol avant de les centrifugés à 2000 rpm pendant 10 minutes. La phase supérieure contenant l'ADN génomique est récupérée puis recentrifugée à 2000 rpm pendant 10 minutes, et les surnageants sont prélevés. On ajoute alors un demi volume d'acétate d'ammonium (130 μl) et 2 volumes d'éthanol 100 % dans le but de précipiter l'ADN génomique qui est conservé à -20 °C pendant 2 heures. L'ADN génomique est sédimenté par une centrifugation de 2 minutes à 2000 rpm, puis rincé avec de l'éthanol à 70 %. Après une dernière centrifugation, l'éthanol est décanté et les culots d'ADN génomique sont séchés à l'air libre avant d'être resuspendus dans 40 μl de tampon TE et incubés 2 heures à 65°C avant d'être stockés à 4 °C. La quantification de l'ADN se fait par une mesure de l'absorbance à 260 nm. Un volume équivalent à 10 μg d'ADN est chargé dans un gel d'agarose 1,2 % en présence de bromure d'éthidium (0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) et soumis à une électrophorèse (100 VOLTS durant une heure). Le gel est ensuite placé sur un transilluminateur UV afin de visualiser l'ADN et de photographier le résultat de migration.

2.7.2. Dosage de la fragmentation de l'ADN par un kit ELISA

Le dosage de la fragmentation de l'ADN génomique a été effectué à partir de cellules cybrides sauvages et mutées incubées ou non en présence de staurosporine à 100 nM pendant 16 h à l'aide du kit : « Cell Death Detection ELISA » commercialisé par la firme ROCHE (#1 544 675). Dans certaines conditions, l'incubation des cellules en présence de staurosporine a été réalisée en présence de cyclosporine A (100 nM), d'acide bongkrélique (10 μM) ou de zVAD-fmk (5 μM).

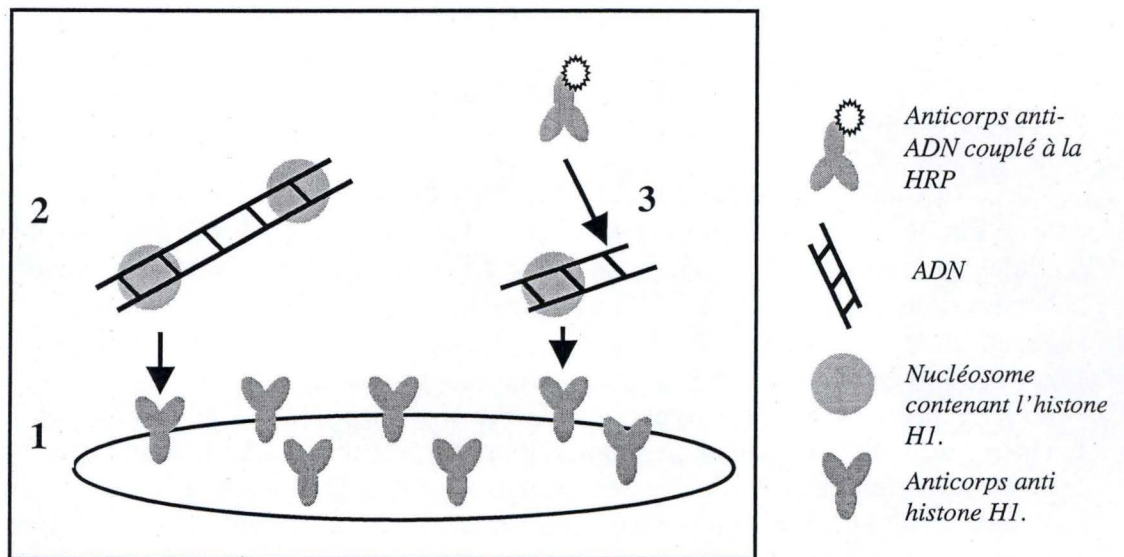


Figure 2.2.: Principe du kit ELISA permettant le dosage de la fragmentation de l'ADN. 1) Dans le fond d'une plaque 96 puits sont fixés des anticorps anti-Histone H1. 2) Lors du processus apoptotique, l'ADN est fragmenté entre les nucléosomes. L'Histone H1 est reconnue par les anticorps et l'ADN fragmenté reste fixé dans les puits. 3) la révélation se fait grâce à un second anticorps dirigé contre l'ADN et couplé à la HRP.

Principe du dosage : il s'agit d'un kit de dosage en colorimétrie de type ELISA dont le principe est présenté à la figure 2.2. Les puits d'une plaque 96 puits sont recouverts d'anticorps anti-histone H1, de manière à capturer les nucléosomes contenus dans les fragments d'ADN générés au cours du processus d'apoptose. La présence de ces fragments est ensuite révélée grâce à des anticorps anti-ADN couplés à une peroxydase. Après plusieurs rinçages pour éliminer l'excès d'anticorps, le dosage de l'activité peroxydase immobilisée dans les complexes immuns est réalisé en présence du substrat ABTS (2,2'-azino-di-3-ethylbenzthizoline sulfonate). Après incubation, le produit de la réaction colorimétrique est dosé à 405 nm au spectrophotomètre.

Pratiquement, les cellules cybrides sauvages et mutées sontensemencées à raison de 50000 cellules par puits dans une plaque 24 puits (Costar). Le lendemain, elles sont incubées 16 heures avec les différentes molécules activatrices/inhibitrices. Après avoir récupéré les cellules en suspension par centrifugation, une lyse est effectuée dans 250 μ l d'un tampon de lyse fourni dans le kit. Les lysats sont centrifugés 7 minutes à 13000 rpm de manière à sédimenter l'ADN non fragmenté. Les surnageants sont alors récoltés et 100 μ l sont incubés pendant 90 min à température ambiante dans les puits tapissés d'anticorps anti-H1. Après 3 rinçages avec un tampon de lavage, un anticorps dirigé contre l'ADN et couplé à une peroxydase est ajouté dans les puits et incubé pendant 90 min. Après 3 rinçages, le substrat de la peroxydase ABTS est ajouté. La réaction permet l'accumulation d'un produit chromogène et la densité optique est mesurée à 405 nm à différents temps. La densité optique mesurée est proportionnelle au nombre de fragments d'ADN générés au cours de la réaction apoptotique. Le tampon de lyse utilisé interférant avec le dosage des protéines, et afin de normaliser les résultats, un dosage de protéines est effectué en parallèle sur des puits « frères » contenant des cellulesensemencées à la même densité et ayant subi les mêmes traitements. Le dosage de protéines par la méthode de Bradford (voir point 2.5) est effectué à partir de lysats cellulaires obtenus avec un tampon de lyse de composition : 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 100 mM Tris ; pH 7,4, 1% Triton X-100. Les valeurs d'absorbance obtenues pour le dosage de la fragmentation d'ADN sont alors rapportées à la quantité de protéines mesurée dans ces conditions. Les résultats seront donc exprimés en unité de D.O. (densité optique) à 405 nm par μ g de protéines.

2.8. Dosage de l'activité de la caspase-3.

La caspase-3, caspase effectrice de la réponse apoptotique dans de nombreux modèles cellulaires, joue un rôle capital dans l'aboutissement de l'apoptose et plus particulièrement dans la fragmentation de l'ADN. Le dosage de son activité est donc un bon moyen de quantifier l'importance de la réponse apoptotique. Le dosage de l'activité de cette protéase a été adapté d'après Wellington et al. (JBC 1998) et Lozana et al. (JBC 2001). Le principe est simple. Des lysats de cellules cybrides sauvages et mutées préalablement incubées en présence de staurosporine à 500 nM pendant 4 heures sont mis en présence d'un substrat fluorescent de l'enzyme (Ac-DEVD-AFC). Le motif DEVD étant reconnu et clivé par la caspase-3. Le groupement 7 amino-4-trifluorométhyl coumarine (AFC) libéré est fluorescent. La mesure de la fluorescence libérée reflète donc l'activité de la caspase-3.

2.8.1. Réactifs :

- PBS : 150 mM NaCl, 10 mM KH_2PO_4 / K_2HPO_4 ; pH 7,4
- Tampon de lyse : 10 mM HEPES/KOH ; pH 7,0 ; 10 % sucrose ; 2 mM EDTA ; 0,1% CHAPS ; 5 mM DTT et 10 $\mu\text{g/ml}$ aprotinine
- Tampon de réaction : 40 mM PIPES ; pH 7,2 ; 200 mM NaCl ; 2 mM EDTA ; 0,2 % CHAPS ; 0,10 % Sucrose ; 10 mM DTT
- Substrat Ac-DEVD-AFC (BD Pharmingen) à une concentration stock de 1,37 mM dans du DMSO.

2.8.2. Lyse cellulaire

Les cellules confluentes repiquées dans des boîtes de culture (Costar) de 25 cm² sont traitées ou non avec des molécules modulatrices durant 4 heures (staurosporine 500 nM +/- ionomycine 1 μM ou BAPTA 20 μM). Après avoir récupéré les milieux, les cellules sont alors rincées avec 5 ml de PBS. Le PBS et les milieux conditionnés sont centrifugés à 1000 rpm pendant 10 minutes dans le but de récupérer les cellules détachées du support. Les cellules adhérentes sont raclées dans 500 μl de PBS et récupérées en microtubes. Les culots cellulaires obtenus par la centrifugation du PBS et du milieu sont resuspendus dans 200 μl de PBS et ajoutés dans les microtubes correspondant. Les cellules sont alors centrifugées à 1000 rpm pendant 10 minutes et lysées avec 100 μl de tampon de lyse pendant 30 minutes. Les lysats sont ensuite centrifugés à 1000 g pendant 10 minutes à 4°C et les surnageants sont alors recentrifugés 10 minutes à 10000 g et à 4°C. Les échantillons sont congelés à -20°C et un dosage des protéines est effectué sur les échantillons par la méthode de Bradford.

2.8.3. Dosage

Dans un microtube, on ajoute 50 μl de tampon de réaction, puis un volume d'échantillon correspondant à 5-20 μg de protéines et enfin 1 μl du substrat Ac-DEVD-AFC (concentration finale : 13,7 μM). Les échantillons sont alors incubés pendant 60 minutes à 37 °C puis la fluorescence est mesurée à au spectrofluorimètre (Ex : 400 nm et Em : 505 nm). Les blancs utilisés sont les suivants :

- blanc enzyme (BE) : tampon de réaction + 1 μl de DMSO + échantillon
- blanc substrat (BS) : tampon de réaction + 1 μl de substrat + tampon de lyse en lieu et place de l'échantillon
- blanc blanc (BB) : tampon de réaction + tampon de lyse

Calcul de la valeur de fluorescence : (TEST - BE) - (BS-BB). Les valeurs sont ensuite normalisées par les quantités de protéines et exprimées en unités arbitraires de fluorescence/ μg de protéines.

3. Résultats et discussion

Gènes	Abondance relative des transcrits: cybrides mutées/sauvages
ADPRT	-2,27
BAD	1,13
BAX	-1,37
BCL2	-
BCLXL	-1,96
BID	-1,75
CASP2	ND
CASP3	-
CASP7	-2,27
CASP8	-2,44
CASP9	-2,13
C-myc	-3,70
JNK1	-
JNK2	-1,82
JNK3	ND
MAX	-2,94
MEK1	-1,69
MEK2	-1,32
p53	-1,10
SMAD4	-2,5

Figure 3.1.: Résultats de l'expression de gènes codant des protéines pro- ou anti-apoptotiques dans les cellules cybrides mutées obtenues suite à l'hybridation d'ADNc sur le damier « Human General Chip ». Les gènes repris dans la colonne gauche sont des gènes intervenant positivement ou négativement dans le processus apoptotique. Les valeurs dans la colonne de droite représentent le niveau d'abondance relative des transcrits des gènes correspondant dans les cellules cybrides mutées par rapport aux cellules cybrides sauvages. Les valeurs se trouvant dans une case grise représentent une variation quantitative et significative de l'expression génique. Le sigle - représente une diminution qualitative et significative de l'expression. ND: valeur non détectée.

3. Résultats et discussions

3.1. Expression différentielle de gènes dans les cellules cybrides mutées

Dans le but d'analyser l'expression différentielle de gènes dans les cellules cybrides présentant un dysfonctionnement mitochondrial induit par la mutation A8334G, une extraction d'ARN total a été effectuée à partir de cellules cybrides sauvages (cellules 143B rho⁰ repeuplées avec des mitochondries de sujets sains) et de cellules cybrides mutées (cellules 143B rho⁰ repeuplées avec des mitochondries portant la mutation A8344G à l'état hétéroplasmique). Suite à une rétrotranscription des ARNm, les ADNc ont été hybridés sur un damier à faible densité contenant 202 sondes de captures permettant l'analyse de gènes regroupés en différentes catégories sur base de leur(s) fonction(s) décrites dans la littérature (apoptose, cycle cellulaire, métabolisme,... voir la liste des gènes analysables et le « design » du damier en annexes I et II). Cela nous a permis d'étudier l'expression différentielle de gènes dans les cellules cybrides mutées. Les résultats reprenant le niveau d'expression de chacun des gènes analysables par le damier sont repris en annexe III. Notons que les quantifications d'expression de gènes sont obtenues au niveau transcriptomique et qu'une seule hybridation a été effectuée. Ces résultats sont donc indicatifs et doivent être interprétés avec précaution. Pour les rendre plus fiables et vérifier leur reproductibilité, il serait nécessaire d'effectuer au minimum 3 hybridations à partir d'extraits biologiques différents et de confirmer ces différences par la technique de real-time PCR. De plus, la relevance biologique de ces changements devrait être testée en recherchant le niveau d'expression et/ou d'activité au niveau protéique. Néanmoins, cette expérience nous donne une première indication sur le niveau d'expression de ces gènes dans les cellules cybrides mutées par rapport aux cellules cybrides sauvages et permet donc d'identifier des gènes dont l'expression pourrait être modifiée en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la variation d'expression de quelques gènes codant pour des effecteurs et des régulateurs impliqués dans la réponse apoptotique (figure 3.1). Mis à part *Bad*, *Bax*, *MEK2* et *p53* qui présentent un niveau d'expression inchangé, les autres gènes analysés semblent être sous-exprimés de 1,7 (*Bid*) à 3,7 x (*c-myc*) dans les cellules cybrides mutées. Notons que les transcrits des gènes codant la JNK3 et la caspase-2 sont non détectés, car probablement très peu abondants. Les gènes codant pour Bcl-2, JNK1 et la caspase-3 sont également sous-exprimés mais analysables seulement de manière qualitative.

Sur le damier sont reprises des sondes de capture pour des gènes de la famille Bcl-2. Les membres pro-apoptotiques de cette famille, *Bax* et *Bad* ne semblent pas présenter de variations d'expression dans les cellules cybrides mutées. Par contre, les gènes *Bcl-X_L* et *Bcl-2*, codant pour des protéines anti-apoptotiques sont moins exprimés dans cette lignée cellulaire, ainsi que le gène *Bid*, codant un membre de la sous-famille BH3-only. Notons que le gène le plus sous-exprimé est *Bcl-X_L* (-1,97). L'analyse de l'expression du gène *Bcl-2* ne donnant qu'une valeur qualitative, la quantification de l'expression de ce gène devrait être déterminée par d'autres hybridations ou en real-time PCR.

Rappelons que les facteurs pro-apoptotiques comme *Bax*, *Bad* et *Bid* facilitent la libération du cytochrome c mitochondrial dans le cytosol, tandis que *Bcl-2* et *Bcl-X_L* inhibent cette libération (Adams, 2003; Adams et al., 1998; Zimmermann et al., 2001). La nature et la

fonction de ces protéines ont été détaillées dans l'introduction (voir point 1.5.4. La voie intrinsèque).

La régulation de l'expression des gènes de la famille Bcl-2 semble complexe et encore peu étudiée. Ainsi, lors d'un stimulus apoptotique comme des dommages à l'ADN, l'expression de gènes codant pour les facteurs pro-apoptotiques de cette famille comme *Bax* est augmentée, suite à l'activation du facteur de transcription p53 (Haupt et al., 2003). De plus, une surexpression des gènes codant pour les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L dans des cellule musculaires lisses peut leur conférer une résistance à l'apoptose (Li et al., 2005). Cependant, l'abondance des transcrits ne reflète pas toujours l'abondance de la protéine. En effet, une étude a montré récemment que l'abondance du transcrit de Bcl-2, analysée par hybridation *in situ* dans des tumeurs hépatiques, n'était pas corrélée à l'abondance de la protéine correspondante (Ravazoula et al., 2002). Notons enfin que les mécanismes principaux permettant la régulation de l'abondance et de la fonction des protéines de la famille Bcl-2 passent par des modifications post-traductionnelles comme le clivage protéolytique, la dégradation par le protéasome, les phosphorylations, et surtout des modifications de localisation (Gross et al., 1999). Les variations d'abondance des transcrits codant pour les protéines de la famille Bcl-2 dans les cellules cybrides mutées par rapport aux cellules cybrides sauvages ne donnent donc pas d'information sur l'action de ces protéines dans les cellules.

Nous avons également vu que les caspases ont un rôle essentiel dans la réponse apoptotique. Rappelons que les caspases-2, -8 et -9 initiatrices agissent en amont des caspases-3 et -7, effectrices (voir introduction, point 1.5.1). Dans les cellules cybrides mutées, tous les gènes codant pour les caspases et pour lesquels nous obtenons une détection sont sous-exprimés. L'analyse de la variation d'expression du gène codant pour la *caspase-3* est qualitative, mais pour les autres caspases, le facteur de sous-expression est supérieur à 2.

Les résultats de quantification de l'abondance relative des transcrits pour les Jun N-terminal Kinase (JNK)-1, -2 et -3 sont également présentés à la figure 3.1. Seule l'abondance du transcrit de la JNK-1 est analysable de manière quantitative. Ce gène est sous-exprimé 1,82 fois dans les cellules cybrides mutées. L'expression du gène *JNK-3* n'est pas détectée, et l'expression du gène de la *JNK-1* donne une valeur qualitative. Les kinases codées par ces gènes appartiennent à la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) de stress et sont impliquées dans l'apoptose médiée par le TNF α (Papa et al., 2004). Elles joueraient un rôle pro-apoptotique en induisant indirectement le clivage (indépendant de la caspase-8) de la protéine Bid en une forme tronquée (jBid) distincte de tBid qui transloque dans la membrane mitochondriale externe et permet la libération de Smac/Diablo mais pas du cytochrome c. Le rôle pro-apoptotique de l'activation de la JNK dans la réponse induite par le TNF α passerait donc par une levée de l'inhibition exercée par TRAF2-cIAP1 sur l'activation de la caspase-8 (Deng et al., 2003; Papa et al., 2004) (voir introduction point 1.5.5).

L'expression du gène codant pour la sérine/thréonine kinase MEK1 est significativement plus faible dans les cellules cybrides mutées, ce qui n'est pas le cas du gène *MEK2* dont l'expression est comparable dans les 2 lignées. Les kinases codées par ces gènes appartiennent également à la famille des MAP kinases et sont impliquées dans l'activation de NF-kappaB, facteur de transcription impliqué dans la survie cellulaire. De plus, les MEK permettent également la surexpression de Bcl-2, protéine anti-apoptotique (Hagemann et al., 2001; Kurland et al., 2003). Il est donc intéressant de constater que la diminution d'abondance du transcrit *MEK1* est corrélée à la diminution de l'abondance du transcrit du gène *Bcl-2*.

Le facteur de transcription c-Myc forme, en s'associant avec son partenaire protéique Max, un hétérodimère qui joue un rôle dans la croissance et la prolifération cellulaire, dans la différenciation mais possède également, lorsqu'il est surexprimé, un rôle pro-apoptotique (voir introduction point 1.5.7). Les gènes codant pour c-Myc et Max sont sous-exprimés dans

les cellules cybrides mutées de respectivement 3,7 et 2,94 fois. Ce sont les gènes dont la variation d'expression est la plus importante entre les deux lignées cellulaires.

S'il est décrit que la surexpression des ces facteurs dans les cellules engendre une susceptibilité accrue à l'apoptose lors de la privation de sérum ou le traitement par des molécules qui induisent des dommages à l'ADN, les mécanismes par lesquels c-myc sensibilise les cellules à l'apoptose ne sont pas clairement identifiés. Ils pourraient impliquer une chute du potentiel de membrane mitochondrial, la libération du cytochrome c et d'AIF et pourraient faire intervenir des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, ainsi que NFkappaB ou encore passer par une modification de l'expression de protéines mitochondriales constitutives du PTP (Iaccarino et al., 2003; Juin et al., 2002; Klefstrom et al., 2002; You et al., 2002).

L'abondance du transcrite de *p53* est comparable dans les cellules cybrides sauvages et mutées. *p53* forme un facteur de transcription tétramérique activé par les dommages à l'ADN et qui permet l'arrêt du cycle cellulaire par l'expression de p21/Waf1, un inhibiteur des cdk (cyclin-dépendent kinases). Si les dommages à l'ADN sont irréversibles, *p53* entraîne la mort cellulaire par apoptose en induisant notamment l'expression de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax, Puma et Noxa (Haupt et al., 2003). Le gène *Smad4* est également sous-exprimé (2,5x) dans les cellules cybrides mutées. La protéine *Smad4* intervient dans l'apoptose induite par le TGF-beta suite à l'activation de récepteurs membranaires et ce, coopérativement avec l'activation de *Smad2* et *3*. Le trimère formé possède alors une fonction transactivatrice.

Enfin, l'ADP-RibosylTransférase (ADPRT), plus connue sous le nom de Poly-ADP-ribose polymérase-1 (PARP-1) est un substrat de la caspase-3 active. Elle intervient dans les mécanismes de réparation de l'ADN. Le gène codant pour cette protéine est sous-exprimé plus de deux fois dans les cellules porteuses de la mutation MERRF (A8344G).

En conclusion, l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines à actions pro- ou anti-apoptotiques analysée par le microarray « Human General Chip » semble diminuer dans les cellules cybrides mutées. Néanmoins, le niveau d'expression des gènes n'est ici qu'indicatif et devrait être confirmé par des hybridations supplémentaires et/ou par PCR en temps réel (Real-Time Polymerase Chain Reaction). De plus, l'abondance d'un transcrite n'est pas toujours corrélée à l'abondance de la protéine (Ravazoula et al., 2002) et ne donne aucune information ni sur l'activité ni sur la localisation de la protéine correspondante.

Plutôt que de tenter de confirmer ces résultats au niveau transcriptomique, nous avons préféré des études plus fonctionnelles permettant d'étudier la sensibilité des cellules cybrides sauvages et mutées à l'apoptose induite par la staurosporine. Cette molécule est un inhibiteur à large spectre de nombreuses kinases qui induit l'apoptose dans de nombreux types de cellules transformées. Parmi les mécanismes d'action principaux décrits pour conduire la cellule à l'apoptose, en réponse à une incubation en présence de cette molécule, rappelons une inhibition des PKCs, une augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre et une élévation de la production de ROS au niveau de la chaîne de transporteurs d'électrons mitochondriale (voir introduction, point 1.5.8., figure 1.28). Les résultats obtenus par l'hybridation sur le damier « Human General Chip » montrent que l'expression de gènes pro- et anti-apoptotiques varie dans les lignées cellulaires étudiées mais ne renseignent en rien sur la réponse de ces cellules à un stimulus pro-apoptotique comme la staurosporine. Des données controversées et contradictoires existent dans la littérature sur la sensibilité de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial à l'apoptose. En effet, certaines cellules rho⁰ semblent plus résistantes à l'apoptose (Sandra Morais Cardoso et Al., 2001) alors que d'autres cellules cybrides mutées portant les mutations MELAS, MERRF ou une délétion de 4,977 pb dans l'ADN mitochondrial ont été décrites comme étant plus sensibles que les cellules cybrides sauvages aux effets d'un stimulus pro-apoptotique (Liu et al., 2004). Nous avons

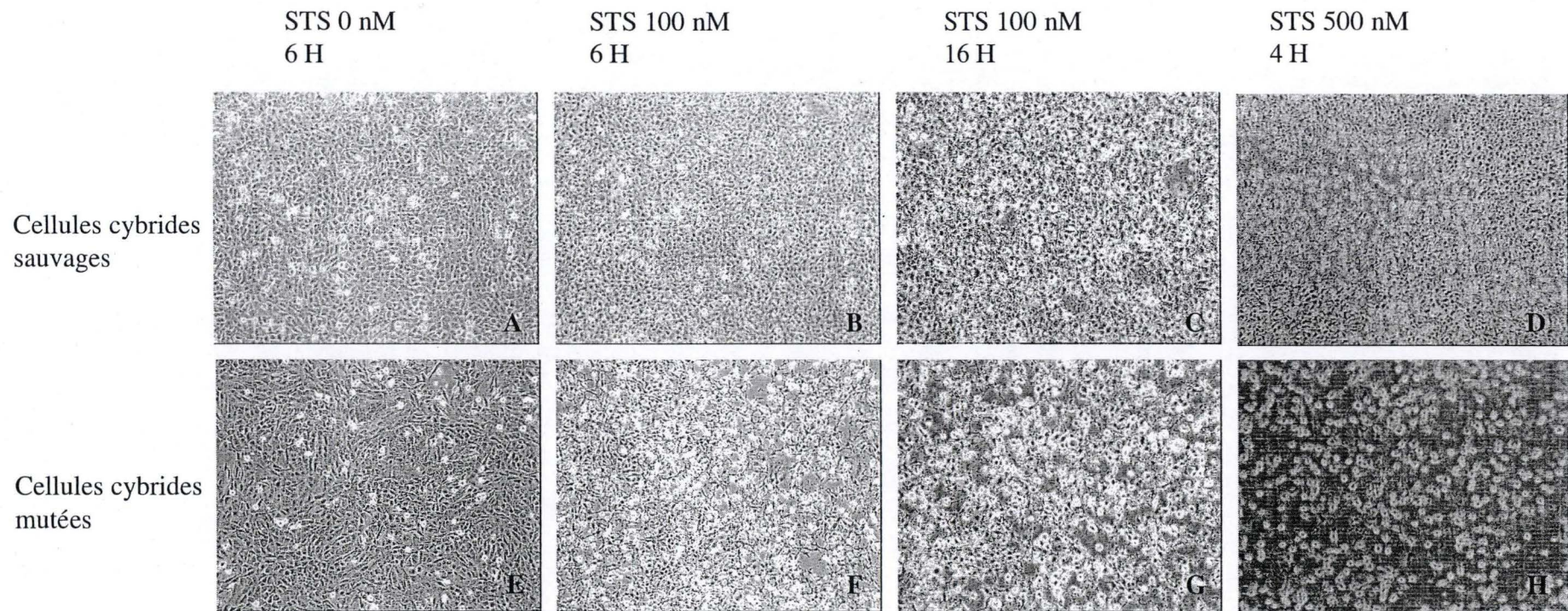


Figure 3.2. Micrographies prises au microscope à contraste de phase illustrant l'évolution de la morphologie de cellules cybrides sauvages et mutées. Les cellules ont été incubées ou non (A et E) avec de la staurosporine à 100 nM pendant 6 ou 16 heures (B, C, F et G) ou avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 heures (D et H).

donc tenté, dans la suite de ce travail, de comparer la réponse apoptotique induite par la staurosporine dans les 2 lignées cellulaires.

3.2. Effet de la staurosporine sur la morphologie des cellules cybrides sauvages et mutées

La réponse apoptotique est caractérisée par un changement de la morphologie des cellules résultant, par exemple, de la condensation du cytosol suite à la désorganisation du cytosquelette (Dynlacht et al., 2000) et à la fragmentation du noyau (Veselska et al., 2003). Ces modifications conduisent à un arrondissement des cellules et, *in fine*, à la formation de corps apoptotiques, ou vésicules membranaires contenant les débris cellulaires résultant de l'activation des caspases. Lors de la mise au point de notre modèle cellulaire d'apoptose, les cellules cybrides sauvages et mutées ont été incubées avec de la staurosporine dans le but de rechercher les concentrations et les temps d'incubation nécessaires pour observer les modifications morphologiques décrites ci-dessus.

Concrètement, les cellulesensemencées dans des boîtes de 75 cm² ont été incubées avec de la staurosporine à 100 nM pendant 6 et 16 heures ou à 500 nM pendant 4 heures, puis des micrographies ont été prises au microscope à contraste de phase (figure 3.2). Morphologiquement, les cellules cybrides sauvages traitées à la staurosporine 100 nM durant 6 heures, ne présentent pas ou peu de différences avec les cellules contrôles non traitées. Par contre, dans les mêmes conditions, les cellules mutées commencent à se rétracter. Une incubation de 16 heures en présence de staurosporine, à la même concentration, accentue encore cet effet (« shrinkage »). A ce temps, on visualise également une rétraction des cellules sauvages, bien que l'effet soit moins marqué que pour les cellules cybrides mutées. Les cellules plus réfringentes présentes sur les micrographies sont des cellules sur le point de se détacher de leur support. Enfin, lorsque les cellules sont incubées en présence de staurosporine à 500 nM pendant 4 heures, les effets différentiels sont encore plus marqués. En effet, la majorité des cellules cybrides mutées sont arrondies alors les cellules cybrides sauvages semblent mieux résister au traitement.

Nous pouvons donc conclure que le temps d'incubation et la concentration en staurosporine sont deux paramètres influençant l'effet de cette molécule sur la morphologie cellulaire et ce, dans les deux lignées cellulaires. De manière très intéressante, l'effet de la staurosporine sur la morphologie cellulaire semble plus marqué pour les cellules cybrides mutées, et ce quel que soit le temps d'incubation et la concentration considérés. Les cellules cybrides sauvages pourraient donc mieux résister à la staurosporine que les cellules cybrides mutées. Néanmoins, ces observations n'apportent que peu d'informations sur le type de mortalité cellulaire (apoptose ou nécrose) et ne permettent qu'une évaluation subjective des effets provoqués par la staurosporine. Nous avons donc tenté de visualiser et de mesurer la fragmentation de l'ADN, une étape tardive et caractéristique d'une réponse apoptotique.

3.3. Analyse de la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans les cellules 143 B.

Assez tardivement dans le processus apoptotique, l'ADN génomique est fragmenté entre les nucléosomes, les protéines histones restant fixées à l'ADN. Néanmoins, la nucléase

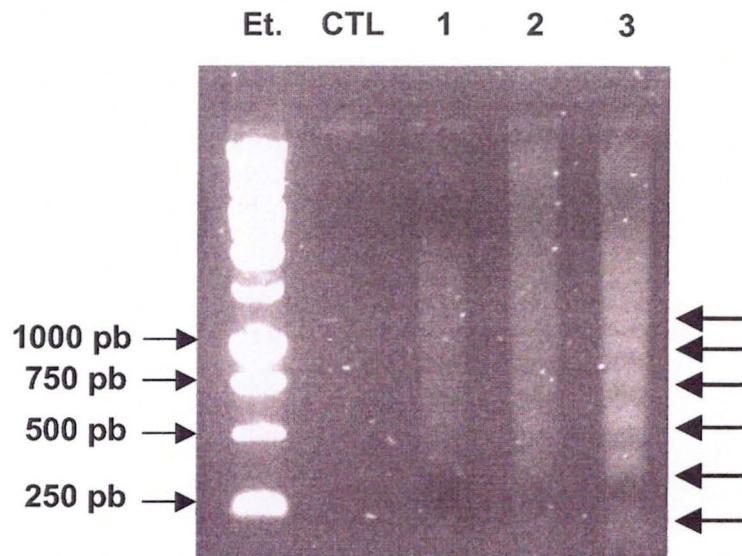


Figure 3.3: Détection de la fragmentation de l'ADN sur gel d'agarose à partir d'ADN génomique extrait de cellules 143B incubées en présence de staurosporine. Des cellules 143B sont incubées ou non (CTL) pendant 16 h en présence de staurosporine à 100 nM (1), 500 nM (2) ou 1 μ M (3). Au terme des incubations, l'ADN génomique est extrait et soumis à une migration électrophorétique dans un gel d'agarose 1,2 % en présence de bromure d'éthidium. Un étalon (Et.) composé de fragments d'ADN de poids moléculaire connus est également chargé. Les flèches de gauche indiquent les poids moléculaires tandis que les flèches de droite montrent la fragmentation internucléosomale de l'ADN (généralisant des fragments dont les tailles sont des multiples de 180-200 pb). La fragmentation de l'ADN est une caractéristique typique d'une réponse apoptotique.

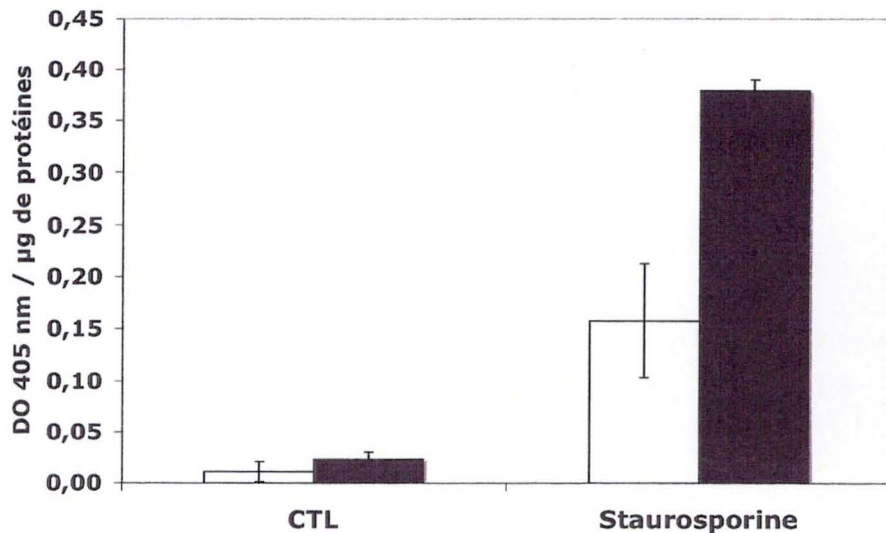


Figure 3.4.: Effet de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN génomique dans des cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires). Les cellules ont été incubées ou non (CTL) en présence de staurosporine (STS) à 100 nM pendant 16 heures. Le dosage de la fragmentation est ensuite effectué grâce au kit « Cell Death Detection Elisa » (voir matériel et méthodes). Les résultats représentant les valeurs d'absorbance obtenues, normalisées par les quantités de protéines engagées dans le test, sont exprimés en D.O. / μ g de protéines comme la moyenne \pm 1 S.D. pour n=3.

CAD (Caspase-Activated DNase) qui fragmente l'ADN ne le clive pas entre tous les nucléosomes, et les fragments ainsi générés ont une taille correspondant à des multiples de 180-200 paires de bases. Après une extraction d'ADN génomique à partir des cellules et une migration électrophorétique sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium, ce phénomène devient visualisable. En effet, l'ADN des cellules apoptotiques se présente alors sous la forme de « DNA ladder », les fragments obtenus après migration étant séparés sur le gel par une distance d'environ 180-200 paires de bases.

Dans le cadre de la mise au point d'un modèle d'apoptose induite par la staurosporine, nous avons voulu mesurer la fragmentation de l'ADN de cellules 143 B incubées pendant 16 heures avec des concentrations croissantes (100 nM, 500 nM et 1 μ M) en staurosporine. Pour obtenir une bonne réponse apoptotique, le temps de 16 heures a été choisi car la fragmentation de l'ADN est une caractéristique tardive de l'apoptose. Après extraction et migration électrophorétique, l'ADN a été révélé sous illumination UV. Le but était d'établir les conditions optimales de stimulation des cellules. Le résultat de la migration est présenté à la figure 3.3. Dans le cas de cellules non traitées à la staurosporine, l'ADN non fragmenté n'a pas pénétré dans le gel. Après un traitement à la staurosporine, l'ADN génomique montre bien une dégradation qui est dépendante de la concentration utilisée et qui fait apparaître des fragments d'ADN séparés d'environ 180-200 paires de bases. Ce résultat attendu montre que l'ADN est bien fragmenté entre les nucléosomes et suggère qu'une proportion des cellules meurent bien par apoptose en réponse à la staurosporine. Ceci est d'autant plus visible pour des cellules incubées avec la staurosporine à 1 μ M.

Néanmoins, l'obtention de ce résultat a été difficile. En effet, l'ADN intact est visqueux et pénètre difficilement dans le gel. De plus, les dosages de la concentration en ADN (par la mesure de l'absorbance à 260 nm) nécessaires pour déterminer précisément les quantités à déposer sur le gel étaient peu reproductibles. Notre but étant de comparer la sensibilité des cellules cybrides sauvages et mutées à la staurosporine, nous avons besoin d'un test quantitatif et reproductible pour comparer l'état de la fragmentation de l'ADN dans ces conditions. Nous avons donc décidé d'utiliser un kit permettant le dosage de la fragmentation de l'ADN.

3.4. Recherche de l'effet de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cybrides sauvages et mutées.

La quantification de la fragmentation de l'ADN permet de rechercher si une lignée cellulaire est plus sensible qu'une autre à l'apoptose en réponse à un stimulus apoptotique. Le dosage a premièrement été effectué sur des échantillons préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées préalablement incubées 16 heures en présence de staurosporine à 100 nM. Le but de cette expérience était de comparer l'effet de la molécule sur l'état de fragmentation de l'ADN dans les deux lignées cellulaires. Les résultats de ce dosage sont présentés à la figure 3.4.

On peut voir que la staurosporine induit bien une augmentation de la fragmentation internucléosomale de l'ADN dans les deux lignées cellulaires. Ceci atteste de l'induction de l'apoptose des cellules en réponse à la staurosporine. Cependant, remarquons que la dégradation de l'ADN en réponse à la staurosporine est bien plus importante dans les cellules possédant la mutation MERRF (A8344G) que dans les cellules possédant l'ADN mitochondrial sauvage. Ceci montre donc que la mutation MERRF est responsable d'une augmentation de la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par la staurosporine. Des résultats allant dans ce sens ont déjà été obtenus par Liu et ses collaborateurs qui ont montré

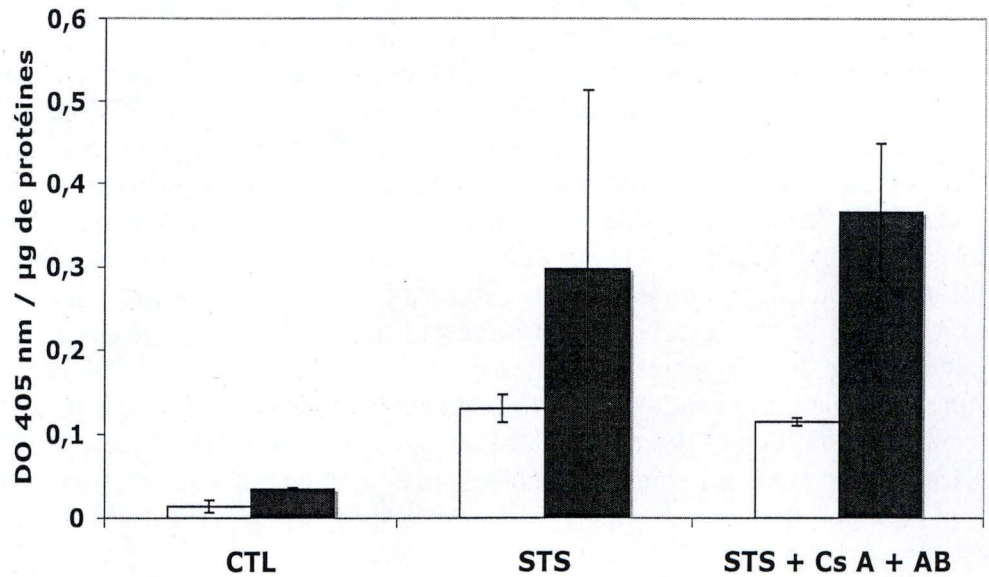


Figure 3.5.: Effet de la cyclosporine A et de l'acide bongkréique sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans des cellules cybrides sauvages et mutées.

Les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) ont été incubées pendant 16 heures avec de la staurosporine à 100 nM (STS) en présence ou en absence de cyclosporine A (Cs A) à 100 nM et d'acide bongkréique (AB) à 10 µM. Le dosage de la fragmentation est effectué grâce au kit « Cell Death Detection Elisa » (voir matériel et méthodes). Les résultats représentant les valeurs d'absorbance obtenues, normalisées par les quantités de protéines engagées dans le test, sont exprimés en D.O. / µg de protéines comme la moyenne \pm 1 S.D. pour n=3.

une sensibilité accrue des cellules affectées par la mutation MERRF (A8344G) à l'apoptose induite par la staurosporine ou par les UV (Liu et al., 2004). Ces résultats sont également en accord avec nos observations morphologiques faites sur les cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de staurosporine et qui montraient un phénomène de rétraction plus important dans les cellules cybrides mutées (voir figure 3.2).

Nous avons donc mis au point un modèle d'apoptose induite par la staurosporine et confirmé la plus grande sensibilité des cellules cybrides mutées à la staurosporine.

Après avoir montré un effet différentiel de la staurosporine sur les cellules cybrides sauvages et mutées, nous avons voulu rechercher les mécanismes potentiellement impliqués dans la réponse apoptotique induite par l'inhibiteur de PKC dans ces lignées cellulaires: 1) en recherchant un rôle éventuel du PTP et 2) en tentant de mettre en évidence le rôle d'une activation des caspases dans la fragmentation de l'ADN observée dans ces conditions.

3.5. Effet de la cyclosporine A et de l'acide bongkrélique sur la fragmentation de l'ADN génomique induite par la staurosporine dans les cellules cybrides sauvages et mutées

Le PTP forme un pore/canal non spécifique dans les membranes mitochondriales qui est constitué de protéines comme l'ANT, VDAC, une hexokinase, la créatine kinase, le récepteur périphérique aux benzodiazepines (PBR) et la cyclophiline D (CycD) (voir introduction point 1.1.5). L'ouverture de ce pore serait, entre autres, régulée par des interactions avec les protéines de la famille Bcl-2. En condition basale, Bcl-2 permettrait sa fermeture, et suite à un stimulus apoptotique, la translocation de Bax dans la membrane mitochondriale externe (MME) permettrait son ouverture (Gross et al., 1999; Loeffler et al., 2000). La conséquence de l'ouverture du PTP est une augmentation de la perméabilité de la MME permettant la libération de facteurs pro-apoptotiques comme le cytochrome c et l'activation de la cascade de caspases.

La cyclosporine A et l'acide bongkrélique sont deux molécules qui inhibent l'ouverture du PTP. L'acide bongkrélique agit au niveau de l'ANT tandis que la cyclosporine A inhibe la cyclophiline D (voir figure 1.7). Nous avons utilisé ces deux molécules afin de tenter d'inhiber la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans les cellules cybrides sauvages et mutées (voir figure 3.5).

L'incubation des cellules cybrides avec la staurosporine à 100 nM induit bien une augmentation de la fragmentation de l'ADN, et ce de manière plus importante dans les cellules cybrides mutées, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment (voir figure 3.4). La présence de cyclosporine A (100 nM) et d'acide bongkrélique (10 μ M) lors de l'incubation des cellules avec la staurosporine n'a pas d'effet inhibiteur sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine et ce, quelle que soit la lignée cellulaire considérée. On ne peut exclure que les concentrations utilisées soient trop faibles, ce qui expliquerait l'absence d'effet des inhibiteurs. Il faudrait, pour s'en assurer, répéter l'expérience à des plus fortes concentrations. Cependant si ces résultats se confirmaient en utilisant de plus fortes concentrations en inhibiteurs, cela suggérerait donc l'induction de l'apoptose induite par la staurosporine ne dépend pas de l'ouverture du PTP dans ces lignées cellulaires. Une conclusion semblable a déjà été émise par Shchepina et collaborateurs (2002) pour des cellules HeLa incubées en présence de staurosporine. De plus, il semble que la libération de cytochrome c mitochondrial dans des hépatocytes primaires incubés en présence de staurosporine ne s'accompagne pas d'une diminution du potentiel de membrane

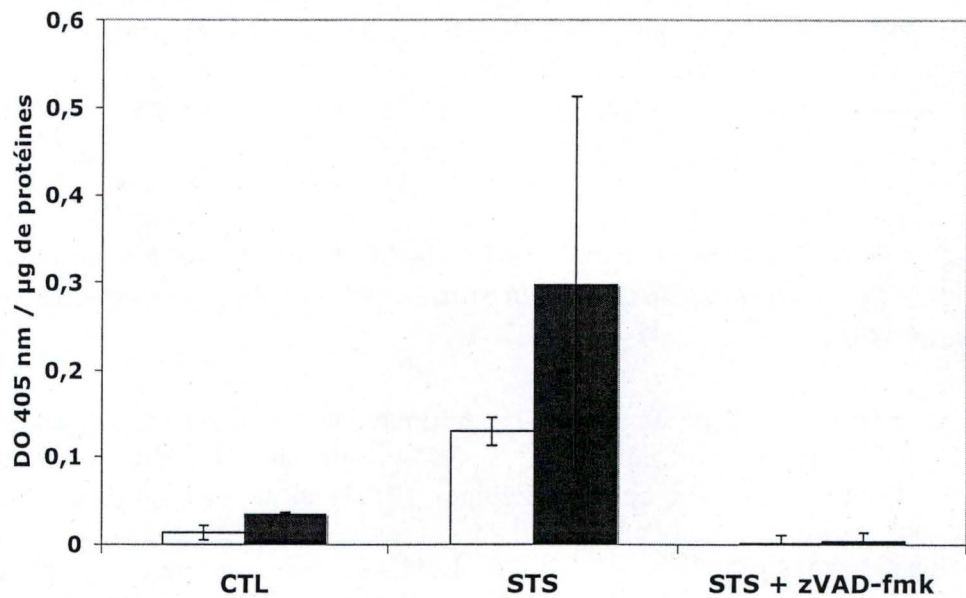


Figure 3.6.: Effet du zVAD-fmk sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans des cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires). Les cellules ont été incubées ou non (CTL) en présence de staurosporine à 100 nM pendant 16 heures en présence (STS + zVAD-fmk) ou en absence de (STS) zVAD-fmk à 5 µM. Le dosage de la fragmentation est ensuite effectué grâce au kit « Cell Death Detection Elisa ». Les résultats représentant les valeurs d'absorbance obtenues, normalisées par les quantités de protéines engagées dans le test, sont exprimés en D.O. / µg de protéines comme la moyenne ± 1 S.D. pour n=3.

mitochondrial (Feng et al., 2002). Il est en effet possible que la libération du cytochrome c, étape cruciale de l'initiation de l'apoptose induite par la staurosporine, se produise par un mécanisme différent de l'ouverture du PTP. Plusieurs hypothèses ont en effet été émises pour tenter d'expliquer la libération du cytochrome c mitochondrial dans le cytosol indépendamment de l'ouverture du PTP (voir figure 1.19). Ainsi, le cytochrome c pourrait sortir par des pores formés par VDAC (Gross et al., 1999) ou par des pores formés dans la membrane mitochondriale externe par des protéines de la famille Bcl-2 comme Bax ou même librement suite à une désorganisation de la MME. Rappelons en effet que la staurosporine augmente la production de ROS déjà plus élevée dans les cellules possédant l'ADN mitochondrial muté (Liu et al., 2004). Les ROS pourraient donc conduire à la peroxydation des phospholipides de la MME. Ensuite, l'activation d'une phospholipase A2 (PLA2) permet le clivage des acides gras peroxydés générant ainsi des lysophospholipides capables d'augmenter la perméabilité de la MME (Broekemeier et al., 1989; Madesh et al., 1997).

3.6. Effet du zVAD-fmk sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dans des cellules cybrides sauvages et mutées.

Dans le but de rechercher l'implication éventuelle des caspases dans le processus de fragmentation de l'ADN en réponse à la staurosporine dans les cellules cybrides sauvages et mutées, nous avons incubé les cellules avec de la staurosporine à 100 nM en présence ou en absence de zVAD-fmk (5 μ M), un inhibiteur de l'ensemble des caspases qui agit en se fixant et en bloquant le site actif de ces protéases. Les résultats sont présentés à la figure 3.6. Nous pouvons donc voir que lorsque les cellules sont incubées avec la staurosporine en présence de zVAD-fmk, la fragmentation de l'ADN est complètement inhibée et ce, dans les deux lignées cellulaires. Ce résultat suggère que la fragmentation de l'ADN en réponse à un traitement à la staurosporine dépend bien de l'activité de caspases. Ce résultat est attendu si l'on considère que la caspase-3, en clivant iCAD (inhibitor of CAD), un inhibiteur de la CAD (Caspase-Activated Dnase), permet l'activité de celle-ci et donc le clivage internucléosomal de l'ADN (Zimmermann et al., 2001). Puisque l'ajout de zVAD-fmk lors de l'incubation induit une inhibition complète de la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine, nous pouvons même conclure que ce phénomène ne dépend que des caspases.

Ajoutons encore que les tests réalisés en présence de zVAD-fmk ont été dosés en même temps que les tests précédents et nous utilisons donc les mêmes contrôles que ceux de la figure 3.5. Nous dissociions simplement leur présentation pour des raisons de clareté. Le zVAD-fmk est un inhibiteur de l'ensemble des caspases et inhibe donc toutes les protéases de cette famille. Pour tenter d'identifier la ou les caspases responsables de la fragmentation de l'ADN, il serait donc intéressant de refaire ce genre de test en utilisant des molécules qui inhibent préférentiellement une caspase particulière, comme par exemple le Ac-DEVD-CHO, qui inhibe préférentiellement la caspase-3. Il existe un éventail d'inhibiteurs de caspases qui diffèrent par leur site de clivage, et qui bien que pas totalement spécifiques sont préférentiellement reconnus par une caspase en particulier (la séquence WEHD, est préférentiellement reconnue par la caspase-1 ; VDAD par la caspase-2,...). Dans la suite de ce travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la caspase-3, une caspase effectrice essentielle dans de nombreux modèles d'apoptose (Voir introduction 1.5.1. Les caspases).

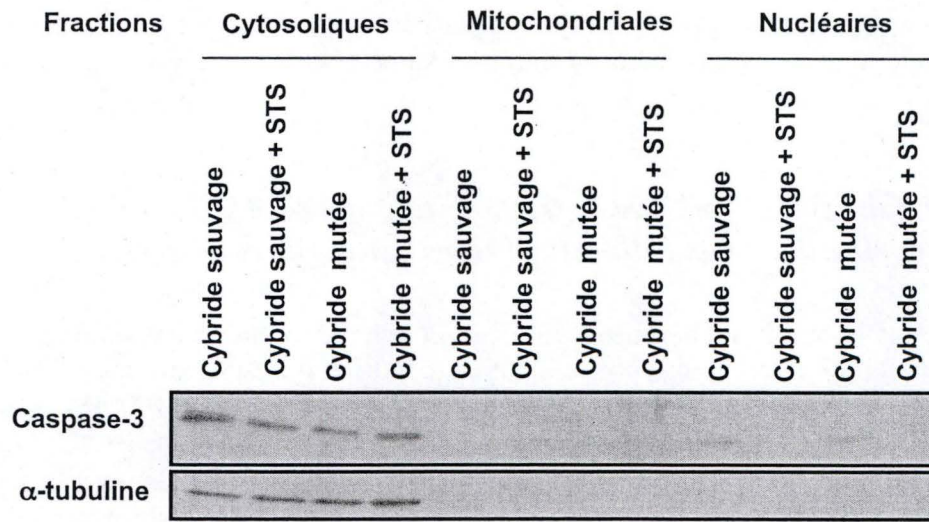


Figure 3.7.: Analyse de l'abondance de la protéine caspase-3 en Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugation différentielle à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (500 nM) pendant 4 heures. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non avec de la staurosporine à 500 nM durant 4 heures avant la préparation des fractions nucléaires, mitochondriales et cytosoliques. Les puits sont chargés avec 30 μ g de protéines pour les fractions mitochondriales ou cytosoliques, et avec 15 μ g de protéines pour les fractions nucléaires. Un contrôle de charge pour les fractions cytosoliques est réalisé par l'immunodétection de l' α -tubuline.

3.7. Recherche de l'abondance et de la localisation de la caspase-3 dans les cellules cybrides sauvages et mutées : effet de la staurosporine.

La caspase-3 est une caspase effectrice de la réponse apoptotique qui est responsable du clivage de nombreux substrats cellulaires comme par exemple iCAD (Zimmermann et al., 2001). Afin de rechercher le niveau basal d'expression de cette caspase dans les cellules cybrides sauvages et mutées, les éventuelles modifications d'expression induites par la staurosporine et sa localisation subcellulaire, nous avons recherché son abondance au niveau protéique en Western blot dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées ou non avec 500 nM de staurosporine pendant 4 heures. Au terme des incubations, un fractionnement cellulaire par centrifugations différentielles a été réalisé dans le but d'obtenir des fractions enrichies en protéines cytosoliques, mitochondriales et nucléaires. Les protéines ont ensuite été séparées par SDS-PAGE et transférées sur une membrane de PVDF. L'abondance de la caspase-3 a été révélée par immunoblotting grâce à un anticorps qui détecte, dans certains tissus, les formes active (17 kDa) et inactive (36 kDa) de la caspase-3. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.7.

Tout d'abord, précisons que la figure ne montre que la forme non clivée de 36 kDa de la caspase-3. L'absence de détection de la forme active de 17 kDa dans les conditions staurosporine est peut-être due à un manque de sensibilité de la technique pour les quantités de protéines engagées et/ou à une plus grande affinité de l'anticorps pour la forme inactive de 36 kDa que pour la forme active.

La détection de la caspase-3 inactive en Western blot montre que la protéase se trouve principalement dans les fractions cytosoliques et est très légèrement détectable dans les fractions nucléaires, mais n'est pas présente dans les fractions mitochondriales. La caspase-3 semble plus abondante dans le cytosol des cellules cybrides sauvages non traitées que dans le cytosol des mêmes cellules traitées à la staurosporine. On n'observe pas cette différence d'abondance en réponse à la staurosporine pour les cellules cybrides mutées. Remarquons également que la caspase-3 semble plus abondante dans les cellules cybrides possédant l'ADN mitochondrial sauvage que dans les cellules cybrides mutées. Ceci est en accord avec les résultats d'expression de gènes obtenus au niveau des transcrits avec le damier « Human General Chip » et permet de conclure que la diminution d'abondance des transcrits de la *caspase-3* dans les cellules cybrides mutées est également visible au niveau protéique.

Dans les fractions nucléaires, la caspase-3 est légèrement détectée dans les deux lignées cellulaires non stimulées (pistes 9 et 11) et le signal correspondant disparaît lorsque les cellules sont stimulées par la staurosporine (pistes 10 et 12). Bien que nous ne détectons pas la forme active de la caspase-3 dans nos conditions expérimentales, nous pouvons supposer que la disparition de la caspase-3 inactive en présence de staurosporine soit due à un clivage de la protéase. Bien que la localisation de la caspase-3 soit principalement cytosolique en conditions basales, il a été montré que la protéase (surtout la forme clivée) est également détectable dans le noyau de cellules HepG2 traitées avec un anticorps dirigés contre le récepteur FAS (Kamada et al., 2005). Cependant, une légère contamination des fractions nucléaires par des protéines cytosoliques n'est pas à exclure pour expliquer la faible détection de la caspase-3 dans ces fractions.

N'ayant pas pu détecter la forme active de la caspase-3 en Western blot, nous avons recherché son activité par un marquage en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale en utilisant un autre anticorps, reconnaissant uniquement la forme clivée de la caspase-3 puisque comme nous l'avons montré au point 3.6, la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine dépend de l'activation des caspases parmi lesquelles, la caspase-3 est un excellent candidat.

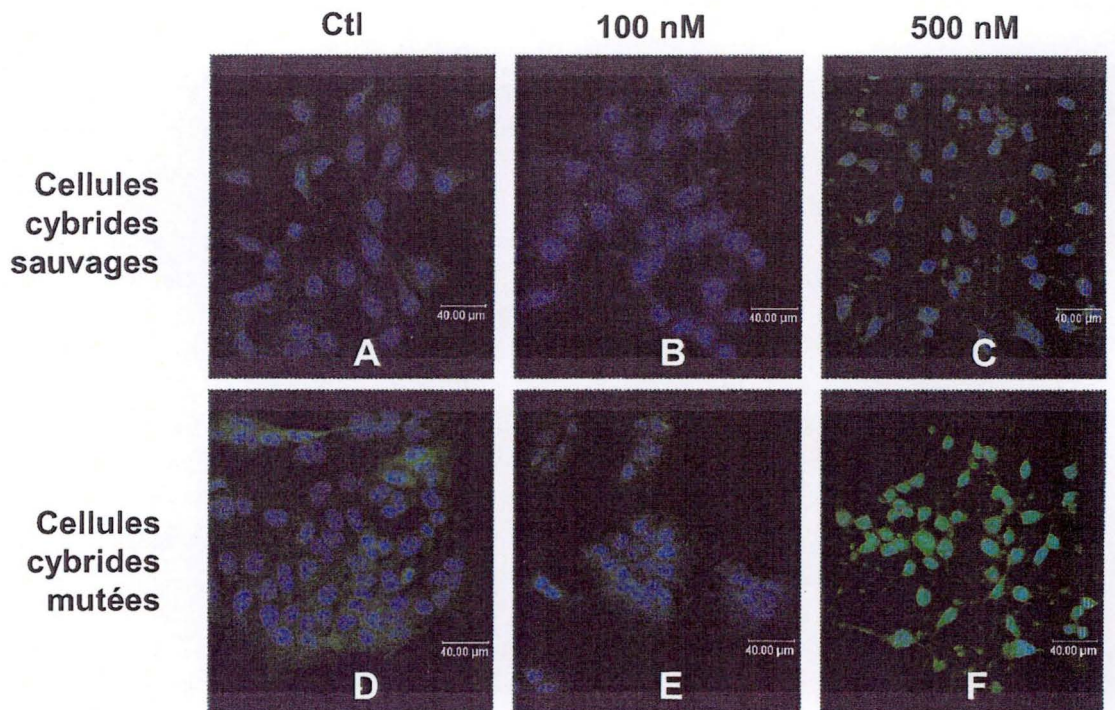


Figure 3.8.: Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale de la protéine caspase-3 active dans des cellules cybrides sauvages (A, B et C) et mutées (D, E et F). Les cellules, sous-cultivées sur des lames porte-objets sont incubées ou non (A, D) pendant 4 heures en présence de 100 nM (B et E) ou 500 nM (C et F) de staurosporine et sont ensuite fixées à la paraformaldéhyde avant d'être perméabilisées au Triton X-100 avant le marquage avec un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme clivée et active de la caspase-3.

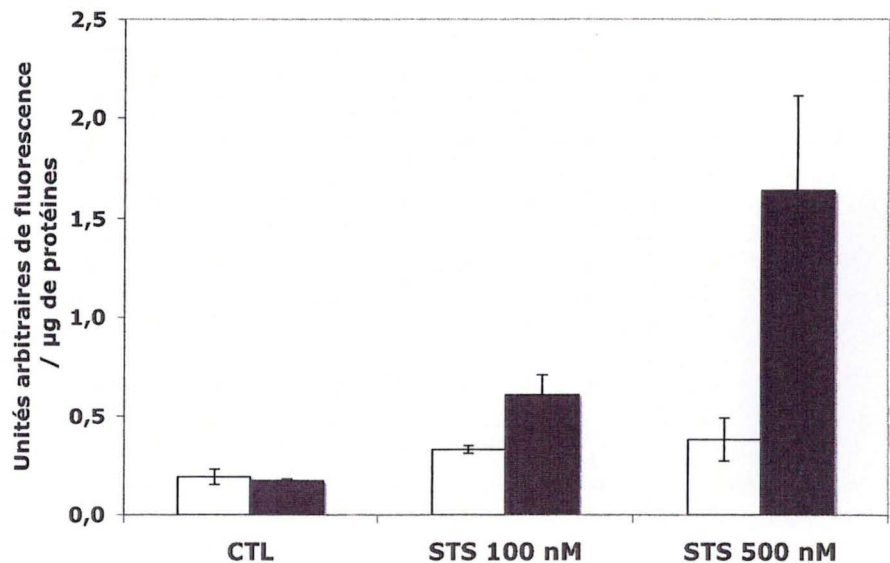


Figure 3.9.: Effet de la staurosporine sur l'activité de la caspase-3 dans des cybrides sauvages et mutées. Les cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) ont été incubées durant 4 heures avec de la staurosporine à 100 nM (STS 100 nM) ou à 500 nM (STS 500 nM). Les cellules sont rincées, lysées et le dosage de l'activité caspase-3 est effectué en présence d'un substrat spécifique de l'enzyme (Ac-DEVD-AFC). Les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines engagées dans le test, sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence / μg de protéines et représentent la moyenne ± 1 S.D pour n=3.

3.8. Etude de l'activation de la caspase-3 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

3.8.1. Abondance et localisation de la caspase-3 active dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

Afin de rechercher l'état d'activité de la caspase-3 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine, nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence en utilisant un anticorps reconnaissant spécifiquement la forme active de la caspase-3. Les cellules cybrides sauvages et mutées ont été stimulées ou non pendant 4 heures avec de la staurosporine à 100 et 500 nM avant d'être fixées et marquées pour la caspase-3 active.

Les micrographies présentées à la figure 3.8 montrent que la caspase-3 est activée de manière dépendante de la concentration dans les deux lignées cellulaires, la concentration de 100 nM n'étant pas suffisante pour visualiser l'activation de la protéase après 4 heures d'incubation. Dans les conditions qui activent cette enzyme (staurosporine pendant 4 heures à 500 nM), la caspase-3 montre une localisation homogène dans les cellules positives pour le marquage et se trouve également dans les noyaux visualisés par un contre marquage au TOPRO-3. Notons également que la morphologie des cellules positives pour la caspase-3 change et que leur taille diminue, comme observé sur les micrographies présentées à la figure 3.2. Il en est de même pour les noyaux qui se condensent.

Sur base de l'intensité du marquage pour la caspase-3 active dans les cellules cybrides incubées en présence de staurosporine à 500 nM, nous pouvons donc dire que l'activité de la caspase-3 en réponse à la staurosporine est plus importante dans les cellules cybrides mutées. Ceci est en accord avec les données obtenues pour la fragmentation de l'ADN (figure 3.4) qui montrent une fragmentation de l'ADN plus importante dans les cellules cybrides mutées en réponse à la staurosporine. Notons que dans les cellules contrôles, le marquage de la caspase-3 active semble également légèrement plus important dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages.

Afin de confirmer ces résultats, de tenir compte de l'ensemble de la population cellulaire et d'obtenir des données quantitatives, nous avons mis au point un dosage d'activité de la caspase-3 dans ces conditions.

3.8.2. Dosage de l'activité caspase-3 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

Les cellules cybrides sauvages et mutées ont étéensemencées dans des boîtes de 25 cm² et stimulées avec de la staurosporine à une concentration de 100 ou 500 nM pendant 4 heures. Ensuite, les cellules ont été rincées, lysées, et le dosage de l'activité de la caspase-3 a été réalisé dans un tampon de réaction contenant du Ac-DEVD-AFC à 13,7 µM. Cette molécule est un substrat synthétique de la caspase-3 qui, lorsqu'il est clivé, devient fluorescent. Après une incubation de 60 minutes à 37°C, la fluorescence est mesurée au

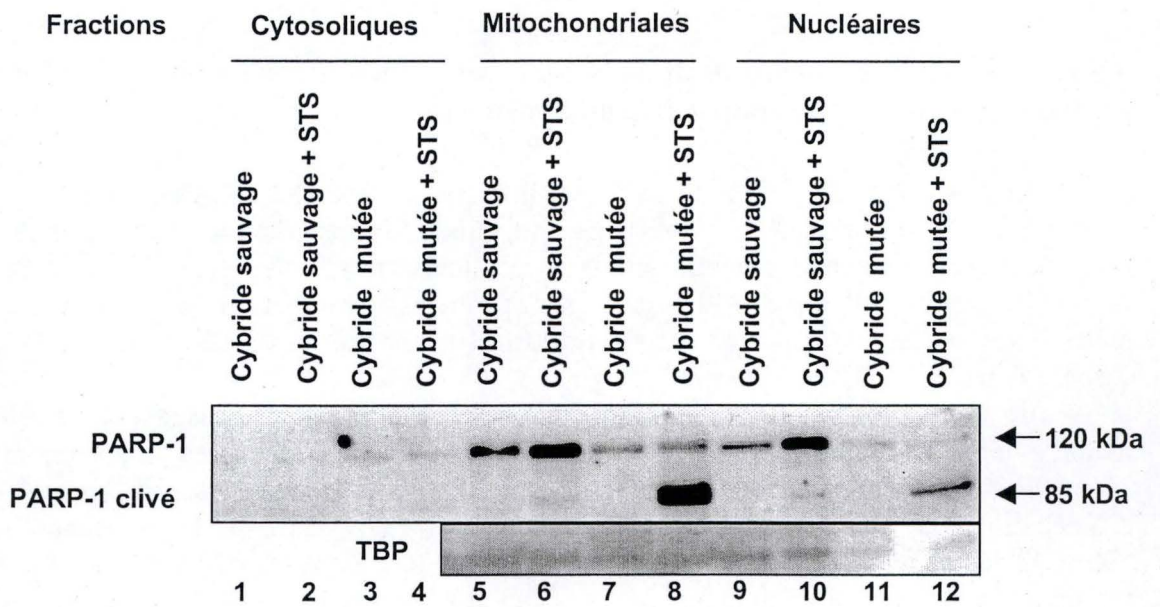


Figure 3.10.: Analyse de l'abondance des protéines PARP-1 et PARP-1 clivées dans différentes fractions subcellulaires préparées par des centrifugations différentielles à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (500 nM) pendant 4 heures. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 heures avant la préparation des fractions nucléaires, mitochondriales et cytosoliques. Les puits sont chargés avec 30 μ g de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosoliques, et avec 15 μ g de protéines pour les fractions nucléaires. L'anticorps utilisé reconnaît la forme native (120 kDa) et la forme clivée de PARP-1 (85 kDa).

spectrofluorimètre. Les intensités de fluorescence mesurées sont directement proportionnelles à l'activité de la caspase-3.

Les résultats présentant les intensités de fluorescence mesurées et normalisées par μg de protéines engagées dans le dosage sont présentés à la figure 3.9. On observe que l'activité de la caspase-3 augmente bien en présence de staurosporine et ce, dans les cybrides sauvages et mutées. Cependant, l'activation de la protéase en réponse à la staurosporine dans les cellules cybrides mutées est plus importante que l'activation mesurée dans les cellules cybrides sauvages et ce, quelle que soit la concentration testée. Ce résultat, appuyé par les variations morphologiques (figure 3.2), par le dosage de la fragmentation de l'ADN (figure 3.4) et par le marquage en immunofluorescence de la caspase-3 active (figure 3.8) en réponse à la staurosporine est un argument en faveur de l'hypothèse proposée par Liu et collaborateurs (2004) selon laquelle des cellules porteuses de la mutation MERRF (A8344G) sont plus sensibles à l'apoptose induite par plusieurs stimuli pro-apoptotiques dont la staurosporine.

La caspase-3 est donc activée par la staurosporine et est capable de cliver, dans un dosage *in vitro*, un substrat synthétique comme le Ac-DEVD-AFC. Pour vérifier que la protéase active est également capable de cliver des substrats endogènes, nous avons voulu visualiser le clivage d'un de ses substrats : la Poly (ADP-Ribose) polymérase-1 (PARP-1).

3.8.3. Visualisation du clivage d'un substrat endogène de la caspase-3 : PARP-1

La Poly (ADP-Ribose) polymérase-1 (PARP-1) est une enzyme intervenant dans le processus de réparation de l'ADN. Lors de dommages à l'ADN, PARP s'y lie à l'endroit de la cassure, hydrolyse le NAD^+ en nicotinamide et ADP-ribose et transfère des polymères d'ADP-riboses sur de nombreuses protéines nucléaires dont PARP-1 lui-même par un domaine d'automodification, les DNA polymérase α et β , des facteurs de transcription comme p53 et des histones intervenant dans la condensation de l'ADN. L'accumulation de charges négatives sur les histones provoque la dissociation de ces protéines de l'ADN, laissant l'ADN accessible à d'autres protéines impliquées dans le processus de réparation (Susse et al., 2004). PARP-1 est également capable d'interagir physiquement avec des facteurs de transcription comme AP-1 et NF-kappaB et de réguler positivement leur activité qui pour NF-kappaB passe par une poly-ADP ribosylation de p50 augmentant la liaison du facteur à l'ADN (Nakajima et al., 2004; Zheng et al., 2004). De plus la suractivation de PARP-1 en réponse à une accumulation massive de dommages dans l'ADN déplete la cellule en NAD^+ et donc par conséquent en ATP, conduisant la cellule à une mort par nécrose induite par une déficience énergétique.

PARP-1 est un substrat de la caspase-3 active (Boulares et al., 1999). Nous nous sommes donc intéressés à l'état de clivage de cette protéine lors de l'apoptose induite par la staurosporine dans les cellules cybrides sauvages et mutées. Pour y parvenir, nous avons cherché à détecter la forme native (120 kDa) et la forme clivée (85 kDa) de la protéine par un Western blot réalisé sur des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires préparées à partir de cellules cybrides sauvages et mutées incubées ou non pendant 4 heures en présence de staurosporine à 500 nM (figure 3.10).

On peut constater que la protéine PARP-1 est très peu abondante dans la fraction cytosolique de cellules cybrides mutées et est non détectée dans cette même fraction pour les cellules cybrides sauvages. Le traitement des cellules à la staurosporine active la caspase-3 qui clive PARP, générant ainsi une forme tronquée de la protéine (85 kDa).

Ce phénomène est bien visible dans les fractions nucléaires et mitochondriales dans lesquelles la protéine est retrouvée de manière abondante. La protéine PARP-1 semble plus

abondante dans les cellules cybrides sauvages que dans les cellules cybrides mutées et elle n'est pas clivée dans les cellules non stimulées, comme l'atteste l'absence de signal pour la bande de 85 kDa. Ceci est en accord avec les résultats obtenus avec le damier « Human General Chip » qui montrent que l'abondance du transcrit du gène codant pour la protéine PARP (ou ADPRT, ADP-Ribosyl Transferase) diminue de 2,27 fois dans les cellules cybrides mutées (voir figure 3.1). Le traitement des cellules à la staurosporine engendre, dans les fractions mitochondriales, le clivage de la protéine PARP ainsi qu'une augmentation de son abondance. Dans les cellules cybrides mutées, la forme clivée est majoritaire, alors que la forme non clivée s'accumule dans les cellules cybrides sauvages. Dans les fractions nucléaires, la protéine PARP montre des variations d'abondance semblables à celles observées dans les fractions mitochondriales, compte tenu des inégalités de la charge entre les pistes, indiquée par l'abondance hétérogène de TBP (TATA-box Binding Protein).

De par sa fonction, la protéine PARP a théoriquement une localisation principalement nucléaire. Si des signaux intenses sont observables dans les fractions mitochondriales, le contrôle de charge nucléaire réalisé par l'immunodétection de TBP est présent dans les pistes 5 à 8, ce qui atteste d'une contamination des fractions mitochondriales par des noyaux. Ainsi, la protéine PARP détectée dans les fractions mitochondriales est probablement d'origine nucléaire. Notons cependant que la présence de cette protéine a déjà été observée dans des mitochondries de neurones murins où elle interviendrait dans le processus de réparation de l'ADN mitochondrial (Masmoudi et al., 1988) et dans des cellules neuronales humaines, où elle pourrait intervenir dans la libération de l'AIF (Apoptosis-Inducing Factor) mitochondrial lors du processus apoptotique (Du et al., 2003).

En conclusion, nous pouvons donc dire que la staurosporine induit bien le clivage de PARP dans les cellules cybrides sauvages et mutées. Ce clivage d'un substrat endogène est certainement le résultat de l'activation des caspases. De plus, ce phénomène semble plus important dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules sauvages stimulées à la staurosporine. Tous les résultats obtenus jusqu'à présent montrent donc, par différentes approches, que les cellules cybrides possédant la mutation MERRF (A8344G) dans l'ADN mitochondrial, sont plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine. Néanmoins, nous n'avons aucune information sur les mécanismes moléculaires responsables de cette différence de sensibilité. Les expériences présentées dans la suite du travail ont donc été effectuées dans le but d'analyser et de comparer plus finement la réponse des cellules cybrides sauvages et mutées à une incubation avec la staurosporine. Nous allons donc tenter d'identifier un ou plusieurs élément(s) pouvant expliquer cette sensibilité accrue des cellules cybrides mutées à un stimulus pro-apoptotique comme la staurosporine.

3.9. Effets de l'ionomycine et du BAPTA/AM sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine dans les cellules cybrides sauvages et mutées respectivement.

Les mécanismes par lesquels la staurosporine induit l'apoptose sont au moins au nombre de trois. Tout d'abord, elle agit en inhibant non sélectivement de nombreuses isoformes de PKCs connues pour leur fonction anti-apoptotique. Citons par exemple la phosphorylation de Bad par les PKC θ et PKC ι qui permet sa dissociation de Bcl-X $_L$ et sa séquestration cytosolique suite à sa liaison aux protéines adaptatrices de la famille 14-3-3 (Jin et al., 2005; Villalba et al., 2001). La staurosporine provoque également l'augmentation de la production de ROS cytosoliques et mitochondriaux et la concentration en calcium, au moins dans des neurones rétiniens (Gil et al., 2003).

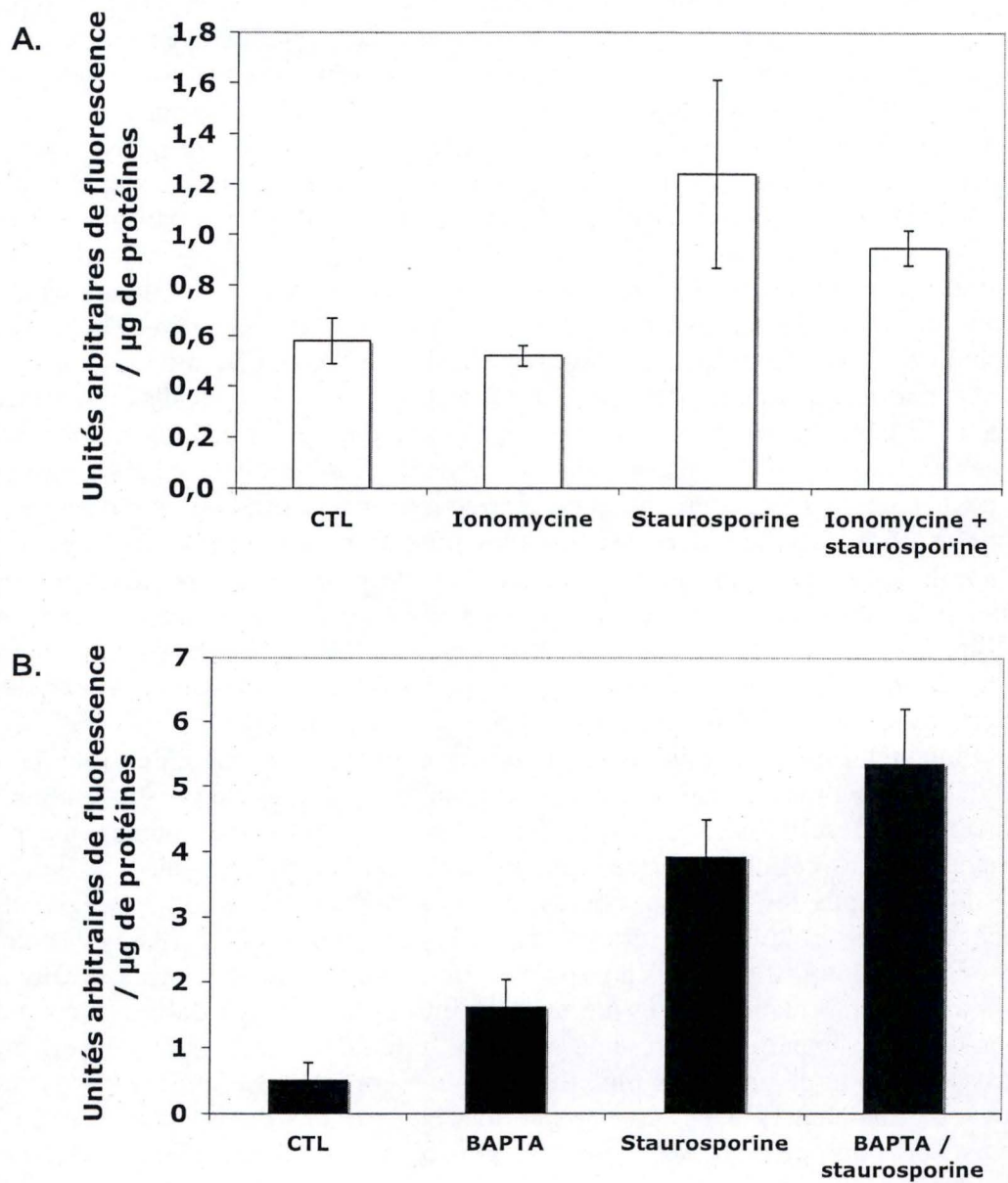


Figure 3.11.: Effet de l'ionomycine sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine dans des cellules cybrides sauvages (A) et effet du BAPTA sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine dans des cellules cybrides mutées (B). A. Les cellules cybrides sauvages ont été incubées ou non (CTL) pendant 4 heures avec de la staurosporine à 500 nM et/ou 4 heures avec de l'ionomycine à 1 μM . B. Les cellules cybrides mutées ont été incubées ou non (CTL) pendant 4 heures avec de la staurosporine à 500 nM et/ou 4 heures avec du BAPTA à 20 μM . Les cellules sont rincées, lysées et le dosage de l'activité caspase-3 est effectué en présence d'un substrat spécifique de l'enzyme (Ac-DEVD-AFC). Les valeurs d'intensité de fluorescence obtenues, normalisées par la quantité de protéines engagées dans le test, sont exprimées en unités arbitraires de fluorescence / μg de protéines et représentent la moyenne \pm 1 S.D pour n=3.

Les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial produisent plus de ROS (Wei et al., 2001) et possèdent également une concentration en calcium cytosolique libre plus importante que les cellules de type sauvage (Amuthan et al., 2002; Arnould et al., 2002; Biswas et al., 1999). Bien que les concentrations calciques cytosoliques et mitochondriales des cellules cybrides mutées n'aient pas été mesurées, il est probable que l'homéostasie du calcium cytosolique et/ou mitochondrial soit modifiée dans ces cellules comme l'ont montré Brini et ses collaborateurs (Brini et al., 1999). Il est donc possible que cette différence intervienne dans la plus grande sensibilité dont font preuve les cellules cybrides mutées à l'apoptose induite par la staurosporine.

Pour tenter de vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'activation de la caspase-3 dans des cellules cybrides sauvages traitées avec de la staurosporine en présence d'ionomycine et dans des cellules cybrides mutées incubées avec de la staurosporine en présence de BAPTA-AM. L'ionomycine est un ionophore qui a pour effet d'augmenter la concentration en calcium cytosolique libre (Bolkent et al., 2002) tandis que le BAPTA/AM est un agent chélateur du calcium intracellulaire (Wie et al., 2001). Le but de cette expérience était donc de rechercher des effets modulateurs éventuels d'une augmentation artificielle de la concentration calcique dans les cellules cybrides sauvages et d'une diminution de la concentration calcique dans les cellules cybrides mutées sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine.

Les cellules cybrides sauvages ont donc été ou non incubées pendant 4 heures avec 500 nM de staurosporine et/ou 1 μ M d'ionomycine. Les cellules cybrides sauvages ont, quant à elles, été incubées pendant 4 heures avec 500 nM de staurosporine et/ou 20 μ M de BAPTA-AM. Au terme des incubations, les cellules ont été rincées, lysées et un dosage de l'activité caspase-3 a été effectué à l'aide d'Ac-DEVD-AFC, un substrat fluorescent spécifique de l'enzyme.

On observe à nouveau l'activation de la caspase-3 dans les cellules incubées en présence de staurosporine. L'ionomycine seule n'engendre qu'une très faible diminution de l'activité caspase-3 dans les cellules cybrides sauvages tandis que l'activation de la caspase-3 dans des cellules cybrides sauvages incubées avec les deux molécules simultanément est plus faible que l'augmentation provoquée par la staurosporine seule. Contrairement à ce que nous attendions en raison du rôle important de l'augmentation de la concentration en calcium dans l'induction de l'apoptose (Hajnoczky et al., 2003), il semble qu'une augmentation de la concentration en calcium dans ces cellules engendre donc une légère inhibition de l'activité caspase-3 induite par la staurosporine.

Si cette hypothèse est correcte, la diminution de la concentration en calcium intracellulaire devrait donner des résultats opposés. C'est ce que nous pouvons observer à la figure 3.11.B qui montre que le BAPTA-AM provoque, à lui seul, une petite augmentation de l'activité caspase-3 dans les cellules cybrides mutées. De plus, la présence du chélateur de calcium renforce encore l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine seule. La diminution de la concentration en calcium dans les cellules cybrides mutées pourrait donc avoir un effet pro-apoptotique en augmentant encore l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine.

Ces deux expériences montrent que le calcium inhibe l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine. Ceci peut paraître paradoxal et en désaccord avec les effets qu'engendre cette dernière. En effet, la staurosporine est capable d'induire l'apoptose notamment par une augmentation de la concentration calcique (Liu et al., 2004). Nous nous attendions donc à obtenir le résultat opposé à celui observé. Néanmoins, dans la littérature, il a été montré que le calcium peut avoir un effet protecteur contre l'apoptose induite par la privation de sérum ou la surexpression de p53 (Gidon-Jeangirard et al., 1999; Lampe et al., 1995; Lotem et al., 1998). Le mécanisme par lequel le calcium protégerait de l'apoptose

passerait par la phosphorylation de la protéine kinase B (PKB)/Akt par une kinase dépendante du calcium, la « Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase kinase » (CaM-KK) (Tokumitsu et al., 1999). La protéine PKB/Akt intervient dans la phosphorylation inactivatrice de la protéine Bad. Certains auteurs ont également montré que l'augmentation de la concentration calcique pouvait activer le facteur de transcription NF-kappaB, qui inhibe l'apoptose (Papa et al., 2004). Une hypothèse supplémentaire que nous pouvons émettre par rapport au mécanisme d'action de la staurosporine est que l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire, connue pour activer certaines isoformes de PKC (α , β I, β II et γ), minimiserait l'action inhibitrice de la staurosporine sur ces enzymes.

La sensibilité accrue des cellules cybrides mutées à l'apoptose induite par la staurosporine ne semble donc pas due à une concentration calcique supérieure à celle observée dans les cellules cybrides sauvages. Nous devrions cependant comparer la concentration en calcium cytosolique libre et mitochondrial matriciel dans ces deux lignées de cellules à l'aide de sondes fluorescentes comme le Fura-2.

La réponse apoptotique étant souvent médiée par des changements de localisation et des déséquilibres dans l'abondance respective des protéines pro- et anti-apoptotiques, nous avons donc, dans la suite de ce travail, tenté de mieux comprendre la raison de la sensibilité accrue des cellules cybrides mutées en analysant l'abondance et la localisation de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules cybrides mutées traitées ou non à la staurosporine.

3.10. Analyse de l'abondance et de la localisation de protéines à action pro- et anti-apoptotiques dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à un traitement à la staurosporine.

Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la sensibilité accrue des cellules cybrides mutées à l'apoptose induite par la staurosporine, nous avons analysé la localisation de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine. Les protéines analysées sont les suivantes : Bax, le cytochrome c, Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1.

Les cellules ont été incubées ou non pendant 4 heures avec de la staurosporine à 500 nM, puis un fractionnement par centrifugations différentielles a été effectué, et les extraits protéiques des fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires ont été chargés sur un gel d'acrylamide. Les fractions nucléaires ont été chargées en quantités moindres (15 μ g) que les deux autres fractions (30 μ g), ce qui ne permettra pas de comparer l'abondance des protéines dans les fractions nucléaires et mitochondriales ou cytosoliques. Après migration électrophorétique des protéines et transfert sur une membrane de PVDF, l'abondance et la localisation des protéines dans les différentes fractions ont été révélées par des anticorps spécifiques.

Pour confirmer l'abondance et la localisation des protéines pro- ou anti-apoptotiques dans les cellules cybrides sauvages et mutées non traitées, des marquages en immunofluorescence et des observations en microscopie confocale ont également été effectués.

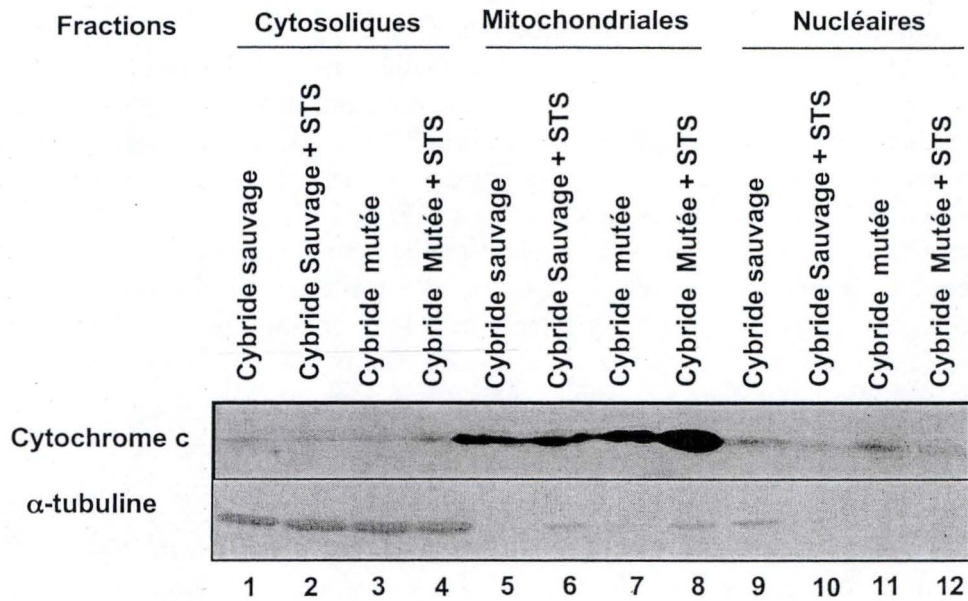


Figure 3.12.: Analyse de l'abondance de la protéine cytochrome c en Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugations différentielles à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (500 nM) pendant 4 heures. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 heures avant la préparation des fractions nucléaires, mitochondriales et cytosoliques. Les puits sont chargés avec 30 μ g de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosoliques, et avec 15 μ g de protéines pour les fractions nucléaires. Un contrôle de charge pour les fractions cytosoliques est réalisé par l'immunodétection de l' α -tubuline.

3.10.1. Analyse de l'abondance et de la localisation du cytochrome c dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

La libération du cytochrome c dans le cytosol par les mitochondries est un processus-clé dans le déclenchement de l'apoptose. Nous avons donc recherché l'abondance de cette protéine dans les fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non avec de la staurosporine.

Le Western blot présenté à la figure 3.12. montre que le cytochrome c est détecté dans les trois fractions analysées, et principalement dans les mitochondries. Dans les fractions mitochondriales, l'abondance du cytochrome c est comparable dans les cellules cybrides sauvages traitées et non traitées (piste 5 et 6) à la staurosporine, ce qui n'est pas le cas dans les cellules cybrides mutées où l'incubation avec la molécule semble entraîner une augmentation de l'abondance du cytochrome c (pistes 7 et 8). Néanmoins, nous n'avons pas pu réaliser de contrôle de charge mitochondrial sur cette membrane, et la seule explication que nous ayons trouvée pour interpréter cette augmentation d'abondance est une différence de charge entre les pistes 7 et 8.

Enfin, des bandes de faible intensité reflétant la présence du cytochrome c sont aussi détectées dans les fractions nucléaires. La staurosporine provoque une diminution de cette abondance dans ces fractions, et ce autant dans les cellules cybrides sauvages que dans les cellules cybrides mutées.

Nous avons vu dans l'introduction que lors du processus apoptotique, la libération dans le cytosol du cytochrome c mitochondrial permet l'activation de la caspase-9 par la formation de l'apoptosome, puis l'activation des caspases effectrices (Adams, 2003).

Une diminution de l'abondance du cytochrome c dans les fractions mitochondriales accompagnée d'une augmentation dans les fractions cytosoliques préparées à partir de cellules incubées en présence de staurosporine était donc attendue, mais n'ont pas été observées.

Bien que nous n'ayons pas d'explication pour l'absence de libération du cytochrome c dans le cytosol des cellules traitées en présence de staurosporine, on peut penser qu'une incubation de 4 heures avec la staurosporine à 500 nM n'est pas suffisamment longue que pour observer cette libération.

La détection du cytochrome c dans les fractions nucléaires n'a semble-t-il jamais été décrite dans la littérature, et est donc difficilement interprétable, si ce n'est par une contamination des fractions nucléaires par des mitochondries, ce qui n'est pas vérifiable ici, vu l'absence du contrôle de charge mitochondrial.

3.10.2. Abondance et localisation de la protéine pro-apoptotique Bax dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

Le Western blot présenté à la figure 3.13 montre que la protéine Bax est détectée dans les fractions cytosoliques, mitochondriales et nucléaires des deux lignées cellulaires. Dans les fractions cytosoliques, l'abondance de la protéine Bax est comparable dans les deux lignées cellulaires, et la staurosporine induit une augmentation de l'abondance dans les cellules cybrides sauvages. Dans les fractions mitochondriales, la protéine est plus abondante que dans les fractions cytosoliques et la staurosporine induit une augmentation importante de l'abondance de Bax, dans les cellules cybrides sauvages comme dans les cellules cybrides mutées. Enfin, Bax est faiblement détectée dans les fractions nucléaires, mais c'est également

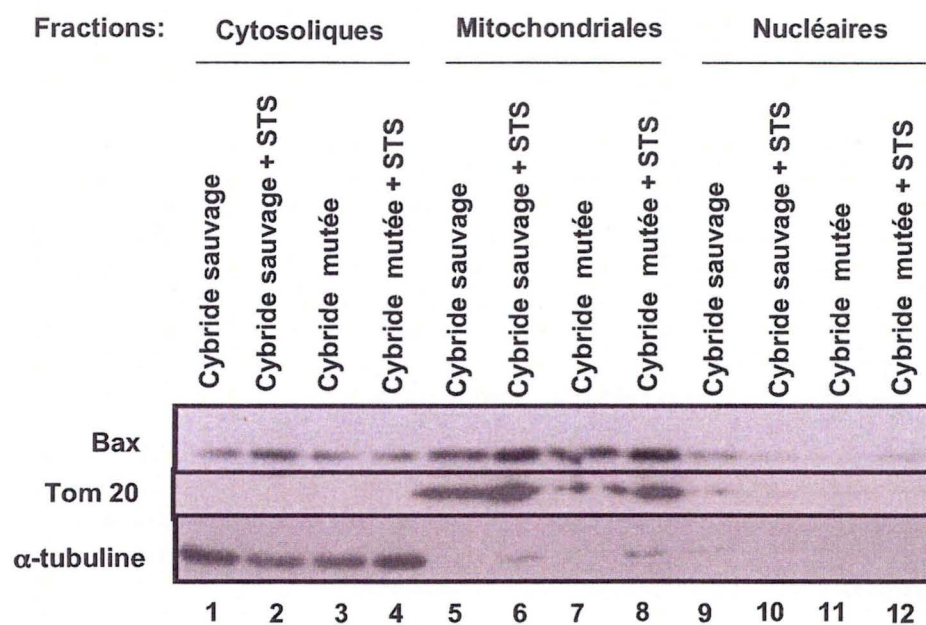


Figure 3.13.: Analyse de l'abondance de la protéine Bax par Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugations différentielles à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (500 nM) pendant 4 heures. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 heures avant la préparation des fractions nucléaires, mitochondriales et cytosoliques. Les puits sont chargés avec 30 µg de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosoliques, et avec 15 µg de protéines pour les fractions nucléaires. La charge et la contamination éventuelle des différentes fractions ont été contrôlées par l'immunodétection de Tom20 (marqueur mitochondrial) et de l'α-tubuline (marqueur cytosolique).

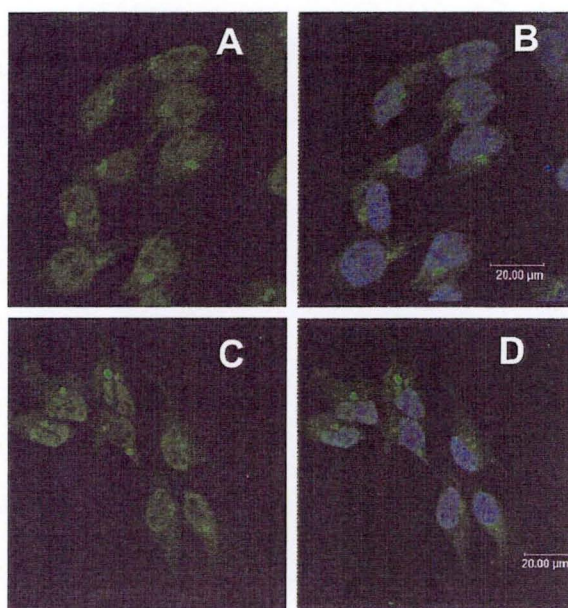


Figure 3.14.: Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale de la protéine Bax dans des cellules cybrides sauvages (A et B) et mutées (C et D). Les cellules, sous-cultivées sur des lames porte-objets, sont fixées à la paraformaldéhyde puis perméabilisées au Triton X-100 avant le marquage avec un anticorps anti-Bax (A et C) et avec du TOPRO-3 (B et D).

le cas de la protéine TOM 20 qui sert de contrôle de charge mitochondrial, ce qui indique que les bandes légèrement visibles dans les fractions nucléaires et correspondant à la protéine Bax sont peut-être le résultat d'une contamination des fractions nucléaires par la présence de mitochondries.

La protéine Bax est une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Suite à un stimulus apoptotique, cette protéine cytosolique transloque dans la MME où elle engendre une perméabilisation de cette membrane. Elle agirait en formant des pores aspécifiques en MME ou en permettant l'ouverture du PTP (voir introduction, point 5.4, (Gross et al., 1999; Kroemer et al., 2000). L'augmentation de l'abondance de Bax dans les fractions mitochondriales des cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à l'incubation avec la staurosporine est donc attendue et en accord avec la littérature (Murphy et al., 2000). Par contre, nous nous attendions à observer une diminution corrélée de l'abondance de la protéine dans les fractions cytosoliques, ce qui n'est pas le cas.

L'analyse des micrographies présentées à la figure 3.14 montre que l'abondance de la protéine Bax est comparable dans les deux lignées cellulaires, ce qui est en accord avec le Western blot, mais la localisation de la protéine est principalement nucléaire, ce qui est en contradiction avec la localisation principalement mitochondriale observée par Western blot. Rappelons que la quantité de protéines chargées étant différente pour ces fractions, il nous est impossible de comparer l'abondance de Bax dans les fractions nucléaires et mitochondriales. De plus, la détection de Bax dans le noyau pourrait être due à une spécificité imparfaite de l'anticorps utilisé (nous avons remarqué l'apparition de bandes parasites sur le Western blot). Notons cependant que la localisation nucléaire de Bax a déjà été signalée dans la littérature. En effet, plusieurs équipes l'ont déjà observée, notamment dans des cellules cancéreuses de poumons (Salah-eldin et al., 2000). Ces auteurs rapportent aussi que la translocation de Bax dans le noyau confère une certaine résistance à l'apoptose aux cellules cancéreuses puisque à cet endroit, il ne possède plus de propriétés pro-apoptotiques. Enfin, la protéine Bax est également observée dans les noyaux pendant la division cellulaire et plus précisément durant l'interphase (Hoetelmans et al., 2000). Elle pourrait y jouer un rôle dans le cycle cellulaire en permettant la transition de la phase G1 vers la phase S. Les mécanismes par lesquels la protéine Bax transloque dans le noyau ne sont pas élucidés, cette protéine ne possédant pas de NLS (Nuclear Localisation Sequence) dans sa séquence primaire.

Notons que, bien que nous observons une augmentation de l'abondance de Bax dans les fractions mitochondriales des cellules traitées à la staurosporine, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe est fonction d'un équilibre entre facteurs pro- et anti-apoptotiques (Zimmermann et al., 2001). Rappelons, par exemple, que la protéine Bax est inhibée par Bcl-2, et n'induit la libération du cytochrome c que lorsqu'elle est plus abondante que cette dernière au niveau de la MME.

3.10.3. Abondance et localisation de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

La protéine Bcl-2 est détectée principalement dans les fractions mitochondriales et nucléaires, et très faiblement dans les fractions cytosoliques (figure 3.15). L'abondance de la protéine dans les fractions mitochondriales et nucléaires est comparable dans les deux lignées cellulaires. L'incubation des cellules cybrides sauvages et mutées avec la staurosporine engendre une légère augmentation de l'abondance de cette protéine dans les fractions mitochondriales, ce qui semble être le seul effet provoqué par la molécule.

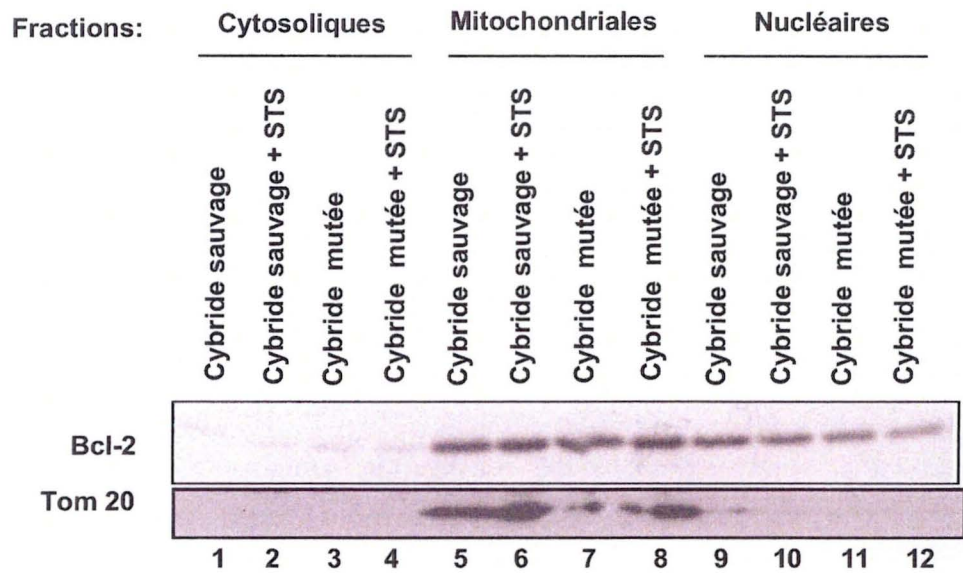


Figure 3.15.: Analyse de l'abondance de la protéine Bcl-2 par Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugations différentielles à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (500 nM) pendant 4 heures. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 heures avant la préparation des fractions nucléaires, mitochondriales et cytosoliques. Les puits sont chargés avec 30 μ g de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosoliques, et avec 15 μ g de protéines pour les fractions nucléaires. La charge et la contamination éventuelle des différentes fractions ont été contrôlées par l'immunodétection de Tom 20.

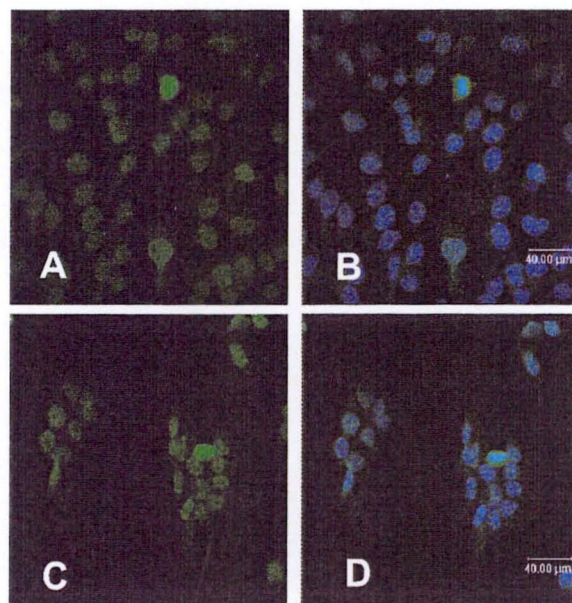


Figure 3.16.: Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale de la protéine Bcl-2 dans des cellules cybrides sauvages (A, B) et mutées (C et D). Les cellules, sous-cultivées sur des lames porte-objets, sont fixées à la paraformaldéhyde puis perméabilisées au Triton X-100 avant le marquage avec un anticorps anti-Bcl-2 (A et C) et avec du TOPRO-3 (B et D).

La protéine Bcl-2 exerce sa fonction anti-apoptotique en membrane mitochondriale externe où elle empêche la libération des facteurs pro-apoptotiques présents dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Adams et al., 1998; Gross et al., 1999). Pour ce faire, elle interagit avec les protéines pro-apoptotiques de la même famille telles que Bax et inhibe leur action. Il est donc logique de retrouver cette protéine principalement dans les fractions mitochondriales. Si l'incubation des cellules cybrides et sauvages avec la staurosporine engendre une légère augmentation de l'abondance de Bcl-2 dans ces fractions, cela n'empêche pas le déclenchement du processus apoptotique. En effet, la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe dépend de l'équilibre entre facteurs pro- et anti-apoptotiques (Zimmermann et al., 2001). Ainsi, la protéine Bcl-2 empêche l'action de la protéine Bax. Or, nous avons vu que l'abondance de la protéine Bax dans les fractions mitochondriales augmentait également suite à l'incubation des cellules avec la staurosporine (figure 3.13). De plus rappelons que la staurosporine est également capable de favoriser la translocation de Bad dans la MME (non étudiée dans le cadre de ce travail), qui inhibe alors l'action anti-apoptotique de Bcl-XL, un second couple de protéines dont les abondances relatives vont moduler la réponse apoptotique induite par la staurosporine (Liu, 2004).

La présence de Bcl-2 dans le noyau a déjà fait l'objet de plusieurs publications. Ainsi, si Bcl-2 est principalement retrouvée au niveau de la mitochondrie, Bcl-2 est également présent dans les noyaux de cellules ML-1 dérivées d'une leucémie myéloblastique (Yang et al., 1995). La localisation de Bcl-2 dans les noyaux est principalement décrite au niveau des membranes nucléaires. Cette protéine possède d'ailleurs un domaine d'insertion en membrane, et a été montrée comme étant associée à la MME et à la membrane du réticulum endoplasmique (Akao et al., 1994). Des études ont également montré que la protéine Bcl-2 était très abondante dans les neurones de rats adultes et que sa localisation était alors principalement nucléaire. La localisation nucléaire, tout comme pour Bax, n'est plus compatible avec son rôle exercé dans l'apoptose. Une hypothèse propose même que la translocation nucléaire de Bcl-2 ait un effet pro-apoptotique en inversant la balance Bcl-2/Bax au niveau mitochondrial (Kaufmann et al., 2003). Enfin, Bcl-2 nucléaire semble également avoir des effets inhibiteurs sur certains facteurs de transcription et ce, uniquement lorsque la protéine est associée aux membranes nucléaires. Ainsi, Bcl-2 inhiberait la translocation de NF-kappaB dans le noyau et diminuerait son activité transcriptionnelle. Une action inhibitrice de Bcl-2 sur l'activité de facteurs tels que AP-1 (activator protein-1), CREB (cAMP-responsive element binding protein) ou encore NFAT (nuclear factor of activated T-cells) a également été rapportée (Massaad et al., 2004).

Le marquage en immunofluorescence de la protéine Bcl-2 est comparable dans les deux lignées cellulaires : la protéine est localisée dans le cytoplasme et est plus abondante dans les noyaux (figure 3.16). La qualité des micrographies ne permet pas cependant d'affirmer avec certitude que Bcl-2 possède une localisation mitochondriale, et pour s'en assurer, il serait intéressant de réaliser, par exemple, un double marquage en cherchant à localiser une protéine mitochondriale telle que les sous-unités de la cytochrome oxydase. Il n'y a donc pas de différence d'abondance de la protéine Bcl-2 entre les cellules cybrides sauvages et mutées et les micrographies obtenues par le marquage en immunofluorescence confirment les résultats obtenus par la technique du Western blot.

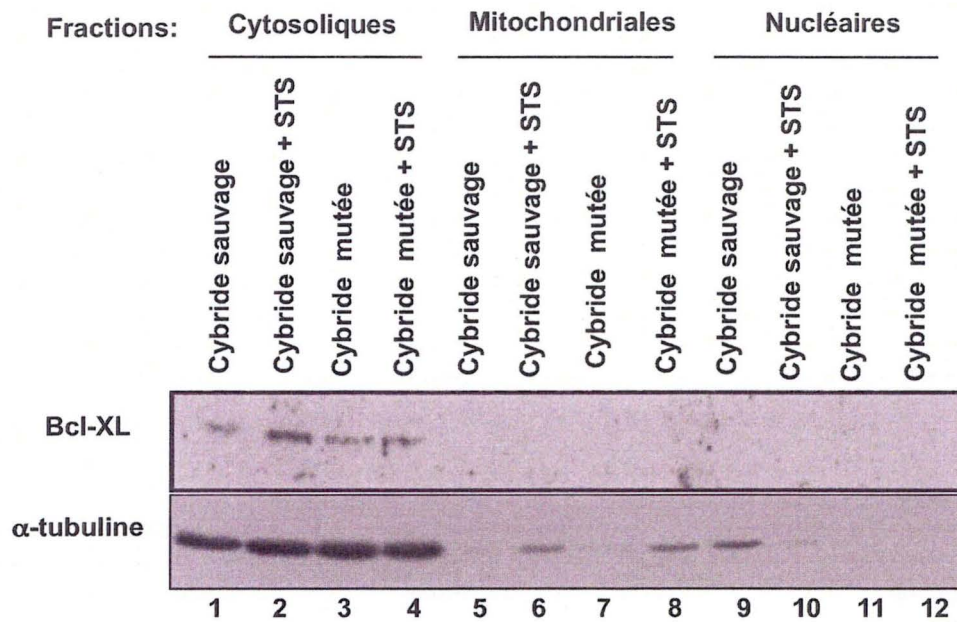


Figure 3.17.: Analyse de l'abondance de la protéine Bcl-X_L par Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugations différentielles à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (500 nM) pendant 4 heures. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 heures avant la préparation des fractions nucléaires, mitochondriales et cytosoliques. Les puits sont chargés avec 30 μ g de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosoliques, et avec 15 μ g de protéines pour les fractions nucléaires. La charge et la contamination éventuelle des différentes fractions ont été contrôlées par l'immunodétection de l' α -tubuline.

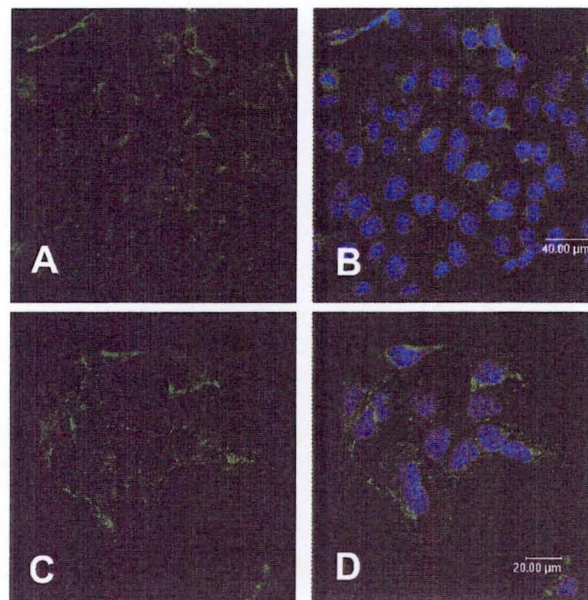


Figure 3.18.: Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale de la protéine Bcl-X_L dans des cellules cybrides sauvages (A et B) et mutées (C et D). Les cellules, sous-cultivées sur des lames porte-objets, sont fixées à la paraformaldéhyde puis perméabilisées au Triton X-100 avant le marquage avec un anticorps anti-Bcl-X_L (A et C) et avec du TOPRO-3 (B et D).

3.10.4. Abondance et localisation de la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

Le Western blot de la figure 3.17 montre que la protéine anti-apoptotique Bcl-X_L n'est détectée que dans les fractions cytosoliques des cellules cybrides sauvages et mutées où son abondance paraît semblable dans les deux lignées cellulaires. Le traitement des cellules à la staurosporine ne semble pas entraîner de modifications d'abondance de Bcl-X_L.

Les micrographies présentées à la figure 3.18 montrent les observations d'un marquage en immunofluorescence de la protéine Bcl-X_L dans les cellules cybrides sauvages et mutées. La protéine n'est pas présente dans les noyaux mais bien dans le cytoplasme, et l'aspect ponctué que présente le marquage à ce niveau fait penser à une localisation mitochondriale de la protéine même si cela reste à confirmer. En effet, rappelons que nos fractions cytosoliques contiennent des structures provenant d'autres organites et que de plus, une localisation de Bcl-X_L au niveau du réticulum endoplasmique a déjà été décrite (Tagami et al., 2000).

Dans la littérature, la protéine Bcl-X_L est connue pour être une protéine anti-apoptotique qui comme Bcl-2 empêche la perméabilisation de la MME en inhibant les protéines telles que Bax, Bak et Bad (Adams, 2003; Adams et al., 1998; Gross et al., 1999). Cette protéine est également capable de lier la protéine Apaf-1, ce qui empêche cette dernière de participer à la formation de l'apoptosome et d'activer la procaspase-9 (Adams et al., 1998; Gross et al., 1999). En condition basale, une certaine proportion de la protéine Bcl-X_L est cytosolique, et suite à un stimulus apoptotique, elle transloque vers la mitochondrie, ou elle agit en inhibant les protéines pro-apoptotiques (Adams, 2003).

La localisation cytosolique de la protéine Bcl-X_L est donc plausible tout comme l'est sa localisation mitochondriale éventuelle observée pour les marquages en immunofluorescence. Il est cependant étrange d'obtenir des résultats différents par les deux techniques, et l'analyse de la localisation de la protéine Bcl-X_L demande confirmation. En ce qui concerne le Western blot, il est possible que la fraction de Bcl-X_L mitochondriale ne soit pas détectée pour cause d'une abondance insuffisante, et que le traitement à la staurosporine engendre une translocation de la protéine, mais qu'une incubation de 4 heures ne soit pas suffisante à observer le phénomène.

3.10.5. Abondance et localisation de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dans les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine.

La protéine Mcl-1 est détectée dans les trois fractions analysées par Western blot (figure 3.19), et ce dans les deux lignées cellulaires. Son abondance est la plus importante dans les mitochondries et est très faible dans les fractions cytosoliques. Dans les fractions mitochondriales, Mcl-1 semble légèrement plus abondante dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages. Le traitement à la staurosporine entraîne une diminution de l'abondance de la protéine dans l'ensemble des fractions, et cette diminution est plus importante dans les fractions mitochondriales des cellules cybrides mutées que dans les fractions mitochondriales des cellules cybrides sauvages. La molécule a donc un effet différent sur les deux lignées cellulaires.

Une deuxième exposition plus longue de la membrane montre que suite au traitement à la staurosporine, une double bande apparaît dans les fractions cytosoliques et mitochondriales (excepté à la piste 12) ce qui suggère un état phosphorylé de la protéine.

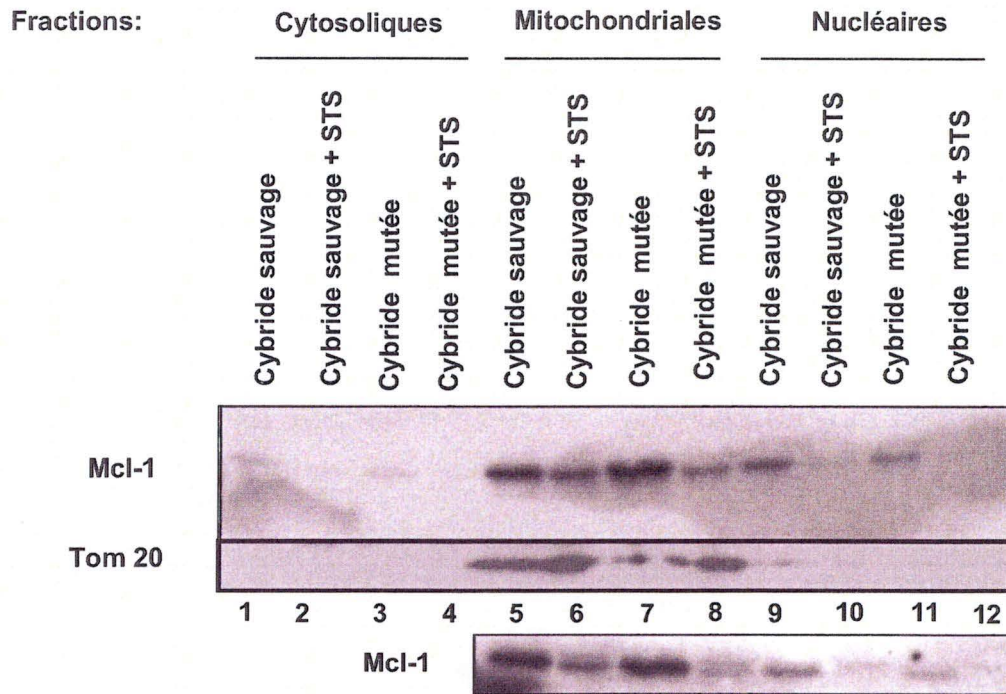


Figure 3.19.: Analyse de l'abondance de la protéine Mcl-1 par Western blot dans différentes fractions subcellulaires préparées par centrifugations différentielles à partir de cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine (500 nM) pendant 4 heures. Les cellules ont été incubées (+ STS) ou non avec de la staurosporine à 500 nM durant 4 heures avant la préparation des fractions nucléaires, mitochondriales et cytosoliques. Les puits sont chargés avec 30 µg de protéines pour les fractions mitochondriales et cytosoliques, et avec 15 µg de protéines pour les fractions nucléaires. Deux expositions du film sont présentées. Un contrôle de charge pour les fractions mitochondriales est réalisé par l'immunodétection de Tom 20.

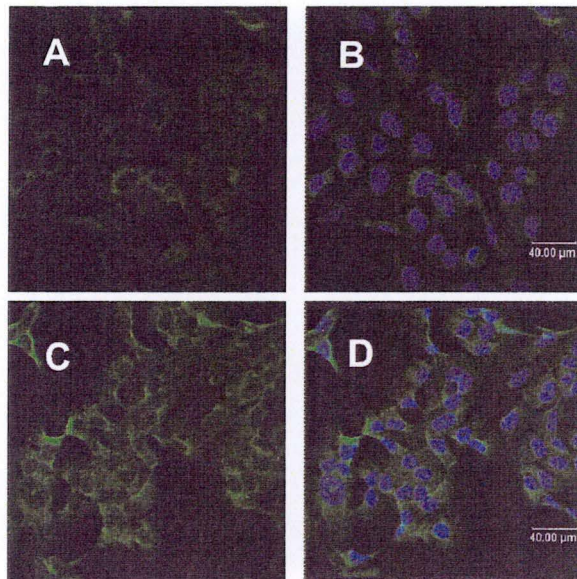


Figure 3.20.: Marquage en immunofluorescence et observation en microscopie confocale de la protéine Mcl-1 dans des cellules cybrides sauvages (A, et B) et mutées (C et D). Les cellules, sous-cultivées sur des lames porte-objets, sont fixées à la paraformaldéhyde puis perméabilisées au Triton X-100 avant le marquage avec un anticorps anti-Mcl-1 (A et C) et avec du TOPRO-3 (B et D).

Le marquage en immunofluorescence de la protéine Mcl-1 (figure 3.20) réalisé sur les cellules cybrides sauvages et mutées montre que la protéine est principalement localisée dans le cytosol, même si elle est également présente en moindre quantité dans les noyaux. L'aspect ponctué du marquage dans le cytoplasme fait penser à une localisation mitochondriale de la protéine. L'abondance de Mcl-1 est plus importante dans les cellules cybrides mutées, et les résultats obtenus par le marquage en immunofluorescence sont donc en accord avec ceux obtenus par Western blot.

La protéine Mcl-1 est une protéine de la famille Bcl-2 qui agit essentiellement au niveau de la MME, en inhibant les actions de protéines pro-apoptotiques comme Bax, Bim (Michels et al., 2005) qui agissent en perméabilisant cette membrane. Mcl-1 diffère des autres protéines anti-apoptotiques de la famille (Bcl-2, Bcl-X_L,...) par le fait qu'elle est soumise à un turn-over rapide (Gojo et al., 2002). L'abondance de Mcl-1, résultant d'un équilibre entre son expression dépendante de la voie de la PI3K/Akt et sa dégradation par le protéasome, permettrait la régulation de l'initiation de l'apoptose (Araki et al., 2002; Huang et al., 2000). De plus, suite à un stimulus pro-apoptotique, la protéine est clivée de manière caspase-dépendante. Cette étape est cruciale pour le déclenchement de l'apoptose, puisque le produit de clivage de Mcl-1 se révèle être un puissant acteur pro-apoptotique (Michels, Oncogene 2004, 23, p4818) (Michels et al., 2005).

Ainsi, les résultats obtenus par la technique du Western blot sont compréhensibles. La protéine est principalement localisée dans la mitochondrie où elle contribue à protéger la cellule de l'apoptose. Le traitement des cellules avec la staurosporine engendre une diminution d'abondance de la protéine (en inhibant sa synthèse et/ou en stimulant sa dégradation par les caspases), ce qui contribue probablement à l'initiation du processus apoptotique. Enfin, la double bande que nous soupçonnons être le reflet d'une phosphorylation mise en relation avec les données de la littérature. Il a été montré en effet que la phosphorylation de Mcl-1 empêchait cette protéine d'exercer son action anti-apoptotique (Inoshita et al., 2002). Les mécanismes par lesquels la phosphorylation inhibe les fonctions de Mcl-1 ne sont pas clairs, mais ne font pas intervenir la dégradation de Mcl-1, et n'empêchent pas sa liaison avec la protéine pro-apoptotique Bax.

3.10.6. L'abondance des facteurs pro- et anti-apoptotiques dans les cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine, essai de synthèse.

Nous avons analysé l'abondance et la localisation de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules cybrides mutées en vue de chercher un élément de réponse à la sensibilité accrue des cellules cybrides mutées face à l'apoptose. Parmi les différents acteurs analysés comme le cytochrome c, Bcl-X_L, Bcl-2, Mcl-1 et Bax, seuls des changements différentiels dans l'abondance de la protéine Mcl-1 entre les deux lignées en réponse à la staurosporine ont été observés (figure 3.19). Un des éléments déclencheurs de l'apoptose induite par la staurosporine pourrait être la disparition de la protéine Mcl-1, phénomène plus important dans les cellules cybrides mutées. Cette protéine, qui jouerait un rôle précoce dans l'initiation de la réponse apoptotique, est constamment synthétisée et dégradée, et il semble que sa dégradation par le protéasome soit dans certaines cellules un élément requis au déclenchement de l'apoptose. De plus, la phosphorylation à laquelle Mcl-1 semble être soumise provoquerait une inhibition de ses fonctions anti-apoptotiques.

Enfin, même si cet effet est comparable dans les deux lignées cellulaires, la staurosporine engendre une augmentation de l'abondance de la protéine Bax. Dans l'ensemble, cette molécule provoque donc un déséquilibre entre protéines pro- et anti-

apoptotiques, en faveur des protéines pro-apoptotiques, ce qui permet le déclenchement de l'apoptose, et ce d'autant plus efficacement dans les cellules cybrides mutées.

Un point qui reste nébuleux est la libération du cytochrome c qui n'est visible dans aucune des deux lignées cellulaires, même si cela ne signifie pas qu'elle n'a pas lieu. Le processus apoptotique est un processus cinétique, et 4 heures d'incubation ne sont peut-être pas suffisantes pour détecter la libération du cytochrome c, ce que nous pourrions tenter de vérifier avec des incubations plus longues des cellules en présence de la molécule.

Malgré tout, la protéine Mcl-1 est un bon candidat pouvant intervenir dans la sensibilité différentielle que présentent les cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine, et des études sur la régulation de la synthèse et de la dégradation de cette protéine pourraient aider à interpréter cette différence de sensibilité.

Ces études non exhaustives ne portent que sur quelques candidats majeurs potentiellement impliqués dans la mortalité cellulaire induite par la staurosporine et susceptibles de donner des pistes permettant d'expliquer la réponse différente observée pour des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial lors d'une incubation avec un inducteur de l'apoptose comme la staurosporine. Les cellules cybrides MERRF, portant la mutation (A8344G) à l'état hétéroplasmique dans le génome mitochondrial, sont, comme nous l'avons montré, plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine que les cellules cybrides sauvages et cette sensibilité accrue est corrélée à une plus faible activation de la caspase-3 résultant peut-être d'une modification des abondances relatives des protéines Mcl-1 et Bax dans les mitochondries de ces cellules. Cependant, les mécanismes impliqués dans la réponse cellulaire à la staurosporine sont encore largement inconnus et probablement multiples. Afin de mieux les étudier, nous allons, dans une analyse préliminaire, élargir le champ d'investigation en nous intéressant, au niveau transcriptomique, aux modifications éventuelles d'expression de gènes codant pour des acteurs de l'apoptose dans les deux lignées cellulaires en réponse à la staurosporine.

3.11. Analyse de l'expression différentielle de gènes dans des cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à la staurosporine

Dans cette étude, nous avons utilisé la « DualChipTM Human Apoptosis », un microarray permettant la quantification de l'expression, au niveau transcriptomique, de 135 gènes codant pour des marqueurs, des effecteurs, ou encore des modulateurs de la réponse apoptotique, des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire, des protéines de réponse aux stressés... (voir « design » du damier et liste de gènes analysables en Annexes IV et V).

Avant d'exposer et d'analyser les résultats obtenus, précisons que les hybridations n'ont été réalisées qu'une seule fois et que la validité et la reproductibilité des résultats ne sont pas établies à ce stade du travail. Des expériences visant à confirmer ces données indicatives préliminaires devront donc être réalisées ultérieurement en triplicats d'extraction, afin de confirmer ou d'infirmer les résultats présentés ci-dessous.

L'analyse de l'expression génique des cellules cybrides sauvages et mutées préalablement incubées pendant 6 h en présence de 100 nM de staurosporine a été réalisée à l'aide du microdamier « DualChipTM Human Apoptosis ». Après extraction de l'ARN total, les ARN messagers correspondant à 20 µg d'ARN total sont rétrotranscrits en ADNc en présence de nucléotides biotinylés puis hybridés sur le microdamier. Enfin, la révélation est effectuée avec un anticorps anti-biotine conjugué à la cyanine 3. Des programmes informatiques permettent de quantifier et de normaliser l'intensité des spots afin d'analyser l'expression génique.

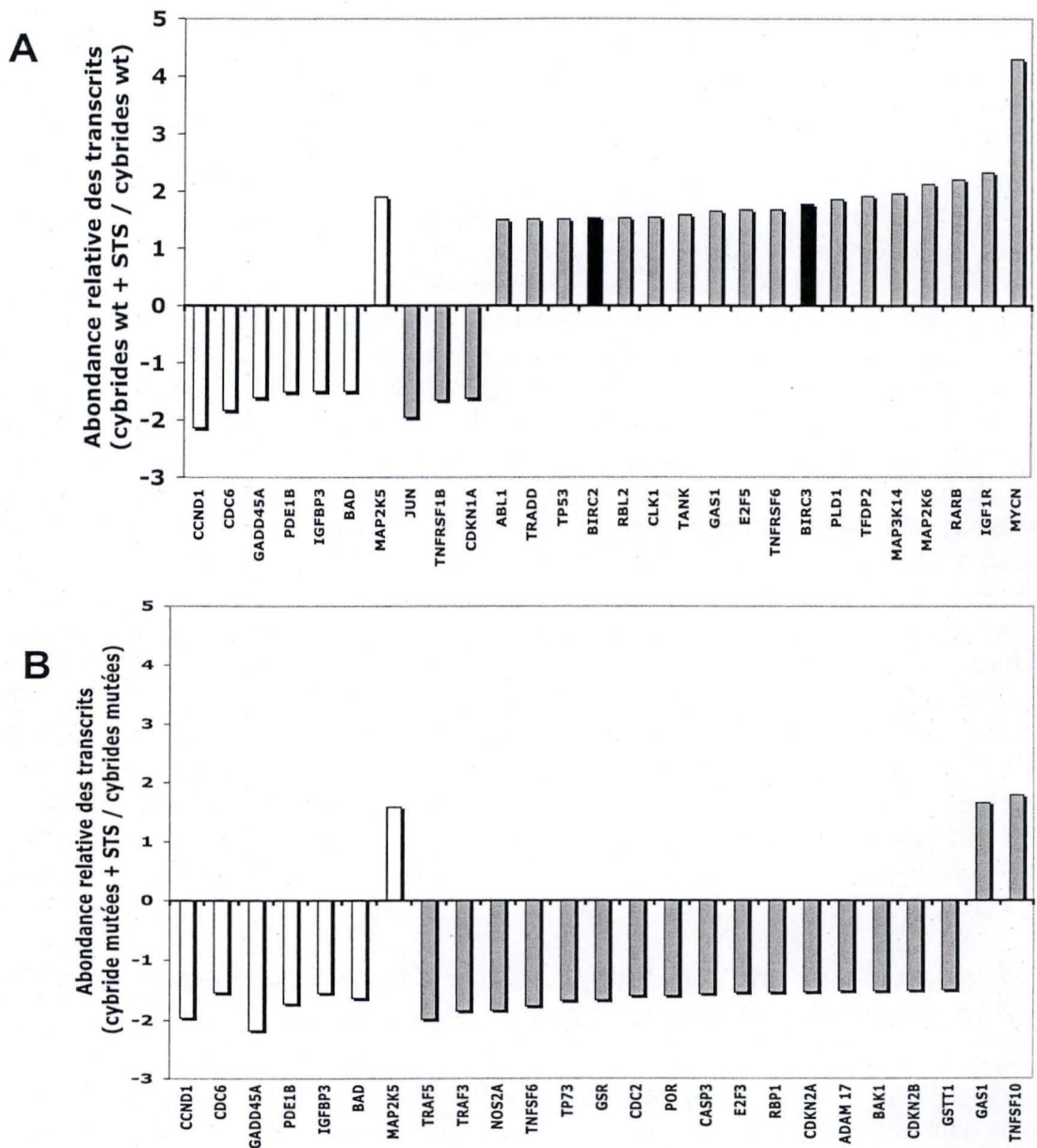


Figure 3.21: Effet de la staurosporine sur l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose, dans la signalisation cellulaire et / ou dans la régulation du cycle cellulaire dans des cellules cybrides sauvages (A) ou mutées (B). Les cellules ont été incubées ou non en présence de staurosporine à 100 nM pendant 6h, puis l'ARN total a été extrait et l'ARNm contenu dans 20 µg ont été rétrotranscrits en ADNc en présence de nucléotides biotinylés. Ces ADNc ont ensuite été hybridés sur le damier «DualChip™ human apoptosis». La révélation est faite grâce à un anticorps anti-biotine couplé à la cyanine 3. Une valeur de ratio quantitative et significative signifie que l'intensité des spots a pu être détectée après hybridation et quantifiée pour la même sonde de capture dans les deux conditions, test et référence, et que le ratio sort de l'intervalle de confiance déterminé sur base des ratios obtenus pour les gènes de maintenance (« house keeping genes »).

Pour rappel, l'expression génique dans la condition test (cellules cybrides sauvages ou mutées traitées avec la staurosporine) est normalisée par rapport à une série de contrôles présentés dans la partie « matériel et méthodes » et par rapport à l'expression génique de la condition référence (cellules cybrides sauvages ou mutées non traitées). Les résultats présentés à la figure 3.21 ne reprennent que les valeurs normalisées quantitatives et significatives issues du tableau présenté en annexe VI.

A la figure 3.21.A, nous pouvons voir que 28 gènes sont différentiellement exprimés dans les cellules sauvages en réponse au traitement à la staurosporine. Parmi ceux-ci, 9 sont sous-exprimés et 19 sont surexprimés en réponse au traitement. Dans les cellules cybrides mutées, nous obtenons 25 gènes différentiellement exprimés en réponse à la staurosporine parmi lesquels 22 sont sous-exprimés et seulement 3 sont sur-exprimés (figure 3.21.B).

Signalons encore que l'analyse quantitative du niveau d'expression de ces gènes montrent des valeurs relativement faibles ($-2 < X < 2$) et que les modifications d'expression de certains candidats devraient être confirmées en real-time PCR mais surtout au niveau protéique. Cependant, rappelons que l'induction de l'apoptose par des molécules pro-apoptotiques est un processus non synchrone qui s'étale de 4 à 48 h et qui est incomplet (20 à 70 % des cellules touchées), ce qui conduit à une certaine hétérogénéité dans les préparations d'ARNm (Voehringer et al., 2000).

Il n'entre pas dans le cadre de ce travail de présenter la biologie de tous les gènes identifiés à l'aide du damier comme étant différentiellement exprimés dans ces cellules en réponse à la staurosporine. Notons simplement que de nombreux gènes codent pour des régulateurs et/ou des effecteurs participant au contrôle du cycle cellulaire et à la réparation des dommages à l'ADN. Par souci de clarté et de cohérence, ces gènes sont repris à la table 3.1 en référant à une fonction principale identifiée et nous renvoyons à la figure 3.22 pour localiser les effets du produit de certains gènes dans le contrôle du cycle cellulaire. Dans les lignes qui suivent, nous allons mettre en exergue quelques modifications d'expression génique que nous pouvons mettre en relation avec nos résultats précédents ou avec le modèle cellulaire utilisé. Finalement, nous détaillerons plus particulièrement les gènes *BIRC2* et *BIRC3* qui codent respectivement pour les protéines inhibitrices de caspases cIAP-1 et cIAP-2, qui pourraient se révéler être des candidats intéressants pour comprendre la plus grande résistance des cellules cybrides sauvages en réponse à la staurosporine.

Parmi les 7 gènes dont l'expression est modifiée en réponse à la staurosporine à la fois dans les cellules cybrides sauvages et les cellules cybrides mutées (figure 3.21, colonnes blanches), remarquons la sous-expression de *GADD45* (Growth Arrest DNA-Damage inducible, alpha) codant pour une protéine participant à la réparation des dommages à l'ADN. *GADD45* est connu pour être surexprimé dans des cellules A 431 en réponse à l'EGF (Epidermal-Growth Factor) tant au niveau nucléotidique qu'au niveau protéique par un mécanisme qui implique l'activation de la PKCdelta (Leung et al., 2001). Un des mécanismes d'action de la staurosporine passant par l'inhibition non sélective des PKCs permet donc de comprendre la sous-expression de ce gène.

Parmi les gènes dont l'expression est modifiée spécifiquement dans les cellules cybrides sauvages en réponse à la staurosporine, citons *TP53*, codant pour le facteur de transcription p53. Celui-ci contrôle l'entrée en mitose quand les cellules entrent en phase G2 avec des dommages dans l'ADN ou lors de l'arrêt dans la phase S induit par une déplétion des substrats nécessaires à la synthèse d'ADN. Mécanistiquement, p53 bloque les cellules au checkpoint G2 par une inhibition de cdk2, une kinase dépendante des cyclines. Comme mentionné dans l'introduction (voir point 1.5.6), si les dégâts occasionnés à l'ADN sont trop importants, p53 déclenche la mort cellulaire par apoptose. Rappelons cependant que la régulation de l'activité de ce facteur de transcription est beaucoup plus complexe que la régulation sur le transcrit.

MAP3K14 et	Mitogen activated protein kinase kinase kinase 14	Ser/Thr kinase de réponse aux stressés
MYCN	c-myc (v-myc myelocytomatosis viral related oncogene)	Facteur de transcription impliqué dans la croissance, la division et le métabolisme cellulaire
NOS2A	Nitric oxide synthase 2	NO synthase inductible
PDE1B	Phosphodiesterase 1B	Diestérase dont l'activité est dépendante de la calmoduline et qui régule le taux de cGMP
PLD1	Phospholipase D1	Phospholipase D spécifique de la phosphatidylcholine
POR	Cytochrome p450 oxidoreductase	Oxydoreductase appartenant au complexe du cytochrome P450
RARB	retinoic acid receptor beta	Facteur de transcription (dimérise avec d'autres récepteurs nucléaires)
RBL2	RB2 : retinoblastoma-like 2 p130	Régulateur transcriptionnel de la famille de pRb
RBP1	retinoblastoma binding protein 1 (pRb)	Suppresseur de tumeur – régulateur transcriptionnel
TANK	Traf family member-associated NfKappaB	Molécule adaptatrice de la voie d'activation du facteur de transcription NF-kappa B
TFDP2	transcription factor Dp-2	Partenaire de dimérisation des protéines E2F, activateur de transcription
TNFRSF1B	TNFRII : TNF α -receptor II ou p75	Récepteur au TNFalpha
TNFRSF6	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (FAS)	Récepteur de mort cellulaire
TNFSF10	TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand	Ligand du récepteur au TNF
TP53	p53	Facteur de transcription contrôlant l'entrée en mitose (suppresseur de tumeur)
TP73	P73	Homologue structurel et fonctionnel du suppresseur de tumeur p53
TRADD	TNFRSF1A-associated via death domain TNFRI	Molécule adaptatrice recrutée par le récepteur au TNF activé.
TRAF3	TNF Receptor Associated Factor 3	Protéine adaptatrice associée au récepteur au TNF activé
TRAF5	TNF Receptor Associated Factor 5	Protéine adaptatrice associée au récepteur au TNF activé

Table 3.1. : Liste des gènes présentés à la figure 3.21. dont l'expression varie significativement dans les cellules cybrides sauvages et/ou mutées traitées à la staurosporine. La fonction principale de chaque gène est citée dans la colonne de droite

Annotation	Gène	Fonction principale
ABL1	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	Kinase intervenant dans le cycle cellulaire
ADAM17	a disintegrin and a metalloprotease 17	Metalloendopeptidase impliquée dans la mobilité cellulaire
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death	Protéine pro-apoptotique de la famille Bcl2
BAK1	Bcl-2 antagonist / killer 1	Protéine pro-apoptotique de la famille Bcl2
BIRC2	BIR domain containing protein 2	c-IAP-1, Inhibiteur de caspases
BIRC3	BIR domain containing protein 3	c-IAP-2, Inhibiteur de caspases
CCND1	CyclinD1	Cycline D1 (régulateur des cyclin-dépendant kinases CDK4 et CDK6)
CDC2	Cell division cycle 2	Cyclin dependent protein kinase (transition G1 à S et G2 à M)
CDC6	Cell division cycle 6	Cyclin dependent protein kinase (initiation de la réplication de l'ADN)
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	p21 ^{Waf-1/Clip1} : inhibiteur de cyclin-dépendant kinases (G1)
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A	inhibitor of CDK4 cell cycle
CDKN2B	cyclin-dependent kinase inhibitor 2B	p15 : inhibiteur de CDK4
c-Jun	v-jun sarcoma virus oncogene homolog	partenaire de Fos dans le facteur de transcription AP-1
CLK1	CDC-like kinase 1	Ser/Thr kinase intervenant dans le cycle cellulaire
E2F3	E2F transcription factor 3	Facteur de transcription régulant l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Régulé par pRb
E2F5	E2F transcription factor 5	Facteur de transcription régulant l'entrée en phase S du cycle cellulaire. Régulé par RB2 (p130)
GADD45A	Growth Arrest DNA Damage, alpha	Réparation des dommages à l'ADN
GAS1	Growth arrest-specific 1	Réparation des dommages à l'ADN Arrêt du cycle cellulaire en G1
GSR	Glutathione Reductase	Enzyme antioxydante permettant de réduire le glutathion oxydé
GSTT1	Glutathione S-transferase theta 1	Enzyme impliquée dans les processus de détoxification
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	Récepteur pour le facteur de croissance IGF
IGFBP3	Insulin like growth factor binding protein 3	Modulateur de l'activité des facteurs de croissance IGF
MAP2K5	Mitogen-activated protein kinase kinase 5	Ser/Thr kinase de la famille des MAPK
MAP2K6	Mitogen activated protein kinase kinase 6	Ser/Thr kinase de réponse aux stresses

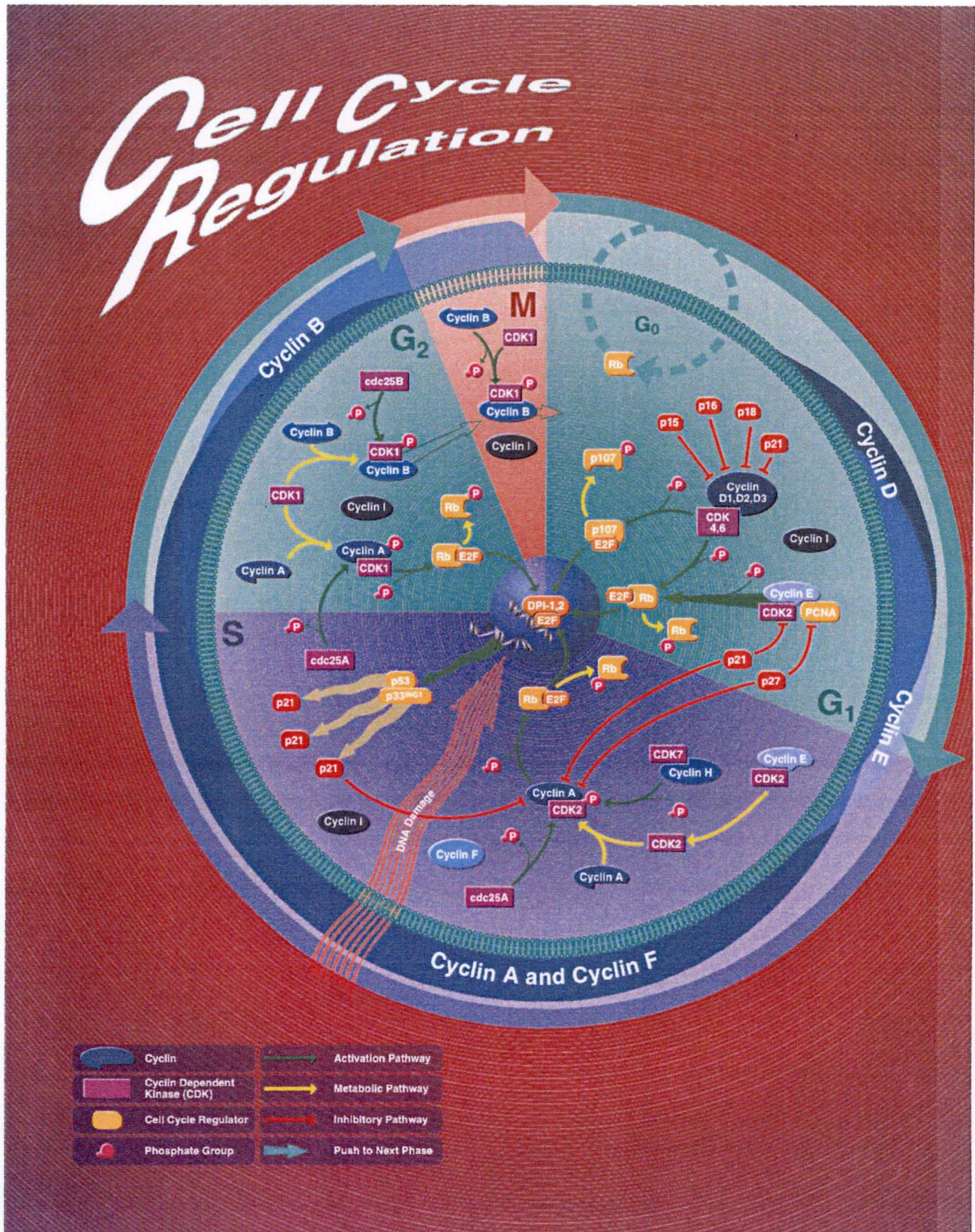


Figure 3.22.: Schéma reprenant les différentes phases du cycle cellulaire (G₁/S/G₂/M) et les différents effecteurs (cyclines/cdk) et régulateurs (E2F, Rb, p21...) qui contrôlent le passage dans chacune des phases. Les relations d'activation et d'inhibition qui relient ces différents acteurs ainsi que les modifications post-traductionnelles qui régissent l'état d'activité et/ou les interactions « protéine-protéine » entre les partenaires sont également représentées.

De même, et de manière très intéressante, BIRC2 et BIRC3 codant respectivement pour les protéines c-IAP-1 et c-IAP-2 inhibitrices des caspases-3,-7, (Roy et al., 1997) et-9 (Deveraux et al., 1998) sont également surexprimés dans les cellules sauvages en réponse à la staurosporine (colonnes noires).

Les protéines inhibitrices d'apoptose IAPs (inhibitory of apoptosis proteins) forment une famille de protéines très conservées d'un point de vue évolutif qui bloquent la progression de l'apoptose en inhibant les caspases (voir introduction point 1.5.3). Ces protéines, surexprimées dans de nombreux cancers humains, contribuent à l'inhibition de l'apoptose observée pendant la tumorigenèse, et confèrent aux cellules tumorales une résistance aux traitements de chimiothérapie et aux radiations. Chez l'homme, il existe au moins six protéines décrites (NIAP, cIAP-1, cIAP-2, XIAP, survivin et BRUCE). L'action des cIAPs est médiée par le domaine BIR (baculovirus IAP repeat) caractérisé par au moins un domaine d'environ 70 acides aminés contenant du Zn, et qui permet aux IAPs de se lier aux caspases. D'autres domaines, appelés domaines RING, ont une fonction d'ubiquitine ligase. Ainsi, un IAP lié à une caspase peut être ubiquitinilé, ce qui engendrerait sa dégradation par le protéasome, ainsi que celle de la caspase lui étant liée (Zimmermann et al., 2001). Par exemple, l'induction de cIAP-2 par des endotoxines comme le LPS permet d'accélérer la dégradation de la caspase-3 active par le protéasome lors d'une stimulation pro-apoptotique induite par un anticorps anti-CD95 mimant l'action Fas-FasL (Mica et al., 2004).

Il est intéressant de constater qu'à la figure 3.7, nous observons une diminution de l'abondance de la forme non clivée de la caspase-3 dans les cellules sauvages incubées en présence de staurosporine qui pourrait s'expliquer par l'action des IAPs.

Les gènes cIAP-1 et cIAP-2 sont donc des candidats potentiels intéressants qui permettraient d'expliquer la plus faible réponse apoptotique (fragmentation de l'ADN et activation de la caspase-3) observée dans les cellules sauvages suite à leur action inhibitrice sur les caspases (figures 3.4 et 3.9).

Comme les résultats de l'hybridation sur microarray indiquent une augmentation du niveau de transcrits des gènes codant pour cIAP-1 et cIAP-2, nous nous sommes intéressés aux données de la littérature relatives au contrôle de l'expression de ce gènes. Plusieurs études montrent que l'expression des IAPs serait dépendante de l'activation du facteur de transcription NF-kappaB (Notarbartolo et al., 2004) qui confère une résistance des cellules à l'apoptose induite par de nombreux stimuli ; la surexpression de cIAP-1 et cIAP-2 offrirait une explication possible, parmi d'autres, de l'effet anti-apoptotique de l'activation de NF-kappaB (Lin et al., 2001).

L'implication éventuelle des IAPs reste donc à établir, ce que nous pourrions envisager 1) en tentant de confirmer cette expression différentielle au niveau protéique et en recherchant la localisation de ces protéines en réponse à la staurosporine, 2) en testant l'effet d'une invalidation de leur expression par un approche de type RNAi ou de leur inhibition par des molécules de petite taille qui miment l'action de Smac (second mitochondria-derived activator of caspase) (« Smac mimetic »), un inhibiteur des IAPs libéré par la mitochondrie lors d'une réponse apoptotique induite par la staurosporine (Zhang et al., 2004).

4. Conclusion et perspectives

4. Conclusions et perspectives

De nombreuses maladies dégénératives sont liées à un dysfonctionnement mitochondrial qui peut être dû à des délétions ou des mutations dans le génome mitochondrial, ou encore à des mutations dans l'ADN génomique. L'apoptose, aussi appelée mort cellulaire programmée est un processus physiologique dans lequel la mitochondrie joue un rôle essentiel et qui semble être impliqué dans les pathologies dégénératives. Dans la littérature, l'étude de l'apoptose dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial a déjà été entreprise sur plusieurs lignées cellulaires, et mène à des conclusions qui sont controversées (voir introduction point 1.6.). Ainsi, nous avons vu qu'un dysfonctionnement mitochondrial peut, en fonction de la lignée cellulaire, de l'origine du dysfonctionnement et de la nature de l'agent inducteur peut sensibiliser ou protéger une cellule de l'apoptose induite.

Dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés au syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers) provoqué par une mutation ponctuelle (A8344G) dans le gène codant l'ARNt liant la lysine, et caractérisé par des symptômes tels que des ataxies cérébrales, des myopathies, de la démence,...(Chomyn, 1998; Graeber et al., 1998). Comme outil d'étude, nous avons utilisé des cellules cybrides obtenues par la fusion de cellules 143B rho⁰ (totalement déplétées en ADNmt) avec des myoblastes énucléés provenant de patients affectés par la mutation A8344G à l'état hétéroplasmique dans l'ADN mitochondrial (= cellules cybrides mutées) ou avec des myoblastes énucléés provenant de sujets sains, et qui nous ont servi de cellules de référence (= cellules cybrides sauvages).

Pour induire l'apoptose, nous avons utilisé la staurosporine, qui est une molécule inhibitrice de nombreuses kinases. Elle induit l'apoptose par au moins trois mécanismes non exclusifs qui sont : 1) une inhibition de plusieurs protéines kinases dont les protéines kinases C (PKCs), 2) une augmentation de la concentration en calcium cytosolique entraînant probablement une modification de la concentration de l'ion dans la matrice mitochondriale et 3) une augmentation de la production mitochondriale de ROS. Par ces trois voies, la staurosporine permettrait la libération du cytochrome c dans le cytosol, ce qui entraîne la formation de l'apoptosome, l'activation des caspases-9 puis -3, et le clivage de nombreux substrats cellulaires.

Dans un premier temps, nous avons montré que les cellules cybrides mutées étaient plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine. Ainsi, cette molécule engendre une rétraction des cellules qui est visible en microscopie à contraste de phase et qui est plus importante dans les cellules cybrides mutées quelle que soit la concentration et le temps d'incubation des cellules avec la staurosporine. De plus, après une incubation des cellules cybrides avec de la staurosporine à 100 et à 500 nM pendant 16 heures, nous avons observé une augmentation de la fragmentation internucléosomale de l'ADN plus importante dans les cellules cybrides mutées (voir figure 3.4.). Nous avons également montré que cette dégradation dépendait des caspases en utilisant un inhibiteur de ces protéases (zVAD-fmk), mais ne dépendait vraisemblablement pas de l'ouverture du PTP (Permeability Transition Pore) dans les conditions expérimentales utilisées. En effet, nous n'observons pas d'effet inhibiteur de la cyclosporine A ni de l'acide bongkrélique, deux molécules inhibitrices de l'ouverture du PTP. Enfin, nous avons étudié l'activation de la caspase-3 par un marquage en immunofluorescence, par un dosage de son activité en présence d'un substrat fluorescent spécifique de cette caspase, et par la visualisation du clivage de la protéine PARP-1 (substrat endogène de l'enzyme) par Western blot, en réponse à une incubation des cellules pendant 4 heures avec de la staurosporine à 100 et/ou à 500 nM (voir figures 3.8., 3.9. et 3.10). Les trois résultats montrent que l'activité de la caspase-3 est plus importante dans les cellules cybrides

mutées que dans les sauvages en réponse à la staurosporine, et ce quelle que soit la concentration de la staurosporine.

Ces résultats sont en accord avec une étude portant sur les cellules cybrides sauvages et mutées qui montre que l'activité de la caspase-3 est supérieure dans les cellules cybrides mutées en réponse aux UV et à la staurosporine (Liu et al., 2004). Ces résultats n'excluent pas que d'autres caspases soient également activées dans ces conditions. Bien que fort probable, n'avons pas non plus établi un lien causal entre l'activation de la caspase-3 et son implication dans la fragmentation de l'ADN. Ceci pourrait être facilement réalisé en recherchant l'effet d'un inhibiteur spécifique de cette protéase comme le Ac-DEVD-CHO sur un test de fragmentation d'ADN.

Néanmoins, nous avons voulu aller plus loin et chercher des éléments pouvant potentiellement expliquer la sensibilité accrue à la staurosporine observée pour les cellules portant la mutation A8344G responsable du syndrome MERRF. Dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial, la concentration en calcium cytosolique est généralement augmentée. La staurosporine modulant la concentration en calcium, nous nous sommes interrogés sur le rôle de ce messenger secondaire sur l'activation de la caspase-3 par la staurosporine. Nous avons donc tenté de moduler l'activation de la caspase-3 en modifiant la concentration en calcium cytosolique grâce à un ionophore dans les cellules sauvages et à un chélateur de calcium dans les cellules mutées. Les résultats que nous avons obtenus suggèrent que le calcium a un effet inhibiteur sur l'activation de la caspase-3 en réponse à la staurosporine, ce qui montre que la sensibilité accrue des cellules cybrides mutées à cette molécule n'est probablement pas due à une concentration calcique plus élevée dans le cytosol de ces cellules. Soulignons encore que l'ionomycine seule n'induit pas d'activation de la caspase-3 dans les cellules sauvages.

Nous avons alors entrepris de caractériser l'abondance et la localisation de protéines pro- (Bax et le cytochrome c) et anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1) en Western blot réalisés sur des fractions cellulaires enrichies en protéines cytosoliques, mitochondriales ou nucléaires préparées à partir de cellules cybrides sauvages et mutées incubées avec de la staurosporine à 500 nM pendant 4 heures. La staurosporine provoque deux changements majeurs dans l'abondance de ces protéines, qui pourraient aider à comprendre la plus grande sensibilité des cellules cybrides mutées à cet inducteur de l'apoptose. Premièrement, la protéine anti-apoptotique Mcl-1 est dégradée et semble phosphorylée dans les deux lignées cellulaires suite à l'incubation, mais l'abondance de la protéine retrouvée dans les fractions mitochondriales de cellules cybrides mutées diminue de manière plus importante. Deuxièmement, la molécule engendre, dans les deux lignées cellulaires, une augmentation de l'abondance de la protéine Bax dans les fractions mitochondriales. Ainsi, au niveau de cet organite clef, la staurosporine induit une débalance entre facteurs pro- et anti-apoptotiques, en faveur des protéines pro-apoptotiques, et la débalance est plus importante dans les cellules cybrides mutées, ce qui est en accord avec leur sensibilité accrue. Rappelons que la protéine Bax agit en perméabilisant la membrane mitochondriale externe, par la formation de pores, ou en permettant l'ouverture du PTP par exemple (Adams et al., 1998; Gross et al., 1999). La protéine Mcl-1 agit en empêchant cette perméabilisation de la membrane mitochondriale externe, en liant les protéines pro-apoptotiques dont Bax (Michels et al., 2005). Il serait intéressant de vérifier que, dans les cellules cybrides sauvages et mutées, les protéines Bax et Mcl-1 interagissent, ce qui sera réalisé par des expériences d'immunoprécipitation. Nous pourrions ainsi immunoprécipiter Bax et rechercher l'abondance de Mcl-1 co-immunoprécipité dans les deux lignées et rechercher l'effet de la staurosporine sur cette interaction.

Une hypothèse que nous pouvons émettre est qu'en condition basale, le rapport d'abondance entre protéines pro- et anti-apoptotique est tel que la membrane mitochondriale

externe est suffisamment imperméable que pour empêcher la libération des facteurs pro-apoptotiques présent dans l'espace intermembranaire. Le traitement des cellules avec la staurosporine induit un déséquilibre du rapport d'abondance de facteurs pro- / anti-apoptotiques, et ce de manière plus importante dans les cellules cybrides mutées, ce qui est en accord avec la sensibilité plus grande que présentent ces cellules à la staurosporine.

De plus, la dégradation de la protéine Mcl-1 peut avoir deux origines. Cette protéine possède dans sa séquence primaire, une séquence PEST, ce qui provoque son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, ce qui explique que Mcl-1 ait un « turnover » rapide (temps 1/2 vie : 3 heures). Cependant, Mcl-1 est également un substrat des caspases actives qui, lorsqu'il est clivé par ces protéases acquiert une activité pro-apoptotique (par des mécanismes non élucidés). Ainsi, cette protéine a un rôle clef dans l'initiation du processus apoptotique, en permettant un phénomène d'amplification (Packham et al., 2005).

Il est cependant troublant de ne pas observer dans nos résultats de délocalisation du cytochrome c en réponse à la staurosporine, ce qui était un résultat attendu. Néanmoins, la cinétique du processus apoptotique est telle que la libération du cytochrome c n'est peut-être pas visible après 4 heures d'incubation, ce qui serait vérifiable par des incubations plus longues avec la molécule. Ajoutons encore que sur des 143B traitées à la staurosporine, Duan et collaborateurs (2003) montrent que ce processus peut prendre 8 heures. Cependant, après 4 heures, nous obtenons déjà une activation de la caspase-3 en réponse à la staurosporine, surtout dans les cellules mutées. Nous émettons donc l'hypothèse que la technique du Western blot pourrait ne pas être suffisamment sensible que pour pouvoir détecter une faible libération du cytochrome c. En effet, sur base de nos résultats, il est impossible de déterminer le pourcentage de cellules qui répondent à l'apoptose et d'obtenir des informations sur l'importance de l'activation de la caspase-3 par rapport à une activation maximale. L'utilisation d'un kit permettant le dosage de la libération du cytochrome c de manière plus sensible pourrait être une approche intéressante pour analyser le phénomène. Enfin, des marquages du cytochrome c en immunofluorescence dans des cellules incubées ou non en présence de staurosporine permettraient également de visualiser libération du cytochrome c.

Nous avons terminé ce travail par l'analyse de modifications de l'expression de gènes dans des cellules cybrides sauvages et mutées en réponse à une incubation de 6 heures en présence de staurosporine à 100 nM. Pour ce faire, nous avons utilisé un damier, le « DualChip Human Apoptosis », porteur de sondes de capture permettant l'analyse de l'abondance de transcrits codant pour des marqueurs, des effecteurs, ou encore des modulateurs de la réponse apoptotique mais aussi pour des protéines impliquées dans la régulation du cycle cellulaire. Parmi toute une série de modifications d'expression de gènes, deux d'entre eux ont particulièrement retenu notre attention : *BIRC2* et *BIRC3* codant respectivement pour c-IAP-1 et c-IAP-2 sont deux gènes surexprimés dans les cellules cybrides sauvages en réponse à la staurosporine, et pas dans les cellules mutées. Les IAPs (inhibitors of apoptosis) sont des protéines qui inhibent l'apoptose en se liant aux caspases, protéases essentielles au déroulement de ce processus, et en provoquant leur dégradation par le protéasome. Ainsi, la surexpression de ces deux gènes dans les cellules cybrides sauvages pourrait être un élément supplémentaire intéressant permettant de mieux comprendre la résistance que présentent les cellules cybrides sauvages à la staurosporine par rapport aux cellules cybrides mutées. Des expériences supplémentaires doivent cependant être envisagées pour établir si les c-IAPs interviennent bien dans cette sensibilité différentielle. Nous pourrions tout d'abord rechercher l'abondance des protéines c-IAPs par des Western blot effectués sur des extraits obtenus à partir des cellules cybrides sauvages et mutées traitées ou non à la staurosporine, afin de confirmer les différences d'expression au niveau protéique. Ensuite, l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) empêchant l'expression de ces protéines dans les cellules cybrides sauvages devrait, si l'hypothèse émise est correcte,

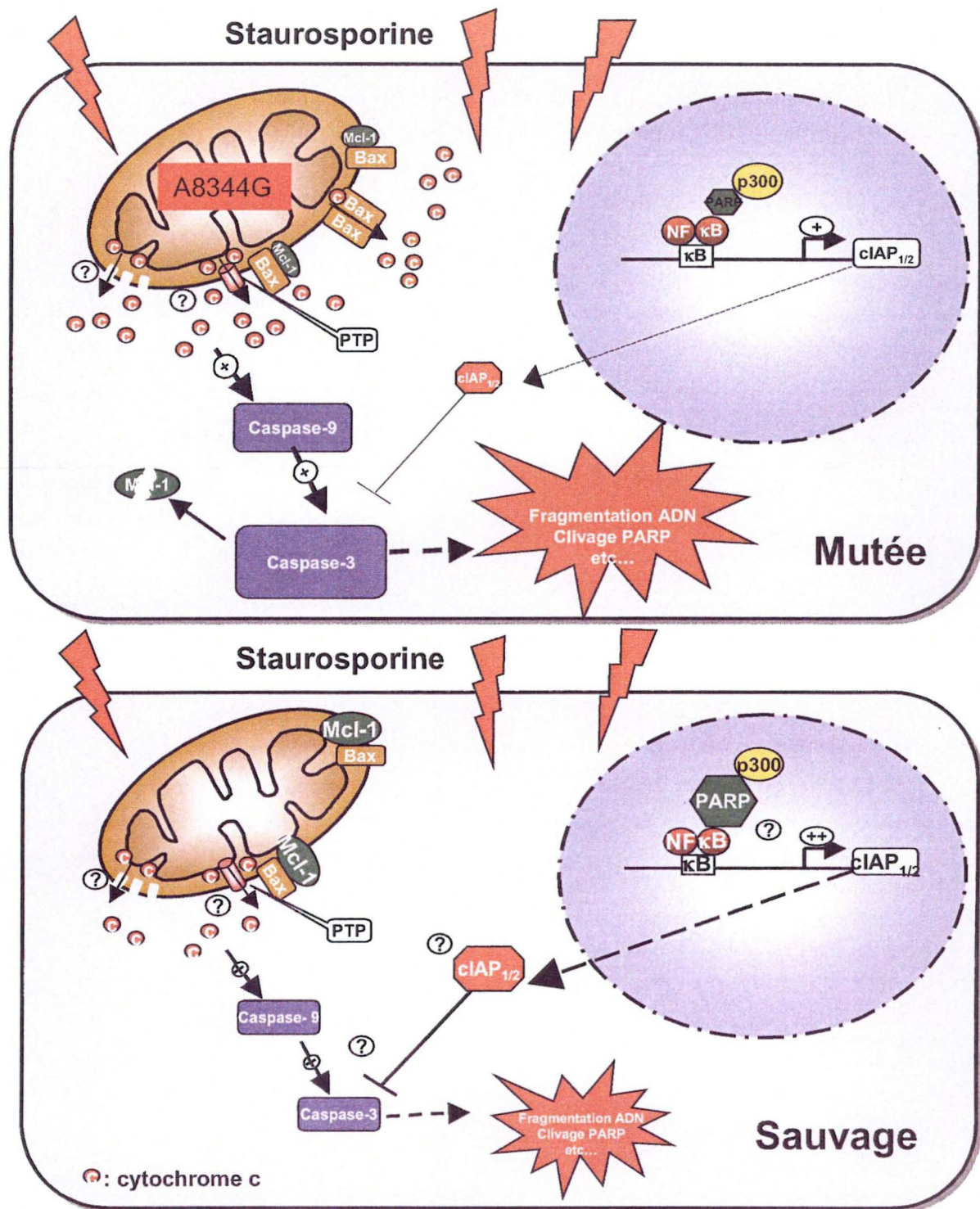


Figure 4.1 : Schéma hypothétique reprenant les acteurs moléculaires identifiés dans ce travail susceptibles d'expliquer la plus grande sensibilité des cellules cybrides portant la mutation MERRF (A8344G) dans le génome mitochondrial à la staurosporine. La sensibilité des cellules **mutées** caractérisée par une activation de la caspase-3 et une fragmentation de l'ADN plus élevée pourrait refléter un rapport Mcl-1/Bax plus faible en raison d'une plus forte dégradation de Mcl-1 par la caspase-3 activée permettant un renforcement de la libération de cytochrome c par la mitochondrie. La résistance relative des cellules **sauvages** pourrait également faire intervenir la surexpression des IAPs par un mécanisme dépendant de NFκB, dont l'activité serait augmentée par la présence de PARP-1 moins clivé dans ces cellules en réponse à la staurosporine (voir texte pour plus de détails). L'importance supposée de l'abondance des acteurs et de leur(s) effet(s) est proportionnelle à l'épaisseur des traits et taille des icônes. ? : Etapes non élucidées et/ou à confirmer.

augmenter leur sensibilité à la staurosporine, ce qui pourrait être mesuré par un dosage de la fragmentation d'ADN ou de l'activité de la caspase-3. L'utilisation de petits peptides mimant la protéine Smac (qui est une protéine inhibitrice des IAPs) pourrait se révéler être une approche intéressante également.

Pour aller un peu plus loin, nous nous sommes intéressés à ce qui est décrit sur la régulation des gènes *BIRC2* (c-IAP-1) et *BIRC3* (c-IAP-2). Ces gènes, ainsi que le gène *Bcl-X_L*, sont sous le contrôle du facteur de transcription NF-kappaB qui est connu pour sa capacité de protéger les cellules contre la mort par apoptose (Busuttill et al., 2002; Munzert et al., 2002). De plus, il a été montré que dans la microglie, la liaison du facteur de transcription NF-kappaB à l'ADN était facilitée par la protéine PARP-1, peut-être par des réactions de poly-ADP ribosylation. Ainsi, nous pouvons proposer un modèle hypothétique de la régulation des gènes c-IAP-1 et c-IAP-2 par le facteur de transcription NF-kappaB en association avec la protéine PARP-1, et un facteur comme P300/CBP qui rendrait l'ADN accessible en acétylant les protéines comme les histones. Comme nous l'avons montré, la protéine PARP-1 est clivée suite à un traitement à la staurosporine et ce de manière moins importante dans les cellules cybrides sauvages, ce qui pourrait peut-être expliquer la surexpression de *BIRC2* et *BIRC3* observée dans ces cellules. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions envisager l'étude de l'activation du facteur de NF-kappaB dans les cellules cybrides sauvages et mutées suite à une incubation avec la staurosporine. Ceci pourrait être réalisable par des tests de liaison à l'ADN du facteur NF-kappaB dans des cellules cybrides sauvages et mutées, ou en transfectant les deux lignées cellulaires avec un rapporteur pour NF-kappaB. Nous pourrions également utiliser un inhibiteur de NF-kappaB comme la molécule Bay, et analyser l'abondance des transcrits pour *Birc2* et *Birc3* par Real Time PCR.

En conclusion, nous pouvons dire que les cellules cybrides mutées sont plus sensibles à l'apoptose induite par la staurosporine que ne le sont les cellules cybrides sauvages. La staurosporine agit sur ces cellules en provoquant une dégradation de Mcl-1 (plus importante dans les cellules cybrides mutées) et une augmentation d'abondance de la protéine Bax dans les mitochondries, ce qui devrait conduire à une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale externe et donc à une libération du cytochrome c. L'activation des caspases suite au traitement pourrait être moins importante (comme mesurée pour la caspase-3) dans les cellules cybrides sauvages, en raison d'une libération plus faible du cytochrome c et/ou de la surexpression des gènes IAPs, peut-être sous contrôle du facteur de transcription NF-kappaB en interaction avec les protéines p300 et PARP-1. Rappelons que la forme active (non clivée) de cette dernière est moins abondante dans les cellules mutées suite à sa possible dégradation par les caspases (voir figure 4.1.).

Ce travail permet donc de compléter des études déjà effectuées sur le sujet, qui montrent une mortalité et une activation de la caspase-3 plus importantes pour des cellules cybrides mutées que pour des cellules sauvages lors d'un traitement à la staurosporine. Nous avons ici présenté des mécanismes potentiels qui demandent à être confirmés mais qui sont de nouvelles pistes visant à expliquer la différence de sensibilité des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial à un inducteur apoptotique comme la staurosporine. Néanmoins, de nombreuses études sur des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial dans la littérature montrent que la sensibilité des cellules à l'apoptose peut dépendre des mécanismes inducteurs. Ainsi, les cellules cybrides mutées sont plus sensibles à la staurosporine, mais cela ne signifie pas que la mutation MERRF sensibilise les cellules à d'autres types de stress cellulaires. Des études complémentaires comparatives pourraient donc être également entreprises pour d'autres stress. Le résultat de ces études devrait permettre de mieux comprendre la mécanistique des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial à l'apoptose spontanée ou induite et ainsi de parfaire nos connaissances sur les

maladies mitochondriales souvent dégénératives dues à de cellules présentant une déficience de l'activité mitochondriale dans lesquelles l'apoptose est de plus en plus suspectée.

5. Bibliographie

5. Bibliographie

- Adams, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* **17**, 2481-95 (2003).
- Adams, J. M. & Cory, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* **281**, 1322-6 (1998).
- Akao, Y., Otsuki, Y., Kataoka, S., Ito, Y. & Tsujimoto, Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* **54**, 2468-71 (1994).
- Amuthan, G. et al. Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene* **21**, 7839-49 (2002).
- Andrikoula, M. & Tsatsoulis, A. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid disease. *Eur J Endocrinol* **144**, 561-8 (2001).
- Arabi, A. et al. c-Myc associates with ribosomal DNA and activates RNA polymerase I transcription. *Nat Cell Biol* **7**, 303-10 (2005).
- Araki, T. et al. Down-regulation of Mcl-1 by inhibition of the PI3-K/Akt pathway is required for cell shrinkage-dependent cell death. *Biochem Biophys Res Commun* **290**, 1275-81 (2002).
- Arnould, T. et al. mtCLIC is up-regulated and maintains a mitochondrial membrane potential in mtDNA-depleted L929 cells. *Faseb J* **17**, 2145-7 (2003).
- Arnould, T. et al. CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *Embo J* **21**, 53-63 (2002).
- Asoh, S. & Ohta, S. Bcl-2 completely blocks Fas-mediated apoptosis in mtDNA-depleted HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **237**, 659-62 (1997).
- Beal, M. F. Less stress, longer life. *Nat Med* **11**, 598-9 (2005).
- Bertolotto, C., Maulon, L., Filippa, N., Baier, G. & Auberger, P. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD. *J Biol Chem* **275**, 37246-50 (2000).
- Biswas, G. et al. Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *Embo J* **18**, 522-33 (1999).
- Bolkent, S. & Zierold, K. Effects of the ionophores valinomycin, ionomycin and gramicidin A on the element compartmentation in cultured rat hepatocytes. *Toxicol In Vitro* **16**, 159-65 (2002).
- Boulares, A. H. et al. Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. Caspase 3-resistant PARP mutant increases rates of apoptosis in transfected cells. *J Biol Chem* **274**, 22932-40 (1999).
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54 (1976).
- Brini, M. et al. A calcium signaling defect in the pathogenesis of a mitochondrial DNA inherited oxidative phosphorylation deficiency. *Nat Med* **5**, 951-4 (1999).
- Broekemeier, K. M. & Pfeiffer, D. R. Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* **163**, 561-6 (1989).

- Brookes, P. S., Yoon, Y., Robotham, J. L., Anders, M. W. & Sheu, S. S. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**, C817-33 (2004).
- Buchet, K. & Godinot, C. Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem* **273**, 22983-9 (1998).
- Busuttill, V. et al. Blocking NF-kappaB activation in Jurkat leukemic T cells converts the survival agent and tumor promoter PMA into an apoptotic effector. *Oncogene* **21**, 3213-24 (2002).
- Butow, R. A. & Avadhani, N. G. Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* **14**, 1-15 (2004).
- Cai, J., Wallace, D. C., Zhivotovsky, B. & Jones, D. P. Separation of cytochrome c-dependent caspase activation from thiol-disulfide redox change in cells lacking mitochondrial DNA. *Free Radic Biol Med* **29**, 334-42 (2000).
- Cardoso, S. M., Rego, A. C., Penacho, N. & Oliveira, C. R. Apoptotic cell death induced by hydrogen peroxide in NT2 parental and mitochondrial DNA depleted cells. *Neurochem Int* **45**, 693-8 (2004).
- Cardoso, S. M., Santos, S., Swerdlow, R. H. & Oliveira, C. R. Functional mitochondria are required for amyloid beta-mediated neurotoxicity. *Faseb J* **15**, 1439-41 (2001).
- Chakraborti, T., Das, S., Mondal, M., Roychoudhury, S. & Chakraborti, S. Oxidant, mitochondria and calcium: an overview. *Cell Signal* **11**, 77-85 (1999).
- Chomyn, A. The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet* **62**, 745-51 (1998).
- Delsite, R., Kachhap, S., Anbazhagan, R., Gabrielson, E. & Singh, K. K. Nuclear genes involved in mitochondria-to-nucleus communication in breast cancer cells. *Mol Cancer* **1**, 6 (2002).
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. & Wu, X. A JNK-dependent pathway is required for TNFalpha-induced apoptosis. *Cell* **115**, 61-70 (2003).
- Desagher, S. & Martinou, J. C. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* **10**, 369-77 (2000).
- Deveraux, Q. L. et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J* **17**, 2215-23 (1998).
- Du, L. et al. Intra-mitochondrial poly(ADP-ribosylation) contributes to NAD⁺ depletion and cell death induced by oxidative stress. *J Biol Chem* **278**, 18426-33 (2003).
- Dumont, A. et al. Hydrogen peroxide-induced apoptosis is CD95-independent, requires the release of mitochondria-derived reactive oxygen species and the activation of NF-kappaB. *Oncogene* **18**, 747-57 (1999).
- Dynlacht, J. R., Earles, M., Henthorn, J. & Seno, J. D. Different patterns of DNA fragmentation and degradation of nuclear matrix proteins during apoptosis induced by radiation, hyperthermia or etoposide. *Radiat Res* **154**, 515-30 (2000).
- Enriquez, J. A., Chomyn, A. & Attardi, G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet* **10**, 47-55 (1995).
- Feng, G. & Kaplowitz, N. Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G825-34 (2002).
- Franzoso, G., Zazzeroni, F. & Papa, S. JNK: a killer on a transcriptional leash. *Cell Death Differ* **10**, 13-5 (2003).
- Fuhrmann, G. et al. The MYC dualism in growth and death. *Mutat Res* **437**, 205-17 (1999).
- Gidon-Jeangirard, C. et al. Annexin V counteracts apoptosis while inducing Ca²⁺ influx in human lymphocytic T cells. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 709-15 (1999).

- Gil, J., Almeida, S., Oliveira, C. R. & Rego, A. C. Cytosolic and mitochondrial ROS in staurosporine-induced retinal cell apoptosis. *Free Radic Biol Med* **35**, 1500-14 (2003).
- Gojo, I., Zhang, B. & Fenton, R. G. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol induces apoptosis in multiple myeloma cells through transcriptional repression and down-regulation of Mcl-1. *Clin Cancer Res* **8**, 3527-38 (2002).
- Graeber, M. B. & Muller, U. Recent developments in the molecular genetics of mitochondrial disorders. *J Neurol Sci* **153**, 251-63 (1998).
- Grandori, C. et al. c-Myc binds to human ribosomal DNA and stimulates transcription of rRNA genes by RNA polymerase I. *Nat Cell Biol* **7**, 311-8 (2005).
- Gray, M. W., Burger, G. & Lang, B. F. Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-81 (1999).
- Grewal, S. S., Li, L., Orian, A., Eisenman, R. N. & Edgar, B. A. Myc-dependent regulation of ribosomal RNA synthesis during *Drosophila* development. *Nat Cell Biol* **7**, 295-302 (2005).
- Gross, A., McDonnell, J. M. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**, 1899-911 (1999).
- Gunter, T. E., Yule, D. I., Gunter, K. K., Eliseev, R. A. & Salter, J. D. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* **567**, 96-102 (2004).
- Hagemann, C. & Blank, J. L. The ups and downs of MEK kinase interactions. *Cell Signal* **13**, 863-75 (2001).
- Hajnoczky, G., Davies, E. & Madesh, M. Calcium signaling and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **304**, 445-54 (2003).
- Harris, E. D. Regulation of antioxidant enzymes. *J Nutr* **122**, 625-6 (1992).
- Haupt, S., Berger, M., Goldberg, Z. & Haupt, Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci* **116**, 4077-85 (2003).
- Hoetelmans, R. et al. Bcl-2 and Bax proteins are present in interphase nuclei of mammalian cells. *Cell Death Differ* **7**, 384-92 (2000).
- Huang, H. M., Huang, C. J. & Yen, J. J. Mcl-1 is a common target of stem cell factor and interleukin-5 for apoptosis prevention activity via MEK/MAPK and PI-3K/Akt pathways. *Blood* **96**, 1764-71 (2000).
- Iaccarino, I., Hancock, D., Evan, G. & Downward, J. c-Myc induces cytochrome c release in Rat1 fibroblasts by increasing outer mitochondrial membrane permeability in a Bid-dependent manner. *Cell Death Differ* **10**, 599-608 (2003).
- Inoshita, S. et al. Phosphorylation and inactivation of myeloid cell leukemia 1 by JNK in response to oxidative stress. *J Biol Chem* **277**, 43730-4 (2002).
- James, A. M., Wei, Y. H., Pang, C. Y. & Murphy, M. P. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* **318** (Pt 2), 401-7 (1996).
- Jiang, S., Cai, J., Wallace, D. C. & Jones, D. P. Cytochrome c-mediated apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. Signaling pathway involving release and caspase 3 activation is conserved. *J Biol Chem* **274**, 29905-11 (1999).
- Jiang, X. & Wang, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu Rev Biochem* **73**, 87-106 (2004).
- Jin, Z., Xin, M. & Deng, X. Survival function of protein kinase C ζ as a novel nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-activated bad kinase. *J Biol Chem* **280**, 16045-52 (2005).
- Juin, P. et al. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol* **22**, 6158-69 (2002).

- Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y. & Hunter, T. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J Biol Chem* **280**, 857-60 (2005).
- Kaufmann, J. A. et al. Free radical-dependent nuclear localization of Bcl-2 in the central nervous system of aged rats is not associated with Bcl-2-mediated protection from apoptosis. *J Neurochem* **87**, 981-94 (2003).
- King, M. P. & Attardi, G. Isolation of human cell lines lacking mitochondrial DNA. *Methods Enzymol* **264**, 304-13 (1996).
- Kleefstrom, J., Verschuren, E. W. & Evan, G. c-Myc augments the apoptotic activity of cytosolic death receptor signaling proteins by engaging the mitochondrial apoptotic pathway. *J Biol Chem* **277**, 43224-32 (2002).
- Kroemer, G. & Reed, J. C. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* **6**, 513-9 (2000).
- Kurland, J. F., Voehringer, D. W. & Meyn, R. E. The MEK/ERK pathway acts upstream of NF kappa B1 (p50) homodimer activity and Bcl-2 expression in a murine B-cell lymphoma cell line. MEK inhibition restores radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 32465-70 (2003).
- Lampe, P. A., Cornbrooks, E. B., Juhasz, A., Johnson, E. M., Jr. & Franklin, J. L. Suppression of programmed neuronal death by a thapsigargin-induced Ca²⁺ influx. *J Neurobiol* **26**, 205-12 (1995).
- Lee, M. S., Kim, J. Y. & Park, S. Y. Resistance of rho(0) cells against apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1011**, 146-53 (2004).
- Leung, C. H. et al. PKCdelta-dependent deubiquitination and stabilization of Gadd45 in A431 cells overexposed to EGF. *Biochem Biophys Res Commun* **285**, 283-8 (2001).
- Li, H., Telemaque, S., Miller, R. E. & Marsh, J. D. High glucose inhibits apoptosis induced by serum deprivation in vascular smooth muscle cells via upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl. *Diabetes* **54**, 540-5 (2005).
- Lin, H., Chen, C. & Chen, B. D. Resistance of bone marrow-derived macrophages to apoptosis is associated with the expression of X-linked inhibitor of apoptosis protein in primary cultures of bone marrow cells. *Biochem J* **353**, 299-306 (2001).
- Liu, C. Y., Lee, C. F., Hong, C. H. & Wei, Y. H. Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1011**, 133-45 (2004).
- Loeffler, M. & Kroemer, G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res* **256**, 19-26 (2000).
- Lotem, J. & Sachs, L. Different mechanisms for suppression of apoptosis by cytokines and calcium mobilizing compounds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 4601-6 (1998).
- Madash, M. & Balasubramanian, K. A. Activation of liver mitochondrial phospholipase A2 by superoxide. *Arch Biochem Biophys* **346**, 187-92 (1997).
- Marusich, M. F. et al. Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome. *Biochim Biophys Acta* **1362**, 145-59 (1997).
- Masmoudi, A., Islam, F. & Mandel, P. ADP-ribosylation of highly purified rat brain mitochondria. *J Neurochem* **51**, 188-93 (1988).
- Massaad, C. A., Portier, B. P. & Taglialatela, G. Inhibition of transcription factor activity by nuclear compartment-associated Bcl-2. *J Biol Chem* **279**, 54470-8 (2004).
- Masucci, J. P., Davidson, M., Koga, Y., Schon, E. A. & King, M. P. In vitro analysis of mutations causing myoclonus epilepsy with ragged-red fibers in the mitochondrial tRNA(Lys) gene: two genotypes produce similar phenotypes. *Mol Cell Biol* **15**, 2872-81 (1995).

- Mates, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* **153**, 83-104 (2000).
- McConkey, D. J. & Orrenius, S. The role of calcium in the regulation of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 357-66 (1997).
- Mica, L., Harter, L., Trentz, O. & Keel, M. Endotoxin reduces CD95-induced neutrophil apoptosis by cIAP-2-mediated caspase-3 degradation. *J Am Coll Surg* **199**, 595-602 (2004).
- Miceli, M. V. & Jazwinski, S. M. Common and cell type-specific responses of human cells to mitochondrial dysfunction. *Exp Cell Res* **302**, 270-80 (2005).
- Michels, J., Johnson, P. W. & Packham, G. Mcl-1. *Int J Biochem Cell Biol* **37**, 267-71 (2005).
- Mootha, V. K. et al. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. *Cell* **115**, 629-40 (2003).
- Mroczek-Tonska, K., Kisiel, B., Piechota, J. & Bartnik, E. Leber hereditary optic neuropathy - a disease with a known molecular basis but a mysterious mechanism of pathology. *J Appl Genet* **44**, 529-38 (2003).
- Munzert, G. et al. Tumor necrosis factor receptor-associated factor 1 gene overexpression in B-cell chronic lymphocytic leukemia: analysis of NF-kappa B/Rel-regulated inhibitors of apoptosis. *Blood* **100**, 3749-56 (2002).
- Murphy, K. M., Ranganathan, V., Farnsworth, M. L., Kavallaris, M. & Lock, R. B. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* **7**, 102-11 (2000).
- Nakajima, H. et al. Critical role of the automodification of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in nuclear factor-kappaB-dependent gene expression in primary cultured mouse glial cells. *J Biol Chem* **279**, 42774-86 (2004).
- Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Lehninger - Principles of Biochemistry* (Worth Publishers, 2000).
- Notarbartolo, M. et al. Expression of the IAPs in multidrug resistant tumor cells. *Oncol Rep* **11**, 133-6 (2004).
- Omura, S. et al. A new alkaloid AM-2282 OF *Streptomyces* origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization. *J Antibiot (Tokyo)* **30**, 275-82 (1977).
- Oskarsson, T. & Trumpp, A. The Myc trilogy: lord of RNA polymerases. *Nat Cell Biol* **7**, 215-7 (2005).
- Packham, G. & Stevenson, F. K. Bodyguards and assassins: Bcl-2 family proteins and apoptosis control in chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology* **114**, 441-9 (2005).
- Pallotti, F. et al. Biochemical analysis of respiratory function in cybrid cell lines harbouring mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* **384**, 287-93 (2004).
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C. & Franzoso, G. Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* **117**, 5197-208 (2004).
- Park, S. Y. et al. Resistance of mitochondrial DNA-depleted cells against cell death: role of mitochondrial superoxide dismutase. *J Biol Chem* **279**, 7512-20 (2004).
- Philchenkov, A. Caspases: potential targets for regulating cell death. *J Cell Mol Med* **8**, 432-44 (2004).
- Piret, J.-P. Thèse de doctorat: "Etude des relations entre le processus apoptotique et l'hypoxie : rôle potentiel dans la survie des cellules cancéreuses." *Département de biologie* (FUNDP, 2005).
- Ravazoula, P. et al. The potential role of bcl-2 mRNA and protein expression in hepatocellular carcinomas. *Anticancer Res* **22**, 1799-805 (2002).
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *Embo J* **16**, 6914-25 (1997).

- Salah-eldin, A., Inoue, S., Tsuda, M. & Matsuura, A. Abnormal intracellular localization of Bax with a normal membrane anchor domain in human lung cancer cell lines. *Jpn J Cancer Res* **91**, 1269-77 (2000).
- Schon, E. A. Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci* **25**, 555-60 (2000).
- Seo, Y. W. et al. The molecular mechanism of Noxa-induced mitochondrial dysfunction in p53-mediated cell death. *J Biol Chem* **278**, 48292-9 (2003).
- Sherer, T. B., Trimmer, P. A., Parks, J. K. & Tuttle, J. B. Mitochondrial DNA-depleted neuroblastoma (Rho degrees) cells exhibit altered calcium signaling. *Biochim Biophys Acta* **1496**, 341-55 (2000).
- Shi, Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci* **13**, 1979-87 (2004).
- Sipos, I., Tretter, L. & Adam-Vizi, V. The production of reactive oxygen species in intact isolated nerve terminals is independent of the mitochondrial membrane potential. *Neurochem Res* **28**, 1575-81 (2003).
- Susse, S., Scholz, C. J., Burkle, A. & Wiesmuller, L. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) and p53 independently function in regulating double-strand break repair in primate cells. *Nucleic Acids Res* **32**, 669-80 (2004).
- Tagami, S., Eguchi, Y., Kinoshita, M., Takeda, M. & Tsujimoto, Y. A novel protein, RTN-XS, interacts with both Bcl-XL and Bcl-2 on endoplasmic reticulum and reduces their anti-apoptotic activity. *Oncogene* **19**, 5736-46 (2000).
- Tokumitsu, H. et al. Substrate recognition by Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase kinase. Role of the arg-pro-rich insert domain. *J Biol Chem* **274**, 15803-10 (1999).
- Tryoen-Toth, P. et al. Proteomic consequences of a human mitochondrial tRNA mutation beyond the frame of mitochondrial translation. *J Biol Chem* **278**, 24314-23 (2003).
- Vergani, L. et al. Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem* **271**, 3646-56 (2004).
- Veselska, R., Zitterbart, K., Jelinkova, S., Neradil, J. & Svoboda, A. Specific cytoskeleton changes during apoptosis accompanying induced differentiation of HL-60 myeloid leukemia cells. *Oncol Rep* **10**, 1049-58 (2003).
- Villalba, M., Bushway, P. & Altman, A. Protein kinase C-theta mediates a selective T cell survival signal via phosphorylation of BAD. *J Immunol* **166**, 5955-63 (2001).
- Voehringer, D. W. et al. Gene microarray identification of redox and mitochondrial elements that control resistance or sensitivity to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2680-5 (2000).
- Wallace, D. C. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**, 1482-8 (1999).
- Wei, Y. H., Lu, C. Y., Wei, C. Y., Ma, Y. S. & Lee, H. C. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol* **44**, 1-11 (2001).
- Wie, M. B. et al. BAPTA/AM, an intracellular calcium chelator, induces delayed necrosis by lipoxygenase-mediated free radicals in mouse cortical cultures. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **25**, 1641-59 (2001).
- Yang, T., Kozopas, K. M. & Craig, R. W. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* **128**, 1173-84 (1995).
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ishii, N., Ohta, S. & Watanabe, K. Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *Embo J* **20**, 4794-802 (2001).

- You, Z., Madrid, L. V., Saims, D., Sedivy, J. & Wang, C. Y. c-Myc sensitizes cells to tumor necrosis factor-mediated apoptosis by inhibiting nuclear factor kappa B transactivation. *J Biol Chem* **277**, 36671-7 (2002).
- Zhang, X. D., Gillespie, S. K. & Hersey, P. Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways. *Mol Cancer Ther* **3**, 187-97 (2004).
- Zheng, L., Szabo, C. & Kern, T. S. Poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the development of diabetic retinopathy via regulation of nuclear factor-kappaB. *Diabetes* **53**, 2960-7 (2004).
- Zimmermann, K. C., Bonzon, C. & Green, D. R. The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* **92**, 57-70 (2001).

6. *Annexes*

Annexe 1: Liste des gènes analysables avec le damier «DualChip Human General »

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
26S-proteasome subunit-p44.5	PSMD11	PSMD11	AB003102	Q00231	Proteasome	Proteasome 26S subunit,non ATPase
A disintegrin and metalloproteinase domain 1	ADAM1	ADAM1	Y09232	N.A.	Protein metabolism	Metalloprotease
Annexin A1	ANX1	ANXA1	NM_000700	P04083	Lipid metabolism	Phospholipid binding protein; PLA2 inhibitor
Anti-oxidant-protein2	AOP2	PRDX6	NM_004905	P30041	Stress response	Hydrolyse the fatty acyl or alkyl bonds of membrane phospholipids
Transcription factor AP-2 alpha	TFAP2A	TFAP2A	M36711	P05549	Transcription	Activator of transcription that binds to a cons. DNA-binding seq.in the SV40 and metallothionein promoters
Transcription factor AP-2 beta	TFAP2B	TFAP2B	X95694	Q92481	Transcription	Regulate the expression of genes required for development of fetus of ectodermal origin
Transcription factor AP-2 gamma	TFAP2C	TFAP2C	NM_003222	Q92754	Transcription	Regulate the expression of genes required for development of fetus of ectodermal origin
Clusterin / ApolipoproteinJ	APOJ	CLU/APOJ	J02908	P10909	Lipid metabolism	Complement lysis inhibitor; plasma glycoprotein
Ataxia telangiectasia mutated	ATM	ATM	U26455	Q13315	Cell cycle	regulator of p53 and BRCA1
v-myb myeloblastosis viral oncogene homolog-like2/ b-myb	MYBL2	MYBL2	X13293	P10244	Transcription	Transcription factor,plays an important role during cell cycle progression; Oncoprotein
BCL2-antagonist of cell death	BAD	BAD	NM_004322	Q92934	Apoptosis	Pro-apoptotic, Bcl2-antagonist of cell death; BCL2 binding protein
Ribosomal protein L13a / 23KDa Highly basic protein	23kd	RPL13A/23kd	X56932	P39023	HouseKeeping gene	Component of the large 60S ribosomal subunit
BCL2-associated X protein	BAX	BAX	NM_004324	Q8WXU1	Apoptosis	Proapoptotic protein,induces cell death by acting on mitochondria;Release of cyt C, activation of caspase-3
B-cell lymphoma2	BCL2	BCL2	NM_000633	P10415	Apoptosis	Oncogene B-cell leukemia;interferes with normal apoptosis of B lymphocytes
BCL2-like 1/BCLX	BCLX	BCL2L1	NM_001191	Q07817	Apoptosis	Induces or inhibits apoptosis according to the alternative form
Beta1-galactosidase	GLB1	GLB1	M34423	P16278	Intermediate metabolism	Catalyses cleavage of galactose
BH3 interacting domain death agonist	BID	BID	NM_001196	P55957	Apoptosis	Apoptotic mitochondrial changes; Death receptor ligand
Bridging Integrator 1	BIN1	BIN1	NM_004305	Q00499	Tumor suppressor	Tumor suppressor; Interact with c-myc
Bone morphogenetic protein2	BMP2	BMP2	NM_001200	P12643	Growth factors and cytokines	Skeletal development; Member of TGFβ family
Feline sarcoma oncogene	FES	FES	X52192	P07332	Oncogenesis	Tyrosine phosphorylation; Oncogene
c-fos/v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	FOS	FOS	NM_005252	P01100	Oncogenesis	Regulator of cell proliferation destined to form and maintain the skeleton; Oncogene
c-myc binding protein	myc	MYCBP	NM_012333	Q99417	Oncogenesis	Activation of E box-dependent transcription by MYC
c-rat-1 / v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	RAF1	X03484	P04049	Oncogenesis	Apoptosis regulation; Kinase
Cadherine 1, type 1,E-cadherine	CDH1	CDH1	NM_004360	P12830	Cell adhesion	Ca2+-dependent cell adhesion molecule;role in food-borne infection with Listeria monocytogene
Cadherine 11, type 2, OB-cadherine	CDH11	CDH11	NM_001797	P55287	Cell adhesion	Mediates cell-cell interactions; may have a role in bone formation
Cadherine 13, H-cadherine	CDH13	CDH13	U59289	P55290	Cell adhesion	Tumor suppressor in breast cancer
Calnexin	CANX	CANX	NM_001746	P27824	Protein metabolism	High affinity for the binding of calcium ions; Chaperone
Calprotectin / S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	S100A8	S100A8	NM_002964	P05109	Cell cycle	Calcium binding
Aldolase A,	Aldo	ALDOA	NM_000034	P04075	HouseKeeping gene	Reversibly cleaves FBP into DHAP and GAP
Caspase2	CASP2	CASP2	NM_001224	P42575	Apoptosis	Activated in cytotoxic stress,required for the permeabilization of mitochondria,required for stress-induced apoptosis
Caspase3	CASP3	CASP3	NM_004346	P42574	Apoptosis	Initiation of apoptotic cell death; PARP cleavage protease
Caspase7	CASP7	CASP7	NM_001227	P55210	Apoptosis	Proteolysis,apoptosis related cystein protease
Caspase8	CASP8	CASP8	X98172	O15519	Apoptosis	Thiol protease; PARP cleavage protease=signature apoptotic fragments
Alpha-tubulin	Tubu	K-ALPHA-1	NM_006082	P05209	HouseKeeping gene	Form the microtubule
Caspase9	CASP9	CASP9	NM_001229	P55211	Apoptosis	Participates in caspase-3 activation in vitro
Catenin , beta 1	CATB	CTNBB1	NM_001904	P35222	Cell adhesion	Adherens junction protein,Links cadherins to the cytoskeleton
CathepsinB	CTSB	CTSB	NM_001908	P07858	Protein metabolism	Lysosomal cysteine (thiol) proteinase that cleaves APP
CathepsinD	CTSD	CTSD	M11233	P07339	Protein metabolism	Lysosomal aspartyl protease
CathepsinL	CTSL	CTSL	NM_001912	P07711	Protein metabolism	Lysosomal cysteine (thiol) protease that cleaves collagen and elastin
Caveolin1	CAV1	CAV1	NM_001753	Q03135	Cell cycle	Tumor suppressor and structural component of caveolar membranes
Cell division cycle42	CDC42	CDC42	NM_001791	P21181	Cell structure	GTP-binding protein
Cyclin-dependent kinase2	CDK2	CDK2	NM_001798	P24941	Cell cycle	Transferase;Ser/Thr protein Kinase; cell division kinase 2
Cyclin-dependent kinase4	CDK4	CDK4	U79269	P11802	Cell cycle	Phosphorylates pRb and inactivates its repressor function
Cyclin-dependent kinase6	CDK6	CDK6	NM_001259	Q00534	Cell cycle	Interacts with D-type cyclins and phosphorylates pRb in G1-phase
Collagen, type VI, alpha 2	COL6A2	COL6A2	NM_001849	P12110	Extracellular matrix	Muscle development; collagen
Cornifin/ small proline-rich protein 1B	SPRR1B	SPRR1B	NM_003125	P22528	Cell differentiation	Epidermal development
Prostaglandin-endoperoxidase synthase 2	COX2	PTGS2	NM_000963	P35354	Lipid metabolism	Regulation of prostaglandin synthesis;prostaglandin synthase
Creatin-kinase, brain	CKB	CKB	M16364	P12277	Intermediate metabolism	Creatin kinase,isoform
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 variant1	CROC1A	UBE2V1	NM_003349	Q9G2W1	DNA repair / synthesis	DNA repair regulation; ubiquiting conjugating enzyme
Colony stimulating factor 1	CSF1	CSF1	M37435	P09603	Growth factors and cytokines	Role in development of the placenta;Differentiation; plasma glycoprotein

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
Colony stimulating factor 1 receptor	CSF1R	CSF1R	NM_005211	P07333	Cell signaling / receptor	Anti-pathogen response; receptor for macrophage stimulating factor
Connective tissue growth factor	CTGF	CTGF	U14750	P29268	Growth factors and cytokines	Epidermal development; connective tissue growth factor
Beta-Actin	ACTB	ACTB	NM_001101	P02570	Housekeeping gene	Major constituent of contractile apparatus
CyclinA1	CCNA1	CCNA1	NM_003914	P78396	Cell cycle	Regulators of CDK kinases
CyclinB1	CCNB1	CCNB1	NM_031966	P14635	Cell cycle	G2 mitotic specific cyclin
CyclinD1	CCND1	CCND1	NM_053056	P24385	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
CyclinD2	CCND2	CCND2	NM_001759	P30279	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
CyclinD3	CCND3	CCND3	NM_001760	P30281	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
CyclinE1	CCNE1	CCNE1	NM_001238	P24864	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK2
CyclinF	CCNF	CCNF	NM_001761	P41002	Cell cycle	Member of the F-box proteins
CyclinH	CCNH	CCNH	NM_001239	P51946	Cell cycle	Phosphorylates and activates cyclin-dependant protein kinases in the regulation of cell cycle progression
Dihydrofolate reductase	DHFR	DHFR	NM_000791	P00374	Cell cycle	Dihydrofolate reductase
Transcription factor Dp-1	DP1	TFDP1	NM_007111	Q00765	Transcription	Mediator of transcriptional activation by TGF-beta receptor; involved in the cell cycle; Pol II transcription
transcription factor Dp-2	DP2	TFDP2	NM_006286	Q14188	Transcription	Transcription factor; Pol II transcription
E2F transcription factor2	E2F2	E2F2	NM_004091	Q14209	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein
E2F transcription factor3	E2F3	E2F3	NM_001949	Q00716	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein
E2F transcription factor4	E2F4	E2F4	NM_001950	Q16254	Transcription	DNA binding protein required for transcription; binds p107, p130 proteins
Cytophilin 33A/peptidylprolyl Isomerase E	cyc	cyc/ PPIE	AF042385	Q9UNP9	Housekeeping gene	Accelerate the folding of proteins
Epidermal growth factor receptor	EGFR	EGFR	NM_005228	P00533	Cell signaling / receptor	Receptor for EGF kinase that attaches phosphate groups to tyrosine residues in proteins
Early growth response1	EGR1	EGR1	NM_001964	P18146	Transcription	Early growth response gene; Tumor suppressor
Early growth response3	EGR3	EGR3	NM_004430	Q06889	Transcription	Transcription factor; contains zinc-finger DNA-binding domain
Eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4-E	EIF4E	NM_001968	Q9NRA8	Protein metabolism	Recognizes and binds the mRNA cap during an early step in the initiation of protein synthesis
Electron-transfer-flavoprotein, beta polypeptide	ETFB	ETFB	NM_001985	P38117	Intermediate metabolism	Mitochondrial fatty acid catabolism
Basigin	BSG	BSG	NM_001728	P35613	Extracellular matrix	Stimulates matrix metalloproteinase synthesis in fibroblasts; Tumor progression
Ems1 sequence	EMS1	EMS1	NM_005231	Q14247	Cell structure	Organization of cytoskeleton and cell adhesion structures
Estrogen receptor 2	ESR2	ESR2	X99101	Q92731	Cell signaling / receptor	Regulation of reproduction; Steroid hormone receptor
von willebrand Factor	VWF	VWF	NM_000552	P04275	Circulation	Carrier for factor VIIIc and major mediator of platelet-vessel wall interaction
Fibroblast growth factor 8	FGF8	FGF8	U36223	P55075	Growth factors and cytokines	Stimulates growth of the cells in an autocrine manner, mediates hormonal action on the growth of cancer cells
Fibroblast growth factor 2	FGF2	FGF2	NM_002006	P09038	Growth factors and cytokines	Mitogenic, angiogenic, and neurotrophic factor
Fibroblast growth factor receptor 1	FGFR	FGFR1	NM_006604	P11362	Cell signaling / receptor	Glycosylated receptor tyrosine kinase that binds both acidic and basic fibroblast growth factors
Fragile histidine triad gene	FHIT	FHIT	NM_002012	P49789	DNA repair / synthesis	diadenosine 5',5'-P1,P3-triphosphate hydrolase
fibronectin 1	FN1	FN1	X02761	P02751	Extracellular matrix	Extracellular matrix; Glycoprotein
DNA-damage-inducible transcript3	GADD153	DDIT3	S40706	P35638	DNA repair / synthesis	DNA damage response; transcription co-repressor
Gelsolin	GSN	GSN	X04412	P06396	Cell structure	Calcium-dependent protein; modulates the actin
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	G6PD	NM_000402	P11413	Intermediate metabolism	Oxydoreductase; Dehydrogenase
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	GAPD	NM_002046	P04406	Housekeeping gene	Catalyzes an important energy-yielding step in carbohydrate metabolism
Glutathione peroxidase 1	GPX	GPX1	M21304	P07203	Oxidative metabolism	selenium containing enzyme function not defined
Growth factor receptor-bound protein2	GRB2	GRB2	NM_002086	P29354	Cell cycle	mitogenesis and cytoskeletal reorganization
Glutathione S-transferase pi	GSTP1	GSTP1	NM_000852	P09211	Oxidative metabolism	Important role in detoxification; Reduced glutathione
Heme oxygenase 1	HMOX	HMOX1	NM_002133	P09601	Stress response	Cleaves the heme ring to form biliverdin and carbon monoxide
histone2b member B/S consensus/ Histone 1, H2bk	H2B/S	HIST1H2BK	NM_080593	P57053	Chromosomal processing	Nucleosome structure
Histone3 member F consensus/ Histone 1, H3l	H3F	HIST1H3I	NM_003533	P16106	Chromosomal processing	Responsible for the nucleosome structure within chromosomal fiber in eukaryotes
Histone4 member M consensus/ Histone 1, H4l	H4M	HIST1H4I	NM_003495	Q80WC8	Chromosomal processing	Nucleosome structure
Heat shock 27kDa protein1	HSP27	HSPB1	AB020027	P04792	Stress response	Drug resistance/thermotolerance
Heat shock 40kD protein1/ DnaJ(Hsp40)homolog	HSP40	DNAJB1	D49547	P25685	Stress response	Prevent aggregation of newly translated proteins
Heat shock 70kDa protein4	HSP70	HSPA4	AB023420	P34932	Stress response	ATP binding and heat shock protein
Heat shock 90kDa protein1, alpha	HSP90-a	HSPCA	X15183	P07900	Stress response	Molecular chaperon, ATPase activity
Heat shock 90kDa protein 1, beta	HSP90-b	HSPCB	NM_007355	P08238	Stress response	Molecular chaperon, ATPase activity
Intracellular adhesion molecule1	ICAM-1	ICAM1	J03132	P05362	Cell adhesion	Surface glycoprotein; binds the Integrin LFA-1 (ITGB2) and promotes adhesion
Hexokinase 1	HK1	HK1	M75126	P19367	Housekeeping gene	Catalyzes the first step in glucose metabolism(glucose-glucose-6-phosphate)

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
Insulin-like growth factor binding protein2	IGFBP2	IGFBP2	M35410	P18065	Growth factors and cytokines	Growth factor modulation
Insulin-like growth factor binding protein3	IGFBP3	IGFBP3	X64875	P17936	Growth factors and cytokines	Growth factor modulation
Insulin-like growth factor binding protein5	IGFBP5	IGFBP5	M65062	P24593	Growth factors and cytokines	Growth factor modulation
Insulin-like growth factor1	IGF1	IGF1	X57025	P01343	Growth factors and cytokines	Muscle/skeletal development; Growth factor
Insulin like growth factor1 receptor	IGF1R	IGF1R	NM 000875	P08069	Cell signaling / receptor	Anti-apoptotic; receptor
Interleukin1 alpha	IL1A	IL1A	NM 000575	P01583	Growth factors and cytokines	Amplify the immune and inflammatory responses
Interleukin1 beta	IL1B	IL1B	M15330	P01584	Growth factors and cytokines	Initiation and amplification of the immune and inflammatory responses
Interleukin 10	IL10	IL10	NM 000572	P22301	Growth factors and cytokines	Chemotaxis; Cytokine synthesis inhibitory factor
Interleukin 11	IL11	IL11	NM 000641	P20809	Growth factors and cytokines	Induces proliferation of human T-cells
Interleukin 11-receptor-alpha	IL11RA	IL11RA	U32324	Q16542	Cell signaling / receptor	Multiple biologic activities on lymphohematopoietic cells; Encodes the IL-11 receptor
Interleukin 15	IL15	IL15	NM 000585	P40933	Growth factors and cytokines	Affects T-cell activation and proliferation; Anti-pathogen response ; Cytokine
Interleukin 4	IL4	IL4	NM 000589	P05112	Growth factors and cytokines	T Cell proliferation; Cytokine
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT1	HPRT1	NM 000194	P00492	Housekeeping gene	Purine salvage pathway
Interleukin 6	IL6	IL6	NM 000600	P05231	Growth factors and cytokines	Induces the maturation of B cells into immunoglobulin-secreting cells
Interleukin 8	IL8	IL8	NM 000584	P10145	Growth factors and cytokines	Chemokine that regulate cell trafficking of various types of leukocytes; role in development, homeostasis, function in the immune system
Inhibitor of growth family, member 1	ING1	ING1	NM 000537	Q00532	Tumor suppressor	Growth regulator ; Tumor suppressor
Integrin alpha6	ITGA6	ITGA6	NM 000210	P23229	Cell adhesion	Receptor; signal transduction
Integrin alpha5	ITGA5	ITGA5	NM 002205	P08648	Cell adhesion	Fibronectin receptor; mediates the binding of cells to fibronectin substrata
Integrin beta1	ITGB1	ITGB1	NM 002211	P05556	Cell adhesion	Integrin; Fibronectin receptor
Mitogen activated protein kinase8	JNK1	MAPK8	L26318	P45983	Stress response	Mitogen-activated protein kinase, participates in signaling system
Mitogen activated protein kinase9	JNK2	MAPK9	U09759	P45984	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
Mitogen-activated protein kinase 10	JNK3	MAPK10	NM 002753	P53779	Stress response	Member of MAP kinase; activate the Jun transcription factor.
Jun D proto-oncogene	JUND	JUND	NM 005354	P17535	Transcription	RNA pol II transcription factor, Oncogene
antigen identified by monoclonal antibody Ki-67	Ki-67	MKI67	NM 002417	P46013	Cell cycle	Required for maintaining cell proliferation
MAX protein	MAX	MAX	NM 002382	P25912	Transcription	Transcription factor; forms heterodimers with MYC, MAD and regulates gene expression
MDM2	MDM2	MDM2	NM 002392	Q00987	Cell cycle	Transcription factor, acts as a major regulator of the tumor suppressor p53
Mitogen activated protein kinase kinase1	MEK1	MAP2K1	L11284	Q02750	Growth factors and cytokines	Chemotaxis, Kinase
Malate dehydrogenase 1	MDH	MDH1	NM 005917	P40925	Housekeeping gene	Catalyzes the reversible oxidation of malate to oxaloacetate
Mitogen activated protein kinase kinase2	MEK2	MAP2K2	NM 030662	P36507	Growth factors and cytokines	Chemotaxis, Kinase
Methionine-sulfoxide-reductase A/peptide	MSRA	MSRA	AF183420	Q9UJ68	Oxidative metabolism	Methionine metabolism, oxidoreductase
Mitotin, centromere protein F	CENPF	CENPF	U30872	P49454	Chromosomal processing	Control of mitosis
Mitotic-centromere-associated-kinesin/ Kinesin family member 2C	KNSL6	KIF2C	NM 006845	Q99661	Chromosomal processing	Microtubule motor, Kinesin, implicated in intracellular transport events
Mitotic-kinesin-like protein1 / kinesin family member 23	KNSL5	KIF23	NM 004856	Q02241	Chromosomal processing	Microtubule motor, Kinesin
Matrix metalloproteinase 1	MMP1	MMP1	NM 002421	P03956	Extracellular matrix	Interstitial collagenase, cleaves collagens (type I, II, III, VII and X)
Matrix metalloproteinase 2	MMP2	MMP2	NM 004530	P08253	Extracellular matrix	Gelatinase A (type IV collagenase); degrades gelatin, types IV, V, and VII collagen, and fibronectin
Matrix metalloproteinase 3	MMP3	MMP3	NM 002422	P08254	Extracellular matrix	Extracellular matrix, degrades fibronectin, collagens
Matrix metalloproteinase 7	MMP7	MMP7	NM 002423	P09237	Extracellular matrix	Matrilysin 7, expressed during the migration/proliferation phase
Matrix metalloproteinase 9	MMP9	MMP9	NM 004994	P14780	Extracellular matrix	Type IV collagenase; digests type IV and type V collagen
Matrix metalloproteinase 11	MMP11	MMP11	NM 005940	P24347	Extracellular matrix	Stromelysin 3; involved in physiologic and pathologic processes associated with extracellular matrix remodeling.
Matrix metalloproteinase 12	MMP12	MMP12	NM 002426	P39900	Extracellular matrix	Extracellular matrix, degrades elastin, important in tissue remodeling and repair during development and inflammation
Matrix metalloproteinase 13	MMP13	MMP13	NM 002427	P45452	Extracellular matrix	Collagenase 3; degrades fibrillar collagens
Matrix metalloproteinase 14	MMP14	MMP14	NM 004995	P50281	Extracellular matrix	Transmembrane matrix metalloprotease 14; activates the collagenase gelatinase A
Matrix metalloproteinase 15	MMP15	MMP15	NM 002428	P51511	Extracellular matrix	Transmembrane matrix metalloprotease 15; activates the collagenase gelatinase A
NCK adaptor protein1	NCK1	NCK1	NM 006153	P16333	Cell signaling / receptor	Signal transduction; activate actin nucleation
Nuclear receptor co-repressor 1	NCOR1	NCOR1	NM 006311	Q75376	Cell signaling / receptor	Inhibits transcription by hormone receptors in the absence of ligand
Nuclear receptor co-repressor 2	NCOR2	NCOR2	NM 006312	Q9Y618	Cell signaling / receptor	Transcription co-repressor; important in development, differentiation and oncogenesis
Phospholipase A2/ lysine3-monooxygenase/tryptophan5-monooxygenase activation prot	PLA2	YWHAZ	M86400	P04054	Housekeeping gene	Kinase activating hydrolases tyr -ty; induces the phosphorylation of cytosolic substrates
Ornithine decarboxylase1	ODC	ODC1	NM 002539	P11926	Intermediate metabolism	Arginine synthesis; acts in polyamine biosynthesis
Osteonectin, secreted protein, acidic, cysteine-rich	ON	SPARC	NM 003118	P09486	Cell structure	Extracellular matrix, collagen binding, may be involved in cell proliferation, repair of tissue damage
Osteopontin/ secreted phosphoprotein 1	OPN	SPP1	NM 000582	Q961Z1	Extracellular matrix	Extracellular matrix

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
Ribosomal Protein S9	S9	RPS9	NM_001013	P46781	Housekeeping gene	Component of the small 40S ribosomal subunit
Cyclin dependent kinase inhibitor 2A	p16	CDKN2A	L27211	Q8N726	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 2A, tumor suppressor gene
Cyclin dependent kinase inhibitor 1A	p21	CDKN1A	U03106	P38936	Cell cycle	Inhibits cyclin-kinase activity, is regulated at the transcriptional level by p53
Cyclin dependent kinase inhibitor 1B	p27	CDKN1B	NM_004064	P46527	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 1B; mediates TGFbeta-induced G1 phase arrest
Cyclin dependent kinase5 regulatory subunit1	p35	CDK5R1	NM_003895	P04083	Cell cycle	Kinase, role in the regulation of the eukaryotic cell cycle, required for development of the mammalian central nervous system
Tumor protein p53	p53	TP53	AF307851	P04637	Cell cycle	DNA-binding protein; tumor suppressor activity, role in DNA repair; induces apoptosis
Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	p57	CDKN1C	NM_000076	P49918	Cell cycle	Inhibits G1-specific CDK-cyclin complexes, negative regulator of cell proliferation.
Plasminogen activator inhibitor type1/serine proteinase inhibitor, clade E, member 1	PAI1	SERPINE1	M14083	P05121	Circulation	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor; Regulates fibrinolysis
Plasminogen activator inhibitor type2/serine proteinase inhibitor, clade B, member 2	PAI2	SERPINE2	J02685	P05120	Circulation	Serine protease inhibitor; inhibits urokinase-type plasminogen activator
P21 activated kinase1	PAK	PAK1	NM_002576	Q13153	Cell structure	Target of CDC42; promotes the disassembly of stress fibers and focal adhesions
Proliferating cell nuclear antigen	PCNA	PCNA	NM_002592	P12004	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility; correlated with the proliferative state of the cell
Polo-like kinase	PLK	PLK	U01038	Q15153	DNA repair / synthesis	Ser/thr kinase; involved in mitosis
Polymerase alpha	POLA2	POLA2	NM_002689	Q14181	DNA repair / synthesis	DNA polymerase
Progesterone receptor	PGR	PGR	NM_000926	P09874	Cell signaling / receptor	Transcription activating factor, progesterone receptor
ADP-ribosyltransferase	ADPRT	ADPRT	J03473	P09874	DNA repair / synthesis	DNA repair, encodes a chromatin associated enzyme
Pyruvate kinase-muscle	PKM2	PKM2	M26252	P14618	Intermediate metabolism	Pyruvate kinase, muscle
Retinoblastome1	RB1	RB1	NM_000321	P06400	Cell cycle	Interacts with histone deacetylase to repress transcription; tumor repressor
Ribonucleotide-reductase M1 polypeptide	RRM1	RRM1	NM_001033	P23921	DNA repair / synthesis	Ribonucleotide reductase essential for the production of deoxyribonucleotides before DNA synthesis in S phase
Serine Dehydratase	SDS	SDS	NM_006843	P20132	Housekeeping gene	Catalyzes the conversion of serine to pyruvate
S100 calcium binding protein A4	S100A4	S100A4	NM_002961	P26447	Cell cycle	Calcylin; interacts with targets to link extracellular stimuli and cellular responses
SHC transforming protein1	SHC	SHC	U73377	Q01973	Oncogenesis	EGFR modulation
Transgelin	SM22	TAGLN	M95787	Q01995	Cell structure	Involved in calcium interactions and contractile properties of the cell
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 1	SMAD1	MADH1	U59423	Q15797	Cell cycle	Tumor suppressor; regulates cell growth, differentiation, matrix production, apoptosis; role during the embryonal development
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 2	SMAD2	MADH2	U68018	Q15796	Cell cycle	Tumor suppressor; role in nuclear accumulation and initiation of signaling
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 3	SMAD3	MADH3	U68019	Q92940	Cell cycle	Tumor suppressor; effector of TGFbeta response
MAD, mothers against decapentaplegic homolog 4	SMAD4	MADH4	U44378	Q13485	Cell cycle	Tumor suppressor
Superoxide dismutase2	SOD2	SOD2	NM_000636	P04179	Oxidative metabolism	Oxidoreductase
Telomerase reverse transcriptase	TERT	TERT	AF018167	Q14746	DNA repair / synthesis	DNA polymerase, predicted to act as reverse transcriptase, may have a role in formation of telomeres
TGF-beta-R2	TGFB2	TGFB2	D50683	P37173	Tumor suppressor	Tumor suppressor, receptor; role in the signal transduction that leads to mitogenic responses
Thymidine-kinase 1	TK1	TK1	NM_003258	P04183	Cell cycle	Generates thymidylate for DNA synthesis
Thymosin beta 10	TB10	TMSB10	NM_021103	P13472	Cell structure	Organization of the cytoskeleton
Thymidylate-synthetase	TYMS	TYMS	NM_001071	P04818	DNA repair / synthesis	Catalyzes reductive methylation of dUMP to dTMP
Tissue inhibitor of metalloproteinase1	TIMP1	TIMP1	NM_003254	P01033	Extracellular matrix	Inhibits type IV collagenase (MMP2) stimulates growth of erythroid cells
Tissue inhibitor of metalloproteinase2	TIMP2	TIMP2	NM_003255	P18035	Extracellular matrix	Inhibits MMP2, involved in homeostasis of the extracellular matrix
Tumor necrosis factor	TNFA	TNF	NM_000594	P01375	Growth factors and cytokines	Endotoxin; pathophysiology of sepsis, role in apoptosis
Topoisomerase2-alpha	TOP2	TOP2A	NM_001067	P11388	DNA repair / synthesis	Relax DNA torsion upon replication or transcription
Plasminogen activator tissue	TPA	PLAT	NM_000930	P00750	Circulation	serine protease that converts inactive plasminogen to plasmin
Telomeric repeat binding factor1	TRF1	TERF1	U40705	Q9BS14	DNA repair / synthesis	Telomere binding
Thromboxane-A2-receptor	TBXA2R	TBXA2R	D38081	P21731	Cell signaling / receptor	Muscle contraction, receptor; stimulator of platelet aggregation
Thrombospondin 1	TSP1	THBS1	NM_003246	P07996	Cell adhesion	Adhesive glycoprotein; potent angiogenic activity
Thrombospondin 2	TSP2	THBS2	NM_003247	P35442	Cell adhesion	Adhesive glycoprotein; role in many cell adhesion and migration events
Ubiquitin conjugating enzyme E2C/ubiquitin carrier protein	UBE2C	UBE2C	NM_007019	Q00762	Proteasome	Proteolysis, ligase
Plasminogen activator, Urokinase	PLAU	PLAU	NM_002658	P00749	Circulation	Serine protease that cleaves plasminogen to form plasmin
Transferrin receptor	TFR	TFR	NM_003234	P02786	Housekeeping gene	Binds and internalizes the iron carrier transferrin
Plasminogen activator, Urokinase-receptor	uPAR	PLAUR	NM_002659	Q03405	Cell signaling / receptor	Key molecule in the regulation of cell-surface plasminogen activation
Vascular endothelial growth factor	VEGF	VEGF	AF022375	P15692	Growth factors and cytokines	Induces endothelial cell proliferation and vascular permeability
Vascular endothelial growth factor B	VEGFB	VEGFB	U43368	P49765	Growth factors and cytokines	Binds heparin and neuropilin-1, growth factor; MEN1 tumor suppressor gene
Vascular endothelial growth factor C	VEGFC	VEGFC	NM_005429	P49767	Growth factors and cytokines	Bind and activate VEGFR-2 receptors
Vascular endothelial growth factor D/ c-fos induced growth factor	VEGFD	FIGF	NM_004469	Q43915	Growth factors and cytokines	Bind and activate VEGFR-2 and VEGFR-3 receptors
Vascular endothelial growth factor receptor1/ fms-related tyrosine kinase 1	VEGFR1	FLT1	NM_002019	P17948	Cell signaling / receptor	Receptor tyrosine kinases; antagonist of vascular endothelial growth factor
Vascular endothelial growth factor receptor2 / Kinase insert domain receptor	VEGFR2	KDR	NM_002253	P35968	Cell signaling / receptor	Receptor for VEGF and VEGFC
Vascular endothelial growth factor receptor3/ fms-related tyrosine kinase 4	VEGFR3	FLT4	NM_002020	P35916	Cell signaling / receptor	Endothelial cell-specific receptor; regulator of blood vessel development in embryos and angiogenesis in adults tissue

Annexe II

Damier DualChip Human General									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	hyb ctl +	buffer	PSMD11	ADAM1	ANX1	AOP2	TFAP2A	TFAP2B	TFAP2C
2	APOJ	ATM	MYBL2	BAD	23kd	BAX	IS3 (RBCL)	BCL2	BCLX
3	GLB1	BID	IS4 (RCA)	BIN1	BMP2	FES	FOS	cmyc	RAF1
4	hyb Ctl -	CDH1	CDH11	CDH13	CANX	S100A8	Aldo	CASP2	CASP3
5	CASP7	CASP8	Tubu	CASP9	CATB	CTSB	CTSD	CTSL	CAV1
6	CDC42	CDK2	CDK4	CDK6	COL6A2 (993)	SPRR1B	COX2	CKB	CROC1A
7	CSF1	CSF1R	IS5 (TAPG)	CTGF	ACTB	CCNA1	IS1 (RBCS)	CCNB1	CCND1
8	CCND2	CCND3	CCNE1	CCNF	CCNH	DHFR	DP1	DP2	E2F2
9	E2F3	E2F4	eye	EGFR	EGR1	EGR3	EIF4	ETFB	hyb Ctl -
10	BSG	EMS1	ESR2	VWF	FGF8	FGF2	FGFR (313)	FHIT	FN1
11	GADD153 (996)	GSN	IS2 (CAB)	G6PD	GLPD	GPX	GRB2	GSTPi	HMOX (998)
12	H2B/S	H3FF	H4FM	HSP27	HSP40	HSP70	IS6 (SIP)	HSP90-a	HSP90-b
13	hyb Ctl -	ICAM-1	HK1	IGFBP2	IGFBP3	IGFBP5	IGF1	IGF1R	IL1A
14	IL1B (423)	IL10	IL11	IL11RA	IL15	IL4	HPRT	IL6	IL8
15	ING1	ITGA6	ITGA5	ITGB1	JNK1	JNK2	JNK3 (511)	JUND	Ki-67
16	MAX	MDM2	IS3 (RBCL)	MEK1 (1004)	MDH1	MEK2	IS6 (SIP)	MSRA	CENPF
17	KNSL6	KNSL5	MMP1	MMP2	MMP3	MMP7	MMP9	MMP11	MMP12
18	MMP13	MMP14	MMP15	NCK1	NCOR1	NCOR2	PLA2	ODC	hyb Ctl -
19	ON	OPN	S9	p16	p21	p27	p35	p53	p57
20	PAI1	PAI2	PAK	PCNA	PLK	POLA2	IS5 (TAPG)	PGR	ADPRT
21	PKM2	RB1	IS2 (CAB)	RRM1	SDS	S100A4	SHC	SM22	SMAD1
22	hyb Ctl -	SMAD2	SMAD3	SMAD4	SOD2 (1007)	TERT	TGFBR2 (1013)	TK1	TB10
23	TYMS (829)	TIMP1	TIMP2	TNFA	TOP2	TPA	TRF1	TBXA2R	TSP1 (780)
24	TSP2	UBE2C	IS1 (RBCS)	PLAU	TFR	uPAR	IS4 (RCA)	VEGF	VEGFB
25	buffer	buffer	VEGFC	VEGFD	VEGFR1 (318)	VEGFR2 (463)	VEGFR3	buffer	buffer
26	hyb ctl +	buffer	buffer	buffer	buffer	1 ctl +	2 ctl +	3 ctl +	4 ctl +
27	hyb ctl +	buffer	5 ctl +	6 ctl +	7 ctl +	8 ctl +	9 ctl +	buffer	hyb ctl +

Annexe II: Design du « DualChip Human General ». Hyb ctl + : contrôles d'hybridation positifs, Hyb-: Contrôles d'hybridations négatifs, IS: standard interne, Buffer: contrôles négatifs de fixations, ctl +: contrôles positifs de fixation, en vert, les gènes de maintenance.

Annexe III

Gènes	Ratio	Gènes	Ratio	Gènes	Ratio	Gènes	Ratio
CCND1	0,47	TRAF5	1,24	CDK4	0,71	MAPK3	1,08
JUN	0,51	TRAF3	0,75	CDK5	1,22	MAPK7	0,91
CDC6	0,54	NOS2A	0,95	CDK5R1	0,87	MAPK8	1,01
TNFRSF1B	0,60	TNFSF6	0,86	CDK6	0,87	MAPK9	0,93
CDKN1A	0,61	TP73	0,69	CDK7	1,37	MCL1	1,04
GADD45A	0,62	GSR	0,97	CDK9	1,01	MDM2	1,26
PDE1B	0,66	CDC2	0,86	CDKN1C	0,98	MGST1	0,99
IGFBP3	0,66	POR	0,91	CFLAR	1,02	NFATC1	1,46
BAD	0,67	CASP3	0,81	CLU	1,39	NFKB1	1,45
ABL1	1,50	E2F3	0,87	CRADD	0,70	PCNA	0,78
TRADD	1,51	RBP1	0,79	CSE1L	0,98	PLK	1,10
TP53	1,51	CDKN2A	0,82	DFFA	0,88	RAF1	1,06
BIRC2	1,53	ADAM 17	0,80	E2F1	0,87	RB1	1,37
RBL2	1,53	CDKN2B	0,71	FADD	0,91	RIPK1	1,06
CLK1	1,55	GSTT1	0,81	GPX1	1,00	TFDP1	0,86
TANK	1,59	TNFSF10	1,20	GRB2	0,89	TNF	0,73
GAS1	1,66	TFRC	0,75	GSA	1,55	TNFRSF10A	1,15
E2F5	1,68	HK1	0,78	GSM	0,96	TNFRSF10B	1,29
TNFRSF6	1,68	BAX	0,90	GSTP1	1,25	TNFRSF1A	0,89
BIRC3	1,78	BCL2	1,07	IGF1	0,67	TNFSF5	1,24
PLD1	1,87	BCL2A1	0,97	IGF2	0,98	TNFSF7	1,25
MAP2K5	1,90	BclX	1,01	IGF2R	1,06	TRAF2	0,78
TFDP2	1,92	BID	1,09	IGFBP2	1,13	TRAF6	0,94
MAP3K14	1,97	BIK	1,08	IGFBP4	1,32	RPL13A	1,21
MAP2K6	2,14	BIRC4	1,17	IGFBP5	1,04	ALDOA	1,25
RARB	2,21	BIRC5	0,87	IGFBP6	1,23	K-ALPHA-1	0,98
IGF1R	2,33	BNIP3	0,96	ING	1,30	ACTB	0,97
MYCN	4,29	CASP2	0,80	LTA	1,01	PPIE	0,94
CASP1	-	CASP4	0,75	LTB	1,19	GAPD	1,12
DDIT4L	-	CASP8	0,84	MAP2K1	0,83	HPRT1	0,97
AKT1	-	CCND2	1,10	MAPK1	1,01	MDH1	1,20
AKT2	-	CCNH	0,81	MAPK10	1,04	YWHAZ	1,06
BAG1	-	CDC25C	1,25	MAPK12	0,89	RPS9	1,05
BAK 1	-	CDK2	1,03	MAPK14	1,13	SDS	0,72

Annexe III: Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes dans les cellules cybrides sauvages traitées à la staurosporine analysée avec le « DualChip Human Apoposis ». Les valeurs se trouvant dans une case grise représentent une variation quantitative et significative de l'expression génique. Les sigles - représentent une variation d'expression qualitative.

Annexe IV: Liste des gènes analysables avec le damier « DualChip Human Apoptosis »

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1	ABL1	ABL1	X16416	P00519	Cell cycle	ATP binding; kinase activity
a disintegrin and metalloprotease domain 17 (tumor necrosis factor, alpha, convertin	ADAM 17	ADAM 17	U69611	P78536	Cell migration	Metalloendopeptidase activity
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	AKT1	AKT1	NM_005163	P31749	Apoptosis	Receptor signaling protein serine/threonine kinase activity
v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2	AKT2	AKT2	NM_001626	P31751	Apoptosis	Protein amino acid phosphorylation
BCL2-antagonist of cell death	BAD	BAD	NM_004322	Q92934	Apoptosis	Pro-apoptotic; BCL2 binding protein
BCL2-associated athanogene	BAG	BAG1	AF022224	Q99933	Apoptosis	Interacts with Bcl2
BCL2-antagonist/Killer 1	BAK 1	BAK 1	U16811	Q16611	Apoptosis	Accelerates programmed cell death by binding to BCL-2
BCL2-associated X protein	bax	BAX	NM_004324	Q8WXXU1	Apoptosis	Induces the release of cyt C, activation of caspase-3
B-cell CLL/lymphoma 2	BCL2	BCL2	NM_000633	P10415	Apoptosis	Regulates the death cell
BCL2-related protein A1	BCL2A1	BCL2A1	NM_004049	Q16548	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
BCLX protein	BclX	BclX	NM_001191	Q07817	Apoptosis	Induces or inhibits apoptosis according to the alternative form
BH3 interacting domain death agonist	BID	BID	NM_001196	P55957	Apoptosis	Apoptotic mitochondrial changes; Death receptor ligand
23kDa highly basic protein	23kd	RPL13A	X56932	P39023	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
BCL2-interacting killer (apoptosis-inducing)	BIK	BIK	NM_001197	Q13323	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
baculoviral IAP repeat-containing 2	BIRC2	BIRC2	NM_001166	Q13490	Apoptosis	Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade
Aldolase A,	Aldo	ALDOA	NM_000034	P04075	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
baculoviral IAP repeat-containing 3	BIRC3	BIRC3	AF070674	Q13489	Apoptosis	Interacts with TNF receptor associated factors 1 and 2 (TRAF1 and TRAF2)
baculoviral IAP repeat-containing 4	BIRC4	BIRC4	NM_001167	P98170	Apoptosis	Inhibitor of caspase-3, -7 and -9.
baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)	BIRC5	BIRC5	NM_001168	Q15392	Apoptosis	Cysteine protease inhibitor activity
BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	BNIP3	BNIP3	NM_004052	Q12983	Apoptosis	Binds to the adenovirus E1B 19 kDa protein or to BCL-2
caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	CASP1	CASP1	M87507	P28906	Apoptosis	Caspase activity
caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed)	CASP2	CASP2	NM_001224	P42575	Apoptosis	Activated in cytotoxic stress, required for the permeabilization of mitochondria, required for stress-induced apoptosis
caspase 3, apoptosis-related cysteine protease	CASP3	CASP3	NM_004346	P42574	Apoptosis	Initiation of apoptotic cell death; PARP cleavage protease
caspase 4, apoptosis-related cysteine protease	CASP4	CASP4	NM_001225	P49662	Protein binding	Involved in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution
caspase 8, apoptosis-related cysteine protease	CASP8	CASP8	X98172	Q15519	Apoptosis	Thiol protease; PARP cleavage protease=signature apoptotic fragments
cyclinD1	cdn1	CCND1	NM_053056	P24385	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK6
cyclinD2	cdn2	CCND2	NM_001759	P30279	Cell cycle	Regulatory subunit of CDK4 or CDK7
Alpha-tubulin	Tubu	K-ALPHA-1	NM_006082	P78395	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
cyclin H	CCNH	CCNH	NM_001239	P51946	Cell cycle	Phosphorylates and activates cyclin-dependent protein kinases in the regulation of cell cycle progression
cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	CDC2	CDC2	X05360	P06493	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
cell division cycle 25C	CDC25C	CDC25C	M34065	P30307	Cell cycle	Dephosphorylates CDC2 and
CDC6 cell division cycle 6 homolog (S. cerevisiae)	CDC6	CDC6	NM_001254	Q99741	Cell cycle	Negative regulation of DNA replication
cyclin-dependent kinase 2	CDK2	CDK2	NM_001798	P24941	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase activity
cyclin-dependent kinase 4	CDK4	CDK4	U79269	P11802	Cell cycle	The activity of this kinase is restricted to the G1-S phase; cell proliferation
cyclin-dependent kinase 5	CDK5	CDK5	NM_004935	Q00535	Cell cycle	Interacts with p35 which
cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	p35	CDK5R1	NM_003885	P04083	Cell cycle	Activates the kinase
cyclin-dependent kinase 6	cdk6	CDK6	NM_001259	Q00534	Cell cycle	Interacts with D-type cyclins and phosphorylate pRB in G1-phase
Beta-Actin	ACTB	ACTB	NM_001101	P02570	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
cyclin-dependent kinase 7 (MO15 homolog, Xenopus laevis, cdk-activating kinase)	cdk7	CDK7	NM_001799	P50613	Cell cycle	Regulation of cyclin dependent protein kinase activity
cyclin-dependent kinase 9 (CDC2-related kinase)	cdk9	CDK9	NM_001261	P50750	Cell proliferation	Regulation of cell cycle
cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	p21	CDKN1A	U03106	P38936	Cell cycle	Inhibitor 1A of G1-specific CDK-cyclin complexes
cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)	p57	CDKN1C	NM_000076	P49918	Cell cycle	Inhibits G1-specific CDK-cyclin complexes, negative regulator of cell proliferation.
cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	p16	CDKN2A	L27211	Q8N726	Cell cycle	Inhibitor of G1-specific CDK-cyclin complexes 2A, tumor suppressor gene
cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)	p14-15	CDKN2B	U17075	Q8N1A6	Cell cycle	Cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity
CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	CFLAR	CFLAR	NM_003879	Q15519	Apoptosis	Caspase activity

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
CDC-like kinase 1	CLK1	CLK1	NM_004071	Q8N5V8	Cell cycle	Protein serine/threonine kinase activity
Apolipoprotein J	APOJ	CLU	J02908	P10909	Lipid metabolism	Activate its kinase activity
CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	CRADD	CRADD	NM_003805	P78560	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
CSE1 chromosome segregation 1-like (yeast)	CSE1L	CSE1L	AF053641	P55060	Cell proliferation	Intracellular protein transport
Cyclophilin 33A	cyc	PPIE	AF042385	Q9UNP9	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
DDIT4L: DNA-damage-inducible transcript 4-like	REDD2	DDIT4L	NM_145244	Q96D03	/	/
DNA fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide	DFFA	DFFA	U91985	O00273	Apoptosis	DNA fragmentation
E2F transcription factor 1	E2F1	E2F1	NM_005225	Q01094	Transcription	Tumor suppressor, Transcription factor
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPD	GAPD	NM_002046	P04406	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
E2F transcription factor 3	E2F3	E2F3	NM_001949	O00716	Transcription	Transcription factor; binds Rb protein
E2F transcription factor 5, p130-binding	E2F5	E2F5	U31556	Q15329	Transcription	Transcription factor, DNA binding
Fas (TNFRSF6)-associated via death domain	FADD	FADD	NM_003824	Q13158	Apoptosis	Active caspase-8 initiates the subsequent cascades of caspase mediating apoptosis
growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	GADD45A	GADD45A	NM_001924	P24522	Stress response	Glutathione transferase activity
growth arrest-specific 1	GAS1	GAS1	NM_002048	P54826	DNA repair	Structural constituent of ribosome
glutathione peroxidase 1	GPX	GPX1	M21304	P07203	Oxidative metabolism	Protects the hemoglobin in erythrocytes from oxidative breakdown
growth factor receptor-bound protein 2	GRB2	GRB2	NM_002086	P29354	Cell cycle	Cell structure
glutathione S-transferase A1	GSA	GSA	NM_000846	P09210	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
glutathione S-transferase M1	GSM	GSM	NM_000561	P09488	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
glutathione reductase	GSR	GSR	NM_000637	P00390	Drug metabolism	Glutathione : Maintain high levels of reduced glutathione (phase II)
Glutathione S-transferase pi	GSTP1	GSTP1	NM_000852	P09211	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
Glutathione S-transferase theta1	GSTT1	GSTT1	NM_000853	P30711	Drug metabolism	Glutathione (phase II)
insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	IGF1	IGF1	X57025	P01343	Growth factor and cytokines	Muscle/skeletal development; Growth factor
insulin-like growth factor 1 receptor	IGF1R	IGF1R	NM_000875	P08069	Cell signaling / receptor	Anti-apoptotic; receptor
insulin-like growth factor 2 (somatomedin A)	IGF2	IGF2	S77035	P01344	Skeletal development	Regulation of cell cycle; potent mitogens for cultured cells
insulin-like growth factor 2 receptor	IGF2R	IGF2R	NM_000876	P11717	Receptor	Binds insulin growth factor II
insulin-like growth factor binding protein 2, 36kDa	IGF2	IGFBP2	M35410	P18065	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
Hexokinase 1	HK1	HK1	M75126	P19367	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
insulin-like growth factor binding protein 3	IGFBP3	IGFBP3	X64875	P17936	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
insulin-like growth factor binding protein 4	IGFBP4	IGFBP4	NM_001552	P22692	Cell proliferation	Regulation of cell growth
Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1	HPRT	HPRT1	NM_000194	P00492	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
insulin-like growth factor binding protein 5	IGFBP5	IGFBP5	M65062	P24593	Growth factor and cytokines	Growth factor modulation
insulin-like growth factor binding protein 6	IGFBP6	IGFBP6	M69054	P24592	Signal transduction	Signal transduction
inhibitor of growth family, member 1	ING1	ING	NM_005537	Q9UK53	Cell proliferation	Tumor suppressor; potent growth regulator in normal and in established cells
v-jun sarcoma virus 17 oncogene homolog (avian)	JUN	JUN	NM_002228	P05412	MAPK signaling pathway	RNA polymerase II transcription factor activity
lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)	TNFB	LTA	NM_000595	P01374	Growth factor and cytokines	induction of apoptosis
lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)	LTB	LTB	L11015	Q06643	Growth factor and cytokines	Role in immune response
mitogen-activated protein kinase kinase 1	MEK1	MAP2K1	L11284	Q02750	Cell cycle	Kinase; Catalyzes the phosphorylation of a thr and a tyr in a thr-glu-tyr
mitogen-activated protein kinase kinase 5	MAP2K5	MAP2K5	BT006780	Q13163	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase kinase 6	MAP2K6	MAP2K6	NM_002758	P52564	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase kinase kinase 14	MAP3K14	MAP3K14	NM_003954	Q99558	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 1	erk2	MAPK1	M84489	P28482	Apoptosis	Transferase activity
mitogen-activated protein kinase 10	JNK3	MAPK10	NM_002753	P53779	Stress response	Kinase
mitogen-activated protein kinase 12	MAPK12	MAPK12	NM_002969	P53778	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 14	MAPK14	MAPK14	AF100544	Q16539	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
Malate dehydrogenase 1	MDH	MDH1	NM_005917	P24347	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene

Gene Name	Gene Symbol	Official Gene Symbol	Genbank	Swissprot	General Function	Specific Function
mitogen-activated protein kinase 3	erk1	MAPK3	X60188	P27361	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 7	erk5	MAPK7	U29725	Q13164	Cell adhesion	Protein-tyrosine kinase activity
mitogen-activated protein kinase 8	JNK1	MAPK8	L26318	P45983	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
mitogen-activated protein kinase 9	JNK2	MAPK9	U09759	P45984	Stress response	Regulates c-jun, Kinase
Phospholipase A2	PLA2	YWHAZ	M86400	P04054	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	MCL1	MCL1	AF118124	Q07820	Apoptosis	Apoptosis regulator activity
Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	MDM2	MDM2	NM_002392	Q00987	Oncogenesis	Transcription factor
microsomal glutathione S-transferase 1	MGST1	MGST1	J03746	P10620	Glutathione metabolism	Transferase activity
v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)	MYCN	MYCN	NM_005378	P04198	Transcription factor	Transcription factor activity
nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 1	NFATC1	NFATC1	U80917	Q95644	Wnt signaling pathway	Regulate the activation, proliferation, differentiation and programmed death of T-lymphocytes
nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1 (p105)	NFKB1	NFKB1	NM_003998	P19838	Transcription	Inflammatory response; antibacterial humoral response
nitric oxide synthase 2A (inducible, hepatocytes)	NOS2A	NOS2A	U31511	P35228	Electron transport	Nitric-oxide synthase activity
proliferating cell nuclear antigen	PCNA	PCNA	NM_002592	P12004	Cell cycle	Increasing the polymerase's processibility
phosphodiesterase 1B, calmodulin-dependent	PDE1B	PDE1B	NM_000924	Q01064	Apoptosis	Calmodulin-dependent cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity
Ribosomal Protein S9	S9	RPS9	NM_001013	P46781	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	PLD1	PLD1	NM_002662	Q13393	Phospholipid metabolism	Phospholipase D activity
polo-like kinase (Drosophila)	PLK	PLK	U01038	Q15153	DNA repair / synthesis	Mitosis, kinase
P450 (cytochrome) oxidoreductase	POR	POR	NM_000941	P16435	Electron transport	Oxidoreductase activity
v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1	RAF1	RAF1	X03484	P04049	Oncogenesis	Apoptosis regulation, Kinase
retinoic acid receptor, beta	RARB	RARB	Y00291	P10826	Receptor activity	Receptor of retinoic acid
retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	RB1	RB1	NM_000321	P06400	Cell cycle	Interacts with histone deacetylase to repress transcription; tumor repressor
retinoblastoma-like 2 (p130)	RB2	RBL2	NM_005611	P61163	Cell cycle	Negative regulation of cell cycle
retinoblastoma binding protein 1	RBP1	RBP1	NM_002899	P29374	DNA binding / cell cycle	Chromatin binding
receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	RIPK1	RIPK1	NM_003804	Q13546	Stress response	Protein serine/threonine kinase activity
TRAF family member-associated NFKB activator	TANK	TANK	U59863	Q92844	Signal transduction	Protein binding
transcription factor Dp-1	DP1	TFDP1	NM_007111	Q00765	Transcription	Mediator of transcriptional activation by TGF-beta receptor;involved in the cell cycle ; Pol II transcription
transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	DP2	TFDP2	NM_006286	Q14188	Transcription	Transcription factor ; Pol II transcription
Serine Dehydratase	SDS	SDS	NM_006843	P17026	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNFA	TNF	NM_000594	P01375	Apoptosis	Endotoxin; pathophysiology of sepsis
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a	TNFRSF10A	TNFRSF10A	NM_003844	Q00220	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b	TNFRSF10B	TNFRSF10B	AF016266	Q14763	Apoptosis	Activation of NF-kappaB-inducing kinase
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	TNFRSF1A	TNFRSF1A	NM_001065	P19438	Growth factor and cytokine	Receptor activity
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B	TNFRSF1B	TNFRSF1B	NM_001066	P20333	Cell signaling / receptor	Receptor
tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6	TNFRSF6	TNFRSF6	NM_000043	P25445	Growth factor and cytokine	Transmembrane receptor activity
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	TNFSF10	NM_003810	P50591	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 5 (hyper-IgM syndrome)	TNFSF5	TNFSF5	NM_000074	P29965	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 6	TNFSF6	TNFSF6	NM_000639	P48023	Growth factor and cytokine	Tumor necrosis factor receptor binding
Transferrin receptor	TFR	TFR	NM_003234	P02786	HouseKeeping gene	HouseKeeping gene
tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7	TNFSF7	TNFSF7	NM_001252	P32970	Apoptosis	Tumor necrosis factor receptor binding
tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)	p53	TP53	AF307851	P04637	Cell cycle	DNA-binding protein; tumor suppressor activity
tumor protein p73	TP73	TP73	NM_005427	Q15350	Transcription factor	Transcription factor activity
TNFRSF1A-associated via death domain	TRADD	TRADD	NM_003789	Q15628	Apoptosis	induction of apoptosis
TNF receptor-associated factor 2	TRAF2	TRAF2	NM_021138	Q12933	Signal transduction	Signal transducer activity
TNF receptor-associated factor 3	TRAF3	TRAF3	U21092	Q13114	Apoptosis	Role in immune response
TNF receptor-associated factor 5	TRAF5	TRAF5	AB000509	Q00463	Apoptosis	Signal transducer activity
TNF receptor-associated factor 6	TRAF6	TRAF6	U78798	Q9Y4K3	MAPK signaling pathway	Mediates activation of NF-kappa-B and JNK

Annexe V

DualChip Human Apoptosis									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	Hyb +	buffer	ABL1	ADAM 17	AKT1	AKT2	BAD	buffer	BAG1
2	SenI	BAK 1	IS4(RCA)	BAX	SenI	BCL2	IS3(RBCL)	BCL2A1	SenI
3	BclX	buffer	BID	buffer	RPL13A (23Kd)	buffer	BIK	buffer	BIRC2
4	Hyb -	ALDOA (ALDO)	BIRC3	BIRC4	SenI	BIRC5	BNIP3	CASP1	CASP2
5	CASP3	CASP4	buffer	CASP8	CCND1	CCND2	buffer	K-ALPHA-1 (tubu)	CCNH
6	SenI	CDC2	CDC25C	CDC6	SenI	CDK2	IS5(TAPG)	CDK4	SenI
7	CDK5	CDK5R1	IS1(RBCS)	CDK6	ACTB (acti)	CDK7	CDK9	CDKN1A	CDKN1C
8	CDKN2A	CDKN2B	CFLAR	CLK1	CLU	CRADD	CSE1L	PPIE /cyc	Hyb -
9	DDIT4L	buffer	DFFA	E2F1	GAPD / GAPDH	E2F3	E2F5	buffer	FADD
10	SenI	GADD45A (997)	IS2(CAB)	GAS1	SenI	GPX1	IS6(SIP)	GRB2	SenI
11	GSA	buffer	GSM	buffer	GSR	buffer	GSTP1	buffer	GSTT1
12	Hyb -	IGF1	IGF1R	IGF2	SenI	IGF2R	IGFBP2	HK1	IGFBP3
13	IGFBP4	HPRT1 (HPRT)	buffer	IGFBP5	IGFBP6	ING	buffer	JUN	LTA (AF- 1012)
14	SenI	LTB	IS3(RBCL)	MAP2K1 (1004)	SenI	MAP2K5	MAP2K6	MAP3K14	SenI
15	MAPK1	MAPK10 (511)	MAPK12	MAPK14	MDH1 (MDH)	MAPK3	IS6(SIP)	MAPK7	MAPK8
16	MAPK9	YWHAZ (PLA2)	MCL1	MDM2	MGST1	MYCN	NFATC1	NFKB1	Hyb -
17	NOS2A	buffer	PCNA	PDE1B	RPS9 (S9)	PLD1	IS5(TAPG)	buffer	PLK
18	SenI	POR	IS2(CAB)	RAF1	SenI	RARB	RB1	RBL2	SenI
19	RBP1	buffer	RIPK1	buffer	TANK	buffer	TFDP1	buffer	TFDP2
20	Hyb -	SDS(SDH)	TNF	TNFRSF10A	SenI	TNFRSF10B	TNFRSF1A (1011)	TNFRSF1B	TNFRSF6
21	TNFSF10	TNFSF5	buffer	TNFSF6	TFRC (TFR)	TNFSF7	buffer	TP53	TP73
22	SenI	TRADD	IS1(RBCS)	TRAF2	SenI	TRAF3	IS4(RCA)	TRAF5	SenI
23	Hyb +	buffer	TRAF6	buffer	buffer	1ctl -	2ctl -	3ctl -	4ctl -
24	Hyb +	buffer	5ctl +	6ctl +	7ctl +	8ctl +	9ctl +	buffer	Hyb +

Annexe V: Design du « DualChip Human General ». Hyb ctl + : contrôles d'hybridation positifs, Hyb-: Contrôles d'hybridations négatifs, IS: standard interne, buffer: contrôles négatifs de fixations, ctl +: contrôles positifs de fixation, en vert, les gènes de maintenance.

Annexe VI

Gènes	Ratio	Gènes	Ratio	Gènes	Ratio	Gènes	Ratio
CCND1	0,51	TRAF5	0,50	CDK4	0,90	MAPK3	0,94
JUN	0,68	TRAF3	0,54	CDK5	0,85	MAPK7	0,77
CDC6	0,65	NOS2A	0,54	CDK5R1	0,77	MAPK8	0,78
TNFRSF1B	0,74	TNFSF6	0,56	CDK6	0,87	MAPK9	0,79
CDKN1A	0,86	TP73	0,60	CDK7	1,12	MCL1	1,10
GADD45A	0,46	GSR	0,60	CDK9	0,96	MDM2	1,10
PDE1B	0,58	CDC2	0,62	CDKN1C	0,86	MGST1	0,92
IGFBP3	0,65	POR	0,63	CFLAR	0,87	NFATC1	1,10
BAD	0,61	CASP3	0,64	CLU	1,09	NFKB1	0,88
ABL1	1,05	E2F3	0,65	CRADD	0,69	PCNA	0,74
TRADD	0,85	RBP1	0,65	CSE1L	0,90	PLK	0,92
TP53	1,16	CDKN2A	0,65	DFFA	0,73	RAF1	0,74
BIRC2	0,85	ADAM 17	0,66	E2F1	0,76	RB1	0,92
RBL2	1,07	CDKN2B	0,66	FADD	0,96	RIPK1	0,88
CLK1	0,98	GSTT1	0,67	GPX1	1,03	TFDP1	0,73
TANK	1,19	TNFSF10	1,79	GRB2	0,88	TNF	1,16
GAS1	1,66	TFRC	0,56	GSA	1,03	TNFRSF10A	0,92
E2F5	1,29	HK1	0,61	GSM	0,95	TNFRSF10B	0,78
TNFRSF6	1,01	BAX	0,83	GSTP1	0,91	TNFRSF1A	0,92
BIRC3	0,76	BCL2	0,91	IGF1	1,00	TNFSF5	1,49
PLD1	1,04	BCL2A1	1,20	IGF2	0,94	TNFSF7	0,69
MAP2K5	1,59	BclX	0,75	IGF2R	0,91	TRAF2	0,70
TFDP2	1,24	BID	0,78	IGFBP2	0,96	TRAF6	0,78
MAP3K14	0,81	BIK	0,74	IGFBP4	1,41	RPL13A	1,07
MAP2K6	1,39	BIRC4	0,98	IGFBP5	0,86	ALDOA	0,91
RARB	0,71	BIRC5	0,74	IGFBP6	1,42	K-ALPHA-1	1,09
IGF1R	1,47	BNIP3	1,03	ING	1,16	ACTB	1,00
MYCN	1,28	CASP2	0,81	LTA	1,10	PPIE	0,94
CASP1	0,83	CASP4	0,80	LTB	0,85	GAPD	1,08
DDIT4L	0,70	CASP8	0,92	MAP2K1	0,81	HPRT1	0,80
AKT1	0,82	CCND2	1,08	MAPK1	0,96	MDH1	0,98
AKT2	0,82	CCNH	0,95	MAPK10	1,02	YWHAZ	1,09
BAG1	1,04	CDC25C	1,12	MAPK12	0,86	RPS9	1,05
BAK 1	0,66	CDK2	0,85	MAPK14	0,77	SDS	1,01

Annexe VI: Valeurs obtenues pour l'expression différentielle de gènes dans les cellules cybrides mutées traitées à la staurosporine analysée avec le « DualChip Human Apoposis ». Les valeurs se trouvant dans une case grise représentent une variation quantitative et significative de l'expression génique.

17 JUIN 2005

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20