

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Caractérisation de l'abondance mitochondriale dans des cellules cybrides d'origine musculaire contenant la mutation A8344 dans l'ADN mitochondrial

BILLARD, Jean-Martin

*Award date:*  
2012

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[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.

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du Département de Biologie  
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR  
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20  
E-mail: joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be/fundp.html>

**Caractérisation de l'abondance mitochondriale dans des cellules cybrides  
d'origine musculaire (rhabdomyosarcome) contenant la mutation A8344G dans  
l'ADN mitochondrial**

BILLARD Jean-Martin

Résumé

Des mutations dans le génome mitochondrial peuvent causer des pathologies telles que le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers) causé par la mutation A8344G de l'ADN mitochondrial située dans le gène de l'ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup>, entraînant une altération de la chaîne de transport des électrons suite au dysfonctionnement de la traduction mitochondriale. L'étude de fibres musculaires individuelles de patients atteints du syndrome MERRF a permis de mettre en évidence une corrélation entre les RRF (Ragged Red Fibers causées par l'accumulation anormale de mitochondries sous le sarcolemme des fibres musculaires) et la présence de marqueurs apoptotiques. Afin d'étudier les mécanismes responsables de cette augmentation d'abondance mitochondriale, nous avons utilisé un modèle cellulaire cybride d'origine musculaire contenant ou non la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial. Après avoir amélioré la différenciation de ces cellules à l'aide notamment d'un inhibiteur chimique, nous avons analysé la population mitochondriale de ces cellules cybrides en évaluant la masse mitochondriale globale, l'abondance de protéines mitochondriales ainsi que de l'ADN mitochondrial, et les niveaux de transcrits de régulateurs de la biogenèse mitochondriale. Cependant ces analyses n'ont pas permis d'observer d'augmentation d'abondance mitochondriale entre les cellules cybrides mutées et sauvages, ni entre les cellules différenciées et non différenciées, alors que cette dernière caractéristique est décrite dans la littérature. Ces résultats suggèrent que la différenciation myogénique, probablement nécessaire à l'augmentation d'abondance mitochondriale dans les cellules porteuses de la mutation MERRF, n'est pas suffisamment efficace avec ce modèle cellulaire. Dès lors, nous avons changé d'approche expérimentale et tenté d'améliorer la différenciation en surexprimant le facteur de transcription myogénique MRF4 couplé à la GFP.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2012

**Promoteur:** P. Renard

# TABLE DES MATIERES

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	<b>3</b>
1.1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE .....	3
1.1.2. <i>Le processus de différenciation myogénique</i> .....	3
1.1.2.1 Facteurs de transcription .....	3
1.1.2.2 Contrôle du cycle cellulaire et contrôle épigénétique des gènes musculaires .....	6
1.1.2.3 Activation de la différenciation par p38 MAPK .....	7
1.2. LA MITOCHONDRIE.....	9
1.2.1 <i>Génétique mitochondriale</i> .....	9
1.2.1.1 L'ADN mitochondrial.....	9
1.2.1.2 Réplication de l'ADN mitochondrial .....	10
1.2.1.3 Fonctions de la mitochondrie .....	11
1.2.2 <i>La biogenèse mitochondriale</i> .....	12
1.2.2.1 Facteurs de transcription .....	12
1.2.2.2 PGC-1 $\alpha$ .....	13
1.3 LES DYSFONCTIONNEMENT MITOCHONDRIAUX.....	15
1.3.1 <i>Le syndrome MERRF</i> .....	16
1.4 OBJECTIFS DU MÉMOIRE .....	18
1.5 MODÈLE CELLULAIRE.....	19
<b>2. MATÉRIEL ET MÉTHODES</b> .....	<b>22</b>
2.1 CULTURE CELLULAIRE ET DIFFÉRENCIATION MYOGÉNIQUE .....	22
2.2 MESURE DE LA CYTOTOXICITÉ : TEST DE RELARGAGE DE LA LDH (LACTATE DEHYDROGENASE) .....	22
2.3 MESURE DE L'ABONDANCE DE PROTÉINES (WESTERN BLOT) .....	23
2.4 IMMUNOFLOUORESCENCE .....	25
2.5 MESURE DE L'ABONDANCE DE L'ADN MITOCHONDRIAL.....	26
2.6 MESURE DE L'EXPRESSION DE GÈNES PAR RT-PCR EN TEMPS RÉEL .....	27
2.7 ÉVALUATION DE LA MASSE MITOCHONDRIALE EN CYTOMÉTRIE DE FLUX .....	28

2.8	TRANSFECTION DU PLASMIDE MRF4-GFP.....	29
2.8.1	<i>Amplification du plasmide.....</i>	29
2.8.2	<i>Transfection.....</i>	30
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS .....</b>	<b>31</b>
3.1	AMÉLIORATION DE LA DIFFÉRENCIATION .....	31
3.2	CARACTÉRISATION DE LA POPULATION MITOCHONDRIALE.....	33
3.2.1	<i>Analyse de l'abondance mitochondriale à l'aide de la sonde Mitotracker Green au FACS.</i> .....	34
3.2.2	<i>Analyse de l'abondance de différentes protéines mitochondriales .....</i>	34
3.2.3	<i>Analyse de l'abondance mitochondriale en mesurant la quantité d'ADNmt .....</i>	35
3.3	ESSAIS D'AUGMENTATION DE LA DURÉE DE LA DIFFÉRENCIATION .....	36
3.4	ÉTUDE DE FACTEURS IMPLIQUÉS DANS LE PROCESSUS DE BIOGÈNESE MITOCHONDRIAL.	37
3.5	TRANSFECTION DES CELLULES AVEC UN PLASMIDE CONTENANT LA SÉQUENCE DE MRF4 COUPLÉES À LA SÉQUENCE DE LA GFP.....	38
<b>4.</b>	<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>40</b>
<b>5.</b>	<b>RÉFÉRENCES .....</b>	<b>44</b>

# 1. Introduction

## 1.1. Le muscle squelettique

Le mouvement est une des caractéristiques essentielles du monde animal. Les muscles striés squelettiques vont remplir cette fonction de locomotion en plus de leur rôle important dans la régulation métabolique. Il s'agit du tissu le plus abondant retrouvé chez les mammifères, représentant de 45 à 55% de la masse totale du corps humain (ANGIONE *et al.* 2011). Ces muscles striés squelettiques, avec les muscles striés cardiaques et les muscles lisses font partie du système musculaire. Les muscles diffèrent des autres tissus du corps humain par différentes caractéristiques : l'excitabilité, la contractilité, l'élasticité et l'extensibilité. L'activité contractile des muscles striés squelettiques ou cardiaques est due à une succession de sarcomères qui, ensemble, forment des myofibrilles. Les sarcomères sont formés de filaments intercroisés composés d'actine et de myosine, de filaments élastiques (Titine), d' $\alpha$ -actinine et de myomesine (BRAUN and GAUTEL 2011). Ces structures sont spécialisées dans la transformation de l'énergie chimique en mouvement (COSSU *et al.* 2000). Les muscles squelettiques sont particulièrement plastiques et peuvent changer de type de fibres en réponse à un changement d'activité physiologique ou de voie de signalisation (ANGIONE *et al.* 2011). Une autre caractéristique importante est sa capacité à se régénérer après un endommagement des fibres. Cette plasticité est principalement due à un type de cellules souches, nommées cellules satellites, se trouvant sous la lame basale des fibres musculaires. Les cellules satellites sont activées lorsque le muscle est endommagé et vont se différencier pour remplacer les fibres musculaires altérées (BRAUN and GAUTEL 2011).

Dans le cadre de ce mémoire, nous allons nous intéresser principalement aux mécanismes impliqués dans la différenciation myogénique.

### 1.1.2. Le processus de différenciation myogénique

La différenciation myogénique chez l'être humain se passe non seulement pendant la vie embryonnaire, mais également pendant toute la vie adulte. Les cellules souches, embryonnaires ou satellites (au niveau de l'organe adulte) vont subir une différenciation myogénique dans le but de former ou de reformer des myotubes. Cependant, ce processus est extrêmement régulé au niveau moléculaire par différents acteurs détaillés ci-dessous.

#### 1.1.2.1. Facteurs de transcription

Les facteurs de transcription basic helix-loop-helix (bHLH) (**Figure 1.1**) sont connus pour contrôler la détermination et la différenciation cellulaire de plusieurs types cellulaires incluant les cellules musculaires, les neurones et les cellules hépatiques (MOLKENTIN and OLSON 1996). Plusieurs facteurs de transcription bHLH sont impliqués dans la différenciation myogénique, dont le facteur clé MyoD, découvert en 1986 (LASSAR *et al.* 1986). En effet, la

transfection de ce facteur de transcription dans des cellules musculaires et même dans des cellules fibroblastiques déclenche la différenciation myogénique (CHOI *et al.* 1990; DAVIS *et al.* 1987; WEINTRAUB *et al.* 1989). Avec trois autres facteurs de transcription (la myogénine, Myf5 et MRF4), MyoD fait partie de la famille des MRF's : Myogenic Related Factor (**Figure 1.1B**). Ces différents MRFs, qui appartiennent à la famille des facteurs de transcription bHLH, peuvent former des hétérodimères avec des protéines E (E12 et E47), ubiquistes, et permettre ainsi leur liaison à l'ADN sur une séquence consensus (E-Box : GANNCT). Des études mutationnelles ont montré que la région bHLH est essentielle à la liaison à l'ADN et à la dimérisation des MRFs avec les protéines E mais elle n'est pas suffisante pour activer efficacement la différenciation myogénique (BERKES and TAPSCOTT 2005).

La séquence E-box a été identifiée dans les régions régulatrices de gènes codant pour différentes protéines structurales musculaires. Cependant, certains gènes codant pour des protéines musculaires, activés via l'expression des MRFs, ne possèdent pas cette E-box dans leur région régulatrice, suggérant que les MRFs agissent via un mécanisme indirect pour activer ces gènes (MOLKENTIN and OLSON 1996).

Des études ultérieures ont mis en évidence la capacité des membres de la famille MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) (**Figure 1.1B**) à agir comme co-régulateurs. Cette famille de protéines se compose de 4 isoformes (MEF2A-MEF2D) possédant toutes un domaine MEF2 et un domaine MADS-box (acronyme référant aux 4 premiers facteurs de transcription se liant à cette séquence : MCM1, Agamous, Deficiens et SRF) très conservés en position N-terminale (MOLKENTIN and OLSON 1996). Les protéines MEF2 ont tout d'abord été décrites comme des facteurs de transcription spécifiques aux cellules musculaires se liant à l'ADN à la séquence consensus CTA(A/T)<sub>4</sub>TAG (MOLKENTIN and OLSON 1996) sur la région régulatrice du gène de la créatine kinase musculaire (GOSSETT *et al.* 1989).

Ces deux familles d'acteurs essentiels, MRFs et MEF2, coopèrent pour induire l'expression des gènes musculaires. Cela a notamment été montré pour la créatine kinase musculaire, la desmine, la MLC (Myosin Light Chain) ou encore pour la myogénine. Comme nous pouvons le voir sur la **figure 1.2**, certains gènes musculaires contiennent uniquement des séquences E-box dans leur promoteur mais MEF2 contribue également à leur activation en interagissant avec les hétérodimères MRFs/Protéine E (MOLKENTIN *et al.* 1995). De même, certains gènes contiennent uniquement un site de liaison à MEF2 sur leur séquence régulatrice et les MRFs contribuent également à leur activation en interagissant avec les protéines MEF2. Le modèle établi par Molkentin et ses collaborateurs met en évidence le fait que les MRFs induisent l'expression des protéines MEF2 alors que les protéines MEF2 amplifient et maintiennent l'expression des MRFs (MOLKENTIN *et al.* 1995).

Des études basées sur des souris knock-down pour ces différents MRFs ont permis de mettre en évidence certaines de leurs caractéristiques. Les souris, dont le gène de MyoD est délété, possèdent toujours des muscles striés squelettiques d'apparence normale malgré le rôle clé de ce facteur. Il a en effet été démontré qu'il existe un mécanisme de compensation entre MyoD et Myf5 (CIEMERYCH *et al.* 2011). D'autre part, lorsque MyoD et Myf 5 sont délétés, aucun muscle squelettique, ni myoblaste (précurseur musculaire) ne peut être observé, indiquant un

rôle de facteur de détermination pour MyoD et Myf5. Par contre, des souris dont le gène de la myogénine est délété ne possèdent pas non plus de muscles squelettiques, mais bien des cellules précurseurs de muscle, suggérant un rôle de facteur de différenciation pour la myogénine. (HASTY *et al.* 1993; KABLAR *et al.* 1998; KASSAR-DUCHOSSOY *et al.* 2004; NABESHIMA *et al.* 1993).

Il existe également un grand nombre de régulateurs transcriptionnels impliqués dans la myogenèse tels que les protéines « forkhead box O1 et 3 » (FOXO1 et FOXO3), les protéines SMAD2-3 ou encore le facteur de réponse au sérum (SRF) (Les actions de ces différents facteurs de transcription sont détaillées dans la review de T. Braun en 2011)

L'activation du réseau de facteurs de transcription qui régule le développement embryonnaire du muscle squelettique dépend de facteurs paracrines sécrétés par les tissus adjacents aux somites comme la notochorde, le tube neural ou l'ectoderme embryonnaire (CIEMERYCH *et al.* 2011). Ces différents signaux déterminent l'activation de la différenciation myogénique d'un point de vue spatial et temporel (BRAUN and GAUTEL 2011). En réponse à la protéine Sonic Hedgehog (Shh) ou à la protéine wingless (Wnt), respectivement synthétisés par la notochorde et le tube neural, les cellules s'engagent dans la lignée myogénique et commencent à exprimer des marqueurs de spécification tels que Pax3 et Pax7 (CIEMERYCH *et al.* 2011; MOK and SWEETMAN 2011). L'expression de ces marqueurs est suivie par la synthèse des MRFs, responsables de la différenciation myogénique.

D'autres molécules telles que Noggin et les BMPs (Bone Morphogénic Proteins) jouent également un rôle important en inactivant ou activant, respectivement, les récepteurs de la famille TGF- $\beta$  (BRAUN and GAUTEL 2011; PERRY and RUDNICK 2000).

Chez l'individu adulte, lorsque les muscles sont formés, la croissance et la régénération de ceux-ci dépendent de la prolifération et de la différenciation des cellules souches musculaires dites cellules satellites. Ces cellules satellites, localisées sous la lame basale des fibres musculaires expriment spécifiquement Pax7 et c-Met. Elles sont majoritairement quiescentes et sont activées lorsqu'il y a une lésion musculaire. Une fois activées, ces cellules vont proliférer et exprimer MyoD pour ensuite sortir du cycle cellulaire, se différencier et remplacer les fibres musculaires lésées. La différenciation est alors accompagnée d'une diminution de l'expression de Pax7 et d'une augmentation de l'expression des MRFs. Les cellules satellites peuvent également subir une division asymétrique permettant à la cellule mère de garder le caractère de cellules souches. Tout comme dans la différenciation myogénique des cellules embryonnaire, le facteur de transcription Myf5 semble jouer un rôle important pour l'engagement dans la lignée myogénique des cellules satellites. En effet, les cellules satellites sont séparées en deux sous-populations : les cellules Myf5-négative, qui possèdent le caractère de cellules souches, et les cellules Myf5 positives, qui sont déjà engagées dans la lignée myogénique (KUANG *et al.* 2007). Les facteurs de transcription Pax et Myf5 sont donc importants pour la spécification et la maintenance des cellules satellites chez l'adulte (BUCKINGHAM 2001; LE GRAND and RUDNICKI 2007).

### ***1.1.2.2. Contrôle du cycle cellulaire et contrôle épigénétique des gènes musculaires***

Un contrôle du cycle cellulaire est particulièrement crucial pour un bon développement des tissus et des organes lors de l'embryogenèse. La formation des tissus adultes résulte d'un équilibre entre une prolifération des cellules précurseurs et leur différenciation. MyoD et Myf5 sont exprimés dans les cellules musculaires prolifératives mais leur expression n'est pas suffisante pour déclencher la différenciation myogénique : d'autres signaux sont nécessaires. *In vitro*, ces signaux peuvent être déclenchés par le retrait des facteurs de croissance ou bien la synthèse de molécules qui lève l'inhibition de la myogenèse (comme la Follistatine qui inhibe la myostatine) (PISCONTI *et al.* 2006), ce qui entraîne la sortie du cycle cellulaire et le début de la différenciation. Il existe donc un lien étroit entre les molécules régulant le cycle cellulaire, la croissance, la division, et les facteurs de détermination et de différenciation myogénique (**Figure 1.3**).

Tant que les myoblastes prolifèrent, ils synthétisent un taux élevé de cycline D1 favorisant la progression dans le cycle cellulaire. L'expression de cette cycline est principalement contrôlée par les facteurs de transcription c-jun et c-fos, exprimés en réponse aux mitogènes. De plus, le facteur c-jun et la cycline D1 sont capables de se lier à MyoD et donc d'inhiber la formation des hétérodimères MyoD/protéine E ainsi que la différenciation (CIEMERYCH *et al.* 2011).

D'autres protéines ont également un rôle inhibiteur, comme les protéines Id (inhibiteurs de différenciation) (**Figure 1.1B**) qui sont fortement exprimées lors de la prolifération cellulaire. Ces protéines possèdent un domaine HLH mais pas de domaine de liaison à l'ADN. Les protéines Id vont séquestrer les MRFs ainsi que les protéines E et former des hétérodimères incapables de se lier à l'ADN, ce qui va empêcher la transcription des gènes cibles (YOKOTA and MORI 2002; ZEBEDEE and HARA 2001).

Lors de la différenciation cellulaire, la cycline D1 est dégradée, libérant MyoD. Celui-ci induit l'expression de pRb (Retinoblastoma protein), qui va inhiber les inhibiteurs de différenciation ainsi que l'expression de p21, qui va quant à lui inhiber les CDK et permettre la sortie du cycle cellulaire. Plus récemment, le répresseur transcriptionnel RP58 a été mis en évidence. Celui-ci est exprimé dans les tissus musculaires en différenciation et inhibe l'expression des inhibiteurs de différenciation (Id2 et Id3), ce qui permet l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la différenciation (YOKOYAMA and ASAHARA 2011).

En plus de ces régulations liées au cycle cellulaire, la prolifération et la différenciation sont régulées par différentes modifications épigénétiques qui vont permettre ou non à la machinerie de transcription d'accéder à certains gènes. Dans les cellules prolifératives, les facteurs MyoD et MEF2 sont liés aux HDACs (Histone Deacetylase) qui, comme leur nom l'indique, exercent leur activité déacétylase sur les histones au sein des gènes musculaires ainsi que sur certains régulateurs transcriptionnels. Ceci a pour effet d'empêcher la liaison à l'ADN de MyoD et MEF2. Lors de cette phase proliférative, l'expression des gènes musculaires est également inhibée par l'activité d'histones méthyl transférase qui convertissent la chromatine en une forme transcriptionnellement inactive. Les gènes régulant la progression du cycle cellulaire sont quant à eux activés par E2F. En effet, pRb est



hyperphosphorylé par les CDK (Cyclin Dependant protein Kinase), le rendant incapable de séquestrer E2F et donc d'inhiber la progression du cycle cellulaire (CIEMERYCH *et al.* 2011).

Par contre, dans le cas de cellules en différenciation, cette protéine pRb est activée et inhibe l'expression des gènes régulant la progression du cycle cellulaire en séquestrant E2F. pRb inhibe également l'expression de ces gènes en recrutant les HDACs et le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF (Switching/Sucrose Non Fermenting). La chromatine au niveau des gènes musculaires est, quant à elle, relâchée suite à l'action des HATs (Histone acetyl transferase) p300 et PCAF et du complexe SWI/SNF, recrutés par MyoD. La liaison des hétérodimères MRFs/Protéine E et des MEF2 est dès lors possible, permettant la transcription des gènes musculaires (CIEMERYCH *et al.* 2011).

pRB joue donc un double rôle durant la différenciation myogénique, inhibant d'un côté la transcription des protéines responsables de la progression du cycle cellulaire et agissant de l'autre comme co-activateur de l'expression des gènes musculaires (CIEMERYCH *et al.* 2011).

### **1.1.2.3 Activation de la différenciation par p38 MAPK**

La plupart des processus cellulaires, comme la différenciation myogéniques, sont déclenchés par des signaux extracellulaires provenant du milieu ou des tissus adjacents. Ces signaux doivent être transmis à l'intérieur de la cellule pour orchestrer les réponses adéquates. La transduction de ces signaux extracellulaires est majoritairement basée sur des modifications post-traductionnelles où la phosphorylation est prédominante (CUADRADO and NEBREDÁ 2010). La famille des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK), composée de ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase), p38 MAPK et JNK, est fortement impliquée dans cette transduction de signal.

La protéine p38 MAPK, d'une masse moléculaire de 38kDa, possède 4 isoformes : p38- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  et - $\delta$ . p38 MAPK est phosphorylée et activée par des MAPK kinase (MAP2K), comme MKK3 et MKK6, qui sont elles-mêmes phosphorylées par différentes MAP3K (TAK1, ASK1, DLK, MEKK4), activées à leur tour par différents stimuli extracellulaires (facteurs de croissance, hormones, cytokines...) (LLUIS *et al.* 2006) (**Figure 1.4**).

L'activation de p38 MAPK est effectuée par la double phosphorylation de la séquence Thr-Gly-Tyr sur leur boucle d'activation. Cette phosphorylation va induire un changement de conformation qui va augmenter l'affinité de p38 MAPK pour ses substrats et lui permettre de les phosphoryler sur leur résidus Ser ou Thr (CUADRADO and NEBREDÁ 2010).

L'intensité ainsi que la durée de l'activation de p38 MAPK sont des paramètres très importants qui influencent le type de réponse engendrée. Il a été montré que la forte activation de p38 induit l'apoptose, alors qu'une activation plus faible promeut la survie cellulaire (DOLADO and NEBREDÁ 2008). Cependant, une activation soutenue de p38 MAPK, résultant de l'expression ectopique de MEKK6 constitutivement active, entraîne l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que la différenciation myogénique des cellules rhabdomyosarcome (RMS) (PURI *et al.* 2000). Une activation temporaire de p38 MAPK est quant à elle caractéristique d'une réponse inflammatoire (CUADRADO and NEBREDÁ 2010).

Le nombre de substrats de p38 ne cesse d'augmenter. Ceux-ci peuvent être des protéines cytoplasmiques (d'autres protéines kinases, Cycline,...) ou bien des protéines nucléaires, principalement des facteurs de transcription (ATF, MEF2A, MEF2C,...), suggérant un rôle important de p38 MAPK dans la régulation de l'expression de gènes (CUADRADO and NEBREDA 2010; LLUIS *et al.* 2006).

p38 MAPK s'est avéré être un régulateur crucial de la différenciation myogénique : l'inhibition de cette kinase entraîne une incapacité des cellules à fusionner en myotubes et à exprimer des gènes musculaires (LLUIS *et al.* 2006). De plus, plusieurs éléments importants pour la différenciation myogénique sont régulés par p38 MAPK, comme MEF2A, MEF2C et la protéine E47. MEF2A et MEF2C ont besoin d'être activés par p38 MAPK pour assurer leur activité transcriptionnelle (KEREN *et al.* 2006) (**Figure 1.5**). En effet, l'inhibition de cette MAPK montre une diminution de la phosphorylation de MEF2 mais également une diminution de son expression, sans doute à cause de la boucle d'auto-activation de MEF2 (CRIPPS *et al.* 2004).

p38 MAPK augmente également la transcription dépendante de MyoD via des mécanismes indirects. E47 est phosphorylé sur son résidu Ser140, ce qui a pour effet d'augmenter la formation des hétérodimères E47/MyoD et leur liaison sur les E-box. Il a d'ailleurs été montré que si le résidu Ser 140 est muté en alanine, la protéine E47 ne forme plus les hétérodimères avec MyoD (CUADRADO and NEBREDA 2010). Cette kinase phosphoryle également deux sous-unités du complexe SWI/SNF, permettant notamment son interaction avec MyoD, et le remodelage de la chromatine au niveau des promoteurs des gènes codant pour la myogénine et la créatine kinase musculaire (SIMONE *et al.* 2004). Enfin, plusieurs études ont montré que p38 MAPK pourrait contribuer au recrutement de l'ARN polymérase II sur les promoteurs de gènes musculaires et faciliter sa progression via la phosphorylation de MEF2 (LLUIS *et al.* 2006).

Une autre caractéristique de p38 MAPK est son implication dans la régulation du cycle cellulaire et plus précisément dans la sortie du cycle. L'isoforme p38 $\alpha$  semble requise pour diminuer l'expression de la cycline D1 ainsi que la phosphorylation de pRb. Ces effets peuvent être dus à l'effet antagoniste de p38 MAPK par rapport à une autre MAPK : JNK. En effet, JNK favorise la prolifération cellulaire en phosphorylant c-jun qui active à son tour l'expression de la cycline D1 (PERDIGUERO *et al.* 2007). L'inhibition de p38 MAPK a provoqué également une diminution de l'abondance de l'inhibiteur du cycle cellulaire p21<sup>WAF1</sup> (ZETSER *et al.* 1999).

Cependant, p38 n'entraîne pas uniquement une régulation positive de la différenciation myogénique : MRF4, impliqué dans des étapes plus tardives de la différenciation myogénique, est phosphorylé sur deux résidus de son domaine de transactivation par p38 MAPK, ce qui a pour conséquence la diminution de son activité transcriptionnelle (LLUIS *et al.* 2006). Cet effet inhibiteur provoque une répression sélective de l'expression de gènes musculaires pendant la différenciation terminale (SUELVES *et al.* 2004).

La p38 MAPK contrôle donc plusieurs étapes de la myogenèse : l'arrêt de la prolifération via son effet antagoniste avec JNK et l'initiation de la différenciation grâce à son action sur

différents acteurs de la différenciation myogénique comme E47, SWI/SNF, MEF2 ou encore l'ARN polymérase II. L'effet de cette kinase sur la myogenèse a également été observé dans d'autres cas de différenciation : l'adipogenèse, neurogenèse, chondrogenèse ou encore érythrogenèse (NEBREDÁ and PORRAS 2000).

Les cellules musculaires ainsi que les cellules nerveuses sont deux types cellulaires qui sont de gros consommateurs d'ATP. Ceux-ci requièrent donc beaucoup d'énergie pour assurer leurs fonctions. La production de l'énergie au sein de la cellule, en plus de bon nombre de processus métabolique, se déroule dans la mitochondrie. Plusieurs études ont par ailleurs montré que la différenciation myogénique est accompagnée d'une forte augmentation de l'activité mitochondriale et de la biogénèse mitochondriale. (REMELS *et al.* 2010; ROCHARD *et al.* 2000)

## 1.2. La mitochondrie

Les mitochondries sont des organites intracellulaires organisés en réseaux que l'on retrouve dans les cellules eucaryotes. La mitochondrie possède une origine procaryotique qui peut être mise en évidence par plusieurs caractéristiques : son propre génome, les similitudes entre la transcription et la traduction bactérienne et mitochondriale ou encore la double membrane de l'organelle (SHUTT and GRAY 2006) (**Figure 1.6**). La mitochondrie joue un rôle très important dans le métabolisme cellulaire, que ce soit par la production d'énergie, le métabolisme des sucres et des acides gras, l'homéostasie calcique ou encore la synthèse des hèmes.

### 1.2.1 Génétique mitochondriale

#### 1.2.1.1 L'ADN mitochondrial

L'ADN mitochondrial (ADNmt) humain est un ADN circulaire double brin composé de 16569 paires de bases (**Figure 1.7**). Les deux brins de l'ADNmt peuvent être séparés au moyen d'une centrifugation dans un gradient de concentration. En effet, l'ADNmt est composé d'un brin H (heavy) riche en guanines et d'un brin L (light) riche en cytosines qui possèdent donc une masse différente due à leur contenu respectif en bases G/C. De plus, le brin H contient la plupart des séquences codantes de l'ADNmt : 2 ARNr, 14 ARNt et 12 polypeptides.

Plusieurs études évolutives ont montré que la mitochondrie avait progressivement transféré la majorité de ses gènes vers le génome nucléaire (TUPPEN *et al.* 2010). Les 37 gènes mitochondriaux restant de nos jours dans les mitochondries des mammifères, codent pour 22 ARN de transfert (ARNt), 2 ARN ribosomiques (ARNr) et 13 polypeptides. Ces derniers font tous partie des différents complexes de la chaîne de transport d'électrons. L'ADNmt contient également plusieurs séquences non-codantes dont la plus importante est la D-loop (Displacement-loop). Elle contient les promoteurs des brins lourd (HSP) et léger (LSP) et l'origine de répllication du brin lourd (O<sub>H</sub>) (DIAZ and MORAES 2008).

Les différentes séquences codant pour des protéines ne contiennent pas d'introns, ce qui rappelle également la transcription chez les procaryotes. Il existe également certaines différences entre l'ADN nucléaire et l'ADNmt (**Table 1.1**), notamment dans le code génétique utilisé pour la transcription mitochondriale : TGA code pour le tryptophane au lieu d'un codon Stop et ATA spécifie la méthionine au lieu de l'isoleucine.

### ***1.2.1.2 Réplication de l'ADN mitochondrial***

La réplication de l'ADN mitochondrial est liée à la transcription du promoteur du brin L. Celui-ci va servir de d'amorce ARN pour initier la réplication à partir de l'origine de réplication du brin H située dans le D-loop ( $O_H$ ) (**Figure 1.7**) (DIAZ and MORAES 2008). La protéine qui va effectuer la réplication est la polymérase gamma, avec son activité 3'-5' exonucléase et son activité 5' deoxyribose phosphate lyase. Deux autres protéines vont aider la polymérase dans sa tâche : l'hélicase TWINKLE et la protéine mtSSB (mitochondrial single strand binding protein) qui vont respectivement déplier l'ADN et garder sa forme simple brin. Il existe à ce jour deux théories pour expliquer le fonctionnement de la réplication de l'ADNmt : l'une prône une réplication unidirectionnelle et asynchrone : début de la synthèse du nouveau brin à l' $O_H$  (l'origine de réplication du brin H) et déplacement du brin parental jusque l' $O_L$  (origine de réplication du brin L), qui est alors activée et entame la réplication du brin L dans la direction opposée. L'autre théorie est en faveur d'une réplication simultanée des deux brins (DIAZ and MORAES 2008).

La transcription débute quant à elle lors de l'activation des promoteurs HSP et LSP (Heavy/Light Strand Promoter) situés dans la D-Loop. Elle est réalisée par l'ARN polymérase mitochondriale (mtRNAPol) qui est aidée par différentes protéines telles que TFAM (Mitochondrial Transcription Factor A), qui va la recruter au niveau du promoteur et les facteurs de transcription mitochondriaux TFB1M et TFB2M (Mitochondrial Transcription factor B1-2). Les transcrits produits dans la mitochondrie sont des ARN polycistroniques (DIAZ and MORAES 2008).

Etant donné que l'ADN mitochondrial ne code que pour 13 protéines et que le protéome mitochondrial contient environ 1500 protéines (DIAZ and MORAES 2008), la majorité de celles-ci sont transportées dans la mitochondrie via un mécanisme d'importation. Celui-ci diffère en fonction de la localisation intra mitochondriale de la protéine : la matrice, la membrane mitochondriale interne, l'espace intermembranaire ou encore la membrane mitochondriale externe. Différentes protéines interviennent dans les processus d'importation dont les translocases de la membrane interne et externe (TIM et TOM), formant ensemble de gros complexes protéiques, et les chaperonnes cellulaires ou mitochondriales (Hsp70, Hsp90, Grp75) (**Figure 1.8**). Les chaperonnes cellulaires, empêchent les protéines d'adopter leur conformation tridimensionnelle leur permettant de conserver une conformation dépliée pour traverser les membranes directement après leur traduction. Les translocases permettent le transport des protéines entre les deux compartiments en utilisant de l'ATP et le potentiel de membrane mitochondrial. Les chaperonnes mitochondriales, elles, permettent la

phase finale de l'importation en aidant les protéines à prendre leur conformation tridimensionnelle essentielle à leur bon fonctionnement.

### ***1.2.1.3 Fonctions de la mitochondrie***

Dans la cellule, la mitochondrie assure plusieurs fonctions, dont la plus importante est la production d'ATP et de NADH. Elle est également impliquée dans un grand nombre de processus métaboliques comme l'oxydation des acides gras, la synthèse des stéroïdes, la séquestration du calcium, le cycle de l'urée ou encore le déclenchement de l'apoptose.

La phosphorylation oxydative ou OXPHOS (**Figure 1.9**) est le mécanisme responsable de la synthèse d'ATP en présence d'O<sub>2</sub>. La chaîne de transport d'électrons est composée d'environ 90 protéines, dont les 13 codées par l'ADN mitochondrial, formant 5 complexes protéiques (Complexes I, II, III, IV et V) localisés dans la membrane interne de la mitochondrie. La chaîne de transport d'électrons va utiliser l'énergie des électrons arrachés aux molécules NADH et FADH<sub>2</sub> (potentiel réducteur élevé) pour transporter des protons H<sup>+</sup> dans l'espace intermembranaire, créant un gradient électrochimique. Le complexe V, composé de la F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATPsynthase, va utiliser la force proton motrice ainsi créée pour former de l'ATP à partir d'ADP + P<sub>i</sub>.

La mitochondrie est impliquée dans un grand nombre de processus métaboliques l'oxydation des acides gras, la production d'énergie via la respiration cellulaire, ou encore la synthèse des hèmes. Pour assurer correctement ces différentes fonctions, la cellule a besoin d'un nombre adéquat de mitochondries fonctionnelles. La cellule en homéostasie va constamment réguler le nombre de mitochondries via les mécanismes de dégradation (mitophagie) et de biogenèse mitochondriale. La cellule peut également augmenter sa population mitochondriale en réponse à des signaux extracellulaire, tels que des hormones, l'exposition au froid ou encore la contraction musculaire. Pour répondre entre autres à ces différents signaux, la cellule requiert l'activation et la coopération de son génome et du génome mitochondrial. Il existe donc des signaux dits « antérogrades » provenant du noyau vers la mitochondrie : l'activation de certains facteurs de transcription régule par exemple la transcription et la réplication mitochondriale. Cependant, dans le cas de dysfonctionnements mitochondriaux altérant le potentiel de membrane mitochondrial ou la production d'ATP, certains signaux dit « rétrogrades » sont envoyés de la mitochondrie vers le noyau.

## 1.2.2 La biogenèse mitochondriale

### 1.2.2.1 Facteurs de transcription

La biogenèse mitochondriale est un processus complexe qui requiert la synthèse ainsi que l'importation des protéines et de lipides vers les mitochondries existantes mais également la réplication de l'ADN mitochondrial. L'expression des différentes protéines impliquées dans ce processus est régulée au niveau transcriptionnel par un réseau de facteurs de transcription et de co-activateurs (**Table 1.2**), dont certains sont détaillés ci-après.

Les nuclear respiratory factors (NRF) premièrement décrits comme activateurs de l'expression du cytochrome c, contrôlent comme leur nom l'indique l'expression de la majorité des gènes nucléaires requis pour la respiration mitochondriale, mais également sur les gènes codants les protéines impliquées dans une large gamme de fonctions mitochondriales telles que l'importation, la réplication, la transcription,... (**Figure 1.10**) (SCARPULLA 2006). Une des cibles de NRF-1 est le facteur de transcription mitochondrial A (TFAM). Celui-ci est essentiel pour la transcription de l'ADN mitochondrial ainsi que pour sa réplication, car nous avons vu ci-dessus que ces deux mécanismes sont étroitement liés. Une autre caractéristique importante de TFAM est sa capacité à former des nucléoïdes en se liant à l'ADN mitochondrial afin de stabiliser le génome (KANG *et al.* 2007).

Le facteur CREB (cAMP Response Element Binding protein) est généralement activé par une phosphorylation activatrice sur le résidu Ser-133 par la  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dépendante protéine kinase (CaMK) ou la protéine kinase A (PKA) suite à différents stimuli comme l'exercice physique ou l'exposition au froid (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011).

Un autre facteur de transcription impliqué dans la biogenèse mitochondriale est l'ERR $\alpha$  (Estrogen-related-receptor- $\alpha$ ), qui est fortement lié à la régulation du métabolisme oxydatif. Ce facteur de transcription, se lie sur les sites de réponse aux ERR (ERR Response Element) sous forme de monomères, d'homo-dimères ou d'hétéro-dimères avec d'autres facteurs de transcription de la famille ERR (HOCK and KRALLI 2009). ERR $\alpha$  régule la  $\beta$ -oxydation des acides gras, en contrôlant le promoteur de l'acetyl-coenzyme A déshydrogénase (MCAD), augmentant ainsi la capacité de la cellule à oxyder les acides gras en réponse à un stress énergétique (SCARPULLA 2006).

Ces différents facteurs de transcription vont réguler l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale mais également dans différents processus métaboliques comme la néoglucogenèse, la glycolyse ou encore la synthèse et l'oxydation des acides gras (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011). L'abondance et l'activité de ces facteurs de transcription sont régulées par différentes voies de transcriptions telles la voie AMPK, CaMK, activées en réponse à différents stimuli extracellulaires comme l'exposition au froid ou l'exercice physique ou encore la voie du NO, activée suite à une restriction calorique (HOCK and KRALLI 2009). De plus, ces différents facteurs de transcription sont coordonnés par une famille de co-activateur : la famille PGC-1.

### 1.2.2.2 PGC-1 $\alpha$

La famille des Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) Coactivator 1 (PGC-1) contient trois membres : PGC-1 $\alpha$ , PGC-1 $\beta$  et PGC-1 Related Coactivator (PRC), ayant tous un domaine d'activation transcriptionnelle et un domaine d'interaction avec les récepteurs nucléaires (LXXLL) dans leur région N-terminale, ainsi qu'un motif de liaison à l'ARN dans leur région C-terminale.

PGC-1 $\alpha$ , découvert en 1998 par Spiegelman (PUIGSERVER *et al.* 1998) est une protéine d'environ 91 kDa (ESTERBAUER *et al.* 1999) considérée comme le principal co-activateur transcriptionnel des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales. Les co-activateurs transcriptionnels sont très importants pour orchestrer la réponse à un changement métabolique en modifiant l'expression de gènes (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011). Comme PGC-1 $\alpha$  est fortement impliqué dans les mécanismes énergétiques de la cellule, il est régulé très finement par différents signaux physiologiques comme la privation de nutriments, l'activité physique ou encore l'exposition au froid. PGC-1 $\alpha$  est régulé de deux manières différentes, soit par des régulations transcriptionnelles, soit par des modifications post-traductionnelles.

#### **Régulations transcriptionnelles**

Il a été montré dans les muscles squelettiques que l'expression de PGC-1 $\alpha$  est rapidement induite par la contraction musculaire qui déclenche le relargage dans le cytoplasme du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique (WRIGHT *et al.* 2007). Cette augmentation de la concentration en calcium cytoplasmique active la cascade de signalisation de la Ca<sup>2+</sup>-dependent calmodulin protein kinase (CaMK) (HOCK and KRALLI 2009) ainsi que la calcineurine A (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011) (**Figure 1.11**). Une des cibles de CaMK est le facteur de transcription cAMP-Response Element Binding protein (CREB). Celui-ci est activé et peut se lier sur le site CRE situé sur le promoteur du gène *PGC-1 $\alpha$* , induisant son expression. La calcineurine A active les facteurs de transcription MEF2C et MEF2D, dont des sites de liaison sont également présents sur le promoteur de *PGC-1 $\alpha$* . Ces deux facteurs de transcription MEF2 sont par ailleurs des cibles de PGC-1 $\alpha$ , qui augmente sa propre expression via une boucle d'auto-activation (HANDSCHIN *et al.* 2003).

La protéine p38 MAPK, en plus de son rôle dans l'activation de la différenciation myogénique, active l'expression de PGC-1 $\alpha$ , via l'activation de MEF2 et de ATF2 (Activating Transcription Factor-2). Ce dernier active l'expression de PGC-1 $\alpha$  en se liant sur le site CRE de son promoteur (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011).

Un autre senseur de l'état énergétique de la cellule est la protéine « AMP-activated Protein Kinase » (AMPK). Cette kinase, activée quand le rapport AMP/ATP est élevé, active une large gamme de voies métaboliques afin d'augmenter le taux d'ATP intracellulaire. Une de ces voies est l'augmentation de la fonction et de la biogenèse mitochondriales, par l'activation de PGC-1 $\alpha$  (JAGER *et al.* 2007).

D'autres régulations transcriptionnelles de PGC-1 $\alpha$  ont également été décrites, comme l'exposition au froid et l'activation des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques, qui activent la protéine

kinase A (PKA) et par la suite CREB, via une signalisation dépendante de l'AMP cyclique (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011) (**Figure 1.12**).

### **Régulations post-traductionnelles**

L'expression et l'activité de PGC-1 $\alpha$  sont rapidement augmentées dans les muscles squelettiques après l'exercice physique. Cependant, on peut observer qu'il y a rapidement une augmentation de la liaison de NRF1 et NRF2 à l'ADN ainsi qu'une augmentation de l'expression de gènes codant pour les protéines mitochondriales avant d'observer une augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$ . L'exercice physique induit donc une réponse rapide par l'activation de PGC-1 $\alpha$  avant d'augmenter l'expression de ce co-activateur. Plusieurs modifications post-traductionnelles sont impliquées dans la régulation de l'activité de PGC-1 $\alpha$ .

L'AMPK, p38 MAPK et Akt sont trois kinases bien décrites pour phosphoryler PGC-1 $\alpha$ . Les deux premières activent la biogenèse mitochondriale en augmentant l'expression de PGC-1 $\alpha$ , ainsi que son activité co-transcriptionnelle via la phosphorylation des résidus Thr-177 et Ser-538 pour l'AMPK et des résidus Thr-262, Ser-265 et Thr-298 pour la p38 MAPK. Cette dernière, augmente l'activité de PGC-1 $\alpha$  en stabilisant la protéine qui possède une demi-vie courte, d'environ 2-3h, et en diminuant son interaction avec le co-represseur p160MBP. La protéine kinase Akt va quant à elle inhiber l'activité de PGC-1 $\alpha$  par la phosphorylation du résidu Ser-570 (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011).

Plusieurs études ont montré que l'acétylation de PGC-1 $\alpha$  inhibe l'activité de cette protéine (KELLY *et al.* 2009; LERIN *et al.* 2006). Les protéines GCN5 et Sirt1, respectivement une acétyl-transférase et une déacétylase de PGC-1 $\alpha$ , sont toutes deux des senseurs de l'état énergétique de la cellule (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011).

Lorsque la cellule est dans un état énergétique faible, l'AMPK est activée et augmente le taux de NAD<sup>+</sup> cellulaire, ce qui mène à l'activation de Sirt1 (CANTO *et al.* 2009). En effet, le ratio NAD<sup>+</sup>/NADH module l'activité de Sirt1, car celle-ci requiert la présence de NAD<sup>+</sup> comme substrat. La phosphorylation de PGC-1 $\alpha$  par AMPK est par ailleurs nécessaire pour permettre la déacétylation de ce co-activateur par Sirt1. La protéine GCN5, dont l'expression est induite par excès calorique, ajoute quant à elle un groupement acétyle sur la protéine PGC-1 $\alpha$ , ce qui inhibe l'activité de ce co-activateur (KELLY *et al.* 2009; LERIN *et al.* 2006). Il y a donc un équilibre entre GCN5 et Sirt1 en fonction du statut énergétique de la cellule, ce qui va permettre la régulation de PGC-1 $\alpha$  via l'ajout ou le retrait d'un groupement acétyle.

Il existe également d'autres régulations post-traductionnelles qui sont connues pour moduler l'activité de PGC-1 $\alpha$ . C'est le cas notamment de l'ubiquitination, responsable de la dégradation de la protéine par le protéasome (FERNANDEZ-MARCOS and AUWERX 2011), de la méthylation de trois résidus arginine par l'arginine methyl transferase (PRMT1), activant l'activité transcriptionnelle de PGC-1 $\alpha$  (TEYSSIER *et al.* 2005), de l'ajout d'un groupement N-acétylglucosamine sur le résidu Ser-333 par la N-acetylglucosamine transferase (OGT) (HOUSLEY *et al.* 2009), ou encore de la SUMOylation de la lysine 183 qui empêche la liaison de PGC-1 $\alpha$  à ses cibles par encombrement stérique (RYTINKI and PALVIMO 2009).



L'activation de PGC-1 $\alpha$ , va augmenter l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription NRF1/2, ERR, CREB impliqués dans la biogenèse mitochondriale comme expliqué ci-dessus mais également d'autres facteurs de transcription impliqués dans le métabolisme mitochondrial (**Table 1.2**)

La biogenèse mitochondriale, peut également être activée par l'augmentation de la concentration en NO (Oxyde Nitrique). En effet, plusieurs études ont montré que l'expression de PGC-1 $\alpha$ , NRF-1 et TFAM est augmentée en réponse à une élévation de la concentration en oxyde nitrique (NO) (KELLY and SCARPULLA 2004; NISOLI *et al.* 2003).

Si l'augmentation de l'abondance mitochondriale est généralement une réponse adaptative favorable à des stimuli extérieurs (exposition au froid, exercice physique, ...), elle peut également être provoquée par des dysfonctionnements de l'organelle.

### 1.3 Les dysfonctionnement mitochondriaux

Le terme de dysfonctionnement mitochondrial est généralement associé à une altération de la phosphorylation oxydative. Cette altération peut être due à un ou plusieurs défauts dans les différents complexes protéiques de la chaîne de transport d'électrons (CHATURVEDI *et al.* 2005). Comme on peut le voir sur la **table 1.1**, les protéines impliquées dans les différents complexes respiratoires sont codées par le génome nucléaire ainsi que par le génome mitochondrial.

De nombreux dysfonctionnements mitochondriaux sont dus à des mutations dans l'ADN nucléaire car la plupart des protéines des complexes respiratoires ainsi que les protéines nécessaires à l'assemblage et à l'importation mitochondriale y sont codées. Cela concerne notamment le syndrome de Leigh, maladie neurodégénérative causée par une ou plusieurs mutations dans les gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire ou bien pour des facteurs impliqués dans l'assemblage de ces différents complexes (FINSTERER 2008).

Cependant, beaucoup de dysfonctionnements mitochondriaux sont causés par un défaut dans l'ADN mitochondrial (**Table 1.3**). En raison de l'exposition aux radicaux libres O<sub>2</sub><sup>•-</sup> générés par la chaîne de transport d'électrons et de l'absence d'histone protecteur, l'ADN mitochondrial a une fréquence de mutation environ 10 fois supérieure à celle de l'ADN nucléaire. De plus, comme il n'y a pas d'introns dans l'ADN mitochondrial, la majorité des mutations touchent une séquence codante (CHATURVEDI *et al.* 2005). Ces mutations peuvent survenir soit dans la séquence codante d'un des 13 polypeptides impliqués dans l'OXPPOS, altérant ou supprimant le fonctionnement de la protéine touchée, soit dans la séquence codante d'un ARN de transfert (ARN<sub>t</sub>), altérant l'ensemble de la synthèse protéique mitochondriale (**Figure 1.13**).

L'apparition des symptômes cliniques, la variabilité phénotypique des pathologies liées à un dysfonctionnement mitochondrial sont régis par différentes caractéristiques de l'ADN mitochondrial détaillées ci-dessous :

- Homoplasmie et hétéroplasmie. Ces deux termes caractérisent un taux de mitochondrie contenant la mutation au sein d'une cellule. Si toutes les molécules d'ADN mitochondrial ont la même séquence, on parle d'homoplasmie. Au contraire, si une cellule contient des molécules d'ADN mitochondrial différents par leur séquence, on parle d'hétéroplasmie. Cette caractéristique permet d'introduire le terme d'effet seuil. En effet, pour observer le phénotype biochimique et clinique d'une mutation dans l'ADN mitochondrial, il faut que le nombre de molécules d'ADN mitochondrial possédant la mutation atteigne une proportion suffisante (>92% dans le cas du syndrome MERRF) (LARSSON *et al.* 1992) par rapport aux mitochondries contenant l'ADN mitochondrial sauvage. Ce seuil peut être différent en fonctions de la mutation ou de l'organe touché ; une proportion de 80 % de mitochondries mutées pourrait être silencieuse dans le foie et symptomatique dans le muscle et le cerveau (CHATURVEDI *et al.* 2005). Le taux d'hétéroplasmie requis pour observer les phénotypes biochimiques et cliniques est généralement élevé car le fonctionnement de la mitochondrie dans le cas de la mutation MERRF peut être assuré par approximativement 15% de molécules d'ADN mitochondrial sauvage.
- Transmission maternelle. Le mode de transmission de l'ADN mitochondrial diffère de la génétique mendélienne. En effet, après la fécondation, tout l'ADN mitochondrial présent dans l'embryon provient de l'oocyte. Il y a également une ségrégation de l'ADN mitochondrial de l'oocyte (« genetic bottleneck ») (**Figure 1.14**): seules certaines molécules d'ADN mitochondrial contribueront à la génération suivante. Cette diminution du nombre de molécules d'ADN mitochondrial sera rapidement suivie d'une répllication et ségrégation aléatoire des molécules d'ADN mitochondrial aux cellules-filles, ce qui permet une augmentation ou une diminution du taux de mitochondries possédant la mutation par rapport au taux présent chez la mère.

Dans le cadre de ce mémoire, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à un dysfonctionnement mitochondrial, dû à une mutation dans un ARN<sub>t</sub> : le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers).

### 1.3.1 Le syndrome MERRF

Le syndrome MERRF a été découvert par Fukuhara en 1980 et est la première maladie mitochondriale décrite qui soit liée à une mutation dans un ARN<sub>t</sub> (CHATURVEDI *et al.* 2005). Ce syndrome présente différents symptômes comme l'épilepsie myoclonique progressive, ou l'ataxie (incoordination des mouvements), accompagnée de la présence de Ragged Red Fibers (RRF) (**Figure 1.15**) dans les biopsies de muscles de patients. Les patients atteints de ce syndrome présentent aussi une diminution progressive de leur masse musculaire. D'autres symptômes peuvent également être observés : démence, surdité, atrophie optique,...

Cette pathologie est causée par une mutation ponctuelle à la position 8344 de l'ADN mitochondrial, remplaçant une adénosine (A) par une guanosine (G). Cette mutation se trouve dans le gène codant pour l'ARN<sub>t</sub> transportant la lysine (ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup>) et induit une modification de la conformation tridimensionnelle de ce dernier.

L'uridine, le premier nucléotide (position wobble) de l'anticodon de l'ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup> doit normalement subir une modification post transcriptionnelle : une tauro-méthylation. Dans le cas du syndrome MERRF, la conformation tridimensionnelle particulière de l'ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup> empêche le recrutement de MUT1 (Mitochondrial tRNA-specific 2 thiouridylase 1) et MTO1 (Mitochondrial Translation Optimization), les enzymes responsables de la tauro-méthylation de l'uridine en position wobble (**Figure 1.16**).

Dans le cas du syndrome MERRF, l'activité de l'aminoacyl ARN<sub>t</sub> transférase, liant l'ARN<sub>t</sub> avec son acide aminé correspondant (aminoacylation), n'est pas affectée. Seule la reconnaissance codon/anticodon est perturbée. En effet, il a été montré que le temps de demi-vie de la liaison de la lysine à son ARN<sub>t</sub> est plus court en cas de mutation de l'ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup>, suggérant que l'affinité de la liaison codon-anticodon est diminuée dans le cas de cette pathologies, causant une diminution de la synthèse protéique mitochondriale (YASUKAWA *et al.* 2001). En effet, l'étude de la traduction mitochondriale a révélé qu'à chaque codon correspondant à une lysine, l'allongement de la chaîne peptidique avait 26% de probabilité de s'arrêter (CHOMYN 1998). Une protéine comme ND-2 (NADH Dehydrogenase-2), contenant 12 lysines dans sa séquence, aura donc très peu de chance d'être complètement traduite. La mitochondrie fait donc face à une synthèse non fonctionnelle des protéines, et plus particulièrement des protéines contenant beaucoup de résidus lysine, mais également à une accumulation des peptides incomplets (CHOMYN 1998).

L'altération de la synthèse protéique mitochondriale entraîne à une diminution de l'efficacité des OXPHOS qui provoque une baisse de la production de l'ATP. La mutation A8344G, en causant cette diminution, va induire une réponse adaptative de la cellule, via une voie rétrograde (ARNOULD *et al.* 2002). On peut observer une activation compensatrice de la biogenèse mitochondriale en réponse au dysfonctionnement de l'organite (JAMES *et al.* 1996). Cette caractéristique se remarque histologiquement au niveau des cellules musculaires car elles demandent un apport énergétique important. On peut en effet observer une accumulation de mitochondries sous le sarcolemme de cellules musculaires, qui peuvent être colorées en rouge par le trichrome de Gomori et nommée Ragged Reg Fibers (RRF).

La perte musculaire progressive observée chez les patients atteints du syndrome MERRF a imputée au phénomène d'apoptose, bien que cela ait été controversé durant de nombreuses années (SCIACCO *et al.* 2001). L'apoptose a également été décrites dans des fibres musculaires déficientes en activité cytochrome c oxidase (COX), avec (UMAKI *et al.* 2002) ou sans accumulation de mitochondries caractéristique des RRF (MIRABELLA *et al.* 2000).

Une étude à grande échelle sur 34 000 fibres musculaires individuelles de patients atteints de différentes maladies mitochondriales a mis en évidence une corrélation entre l'accumulation de mitochondries (RRF) et la présence de marqueurs apoptotiques (AURE *et al.* 2006). Ces résultats suggèrent donc un lien entre l'abondance mitochondriale et l'apoptose, mais les mécanismes par lesquels l'apoptose serait déclenchée sont à l'heure actuelle inconnus, bien que les récepteurs au Fas-L et au TNF- $\alpha$ , deux molécules connues pour déclencher l'apoptose, soient surexprimés dans les biopsies de patients atteints du syndrome MERRF.

## 1.4 Objectifs du mémoire

Comme nous venons de l'indiquer, la présence des marqueurs apoptotiques est corrélée à l'augmentation de l'abondance mitochondriale dans les cellules de muscle strié squelettique. Comme plusieurs études l'ont démontré (SILVESTRI *et al.* 1993; YONEDA *et al.* 1990), la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial, s'accompagne d'une augmentation de l'abondance mitochondriale. Dès lors, on peut poser l'hypothèse que la perte progressive de la masse musculaire observée chez les patients atteints du syndrome MERRF soit provoquée par une apoptose cellulaire. Cependant les mécanismes sous-jacents sont encore inconnus ; ce mémoire s'inscrit dans la recherche des mécanismes liés à l'augmentation de l'abondance mitochondriale dans les cellules musculaires porteuses de la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial et le lien potentiel avec la mort de ces cellules par apoptose.

Afin de rechercher ces mécanismes, un nouveau modèle de cellules musculaires cybrides porteuses de la mutation A8344G a été conçu au laboratoire (voir point ci-après). L'objectif de notre mémoire est dans un premier temps de vérifier que ce modèle *in vitro* présente les mêmes caractéristiques d'augmentation d'abondance mitochondriale liée à cette mutation ponctuelle que celles rapportées *in vivo*, à partir de biopsies musculaires de patients. Nous analyserons donc l'abondance mitochondriale de cellules musculaires cybrides différenciées ou non, et contenant ou non la mutation responsable de la pathologie, par le biais de différentes méthodes (analyse globale de l'abondance mitochondriale, analyse de protéines ainsi que de l'ADN mitochondrial).

Dans un deuxième temps, nous rechercherons si les cellules mutées sont plus sensibles à l'apoptose que leur équivalent sauvage, et si oui par quels mécanismes.

## 1.5 Modèle cellulaire

Il n'existe pas à notre connaissance de modèle animal pour l'étude du syndrome MERRF. L'étude des mécanismes conduisant à une myopathie mitochondriale est donc soit menée sur des biopsies de patients, soit sur des cellules cybrides.

Le taux de mutation de l'ADN mitochondrial pour les biopsies est très hétérogène, que ce soit entre deux individus ou bien entre deux fibres musculaires du même patient. En plus de la limitation d'approvisionnement due à la rareté de la maladie, les études menées à partir de biopsies présentent donc une difficulté d'interprétation à cause de cette hétérogénéité.

Des cellules cybrides ont donc été utilisées pour étudier le syndrome MERRF. Ces cellules résultent de la fusion d'une lignée cellulaire dite Rho0, complètement déplétée en ADN mitochondrial suite à un traitement chronique au bromure d'éthidium inhibant la polymérase- $\gamma$  mitochondriale, avec des cellules énuclées provenant de patients (**Figure 1.17**). Cette méthode mise au point par G. Attardi a permis d'élaborer des modèles cellulaires pour l'étude de l'impact d'une mutation/délétion dans l'ADN mitochondrial et les mécanismes menant au dysfonctionnement mitochondrial.

Au sein du laboratoire, nous utilisons des cellules cybrides provenant de cellules d'ostéosarcome 143B Rho0, repeuplées avec des mitochondries contenant la mutation A8344G dans leur ADN, ou bien contenant un ADN mitochondrial sauvage. Bien qu'il ait permis d'étudier différents aspects de la pathologie tels l'apoptose (ROMMELAERE *et al.* 2012) ou la réponse rétrograde impliquant l'axe  $Ca^{2+}$ -calmoduline-CREB (voir point 1.2.2.2) (ARNOULD *et al.* 2002), ce modèle cellulaire a le désavantage de présenter un profil d'expression génique non musculaire. Cette caractéristique limite son potentiel pour étudier les mécanismes à l'origine de l'accumulation de mitochondries observée spécifiquement dans les cellules musculaires de patients.

C'est pour ces raisons qu'un modèle de cellules cybrides d'origine musculaire a été mis en place au sein du laboratoire en collaboration avec le Dr Vergani (Université de Padoue, Italie), à partir de cellules issues d'un rhabdomyosarcome humain (lignée RD) totalement déplétées en ADN mitochondrial (RD Rho0). Il a préalablement été montré que ces cellules ont toujours la capacité de se différencier (VERGANI *et al.* 2000). La capacité de différenciation est probablement un critère important à considérer pour le choix d'un modèle cellulaire pour étudier la question biologique posée car l'accumulation de mitochondries n'a été rapportée que dans les fibres musculaires (donc des cellules complètement différenciées) des patients porteurs du syndrome MERRF.

La plupart des modèles *in vitro* de différenciation musculaire sont issus de cellules murines (C2C12, 10T1/2 (REMELS *et al.* 2010)) ou de rat (L6, L8 (JAHNKE *et al.* 2009)). Ces cellules se différencient spontanément sous l'influence de la confluence ou du retrait des facteurs de croissances

Dans le cas des cellules de rhabdomyosarcomes humains, le processus de différenciation est plus difficile à déclencher *in vitro*. Il existe différentes lignées cellulaires provenant de rhabdomyosarcomes (RD, Rh28 et Rh30) (TAPSCOTT *et al.* 1993) et chacune de ces lignées

expriment des facteurs de transcription spécifiques des tissus musculaires et certaines protéines structurales musculaires comme la desmine et la vimentine (AL-TAHAN *et al.* 2011). Mais malgré cette expression, aucune de ces différentes lignées ne se différencie pleinement sous l'influence de la confluence et du retrait des facteurs de croissances (MAURO *et al.* 2002).

La difficulté des cellules RD à se différencier peut s'expliquer par différentes caractéristiques :

- Un taux élevé de myostatine. La myostatine (GDF8, Growth and Differentiation factor-8), un membre de la famille des TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) est un régulateur négatif de la masse musculaire (LANGLEY *et al.* 2004) qui inhibe la prolifération et la différenciation musculaire (LANGLEY *et al.* 2002). Plusieurs études montrent une surexpression de la myostatine dans les cellules rhabdomyosarcome, inhibant la prolifération et la différenciation de ces cellules (BOUCHE *et al.* 2000; LANGLEY *et al.* 2004; RICAUD *et al.* 2003).
- Une dérégulation de la voie des MAPK. Une autre caractéristique responsable du blocage de la différenciation myogénique dans les cellules RD est la dérégulation des MAPK ERK et p38 (ROSSI *et al.* 2011). En effet, l'équilibre entre ces deux voies de signalisation est en faveur de la surexpression de ERK, qui induit la production de signaux mitotiques, contrairement à p38 MAPK qui apparait sous-phosphorylé (MAURO *et al.* 2002). L'inhibition de la voie MEK/ERK ainsi que l'augmentation de l'activation de p38 via l'expression de la MAP2K MKK6, sont suffisants pour inverser l'équilibre entre ces deux voies et induire l'arrêt du cycle cellulaire ainsi que l'activation de la différenciation myogénique dans les cellules RD.
- Mutations dans les gènes N/Ras et p53. Les cellules RD semblent avoir obtenu un avantage de prolifération suite à une mutation dans l'oncogène N-Ras et/ou d'une mutation dans le suppresseur de tumeur p53. Ces mutations seraient à l'origine de la prolifération non contrôlée des cellules RD ainsi que de la sécrétion de manière autocrine de facteurs de croissance et d'inhibiteurs de la myogenèse comme l'IGF-II (Insuline-like Growth Factor-II) et TGF- $\beta$  (GERMANI *et al.* 1994; MAURO *et al.* 2002). La mutation du gène N-Ras semble également être à l'origine de la sur-activation de la voie de signalisation de ERK (ROSSI *et al.* 2011).
- Augmentation du taux de Cycline D1 et CDK. Les cellules RD présentent également une activité élevée de cycline D1 et de CDK, ce qui contribuerait à l'incapacité de ces cellules à quitter le cycle cellulaire lorsque les facteurs de croissance sont retirés du milieu (KNUDSEN *et al.* 1998; MAURO *et al.* 2002). L'inhibiteur du cycle cellulaire p21<sup>WAF1</sup> présente un faible taux d'expression dans les cellules RD. L'expression de cette protéine est régulée par les facteurs de transcription MyoD et myogénine tandis que son activité est régulée de manière post-traductionnelle par les MAPK ERK et p38. L'inactivité de MyoD et de la myogénine ainsi que la dérégulation de la voie des MAPK dans les cellules RD expliqueraient les faibles taux de p21<sup>WAF1</sup> observés dans ces cellules (CICCARELLI *et al.* 2005).
- Recrutement du complexe SWI/SNF. Il a également été montré que le complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF n'est pas correctement recruté sur les loci de gènes musculaires dans les cellules RD. De plus, une dérégulation négative et/ou des mutations de ce complexe ont été décrites dans les rhabdomyosarcomes (DECRISTOFARO *et al.* 2001).

En vue de restaurer la différenciation des cellules RD, le traitement avec un activateur de PKC leur permet de prendre progressivement une forme allongée, qui est une caractéristique morphologique typique des cellules musculaires, et de sortir du cycle cellulaire pour se différencier (AGUANNO *et al.* 1990; MAURO *et al.* 2002). Ainsi, le PMA (Phorbol myristate acetate) induit la myogenèse des cellules RD, via l'activation de PKC- $\alpha$ , qui est une kinase en amont de la voie des MAPK. Effectivement, un traitement par le PMA permet une activation soutenue des MAPK ERK et p38, et une activation transitoire de JNK, permettant l'activation de la myogenèse (MAURO *et al.* 2002) (**Figure 1.18**).

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1 Culture cellulaire et différenciation myogénique

Les cellules utilisées durant le mémoire, sont des cellules cybrides provenant de deux lignées cellulaires, une lignée sauvage et une mutée. Ces cellules résultent de la fusion entre des cellules humaine de rhabdomyosarcome (RD) déplétées en ADN mitochondrial généreusement donnée par le Pr Vergani (Université de Padoue, Italie)(VERGANI *et al.* 2000), avec des cellules d'ostéosarcome 143B énuclées contenant 100% de la mutation MERRF dans l'ADN mitochondrial ou contenant de l'ADN mitochondrial sauvage (143B) (CHOMYN *et al.* 1994). Ces deux lignées sont maintenues en culture dans des boîtes T25 (Corning 430639) et ensemencées 3 fois par semaine à une densité de 35.000/cm<sup>2</sup>.

Matériel (préchauffé à 37°C)

- Milieu DHG (Dubelcco Modified Eagle's Medium – High Glucose : 4,5 g/L) + 10 % de sérum de veau fœtal (Fœtal Bovine Serum (FBS), Gibco, UK)
- PBS (Phosphate Buffer Saline, Whittacker BE)
- Trypsine 0,25 % (Invitrogen 25050, USA)
- Milieu DHG (Dulbecco's modified Eagles medium High Glucose 4.5g/l (Gibco-Invitrogen USA)
- Sérum de cheval (HS, Horse Serum, Gibco 16050, USA)
- PMA (Phorbol myristate acétate)(Sigma P8139, USA)
- Inhibiteurs de la voie ERK :
  - o U0126 (Cell Signaling 9903)
  - o PD98059 (BIOMOL international EI-360)

Méthode

Les cellules sont rincées une fois avec 5 mL de PBS. Elles sont ensuite détachées à l'aide de 370 µL de trypsine et resuspendues dans du milieu DHG + 10% FBS. La suspension cellulaire est ensuite répartie dans de nouvelles boîtes T25 à une dilution 1/6. Le volume final est porté à 7mL avec du milieu DHG + 10% FBS.

Un jour après l'ensemencement dans des plaques 6 puits à une densité de 200000 cellules par puits, les cellules sont mises en présence d'un milieu de différenciation (DM) composé de milieu DHG contenant 2% de sérum de cheval (HS) et 100nM de PMA (Protocole de base). Ce milieu est renouvelé tout les deux jours. Une partie des expériences a été réalisée avec du milieu de différenciation additionné de 5µM de U0126.

### 2.2 Mesure de la cytotoxicité : test de relargage de la LDH (Lactate Dehydrogenase)

Matériel:

- Kit de détection de cytotoxicité (Roche, USA)



- Triton X-100 (Merck, Allemagne)
- Plaque 96 puits (Greiner Bio-one, Autriche)
- PBS

Méthode :

L'évaluation de la cytotoxicité de molécules est un dosage colorimétrique basé sur la mesure de l'activité de l'enzyme cytoplasmique lactate déshydrogénase (LDH). Celle-ci est libérée du cytoplasme de cellules endommagées dans le milieu extracellulaire lorsque leur membrane plasmique perd son intégrité. Le rapport entre d'une part l'activité LDH dans les fractions milieu et les fractions cellules détachées, et d'autre part l'activité LDH totale présente dans toutes les fractions confondues, permet d'évaluer la mortalité cellulaire.

Les cellules ont été cultivées en plaques 24 puits en présence des molécules testées. Après incubation, le milieu de culture de chaque puits est récupéré et centrifugé pendant 5 minutes à 2000 rpm et à 4°C, dans le but de sédimenter les cellules détachées présentes. Les surnageants sont prélevés, et les culots ainsi que les cellules dans les puits sont lysés à l'aide de 250µl de PBS contenant 2% de Triton X-100. Le milieu cellulaire ainsi que le PBS + 2% de Triton X-100 servent de blanc pour l'analyse de l'activité LDH des surnageant et des lysats respectivement. Chaque échantillon est placé dans la plaque 96 puits en triplicats techniques, et 100µl du mélange réactionnel est ajouté dans chacun des puits. L'absorbance est mesurée à 490 et 655nm (longueur d'onde de référence) après différents temps d'incubation, et cela jusque la valeur d'absorbance la plus élevée de la plaque se situe entre 2 et 3. Les résultats obtenus (absorbance 490nm – absorbance 655nm) sont utilisés pour calculer le pourcentage de cytotoxicité grâce à la formule suivante :

$$\text{Cytotoxicité (\%)} = \frac{(\text{culot} - \text{blanc}) + ((\text{surnageant} - \text{blanc}) \times 4)}{(\text{culot} - \text{blanc}) + ((\text{surnageant} - \text{blanc}) \times 4) + (\text{lysats} - \text{blanc}) \times 20} \times 100$$

## 2.3 Mesure de l'abondance de protéines (Western Blot)

Matériel :

- Antioxydant NuPage (NP0005)
- Gels NuPage 3-8% Tris-Acétate 15 puits (Invitrogen, USA)
- Tampon d'électrophorèse : Stock NuPage Tris-Acetate SDS Running Buffer 20x (NP000J Invitrogen, USA).
- Bleu de charge : Stock NuPage LDS Sample Buffer 4x (NP0007 Invitrogen, USA) (100µl de stock + 5µl de DTT 1M)
- Blocking Solution (Licor)
- PBS – Tween 0.1% (P-1379, Sigma-Aldrich, USA)
- Tampon de transfert : Stock NuPage transfert Buffer 20x (NP0006 Invitrogen, USA) (Pour 200ml : 10ml de solution stock, 20 ml de méthanol, 200µl d'antioxydant et porter à volume avec de l'eau)
- Papier Whatman
- Membrane PVDF (Immobilon FL, Millipore corporation, USA)

- PIC (Protease Inhibitor Cocktail) (Roche, Allemagne)
- PIB (Phosphatase Inhibitor Buffer) (Roche, Allemagne)
- Tampon de lyse au SDS (0.5M Tris HCl pH 8, 20% SDS, 20% glycerol, 10%  $\beta$ -mercaptoéthanol).
- Tampon de lyse classique (20mM Tris, 150mM KCl, 1mM EDTA, PIC 25x, PIB 25x, 1% triton X-100).
- Tampon d'électrophorèse 1x (Tris 3.028g/l, Glycine 14.4g/l, SDS 1g/l)
- Gel Mini Protean TGX 10% (456-1036, BIO-RAD)
- Tampon de Transfert : Bicine (Sigma, USA) 500mM, Bis-Tris (Merck, All.) 500mM, EDTA (Merck, All.) 20,5mM, Chloro-butanol (Merck, All.) 1mM et 10% de méthanol
- Ionic detergent compatibility Reagent (1g/ 20ml de Réactif Pierce) (22663, Thermo Scientific, USA).
- Bleu de charge 5x (0.5M Tris HCl pH 8, 20% SDS, 20% Glycerol, 10%  $\beta$ -mercaptoéthanol et 1% bleu de bromophénol).

#### Méthode :

Les cellules sont rincées avec du PBS avant d'être lysées à l'aide d'un tampon de lyse (20mM Tris, 150mM KCl, 1mM EDTA, PIC 25x, PIB 25x, 1% triton X-100). Les lysats sont récupérés et centrifugés à 13000 rpm à 4°C pendant 10 min. Les surnageants sont récupérés et la concentration en protéines de ceux-ci est mesurée par la méthode Pierce : 1 $\mu$ l de lysat est ajouté à 9 $\mu$ l d'eau et 150 $\mu$ l de réactif Pierce, après agitation pendant 5 minutes, la densité optique (DO) est mesurée à 660nm à l'aide de spectrophotomètre. La concentration en protéine est obtenue grâce à une droite d'étalonnage avec des valeurs de DO pour une concentration connue de BSA.

10 $\mu$ g de ces protéines sont ajoutés à 4 $\mu$ l de bleu de charge et dénaturées à 70°C pendant 10 minutes avant d'être chargées dans un gel Nu-page (3-8%). La migration des échantillons dans le gel se fait à un Voltage de 150V jusqu'à ce que le bleu de charge atteigne la limite du gel.

Dans le cas de l'analyse de l'abondance mitochondriale, comme nous évaluons l'abondance de protéines membranaire, nous avons extrait les protéines à l'aide d'un tampon SDS. La concentration en protéines des lysats totaux obtenus est évaluée en utilisant la méthode Pierce., la présence de SDS restreint l'utilisation du réactif Pierce, il est dès lors nécessaire d'ajouter au réactif une poudre spéciale pour les détergents ioniques qui va permettre l'analyse au spectrophotomètre de la concentration en protéines des échantillons. Le Western Blot est quant à lui réalisé avec des gels BioRad, contenant 10% d'acrylamide.

Après la migration des échantillons, le gel est démoulé et les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride) préalablement réhydratée pendant une minute dans du méthanol 100% puis 5 minutes dans le tampon de transfert. Le gel est ensuite déposé sur la membrane et un montage « Sandwich » est réalisé avec du papier Whatman et des éponges imbibées de tampon de transfert (**Figure 2.1**). Ce montage est placé dans une cuve permettant un électrotransfert de type semi-sec. Le transfert s'effectue soit 2 heures et demi à 150mA, soit durant la nuit à 30mA. La membrane est alors incubée pendant une heure avec une solution de blocking Licor diluée 4X dans du PBS.

Après l'incubation en présence d'agent bloquant, la membrane est incubée en présence des anticorps primaires pendant une heure à température ambiante. Les anticorps sont dilués dans la solution Licor+ Tween 0.1%. La dilution des anticorps varie d'un anticorps à l'autre : ces dilutions sont reprises dans la (**Table 2.1**). Après incubation, la membrane est rincée 3 fois 5 minutes avec du PBS+Tween 0.1%. Pour détecter la présence des protéines d'intérêt, la membrane est incubée pendant 1 heure en présence d'anticorps secondaire anti-IgG de souris, couplés à un fluorochrome. La membrane est ensuite rincée 3 fois 5 minutes avec du PBS + Tween 0.1% et 2 fois 5 minutes avec du PBS.

Une fois ces différentes incubations réalisées, la membrane est séchée avant d'être scannée à l'aide d'un scanner Odyssey Licor. L'abondance des protéines d'intérêt est évaluée en établissant le rapport des intensités de fluorescence entre la bande correspondant à la protéine d'intérêt et la bande correspondant à une protéine d'abondance non influencée par les différentes conditions expérimentales (tubuline).

## 2.4 Immunofluorescence

Matériel :

- Lame couvre-objet (Karl Hecht KG, Allemagne)
- Lame porte-objet (631-0912 VWR, USA)
- Paraformaldéhyde, PFA (Merck, Allemagne)
- PBS-Triton X-100 1% (Merck, Allemagne)
- PBS-BSA (Bovine Serum Albumin, K41-017 PAA, UK) 2%
- Mowiol (Sigma-Aldrich, USA)
- TOPRO-3 Iodide (T-3605 Invitrogen, USA)

Méthode :

Les cellules sontensemencées sur des lames couvre-objets (Karl Hecht KG, Germany) dans des plaques 24 puits, et après différenciation, sont fixées pendant 10 minutes à l'aide de PBS + 4% de PFA. Après trois rinçages au PBS, les cellules sont ensuite perméabilisées avec du PBS+ 1% de Triton X-100. Avant l'incubation avec les anticorps primaires, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS-BSA 2% pour diminuer le nombre de liaisons non-spécifiques des anticorps. Les cellules sont donc incubées avec les différents anticorps primaires et secondaires (**Table 2.2**) dans une chambre humide pendant 2h et 1h respectivement. Les noyaux sont marqués à l'aide d'une incubation de 30 minutes avec le TOPRO-3 qui va se fixer à l'ADN double brin. Les lames sont ensuite fixées sur une lame porte-objet à l'aide de Mowiol préchauffé à 56°C. Chaque condition a été réalisée en double, et des contrôles sans anticorps ont également été réalisés.

## 2.5 Mesure de l'abondance de l'ADN mitochondrial

Matériel :

- Amorces sens et anti-sens du gène mitochondrial ND-1 et du gène nucléaire TBP (Table 2.3)
- Mix Sybr Green (Applied Biosystem, UK)
- DNA purification Kit (Promega A-1120, USA)

Méthode:

L'extraction d'ADN est réalisée à l'aide du DNA Purification Kit (Promega A-1120, USA). Les cellules cultivées dans des plaques 6 puits sont détachées et lysées dans 200µl de Nuclei Lysis Solution. Après l'ajout de 17.5 µl de Protéinase K, les lysats sont incubés sous légère agitation pendant 3 heures à 65°C. Afin d'éliminer les résidus d'ARN, 3 µl de RNase sont ajoutés aux lysats qui sont placés à 37°C pendant 30 minutes. Les protéines présentes dans les lysats sont précipitées avec 200µl de Protein Precipitation Solution. Les lysats sont ensuite centrifugés pendant 4 minutes à 16.000g. Le surnageant contenant l'ADN est transféré dans un tube contenant 600 µl d'isopropanol. Après mélange et centrifugation, on peut observer l'ADN dans les tubes sous forme d'un petit culot blanc. Celui-ci est rincé à l'éthanol 70% et centrifugé 1 minute à 16.000g. Le surnageant est jeté, et le culot contenant l'ADN est séché pendant 15 minutes à température ambiante. Le culot d'ADN est réhydraté avec 50 µl de DNA Rehydration Solution pendant 1 heure à 65°C, et la concentration en ADN est mesurée avec le Biophotometer 6131.

Afin d'évaluer le nombre relatif de molécules d'ADN mitochondrial, nous avons réalisé une PCR quantitative sur les extraits d'ADN. Les séquences des primers utilisés pour amplifier les gènes ND-1 (NADH Dehydrogenase-1) et TBP (TATA Box Protein), provenant respectivement de l'ADN mitochondrial et nucléaire se trouvent dans la table 2.3. Pour chaque gène étudié, un mélange réactionnel est réalisé. Celui-ci est composé de 300nM de chaque primer, 12.5µl de SYBR Green et le volume est porté à 20µl avec de l'eau. On dépose 20µl par puits de ce mélange dans une plaque 96 puits auxquels on ajoute 5µl d'extrait d'ADN dilué 100x. L'ADN extrait a été préalablement dilué dans de l'eau Nucléase-Free, à raison de 2µg d'ADN dans 30 µl d'eau pour obtenir la même concentration pour chaque échantillon. Les puits sont alors fermés hermétiquement à l'aide d'un film plastique. Après centrifugation de la plaque pendant 30 secondes à 600rpm, celle-ci est placée dans l'appareil (7900HT Fast Real Time PCR system, Applied Biosystem) qui va réaliser l'amplification PCR. Le nombre relatif de molécules d'ADN mitochondrial est calculé en faisant la différence des nombres de Ct entre le gène nucléaire et le gène mitochondrial ( $\Delta Ct$ ). La quantité d'ADN mitochondrial étant comparée aux deux copies de l'ADN nucléaire, nous utilisons la formule  $2(2^{-\Delta Ct})$  (DIMMOCK *et al.* 2010)

## 2.6 Mesure de l'expression de gènes par RT-PCR en temps réel

Matériel :

- RNeasy microkit (74004 Qiagen, All.)
- Amorces sens et anti-sens des gènes nucléaire PPIE, PGC-1 $\alpha$  et TFAM (**Table2.3**)
- Mix Sybr Green (Applied Biosystem, UK)

Méthode :

L'extraction d'ARN est réalisée par le QIAcube, à partir de plaques 6-puits contenant les cellules wt et mutées différenciées ou non. La préparation des cellules à l'extraction est réalisée en condition RNase Free afin d'éviter la dégradation de l'ARN. L'extraction proprement dite est réalisée par le QIAcube. Les cellules sont préalablement rincées au PBS froid et lysées avec 600 $\mu$ l de tampon RLT fourni avec le kit RNeasy microkit. Après extraction, la concentration en ARN des différents échantillons est mesurée à l'aide du Nanodrop et l'ARN est conservé à -70°C.

### i. Reverse transcription des ARNm en ADN complémentaire PGC-1/TFAM

Deux méthodes de retrotranscription différentes, choisies en fonction du gène étudié, ont été utilisées : la séquence et la position sur l'ARNm des amorces de TFAM permettent une rétrotranscription classique, tandis que les amorces de PGC-1 $\alpha$ , sont situées à plus de 600 paires de bases de l'extrémité de l'ARNm, compromettant la rétrotranscription à partir d'une sonde oligodT. Afin de contourner ce problème, la rétrotranscription s'est effectuée à l'aide de random hexamer primers, qui vont s'hybrider aléatoirement sur toute la séquence des ARNm présent dans l'extrait.

Matériel

- Transcriptor First Strand cDNA synthesis kit (Roche, All.)
  - o RNAsin : Ribonuclease Inhibitor
  - o Eau Nuclease Free
  - o Oligo(dT)
  - o dNTP mix
  - o Reverse Transcriptase
  - o Buffer 5x
  - o Random Hexamers

Méthode

En fonction de la concentration en ARN obtenue après extraction, un volume correspondant à 2 $\mu$ g est prélevé auxquels on ajoute 1 $\mu$ l d'oligo dT ou 2 $\mu$ l de Random hexamers primers. Le volume est porté à 13 $\mu$ l et incubé 10 minutes à 65°C pour permettre l'hybridation des amorces ou des oligo dT sur les ARNm. La solution est alors placée sur glace pour ajouter le mix réactionnel composé de

- 4 $\mu$ l de tampon de rétrotranscription 5X
- 0.5 $\mu$ l de Reverse transcriptase
- 0.5 $\mu$ l de RNAsin

- 2µl de dNTP mix,

Portant ainsi le volume à 20µl. La solution est incubée pendant 30 minutes à 55°C pour les ARN rétrotranscrits à partir des oligo dT, et incubées pendant une heure à 50°C pour ceux rétrotranscrits à partir des Random Hexamers. L'incubation à ces températures permet une activité optimale de la Reverse Transcriptase, qui est ensuite inactivé par une incubation des échantillons pendant 5 minutes à 85°C. L'ADN complémentaire ainsi obtenu est stocké à -20°C.

L'analyse PCR des différents ADNc obtenus suit exactement le même principe que l'analyse de l'ADNmt.

La RT-PCR en temps réel a été utilisée pour mesurer la variation d'expression des gènes TFAM (PGC-1α) entre les cellules RD cybrides, wt ou mutées, avant et après différenciation. L'ARNm de ces différentes conditions est donc extrait et rétrotranscrit en ADN complémentaire. La RT-qPCR permet de suivre l'accumulation d'amplicons sélectionnés via des amorces spécifiques aux gènes d'intérêt par un marquage en fluorescence au SYBR Green, un agent intercalant dans l'ADN double brin. La quantification repose sur le concept de cycle seuil (Ct), c'est-à-dire le cycle correspondant à un signal de fluorescence émise par le Sybr Green qui se distingue du bruit de fond. Les valeurs sont normalisées par un contrôle endogène, dans notre cas l'ARNm de PPIE.

## 2.7 Evaluation de la masse mitochondriale en cytométrie de flux

Principe du FACS (Fluorescent Activated Cell Sorter)

La cytométrie de flux permet d'étudier des cellules isolées dans un flux de liquide. Les cellules défilent (~1000 cellules par seconde) devant une source lumineuse, le plus souvent un laser. Cette technique permet d'analyser plusieurs paramètres cellulaires simultanément : taille, granulosité et émission de fluorescence suite au marquage par la sonde Mitotracker Green dans notre cas. Les différents signaux lumineux correspondant à ces paramètres sont captés par des détecteurs qui les transforment en un signal électrique comportant plusieurs coordonnées pour chaque cellule (Taille, granulosité et fluorescence) (**Figure 2.2**).

Matériel :

- Tampon KRH (Kreb's Ringer Hepes Buffer: 125nM NaCl, 5mM KCl, 1.3M CaCl<sub>2</sub>, 1.2mM MgSO<sub>4</sub> et 25mM HEPES; pH 7.4)
- Sonde Mitotracker Green (M-7514 Invitrogen, USA)
- Solution KRH+BSA 2%

Méthode :

Des cellules cybrides sontensemencées dans des plaques 6 puits et sont différenciées suivant le processus décrit ci-dessus. Une fois la différenciation terminée, les cellules sont trypsinisées et le culot de cellule est resuspendu dans une solution KRH + 2% BSA. Après une deuxième centrifugation, les cellules sont resuspendue avec la solution KRH + 2% BSA +

100nM de Mitotracker Green (ou DMSO pour les contrôles de fluorescence basale) et incubée sous agitation pendant 30 minutes à 37°C et à l'abri de la lumière.

Une fois incubées avec la sonde fluorescente, les suspensions cellulaires sont centrifugées pendant 5 minutes à 1000 rpm et à 4°C. Les culots sont ensuite resuspendus dans la solution de KRH + 2% BSA et transférés dans des tubes adaptés pour le FACS.

## **2.8 Transfection du plasmide MRF4-GFP**

### **2.8.1 Amplification du plasmide**

#### Matériel

- Milieu LB (Luria Bertani) liquide : 20g/l (Difco LB Broth 240230 BD, USA)
- Milieu LB solide 20g/l + 2% d'Agar (214010 BD, USA)
- Boîtes de Petri (82.1472 Sarstedt, All.)
- Plasmide MRF4-GFP (RG 204705 Origene, USA)
- Ampicilline (0.1mg/ml)
- Plasmid Plus Maxi Kit (12963 Qiagen, All.)

#### Méthode

Des boîtes contenant du milieu LB solide + 0.1mg/ml d'ampicilline sont préparées. La transformation des bactéries compétentes (E. Coli DH10-B) est réalisée par choc thermique : 50ng de plasmide est ajouté à 100µl de bactéries et la suspension est incubée sur glace pendant 10 minutes. Le choc thermique est réalisé par une incubation à 42°C pendant 2 minutes. Les bactéries sont ensuite incubées à 37°C pendant 45 minutes avec 500µl de milieu LB liquide avant d'être étalées sur les boîtes de Petri.

Après une nuit d'incubation à 37°C, 2 ou 3 clones sont prélevés et placés dans 4ml de milieu LB (toujours avec l'ampicilline) pendant 6h à 37°C et sous agitation. Après les 6 heures d'incubation, 1ml de la culture la plus trouble est placé dans 100ml de milieu LB avec ampicilline et incubé toute une nuit à 37°C et sous agitation.

La purification du plasmide amplifié est réalisée à l'aide du kit QIAGEN Plasmid Plus Purification. Après centrifugation des bactéries pendant 10 minutes à 10.000g, le surnageant est éliminé et le culot bactérien est lysé à l'aide du tampon P1 fourni dans le kit. Après ajout des tampons P2 et S3, le lysat bactérien est transféré dans une colonne de filtration et incubé pendant 10 minutes à température ambiante. L'ensemble du lysat passe à travers le filtre qui va retenir les débris cellulaire. Après ajout de « binding buffer » (BB), la solution obtenue contenant l'ADN va être filtrée sur un deuxième filtre à l'aide d'une pompe à vide. Le filtre, qui retient l'ADN va être nettoyé à l'aide de deux tampons fournis dans le kit. L'ADN est ensuite élué dans 400µl d'eau stérile. Le plasmide ainsi purifié est stocké à -20°C.

## 2.8.2 Transfection

### Matériel

- Plasmide MRF4-GFP amplifié et purifié (RG 204705 Origene, USA)
- Lipofectamin 2000 Reagent (11668.019 Invitrogen, USA)
- OptiMEM (31985 Gibco-Invitrogen, USA)
- Milieu DHG sans sérum

### Méthode

Les cellules sont cultivées à 80-90% de confluence pour permettre une efficacité de transfection optimale. Pour cela, les cellules RD cybrides ont étéensemencées en plaque 6-puits, à une densité de 200000 cellules, 24h avant la transfection.

Séparément, 4µg du plasmide et 10µl de Lipofectamine sont dilués dans 250µl d'OptiMEM par condition et incubés pendant 5 minutes à température ambiante. Les deux solutions sont ensuite rassemblées dans un même tube portant le volume à 500µl et incubées pendant 20 minutes afin de permettre la formation des complexes plasmide/Lipofectamine.

Après avoir rincés les cellules, la solution de transfection (500µl) est placée directement sur les cellules et incubée pendant 5 heures à 37°C. Les cellules sont ensuite incubées 24 heures avec du milieu DHG contenant 10% de sérum bovin, ou 10% de sérum de cheval. Les taux de transfection des cellules a été observé au microscope à épifluorescence.



### 3. Résultats

Durant ce travail, nous avons tenté de différencier les cellules RD cybrides pour observer la population mitochondriale dans les deux lignées (sauvage et mutante). Il existe différents protocoles décrits dans la littérature pour induire la différenciation myogénique des cellules RD ou RD rho0 basés sur l'utilisation de PMA ainsi que la diminution des facteurs de croissance (**Figure 3.1C-D**).

Nous avons dans un premier temps utilisé le protocole de différenciation utilisant 2% de sérum de cheval et 100nM de PMA durant 7 jours décrits pour différencier les RD rho0, car ces cellules ont subis les mêmes modifications que les RD cybrides, excepté l'insertion de l'ADN mitochondrial. Nous avons défini ce protocole comme notre protocole de base. Une fois ce protocole testé sur les cellules RD cybrides contenant ou non la mutation MERRF dans l'ADN mitochondrial, nous avons pu observer la formation de beaucoup d'amas cellulaire (**figure 3.1A-B**), suggérant que la majorité des cellules étaient toujours prolifératives et que le protocole de différenciation des cellules RD devait être optimisé.

#### 3.1 Amélioration de la différenciation

A partir du protocole de base, plusieurs paramètres ont été testés pour améliorer la différenciation : la densité cellulaire, la durée de la différenciation et différents inhibiteurs de la MAPK kinase MEK1/2 à différentes concentrations. Ces différentes conditions ont toutes été comparées au protocole de base suivant différents critères : la morphologie cellulaire, décrite dans la littérature pour les cellules musculaire comme allongée et plurinucléée, l'absence d'amas cellulaire suggérant l'arrêt de la prolifération et l'expression de deux marqueurs de la différenciation myogénique : la myogénine (marqueur précoce) et la Myosin Heavy Chain (MHC) (marqueur tardif).

Différentes densités ont donc été testées : 260, 1200, 2500, 4000, 5000 et 8000 cellules/ cm<sup>2</sup> lors des tests de différenciation avec le sérum de cheval et le PMA durant 7 jours de notre protocole de base. L'expression des deux marqueurs de la différenciation myogénique a été évaluée en Western Blot. (Résultat non montrés) Ces résultats ont montré une abondance plus élevée de ces deux marqueurs lorsque l'on utilisait une densité de 2500 cellules par cm<sup>2</sup>, conditions qui a été conservée pour les expériences ultérieures.

A ce stade, différents tests préliminaires ont été réalisés en vue d'évaluer l'abondance mitochondriale par le biais de l'abondance de différentes protéines mitochondriales par Western Blot (résultats non montrés). Ces résultats n'ont pas montré d'augmentation de l'abondance mitochondriale suite au traitement utilisé pour induire la différenciation myogénique.

L'aspect morphologique des cellules après une incubation de 7 jours en présence du milieu de différenciation ainsi que l'existence d'amas cellulaire suggèrent que la majorité des cellules n'ont pas entamé le processus de différenciation. Dès lors, nous avons utilisé des inhibiteurs de la voie des MAPK pour tenter de limiter la prolifération cellulaire et d'activer la différenciation myogénique : le U0126 et le PD098059 sont deux molécules qui inhibent l'activation de MEK1/2 sans compétition avec leurs substrats (ERK ou l'ATP). L'inhibition de MEK1/2 a notamment permis d'accélérer l'expression de MHC induite en présence du PMA dans des cellules RD (CICCARELLI *et al.* 2005).

Ces deux inhibiteurs ont été testés à des concentrations de 5µM et 10µM en présence du milieu de différenciation durant trois jours. La durée de la différenciation a été diminuée car les données de la littérature (MAURO *et al.* 2002) indiquent que l'ajout des inhibiteurs permet d'induire plus rapidement la différenciation myogénique. L'abondance des deux marqueurs de la différenciation myogénique myogénine et MHC a été évalué par Western Blot (**Figure 3.2**). Nous avons pu observer que la différenciation pendant 3 jours en présence du milieu de différenciation additionné de l'inhibiteur U0126 permet d'obtenir une expression de la myogénine comparable à celle du protocole de base après 7 jours de différenciation. Cependant l'expression de MHC n'atteint pas le même niveau que celle du protocole de base. Par contre, la différenciation avec le deuxième inhibiteur (PD098059) induit une forte expression de la myogénine, mais une expression très faible de MHC. Comme il a été montré que la myogénine était exprimée sans être fonctionnelle chez les cellules RD (BOUCHE *et al.* 1993) et que l'inhibiteur U0126 a une affinité plus importante pour MEK que le PD098059, nous avons sélectionné le U0126 pour réaliser les expériences ultérieures.

Malgré cette amélioration de l'expression des marqueurs de différenciation après seulement trois jours en présence du milieu de différenciation et de U0126, on pouvait observer beaucoup de cellules mortes. Nous avons dès lors testé des concentrations plus faibles de l'inhibiteur (5µM, 1µM, 200nM et 40nM) afin d'observer leur effet sur la différenciation myogénique. Les résultats (non montrés), indiquent que l'utilisation de concentration en U0126 inférieures à 5µM, s'accompagne d'une reprise de la prolifération cellulaire. Par contre, lorsque l'on augmente la concentration de l'inhibiteur, ou la durée de l'incubation en présence de 5µM de l'inhibiteur U0126, on peut observer beaucoup de cellules mortes.

Après avoir observé l'abondance des deux marqueurs de différenciation et la morphologie des cellules séparément, une immunofluorescence a été réalisée afin d'évaluer la proportion de cellules engagées dans le processus de différenciation cellulaire (observation de la morphologie des cellules et de l'expression des marqueurs de différenciation). Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 24 puits sur des lames couvre-objet à une densité de 20000 cellules/cm<sup>2</sup>. Nous avons testé différentes conditions : le protocole de base pendant 7 jours et d'autres conditions pendant trois jours : HS-PMA, HS-PMA-U0126 et HS-U0126 ainsi qu'une condition contrôle correspondant à des cellules non différenciées, incubée pendant trois jours en présence de 10% de FBS. Malgré quelques difficultés techniques dues au détachement cellulaire pendant la procédure de marquage avec les anticorps, nous avons pu observer la morphologie des cellules dans ces différentes conditions. Comparée aux autres

conditions, la morphologie des cellules incubées en présence de 2% de HS, 100nM de PMA et 5 $\mu$ M de U0126 est la plus proche de la morphologie attendue d'un myocyte, c'est-à-dire des cellules plus fines et allongées, bien qu'aucune cellule plurinuclée n'ait été observée. La proportion des cellules engagées dans la différenciation a pu être évaluée sur base du nombre de cellules exprimant la myogénine comparé au nombre de cellules totales. Cette proportion est plus élevée pour les cellules incubées en présence de 2% de HS, 100nM de PMA et 5 $\mu$ M de U0126 (49%) comparé au protocole de base (28%) ou aux conditions sans PMA (25%) et sans l'inhibiteur U0126 (34%) (**Figure 3.3A**).

Les résultats de cette immunofluorescence confirment donc le choix du protocole de différenciation pendant 3 jours en présence de 2% de HS, 100nM de PMA et 5 $\mu$ M de U0126. En effet, le pourcentage de cellules engagées dans la différenciation est encourageant, et ce déjà après trois jours de différenciation. Cependant, le pourcentage de cellules exprimant MHC est toujours assez faible dans toutes les conditions, suggérant que la différenciation n'est pas complète (**Figure 3.3B**).

## 3.2 Caractérisation de la population mitochondriale

Une fois choisi, le protocole induisant une bonne proportion de cellules engagées dans la différenciation a été utilisé sur des cellules cybrides wt et mutées afin de comparer l'abondance de la population mitochondriale dans les cellules différenciées ou non. Pour caractériser cette abondance mitochondriale, différentes techniques ont été employées : certaines ciblant la population mitochondriale globale, d'autres des éléments plus précis de la mitochondrie comme l'ADNmt ou des protéines représentatives des compartiments de la mitochondrie.

Des tests préliminaires ont été réalisés en utilisant une incubation avec les sondes NAO (nonyl acridine orange) et le Mitotracker Green. La sonde NAO est une sonde fluorescente qui se lie à la cardiolipine, un phospholipide caractéristique de la membrane mitochondriale interne (WIDLANSKY *et al.* 2010). Nous avons tenté de mesurer l'abondance mitochondriale des cellules cybrides sur le tapis cellulaire et sur cellules en suspension avec les deux sondes. Premièrement, nous avons mesuré la fluorescence des sondes directement sur le tapis cellulaire, mais les valeurs de fluorescence obtenues n'étaient pas proportionnelles au contenu en protéines des échantillons, utilisé pour la normalisation. Nous pouvions observer que dans l'analyse avec le mitotracker green, les valeurs de fluorescence semblaient atteindre un plateau, suggérant une saturation de la sonde (Résultats non montrés). Pour éviter des effets de saturation de la sonde et d'autres effets liés à la densité des cellules analysées, les expériences ultérieures utilisant ces sondes seront réalisées à partir de cellules en suspension.

Cependant, il existe une controverse à propos de la sonde NAO (BENEL *et al.* 1989; SEPTINUS *et al.* 1985). En effet, l'intensité de la fluorescence de la sonde, contrairement au Mitotracker Green, pourrait dépendre du potentiel de membrane mitochondrial (KEIJ *et al.* 2000). Et comme la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial est connue pour diminuer

l'efficacité de l'OXPPOS et donc diminuer le potentiel de membrane mitochondrial (ANTONICKA *et al.* 1999; JAMES *et al.* 1996), les valeurs de fluorescence de la sonde NAO mesurées dans les cellules RD cybrides mutées pourraient être sous-estimées. C'est pour cela que l'analyse de la masse mitochondriale utilisant la sonde Mitotracker Green a été privilégiée.

### **3.2.1 Analyse de l'abondance mitochondriale à l'aide de la sonde Mitotracker Green au FACS.**

Le mitotracker Green est une sonde fluorescente qui se lie aux groupements thiols de protéines mitochondriales, et devient fluorescente après accumulation dans l'environnement lipidique mitochondrial (Molecular probes). Le marquage des mitochondries par le Mitotracker Green peut être visualisé grâce à un microscope à fluorescence, ou quantifié suite à une analyse par cytométrie de flux. Avant d'analyser les cellules RD cybrides dans le FACS, nous nous sommes assuré que les amas cellulaires observés lors de la différenciation n'empêcheraient pas l'analyse. Pour ce faire, nous avons testé différents modes de mise en suspension des cellules, par détachement des cellules à l'aide d'un racloir, ou bien suite à un traitement avec de la trypsine ou de la trypsine + EDTA. Une observation microscopique a permis de sélectionner la mise en suspension du tapis cellulaire grâce à la trypsine + EDTA, ce traitement permettant d'éliminer durablement les agrégats cellulaires.

Les cellules détachées à l'aide de trypsine EDTA ont été incubées en présence de la sonde fluorescente Mitotracker Green et analysées au FACS (**Figure 3.4**). La normalisation des résultats est faite grâce au calcul des MCFRs (Mean Channel Fluorescent Ratio), qui correspondent à la normalisation du déplacement du pic de fluorescence par rapport au blanc (cellules non marquées) de chaque condition (cellules différenciées ou non). Les résultats bruts montrent un shift du pic de fluorescence entre les cellules wt et mutées, montrant une diminution de la fluorescence dans les cellules mutées comme on peut le voir sur les overlays (**Figure 3.4A**). Après normalisation, les résultats obtenus indiquent une légère diminution des MCFRs avec la différenciation et ce pour les cellules cybrides wt autant que pour les mutées, mais ces diminutions observées ne sont pas significatives. Ces résultats montrent donc une légère baisse de l'abondance mitochondriale lorsque l'on différencie les cellules cybrides.

### **3.2.2 Analyse de l'abondance de différentes protéines mitochondriales**

La deuxième méthode d'analyse de la population mitochondriale cible différentes protéines de l'organite, sur les différentes conditions préalablement utilisées : les cellules cybrides wt et mutées différenciées ou non. L'abondance de différentes protéines mitochondriales a été analysée en Western Blot : le cytochrome c de l'espace intermembranaire, la chaperone Grp75 ou mtHsp70 de la matrice mitochondriale, les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de l'ATP synthase de la membrane mitochondriale interne et les protéines du complexe TOM (Translocase of Outer Membrane) TOM20 et TOM40 de la membrane mitochondriale externe. Afin d'extraire le

plus complètement possible les protéines membranaires, nous avons utilisé un tampon contenant du SDS.

Le Western Blot de la **figure 3.5A** nous montre les différentes protéines analysées. Nous pouvons voir que l'abondance des différentes protéines n'est pas visiblement différentes d'une condition à l'autre.

Une fois normalisées, les valeurs de fluorescence des différentes protéines sont exprimées en fold d'induction par rapport à l'abondance de ces protéines dans les cellules RD cybrides wt non différenciées (**Figure 3.5B**). Les différents profils d'abondance entre les cellules cybrides différenciées ou non varient en fonction des différentes protéines étudiées. En effet, nous pouvons observer une tendance à la hausse de l'abondance de certaines protéines avec la différenciation, comme c'est le cas pour les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de ATP synthase et le cytochrome c, suggérant une augmentation de la population mitochondriale. A l'inverse, une légère tendance à la diminution avec la différenciation s'observe pour l'abondance de Grp75, TOM20 et TOM40. Cependant, la reproductibilité de ces résultats est médiocre, comme l'indiquent les écart-types sur le graphique, rendant l'interprétation de ces résultats difficile.

### 3.2.3 Analyse de l'abondance mitochondriale en mesurant la quantité d'ADNmt

Afin d'évaluer le nombre moyen de copies d'ADN mitochondrial par cellule, une région de l'ADN mitochondrial (ND-1 : NADH Dehydrogenase-1) et une région de l'ADN nucléaire (TBP : TATA Box Protein) ont été amplifiées par PCR quantitative. L'ADN des cellules cybrides sauvages et mutées, différenciées ou non, a été extrait grâce à un kit d'extraction de chez Promega, qui donne de meilleurs rendements que l'extraction au phénol/chloroforme ou le kit d'extraction d'ADN de chez Qiagen (données non montrées).

Après l'analyse par PCR en temps réel, nous obtenons des valeurs de Ct pour chaque gène analysé et pour chaque condition. Pour chacune de ces 4 conditions expérimentales, les Ct relatifs au gène mitochondrial sont normalisés par rapport aux Ct relatifs au gène nucléaire comme indiqué dans le matériel et méthode pour obtenir un nombre de molécule d'ADN mitochondrial par molécule d'ADN nucléaire (Cfr Matériel et méthodes). Nous obtenons des nombres de molécule de mtDNA comparables à ceux retrouvés dans la littérature (DIMMOCK *et al.* 2010). Sur la **figure 3.6** nous pouvons voir que ce nombre de copies d'ADN mitochondrial varie fortement au sein des différents réplicats réalisés. Nous pouvons cependant observer un profil similaire à celui observé pour l'analyse en cytométrie de flux, qui montre une tendance légèrement à la baisse de l'ADN mitochondrial avec la différenciation myogénique.

Les différents résultats obtenus pour les cellules RD cybrides mutées ne montrent pas une abondance mitochondriale plus élevée par rapport aux cellules RD cybrides sauvages, contrairement à notre hypothèse de travail. Cependant, l'abondance mitochondriale n'augmente pas non plus lors de la différenciation myogénique contrairement à ce qui est attendu (REMELS *et al.* 2010). On observe même une tendance à la diminution de cette

abondance comme le suggèrent l'analyse en cytométrie de flux suite à un marquage au Mitotracker Green et la mesure de l'abondance de l'ADN mitochondrial. Les profils d'expression étant très hétérogènes pour les différentes protéines mitochondriales étudiées nous ne pouvons pas tirer de conclusion claire de cette analyse. Ceci indique que la différenciation myogénique induite par le traitement des cellules RD cybrides avec le sérum de cheval, le PMA et U0126 n'est pas assez efficace et ne permet donc pas d'observer une augmentation de la population mitochondriale comme il est attendu. Ce n'est donc pas forcément notre hypothèse de travail qui est fautive, mais plus vraisemblablement la différenciation myogénique qui n'est pas suffisante.

### 3.3 Essais d'augmentation de la durée de la différenciation

Parce que la biogenèse mitochondriale est un processus d'adaptation à long terme (HOCK and KRALLI 2009), il est possible que la durée de la différenciation (3 jours) soit trop courte pour induire une différence de l'abondance mitochondriale détectable. En effet, les paramètres mitochondriaux mesurés pour évaluer la biogenèse mitochondriale dans les cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> l'ont été après 7 jours de différenciation (REMELS *et al.* 2010). Parmi ces paramètres, citons l'abondance de l'ADNmt, la consommation en O<sub>2</sub>, l'abondance de transcrits et/ou de protéines impliquées dans la chaîne de transport d'électrons ou dans le cycle de Krebs. L'étude de ces paramètres au terme de 7 jours de différenciation myogénique a montré une augmentation générale de 4 à 8 fois comparé aux cellules non-différenciées (REMELS *et al.* 2010). Cette augmentation a également été montrée sur ces cellules C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> après 3 et 5 jours de différenciation, mais dans des proportions plus faibles.

Nous avons donc tenté d'augmenter la durée de la différenciation dans le but d'améliorer celle-ci. Comme il a déjà été indiqué dans le point 3.1, l'utilisation de concentration en U0126 inférieures à 5µM, s'accompagne d'une reprise de la prolifération cellulaire et l'augmentation de la concentration de l'inhibiteur, ou de la durée de l'incubation en présence de 5µM de l'inhibiteur U0126 est cytotoxique. Après 4 et 6 jours de traitement avec l'inhibiteur, beaucoup de cellules mortes flottaient.

Différentes « fenêtres » de temps ont été testées : un traitement pendant 2 jours avec l'inhibiteur pour déclencher l'arrêt du cycle cellulaire et activer la différenciation myogénique, suivi d'un traitement pendant 2 ou 4 jours avec une concentration de l'inhibiteur plus faible afin de limiter la cytotoxicité et de permettre à la différenciation de se poursuivre. La cytotoxicité a été mesurée en évaluant le relargage d'une grosse protéine, la lactate déhydrogénase (LDH) dans le milieu de culture (**Figure 3.7B**). Parallèlement à cette analyse, l'activation de la différenciation myogénique a été évaluée en mesurant l'abondance protéique des 2 marqueurs de différenciation, myogénine et MHC (**Figure 3.7D-E**).

L'observation des cellules au microscope montre que l'inhibition de la différenciation n'est plus efficace après 4 jours de traitement lorsque l'on diminue la concentration de l'inhibiteur autant dans les cellules cybrides wt que dans les cellules mutées (**Figure 3.7A**). De plus, le tapis cellulaire s'est détaché dans les conditions avec un traitement pendant 6 jours rendant

impossible l'extraction protéique pour l'analyse en Western Blot des marqueurs de différenciation.

L'analyse de l'abondance des marqueurs de différenciation montre que l'expression de MHC est plus importante après 4 jours de différenciation. Cependant, la morphologie des cellules différenciées est probablement masquée par le nombre important de cellules qui ont recommencé à proliférer. Bien que l'abondance de MHC (**Figure 3.7E**) soit comparable entre les différentes conditions, le niveau d'expression de la myogénine est plus faible après 4 jours de différenciation que dans les conditions à 2 et à 3 jours de différenciation. Ceci peut s'expliquer par la reprise de la prolifération de cellules cybrides qui n'expriment pas la myogénine. L'abondance de la myogénine sur la **figure 3.7D** suggère également que la différenciation semble moins efficace pour les cellules cybrides mutées que pour les wt.

L'analyse de la cytotoxicité (**Figure 3.7B**) montre une légère augmentation du relargage de la LDH après trois jours de différenciation, mais malgré cela, la cytotoxicité dans toutes les conditions reste acceptable (<10%). Cette analyse montre également une diminution de la cytotoxicité après 4 jours de traitement. Ceci peut être encore une fois être expliqué par la reprise de la prolifération cellulaire mais également par le changement du milieu de différenciation effectué après deux jours de traitement et qui a enlevé le contenu en LDH des cellules mortes libéré dans le milieu.

### **3.4 Etude de facteurs impliqués dans le processus de biogenèse mitochondrial.**

Etant donné que l'on n'observe pas d'augmentation de l'abondance mitochondriale après la différenciation myogénique dans les cellules cybrides, probablement parce que celle-ci n'a pas le temps de se manifester en terme d'abondance mitochondriale et que la cytotoxicité de l'inhibiteur ne permet pas d'augmenter la durée de la différenciation, nous avons voulu étudier des indicateurs précoces de la biogenèse mitochondriale, à savoir PGC-1 $\alpha$ , considéré comme le principal co-activateur transcriptionnel des gènes nucléaires codant pour les protéines mitochondriales, et TFAM, un facteur de transcription impliqué dans la transcription et la réplication du génome mitochondrial (cfr introduction, point 1.2.1.2) Pour analyser ces deux régulateurs, nous avons étudié l'abondance de leur transcrit en réalisant une RT-qPCR.

Les Ct obtenus pour chaque gène étudié (TFAM et PGC-1 $\alpha$ ) ont été normalisés par rapport au Ct obtenu pour le HKG (HouseKeeping Gene) PPIE (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase E). De plus, les valeurs d'abondance normalisées pour les deux gènes étudiées ont été arbitrairement portées à un dans la condition des cellules wt non différenciées.

Nous pouvons voir sur la **figure 3.8A** que l'expression de TFAM tend à diminuer avec la différenciation dans les cellules RD cybrides wt et mutées, ce qui correspond au profil obtenu pour les précédents marqueurs utilisés pour mesurer l'abondance de la population mitochondriale.

L'analyse de l'expression du corégulateur PGC-1 $\alpha$  (**Figure 3.8B**) montre que l'abondance de son transcrit semble augmenter avec la différenciation myogénique, dans les cellules cybrides wt et mutées, contrairement à tout ce que l'on a observé dans les analyses précédentes.

Cependant, la variabilité obtenue ne permet pas de tirer de conclusion de ce graphique. Cette grande variabilité de résultat peut être due au moins en partie à la difficulté de trouver un HKG stable pour normaliser les Ct correspondant à PGC-1 $\alpha$ .

Toutefois, cette expérience analyse l'abondance du transcrite de PGC-1 $\alpha$ , or plusieurs études ont montrés l'importance de régulations post-traductionnelle qui modifient son activité (Cfr Introduction, point 1.2.2.2).

Cette expérience, malgré le résultat encourageant de l'augmentation de l'expression de PGC-1 $\alpha$  avec la différenciation, ne montrent pas de nette augmentation de la biogenèse mitochondriale et ce alors qu'on regarde l'expression des facteurs les plus précoces de ce processus. Ceci suggère que la différenciation myogénique, induite par le traitement avec le sérum de cheval 2%, le PMA et l'inhibiteur de MEK1/2 U0126, n'est pas encore optimale et ne permet pas d'enclencher efficacement la biogenèse mitochondriale malgré une tendance à la hausse de l'abondance du transcrite de PGC-1 $\alpha$ .

### **3.5 Transfection des cellules avec un plasmide contenant la séquence de MRF4 couplée à la séquence de la GFP.**

L'utilisation d'un inhibiteur chimique de MEK1/2 destiné à augmenter la différenciation myogénique induite par le PMA présentant des limitations importantes en terme de toxicité, nous nous sommes tournés vers une autre approche, génétique cette fois, reposant sur l'expression forcée d'un facteur de transcription. En effet, Sirri et ses collaborateurs ont montré que la surexpression du facteur de transcription myogénique MRF4 permet d'activer la différenciation des cellules RD (SIRRI *et al.* 2003). Après plusieurs tentatives infructueuses pour obtenir leur construction, nous avons utilisé un vecteur d'expression contenant la séquence de la protéine MRF4 humaine en amont de la séquence de la protéine GFP (Green Fluorescent Protein). La présence de la GFP permet d'évaluer facilement le taux de transfection des cellules et éventuellement par la suite de sélectionner les cellules transfectées. La transfection des cellules RD cybrides wt et mutées avec le plasmide à été réalisée par lipofection, en utilisant la Lipofectamine 2000. Celle-ci est un agent lipidique qui va se lier à l'ADN et former des liposomes en milieu aqueux, liposomes qui vont fusionner avec la membrane plasmique des cellules.

La lipofection a été réalisée en utilisant un ratio de 4 $\mu$ g d'ADN par rapport à des 10 $\mu$ l de Lipofectamine par puits d'une plaque 6-puits. Après les 5 heures d'incubation avec les complexes plasmides/ lipofectamine, les cellules ont été incubées soit avec 10% de FBS, soit avec 2% de sérum de cheval pendant 24 heures pour permettre aux cellules de récupérer du stress de la transfection. Après cette incubation, différents milieux de culture ont été testés afin d'activer au mieux la différenciation myogénique : HS 2% + PMA 100nM, HS 2%, et FBS 10%. Nous pouvons voir sur la **figure 3.9** que les cellules incubées pendant les premières 24 heures avec du FBS 10% et ensuite avec HS 2% et PMA 100nM présentent une meilleure expression du plasmide comparées aux autres conditions testées. Ceci est assez surprenant, les différentes conditions testées avaient pour but d'améliorer la différenciation myogénique or on peut observer une augmentation de l'expression du plasmide. Ceci peut être expliqué par une possible activation du promoteur CMV du plasmide par l'ajout du PMA.



Cependant, 3-4 jours après la transfection, la plupart des cellules exprimant le plasmide apparaissent fort rondes ou bien détachées du tapis cellulaire, suggérant une toxicité liée à l'expression du plasmide. Cette toxicité pouvant être due à une trop grande quantité d'ADN transfectée dans les cellules, nous avons transfecté des quantités plus faibles d'ADN tout en conservant le même ratio ADN/Lipofectamine: 1/2,5 et 0,5/1,25. Nous pouvons voir sur les photos prises à l'aide d'un microscope à épifluorescence que le taux de transfection des cellules RD cybrides est le plus élevé lorsque 4µg d'ADN sont transfectés (**Figure 3.10**). Cependant, nous observons toujours beaucoup de toxicité 3-4 jours après la transfection, suggérant que la toxicité observée n'est pas due à une trop grande quantité d'ADN transfectée.

Afin de voir si la toxicité observée est due à la transfection ou à l'expression du plasmide dans les cellules, nous avons comparé la transfection du plasmide sur des cellules RD cybrides par rapport à la transfection de cellules RD non cybrides (ATCC : CCL-136). Ces cellules, même en absence de traitement de différenciation, forment déjà des structures suggérant la présence des myotubes. La transfection des cellules RD avec le plasmide induit moins de toxicité que dans les cellules RD cybrides wt ou mutées (**Figure 3.11 A-C**). Cependant le taux de transfection des cellules RD comparé au taux de transfection des cellules RD cybrides est beaucoup plus faible.

La plupart des cellules exprimant le plasmide sont rondes comme on peut le voir sur les **figures 3.9-10-11D-E**. Cependant, certaines cellules ayant été transfectées présentent une morphologie plus proche de cellules en différenciation, c'est-à-dire allongée. Nous pensons même observer des cellules plurinucléés (**Figure 3.11F et G**), mais la qualité des images issues du microscope ne permet pas de l'affirmer. Si ces observations sont encourageantes, toutefois, les cellules allongées observées restent un événement rare par rapport au grand nombre de cellules rondes observées à leur côté (**Figure 3.11D et E**).

Confronté au problème de toxicité provoqué par la transfection par la lipofectamine, une autre technique de transfection du plasmide a été testée (S. Michel): l'électroporation. Cette technique permet d'introduire le plasmide dans la cellule via l'application d'un champ électrique qui déstabilise les membranes. Des tests préliminaires ont été réalisés sur des cellules RD cybrides wt avec un plasmide contenant uniquement la séquence GFP. Les résultats de la transfection ont montrés des taux de transfection très élevés assez encourageants, mais l'application du protocole de transfection avec le plasmide MRF4-GFP sur les cellules RD cybrides wt et mutées ainsi que sur les cellules RD a montré des taux de transfection quasi nuls. Cela suggère qu'il y a des différences trop importantes entre le plasmide GFP et le plasmide MRF4-GFP, en terme de taille, ou de niveau d'expression. Les optimisations de la transfection devraient être réalisée avec le plasmide MRF4-GFP.

## 4. Conclusion et perspectives

Le syndrome MERRF est caractérisé par la présence de la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial. Cette mutation, située dans le gène de l'ARN<sub>t</sub><sup>Lys</sup>, induit une diminution de la reconnaissance entre codon et anticodon altérant l'ensemble de la traduction mitochondriale. Comme la plupart des pathologies mitochondriales, le syndrome MERRF présente un dysfonctionnement de la chaîne de transport des électrons et touche donc principalement les organes qui consomment beaucoup d'énergie comme le système nerveux ou les muscles. On peut d'ailleurs le constater dans les différents symptômes observés : la faiblesse (puis la perte) musculaire, l'ataxie, la démence ou encore la surdité.

De plus, ce syndrome est généralement caractérisé par une augmentation de la population mitochondriale dans les fibres musculaires appelées RRFs (Ragge Red Fiber). L'étude d'un grand nombre de fibres musculaires individuelles a permis de mettre en évidence une corrélation entre ces RRFs et la présence de marqueurs apoptotiques, suggérant que la perte musculaire progressive observée chez les patients est provoquée par de l'apoptose cellulaire. Cependant, les différents mécanismes régulant l'activation de l'apoptose liée à l'augmentation de l'abondance mitochondriale dans les fibres musculaires sont encore inconnus.

Afin d'étudier les mécanismes liés à l'augmentation de l'abondance mitochondriale dans les cellules musculaires porteuses de la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial, et le lien potentiel avec la mort de ces cellules par apoptose, un modèle de cellules cybrides d'origine musculaire a été mis au point au laboratoire (S. Michel, thèse de doctorat en cours).

Le but de ce mémoire est dans un premier temps de rechercher dans ce modèle *in vitro* de cellules cybrides porteuses de la mutation A8344G, une augmentation de l'abondance mitochondriale similaire à celle observée chez des patients atteints du syndrome MERRF.

Nous avons tout d'abord sélectionné dans la littérature un protocole de base utilisé pour différencier des cellules RD Rho0 (VERGANI *et al.* 2000). Nous avons ensuite effectué de nombreuses tentatives d'optimisation de la différenciation de ces cellules cybrides en nous basant sur des protocoles de différenciation myogénique publiés dans la littérature : densité cellulaire, utilisation de PMA, de sérum de cheval et d'inhibiteurs chimiques de MEK1/2 (U0126 et PD98059). Ces derniers sont connus pour activer plus rapidement la différenciation myogénique .

L'utilisation du traitement de différenciation (HS 2% - PMA 100nM) additionné de 5µM de l'inhibiteur U0126 a permis d'améliorer le protocole de base, induisant un taux plus important de cellules engagées dans la différenciation (49%, cfr point 3.1) ainsi qu'une abondance plus élevée des deux marqueurs de différenciation (myogénine et MHC). Cependant, l'utilisation de l'inhibiteur U0126 présente certaines limitations en termes de toxicité.

Afin de mesurer l'abondance mitochondriale nous avons utilisé différentes approches permettant d'étudier la masse mitochondriale globale, l'abondance protéique mitochondriale

ainsi que l'abondance de l'ADN mitochondrial sur ces cellules cybrides. Lors de l'analyse de l'abondance protéique mitochondriale, nous avons étudié l'abondance de plusieurs protéines mitochondriales différentes, car leur expression peut être influencée par d'autres mécanismes comme c'est le cas pour l'Hsp70 mitochondriale qui est notamment surexprimée en cas de stress oxydatif ou de déprivation en glucose (XU *et al.* 2009). Nous avons également eu quelques problèmes de reproductibilité lors de la réalisation de cette expérience qui rend difficile l'interprétation de ces résultats. Les deux autres analyses (de la masse mitochondriale globale et de l'ADN mitochondrial) ont montré une tendance à la baisse de la population mitochondriale dans les cellules cybrides mutées et dans les cellules soumises au traitement de différenciation, contrairement à notre hypothèse de travail.

Les différentes techniques utilisées ne nous ayant pas permis d'observer une augmentation de la population mitochondriale dans les cellules cybrides mutées par rapport aux cellules sauvages, mais comme nous n'avons pas non plus observé d'augmentation de la population mitochondriale avec la différenciation, alors que cela est décrit (REMELS *et al.* 2010), cela suggère que le protocole utilisé n'active pas la différenciation complète des cellules cybrides. Nous avons dès lors tenté d'augmenter la durée de la différenciation. Or le traitement avec 5µM de l'inhibiteur U0126 pendant plus de trois jours s'avère être toxique pour les cellules cybrides. Nous avons donc utilisé des concentrations en U0126 inférieures à 5µM mais ces traitements s'accompagnent d'une reprise de la prolifération cellulaire.

Etant donné que la biogenèse mitochondriale est un processus adaptatif à long terme, et que nous n'arrivons pas à augmenter la durée de la différenciation, nous avons étudié des facteurs précoces (TFAM et PGC-1α) impliqués dans la biogenèse mitochondriale. Malgré des résultats encourageants pour PGC-1α, l'étude de ces facteurs précoces ne montre toutefois aucune augmentation de la biogenèse mitochondriale avec la différenciation. Cependant, comme expliqué dans l'introduction (point 1.2.2.2), beaucoup de modifications post-traductionnelles régulent l'activité de PGC-1α. Il serait donc intéressant d'analyser l'abondance protéique de PGC-1α ainsi que certaines modifications post-traductionnelles telles que la phosphorylation des résidus Thr-177, 262 et 298 et des résidus Ser 538 et 265.

Ayant observé que l'utilisation de l'inhibiteur chimique U0126 a des limitations importantes en terme de toxicité sur les cellules cybrides, nous nous sommes alors tournés vers une approche génétique reposant sur l'expression forcée d'un facteur de transcription. Ce type d'approche génétique, consistant à surexprimer un facteur de transcription clé de différenciation, est classique : plusieurs études ont montré que la surexpression de MyoD permet de provoquer la différenciation de cellules fibroblastiques en cellules musculaires (CHOI *et al.* 1990; WEINTRAUB *et al.* 1989). La surexpression de la protéine MRF4 a préalablement été montrée comme étant activatrice de la différenciation myogénique dans les cellules RD (SIRRI *et al.* 2003). Comme nous n'avons pas obtenu la construction de cette équipe, nous avons utilisé un plasmide codant pour la protéine MRF4-GFP. La présence de la protéine GFP, permet d'évaluer facilement le taux de transfection des cellules. Un autre atout potentiel de cette protéine GFP est de pouvoir par la suite sélectionner les cellules cybrides transfectées, et d'étudier par exemple l'expression de marqueurs de différenciation et

d'abondance mitochondriale de ces cellules transfectées par une analyse en cytométrie de flux.

Nous avons testé 2 méthodes de transfection : la lipofection et l'électroporation. Dans le cas de la lipofection, les cellules cybrides ont été transfectées avec différentes quantités d'ADN et de Lipofectamine 2000 à un ratio de 1 : 2.5. Quelle que soit la quantité d'ADN transfectée, les cellules apparaissaient fort rondes ou même détachées du tapis cellulaire, suggérant une certaine toxicité due à la transfection ou à l'expression de la protéine d'intérêt.

Afin de savoir si cette toxicité observée est due à la transfection ou à l'expression de MRF4-GFP, nous avons tenté d'obtenir le plasmide vide, en retirant la séquence codant pour la protéine MRF4 par restriction enzymatique. Nos essais n'ont cependant pas abouti. De plus, afin de savoir si la fusion de la protéine MRF4 à la GFP induit toujours la différenciation myogénique des cellules RD comme rapporté dans la littérature (SIRRI *et al.* 2003), nous avons également tenté de transfecter les cellules RD non cybrides avec le plasmide MRF4-GFP. Cependant, les taux de transfection observés étaient largement inférieurs à ceux observés pour les cellules RD cybrides.

La deuxième méthode de transfection testée est l'électroporation. La transfection des cellules RD cybrides a été optimisée à l'aide d'un plasmide contenant la séquence de la protéine GFP et a permis de transfecter un très grand nombre de cellules (70-80%). Malgré les hauts taux de transfection observés lors de l'optimisation avec le plasmide GFP, l'électroporation des cellules RD et RD cybrides, avec, cette fois, le plasmide MRF4-GFP, s'est soldée par un taux de transfection proche de 0. Cette différence entre les taux de transfection de ces deux plasmides pourrait être due à la différence de taille de ces deux vecteurs (3486bp pour le plasmide GFP comparé aux 7286bp pour le plasmide MRF4-GFP).

La transfection doit donc être optimisée en utilisant le plasmide vide comme contrôle de transfection. Une fois ce test réalisé, nous pourrions savoir si la toxicité observée lors de la transfection des cellules est due à l'expression de la protéine d'intérêt ou bien à cause de la transfection en elle-même.

A cause du fait que nous n'avons pas pu différencier efficacement les cellules RD cybrides, nous ne pouvons pas, à ce stade, confirmer ou infirmer l'hypothèse de travail selon laquelle la mutation A8344G provoquerait une augmentation de l'abondance mitochondriale dans les cellules cybrides contenant la mutation A8344G dans l'ADN mitochondrial, de manière similaire à celle observée chez des patients atteints du syndrome MERRF.

En effet, même si la plupart des modèles de différenciation myogénique murins et de rats se différencient spontanément en atteignant la confluence ou suite au retrait des facteurs de croissance, les cellules RD sont connues pour avoir des difficultés pour se différencier (voir point 1.5 Modèle cellulaire). Cependant, dans la littérature, plusieurs auteurs ont rapporté que la différenciation des cellules RD est possible en utilisant en plus des facteurs confluence et retrait des facteurs de croissance, un activateur des PKC, le PMA (AGUANO *et al.* 1990) et/ou des inhibiteurs de ERK (MAURO *et al.* 2002). On peut dès lors se demander pourquoi ces

protocoles appliqués aux cellules cybrides, ne permettent pas d'observer une différenciation myogénique consécutive.

Les cellules RD ont subi beaucoup de traitements, dont un long traitement au bromure d'éthidium connu pour être mutagène (SINGER *et al.* 1999), pour les rendre complètement déplétées en ADN mitochondrial. Ce long traitement avec cet agent mutagène peut avoir causé des mutations dans l'ADN nucléaire, altérant l'expression de gènes, dont les gènes responsables de l'activation de la différenciation et de la biogenèse mitochondriale. Cependant, le fait que le Dr Vergani ait préalablement démontré que les cellules Rho0 possèdent toujours une certaine capacité à se différencier, suggère que cette explication n'est pas suffisante. Les autres étapes de la construction des cellules cybrides ont pu également causer un défaut dans le génome : il a fallu transférer de manière stable un gène de résistance dans le noyau des cellules Rho0 afin de pouvoir sélectionner les cellules cybrides après fusion avec les cellules 143B énuclées.

Le modèle cellulaire RD cybride n'est sans doute pas le modèle le plus approprié pour étudier l'augmentation de l'abondance mitochondriale éventuellement causée par une mutation dans l'ARNt<sup>Lys</sup>. L'étude de cette pathologie pourrait se faire directement sur des biopsies de patients, mais l'approvisionnement est limité en raison de la rareté de la maladie. De plus, le taux de mutation de l'ADN mitochondrial pour les biopsies est très hétérogène, que ce soit entre deux individus ou bien entre deux fibres musculaires du même patient. Les études menées à partir de biopsies présentent donc une difficulté d'interprétation à cause de cette hétérogénéité. Un autre désavantage des biopsies de patients réside dans le fait qu'il n'y a pas moyen d'interférer avec les différents acteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale ou dans l'apoptose.

## 5. Références

- AGUANNO, S., M. BOUCHE, S. ADAMO and M. MOLINARO, 1990 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced differentiation of a human rhabdomyosarcoma cell line. *Cancer Res* **50**: 3377-3382.
- AL-TAHAN, A., O. SARKIS, M. HARAJLY, O. K. BAGHDADI, K. ZIBARA *et al.*, 2011 Retinoic acid fails to induce cell cycle arrest with myogenic differentiation in rhabdomyosarcoma. *Pediatr Blood Cancer*.
- ANGIONE, A. R., C. JIANG, D. PAN, Y. X. WANG and S. KUANG, 2011 PPARdelta regulates satellite cell proliferation and skeletal muscle regeneration. *Skelet Muscle* **1**: 33.
- ANTONICKA, H., D. FLORYK, P. KLEMENT, L. STRATILOVA, J. HERMANSKA *et al.*, 1999 Defective kinetics of cytochrome c oxidase and alteration of mitochondrial membrane potential in fibroblasts and cytoplasmic hybrid cells with the mutation for myoclonus epilepsy with ragged-red fibres ('MERRF') at position 8344 nt. *Biochem J* **342 Pt 3**: 537-544.
- ARNOULD, T., S. VANKONINGSLOO, P. RENARD, A. HOUBION, N. NINANE *et al.*, 2002 CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *EMBO J* **21**: 53-63.
- AURE, K., G. FAYET, J. P. LEROY, E. LACENE, N. B. ROMERO *et al.*, 2006 Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain* **129**: 1249-1259.
- BENEL, L., X. RONOT, J. C. MOUNOLOU, F. GAUDEMER and M. ADOLPHE, 1989 Compared flow cytometric analysis of mitochondria using 10-n-nonyl acridine orange and rhodamine 123. *Basic Appl Histochem* **33**: 71-80.
- BERKES, C. A., and S. J. TAPSCOTT, 2005 MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* **16**: 585-595.
- BOUCHE, M., R. CANIPARI, R. MELCHIONNA, D. WILLEMS, M. I. SENNI *et al.*, 2000 TGF-beta autocrine loop regulates cell growth and myogenic differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *FASEB J* **14**: 1147-1158.
- BOUCHE, M., M. I. SENNI, A. M. GROSSI, F. ZAPPELLI, M. POLIMENI *et al.*, 1993 TPA-induced differentiation of human rhabdomyosarcoma cells: expression of the myogenic regulatory factors. *Exp Cell Res* **208**: 209-217.
- BRAUN, T., and M. GAUTEL, 2011 Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 349-361.
- BUCKINGHAM, M., 2001 Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 440-448.
- CANTO, C., Z. GERHART-HINES, J. N. FEIGE, M. LAGOUGE, L. NORIEGA *et al.*, 2009 AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* **458**: 1056-1060.
- CHATURVEDI, S., K. BALA, R. THAKUR and V. SURI, 2005 Mitochondrial encephalomyopathies: advances in understanding. *Med Sci Monit* **11**: RA238-246.
- CHOI, J., M. L. COSTA, C. S. MERMELSTEIN, C. CHAGAS, S. HOLTZER *et al.*, 1990 MyoD converts primary dermal fibroblasts, chondroblasts, smooth muscle, and retinal pigmented epithelial cells into striated mononucleated myoblasts and multinucleated myotubes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7988-7992.
- CHOMYN, A., 1998 The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet* **62**: 745-751.
- CHOMYN, A., S. T. LAI, R. SHAKELEY, N. BRESOLIN, G. SCARLATO *et al.*, 1994 Platelet-mediated transformation of mtDNA-less human cells: analysis of phenotypic variability among clones from normal individuals--and complementation behavior of the tRNALys mutation causing myoclonic epilepsy and ragged red fibers. *Am J Hum Genet* **54**: 966-974.
- CICCARELLI, C., F. MARAMPON, A. SCOGLIO, A. MAURO, C. GIACINTI *et al.*, 2005 p21WAF1 expression induced by MEK/ERK pathway activation or inhibition correlates with growth arrest, myogenic differentiation and onco-phenotype reversal in rhabdomyosarcoma cells. *Mol Cancer* **4**: 41.

- CIEMERYCH, M. A., K. ARCHACKA, I. GRABOWSKA and M. PRZEWOZNIAK, 2011 Cell cycle regulation during proliferation and differentiation of mammalian muscle precursor cells. *Results Probl Cell Differ* **53**: 473-527.
- COSSU, G., L. DE ANGELIS, U. BORELLO, B. BERARDUCCI, V. BUFFA *et al.*, 2000 Determination, diversification and multipotency of mammalian myogenic cells. *Int J Dev Biol* **44**: 699-706.
- CRIPPS, R. M., T. L. LOVATO and E. N. OLSON, 2004 Positive autoregulation of the Myocyte enhancer factor-2 myogenic control gene during somatic muscle development in *Drosophila*. *Dev Biol* **267**: 536-547.
- CUADRADO, A., and A. R. NEBREDÁ, 2010 Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**: 403-417.
- DAVIS, R. L., H. WEINTRAUB and A. B. LASSAR, 1987 Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**: 987-1000.
- DECRISTOFARO, M. F., B. L. BETZ, C. J. RORIE, D. N. REISMAN, W. WANG *et al.*, 2001 Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *J Cell Physiol* **186**: 136-145.
- DIAZ, F., and C. T. MORAES, 2008 Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* **44**: 24-35.
- DIMMOCK, D., L. Y. TANG, E. S. SCHMITT and L. J. WONG, 2010 Quantitative evaluation of the mitochondrial DNA depletion syndrome. *Clin Chem* **56**: 1119-1127.
- DOLADO, I., and A. R. NEBREDÁ, 2008 AKT and oxidative stress team up to kill cancer cells. *Cancer Cell* **14**: 427-429.
- ESTERBAUER, H., H. OBERKOFER, F. KREMLER and W. PATSCH, 1999 Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics* **62**: 98-102.
- FERNANDEZ-MARCOS, P. J., and J. AUWERX, 2011 Regulation of PGC-1alpha, a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *Am J Clin Nutr* **93**: 884S-890.
- FINSTERER, J., 2008 Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatr Neurol* **39**: 223-235.
- GERMANI, A., C. FUSCO, S. MARTINOTTI, A. MUSARO, M. MOLINARO *et al.*, 1994 TPA-induced differentiation of human rhabdomyosarcoma cells involves dephosphorylation and nuclear accumulation of mutant P53. *Biochem Biophys Res Commun* **202**: 17-24.
- GOSSETT, L. A., D. J. KELVIN, E. A. STERNBERG and E. N. OLSON, 1989 A new myocyte-specific enhancer-binding factor that recognizes a conserved element associated with multiple muscle-specific genes. *Mol Cell Biol* **9**: 5022-5033.
- HANDSCHIN, C., J. RHEE, J. LIN, P. T. TARR and B. M. SPIEGELMAN, 2003 An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7111-7116.
- HASTY, P., A. BRADLEY, J. H. MORRIS, D. G. EDMONDSON, J. M. VENUTI *et al.*, 1993 Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* **364**: 501-506.
- HOCK, M. B., and A. KRALLI, 2009 Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* **71**: 177-203.
- HOUSLEY, M. P., N. D. UDESHI, J. T. RODGERS, J. SHABANOWITZ, P. PUIGSERVER *et al.*, 2009 A PGC-1alpha-O-GlcNAc transferase complex regulates FoxO transcription factor activity in response to glucose. *J Biol Chem* **284**: 5148-5157.
- JAGER, S., C. HANDSCHIN, J. ST-PIERRE and B. M. SPIEGELMAN, 2007 AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 12017-12022.
- JAHNKE, V. E., O. SABIDO and D. FREYSSENET, 2009 Control of mitochondrial biogenesis, ROS level, and cytosolic Ca<sup>2+</sup> concentration during the cell cycle and the onset of differentiation in L6E9 myoblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **296**: C1185-1194.
- JAMES, A. M., Y. H. WEI, C. Y. PANG and M. P. MURPHY, 1996 Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* **318 ( Pt 2)**: 401-407.

- KABLAR, B., A. ASAKURA, K. KRSTEL, C. YING, L. L. MAY *et al.*, 1998 MyoD and Myf-5 define the specification of musculature of distinct embryonic origin. *Biochem Cell Biol* **76**: 1079-1091.
- KANG, D., S. H. KIM and N. HAMASAKI, 2007 Mitochondrial transcription factor A (TFAM): roles in maintenance of mtDNA and cellular functions. *Mitochondrion* **7**: 39-44.
- KASSAR-DUCHOSSOY, L., B. GAYRAUD-MOREL, D. GOMES, D. ROCANCOURT, M. BUCKINGHAM *et al.*, 2004 Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:Myod double-mutant mice. *Nature* **431**: 466-471.
- KEIJ, J. F., C. BELL-PRINCE and J. A. STEINKAMP, 2000 Staining of mitochondrial membranes with 10-nonyl acridine orange, MitoFluor Green, and MitoTracker Green is affected by mitochondrial membrane potential altering drugs. *Cytometry* **39**: 203-210.
- KELLY, D. P., and R. C. SCARPULLA, 2004 Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* **18**: 357-368.
- KELLY, T. J., C. LERIN, W. HAAS, S. P. GYGI and P. PUIGSERVER, 2009 GCN5-mediated transcriptional control of the metabolic coactivator PGC-1beta through lysine acetylation. *J Biol Chem* **284**: 19945-19952.
- KEREN, A., Y. TAMIR and E. BENGAL, 2006 The p38 MAPK signaling pathway: a major regulator of skeletal muscle development. *Mol Cell Endocrinol* **252**: 224-230.
- KNUDSEN, E. S., C. PAZZAGLI, T. L. BORN, B. L. BERTOLAET, K. E. KNUDSEN *et al.*, 1998 Elevated cyclins and cyclin-dependent kinase activity in the rhabdomyosarcoma cell line RD. *Cancer Res* **58**: 2042-2049.
- KUANG, S., K. KURODA, F. LE GRAND and M. A. RUDNICKI, 2007 Asymmetric self-renewal and commitment of satellite stem cells in muscle. *Cell* **129**: 999-1010.
- LANGLEY, B., M. THOMAS, A. BISHOP, M. SHARMA, S. GILMOUR *et al.*, 2002 Myostatin inhibits myoblast differentiation by down-regulating MyoD expression. *J Biol Chem* **277**: 49831-49840.
- LANGLEY, B., M. THOMAS, C. MCFARLANE, S. GILMOUR, M. SHARMA *et al.*, 2004 Myostatin inhibits rhabdomyosarcoma cell proliferation through an Rb-independent pathway. *Oncogene* **23**: 524-534.
- LARSSON, N. G., M. H. TULINIUS, E. HOLME, A. OLDFORS, O. ANDERSEN *et al.*, 1992 Segregation and manifestations of the mtDNA tRNA(Lys) A-->G(8344) mutation of myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF) syndrome. *Am J Hum Genet* **51**: 1201-1212.
- LASSAR, A. B., B. M. PATERSON and H. WEINTRAUB, 1986 Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* **47**: 649-656.
- LE GRAND, F., and M. A. RUDNICKI, 2007 Skeletal muscle satellite cells and adult myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **19**: 628-633.
- LERIN, C., J. T. RODGERS, D. E. KALUME, S. H. KIM, A. PANDEY *et al.*, 2006 GCN5 acetyltransferase complex controls glucose metabolism through transcriptional repression of PGC-1alpha. *Cell Metab* **3**: 429-438.
- LLUIS, F., E. PERDIGUERO, A. R. NEBREA and P. MUNOZ-CANOVES, 2006 Regulation of skeletal muscle gene expression by p38 MAP kinases. *Trends Cell Biol* **16**: 36-44.
- MAURO, A., C. CICCARELLI, P. DE CESARIS, A. SCOGLIO, M. BOUCHE *et al.*, 2002 PKCalpha-mediated ERK, JNK and p38 activation regulates the myogenic program in human rhabdomyosarcoma cells. *J Cell Sci* **115**: 3587-3599.
- MIRABELLA, M., S. DI GIOVANNI, G. SILVESTRI, P. TONALI and S. SERVIDEI, 2000 Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain* **123 ( Pt 1)**: 93-104.
- MOK, G. F., and D. SWEETMAN, 2011 Many routes to the same destination: lessons from skeletal muscle development. *Reproduction* **141**: 301-312.
- MOLKENTIN, J. D., B. L. BLACK, J. F. MARTIN and E. N. OLSON, 1995 Cooperative activation of muscle gene expression by MEF2 and myogenic bHLH proteins. *Cell* **83**: 1125-1136.
- MOLKENTIN, J. D., and E. N. OLSON, 1996 Combinatorial control of muscle development by basic helix-loop-helix and MADS-box transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9366-9373.



- NABESHIMA, Y., K. HANAOKA, M. HAYASAKA, E. ESUMI, S. LI *et al.*, 1993 Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. *Nature* **364**: 532-535.
- NEBREDA, A. R., and A. PORRAS, 2000 p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* **25**: 257-260.
- NISOLI, E., E. CLEMENTI, C. PAOLUCCI, V. COZZI, C. TONELLO *et al.*, 2003 Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* **299**: 896-899.
- PERDIGUERO, E., V. RUIZ-BONILLA, A. L. SERRANO and P. MUNOZ-CANOVES, 2007 Genetic deficiency of p38alpha reveals its critical role in myoblast cell cycle exit: the p38alpha-JNK connection. *Cell Cycle* **6**: 1298-1303.
- PERRY, R. L., and M. A. RUDNICK, 2000 Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* **5**: D750-767.
- PISCONTI, A., S. BRUNELLI, M. DI PADOVA, C. DE PALMA, D. DEPONTI *et al.*, 2006 Follistatin induction by nitric oxide through cyclic GMP: a tightly regulated signaling pathway that controls myoblast fusion. *J Cell Biol* **172**: 233-244.
- PUIGSERVER, P., Z. WU, C. W. PARK, R. GRAVES, M. WRIGHT *et al.*, 1998 A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**: 829-839.
- PURI, P. L., Z. WU, P. ZHANG, L. D. WOOD, K. S. BHAKTA *et al.*, 2000 Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38 MAP kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Genes Dev* **14**: 574-584.
- REMELS, A. H., R. C. LANGEN, P. SCHRAUWEN, G. SCHAART, A. M. SCHOLS *et al.*, 2010 Regulation of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Mol Cell Endocrinol* **315**: 113-120.
- RICAUD, S., B. VERNUS, M. DUCLOS, H. BERNARDI, O. RITVOS *et al.*, 2003 Inhibition of autocrine secretion of myostatin enhances terminal differentiation in human rhabdomyosarcoma cells. *Oncogene* **22**: 8221-8232.
- ROCHARD, P., A. RODIER, F. CASAS, I. CASSAR-MALEK, S. MARCHAL-VICTORION *et al.*, 2000 Mitochondrial activity is involved in the regulation of myoblast differentiation through myogenin expression and activity of myogenic factors. *J Biol Chem* **275**: 2733-2744.
- ROMMELAERE, G., S. MICHEL, J. MALAISSE, S. CHARLIER, T. ARNOULD *et al.*, 2012 Hypersensitivity of A8344G MERRF mutated cybrid cells to staurosporine-induced cell death is mediated by calcium-dependent activation of calpains. *Int J Biochem Cell Biol* **44**: 139-149.
- ROSSI, S., E. STOPPANI, P. L. PURI and A. FANZANI, 2011 Differentiation of human rhabdomyosarcoma RD cells is regulated by reciprocal, functional interactions between myostatin, p38 and extracellular regulated kinase signalling pathways. *Eur J Cancer* **47**: 1095-1105.
- RYTINKI, M. M., and J. J. PALVIMO, 2009 SUMOylation attenuates the function of PGC-1alpha. *J Biol Chem* **284**: 26184-26193.
- SCARPULLA, R. C., 2006 Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* **97**: 673-683.
- SCIACCO, M., G. FAGIOLARI, C. LAMPERTI, S. MESSINA, P. BAZZI *et al.*, 2001 Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology* **56**: 1070-1074.
- SEPTINUS, M., T. BERTHOLD, A. NAUJOK and H. W. ZIMMERMANN, 1985 [Hydrophobic acridine dyes for fluorescent staining of mitochondria in living cells. 3. Specific accumulation of the fluorescent dye NAO on the mitochondrial membranes in HeLa cells by hydrophobic interaction. Depression of respiratory activity, changes in the ultrastructure of mitochondria due to NAO. Increase of fluorescence in vital stained mitochondria in situ by irradiation]. *Histochemistry* **82**: 51-66.
- SHUTT, T. E., and M. W. GRAY, 2006 Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet* **22**: 90-95.
- SILVESTRI, G., E. CIAFALONI, F. M. SANTORELLI, S. SHANSKE, S. SERVIDEI *et al.*, 1993 Clinical features associated with the A-->G transition at nucleotide 8344 of mtDNA ("MERRF mutation"). *Neurology* **43**: 1200-1206.
- SIMONE, C., S. V. FORCALES, D. A. HILL, A. N. IMBALZANO, L. LATELLA *et al.*, 2004 p38 pathway targets SWI-SNF chromatin-remodeling complex to muscle-specific loci. *Nat Genet* **36**: 738-743.

- SINGER, V. L., T. E. LAWLOR and S. YUE, 1999 Comparison of SYBR Green I nucleic acid gel stain mutagenicity and ethidium bromide mutagenicity in the Salmonella/mammalian microsome reverse mutation assay (Ames test). *Mutat Res* **439**: 37-47.
- SIRRI, V., M. P. LEIBOVITCH and S. A. LEIBOVITCH, 2003 Muscle regulatory factor MRF4 activates differentiation in rhabdomyosarcoma RD cells through a positive-acting C-terminal protein domain. *Oncogene* **22**: 5658-5666.
- SUELVES, M., F. LLUIS, V. RUIZ, A. R. NEBREA and P. MUNOZ-CANOVES, 2004 Phosphorylation of MRF4 transactivation domain by p38 mediates repression of specific myogenic genes. *EMBO J* **23**: 365-375.
- TAPSCOTT, S. J., M. J. THAYER and H. WEINTRAUB, 1993 Deficiency in rhabdomyosarcomas of a factor required for MyoD activity and myogenesis. *Science* **259**: 1450-1453.
- TEYSSIER, C., H. MA, R. EMTER, A. KRALLI and M. R. STALLCUP, 2005 Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1alpha by arginine methylation. *Genes Dev* **19**: 1466-1473.
- TUPPEN, H. A., E. L. BLAKELY, D. M. TURNBULL and R. W. TAYLOR, 2010 Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 113-128.
- UMAKI, Y., T. MITSUI, I. ENDO, M. AKAIKE and T. MATSUMOTO, 2002 Apoptosis-related changes in skeletal muscles of patients with mitochondrial diseases. *Acta Neuropathol* **103**: 163-170.
- VERGANI, L., A. R. PRESCOTT and I. J. HOLT, 2000 Rhabdomyosarcoma rho(0) cells: isolation and characterization of a mitochondrial DNA depleted cell line with 'muscle-like' properties. *Neuromuscul Disord* **10**: 454-459.
- WEINTRAUB, H., S. J. TAPSCOTT, R. L. DAVIS, M. J. THAYER, M. A. ADAM *et al.*, 1989 Activation of muscle-specific genes in pigment, nerve, fat, liver, and fibroblast cell lines by forced expression of MyoD. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**: 5434-5438.
- WIDLANSKY, M. E., J. WANG, S. M. SHENOUDA, T. M. HAGEN, A. R. SMITH *et al.*, 2010 Altered mitochondrial membrane potential, mass, and morphology in the mononuclear cells of humans with type 2 diabetes. *Transl Res* **156**: 15-25.
- WRIGHT, D. C., P. C. GEIGER, D. H. HAN, T. E. JONES and J. O. HOLLOSZY, 2007 Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem* **282**: 18793-18799.
- XU, L., L. A. VOLOBOUEVA, Y. OUYANG, J. F. EMERY and R. G. GIFFARD, 2009 Overexpression of mitochondrial Hsp70/Hsp75 in rat brain protects mitochondria, reduces oxidative stress, and protects from focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**: 365-374.
- YASUKAWA, T., T. SUZUKI, N. ISHII, S. OHTA and K. WATANABE, 2001 Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J* **20**: 4794-4802.
- YOKOTA, Y., and S. MORI, 2002 Role of Id family proteins in growth control. *J Cell Physiol* **190**: 21-28.
- YOKOYAMA, S., and H. ASAHARA, 2011 The myogenic transcriptional network. *Cell Mol Life Sci* **68**: 1843-1849.
- YONEDA, M., Y. TANNO, S. HORAI, T. OZAWA, T. MIYATAKE *et al.*, 1990 A common mitochondrial DNA mutation in the t-RNA(Lys) of patients with myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers. *Biochem Int* **21**: 789-796.
- ZEBEDEE, Z., and E. HARA, 2001 Id proteins in cell cycle control and cellular senescence. *Oncogene* **20**: 8317-8325.
- ZETSER, A., E. GREDINGER and E. BENGAL, 1999 p38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation. Participation of the Mef2c transcription factor. *J Biol Chem* **274**: 5193-5200.