

# Sommaire

<b>La Mitochondrie .....</b>	<b>13</b>
<b>I. Origine, structure et rôles de la mitochondrie.....</b>	<b>15</b>
1. Origine endosymbiotique des mitochondries .....	15
2. Structure et dynamique mitochondriales .....	16
2.1. Structuration des mitochondries .....	16
2.2. Modulation de la dynamique mitochondriale.....	17
3. Rôles de la mitochondrie au sein de la cellule .....	19
<b>II. Génétique mitochondriale .....</b>	<b>20</b>
1. Organisation de l'ADN mitochondrial humain .....	20
1.1. Structure de la molécule d'ADNmt.....	20
1.2. Distribution des molécules d'ADNmt.....	22
2. Réplication et expression de l'ADNmt.....	23
2.1. Nucléoïdes mitochondriaux.....	23
2.2. Réplication de l'ADNmt .....	23
2.3. Transcription de l'ADNmt .....	24
2.4. Protéines mitochondriales.....	25
2.5. Contrôle-Qualité mitochondrial .....	28
3. Phylogénie moléculaire et phylogéographie de l'ADNmt .....	28
3.1. Théorie de la coalescence .....	28
3.2. Hypothèse de l'horloge moléculaire.....	29
3.3. Haplotype, haplogroupe et nomenclature de l'ADNmt.....	30
3.4. Phylogéographie .....	31
<b>III. Phosphorylations oxydatives.....</b>	<b>32</b>
1. Chaîne respiratoire mitochondriale .....	33
1.1. Complexe I : NADH-Ubiquinone oxydoréductase.....	33
1.2. Complexe II : Succinyl-CoQ oxydoréductase .....	35
1.3. Complexe III : CoQH <sub>2</sub> -Cytochrome c oxydoréductase.....	35
1.4. Complexe IV : Cytochrome c oxydase.....	35
2. ATP synthase .....	36
3. Théorie chimio-osmotique.....	36
<b>IV. Les cytopathies mitochondriales .....</b>	<b>36</b>
<b>Problématique et objectifs du projet de thèse .....</b>	<b>41</b>
<b>I. Modèles pour les pathologies mitochondriales .....</b>	<b>43</b>
<b>II. Travaux de recherche : développement de nouveaux modèles ciblés sur le métabolisme énergétique mitochondrial.....</b>	<b>44</b>
1. Caractérisation d'un modèle pour le syndrome de Leigh.....	44
2. Caractérisation d'un modèle d'haplogroupe de l'ADNmt .....	44

<b>Caractérisation de l'effet du MPTP sur la chaîne respiratoire.....</b>	<b>47</b>
<b>I. Introduction.....</b>	<b>49</b>
1. Le syndrome de Leigh.....	49
1.1. Définition du syndrome de Leigh .....	49
1.2. Atteintes neurologiques .....	49
1.3. Origine génétique du syndrome de Leigh .....	50
2. Développement d'un modèle animal applicable au syndrome de Leigh .....	51
2.1. Mutants et inhibiteurs mitochondriaux .....	51
2.2. La neurotoxine MPTP .....	51
3. Objectif de ce projet .....	52
<b>II. Publication scientifique .....</b>	<b>53</b>
<b>III. Discussion.....</b>	<b>62</b>
1. La fonction hépatique pourrait instaurer un environnement enrichi en MPP <sup>+</sup> .....	62
2. Le MPTP augmente la masse mitochondriale des tissus musculaires .....	62
3. Les terminaisons nerveuses du striatum sont plus sensibles à l'intoxication.....	62
4. L'inhibition du cervelet et le cortex est différente malgré des caractéristiques tissulaires similaires .....	63
5. Le modèle murin par intoxication au MPTP peut être utilisé comme modèle du syndrome de Leigh.....	63
<b>Influence des haplogroupes de l'ADNmt sur la bioénergétique de la mitochondrie.....</b>	<b>67</b>
1. Les haplogroupes peuvent-ils modifier le métabolisme mitochondrial ?.....	69
2. Hypothèse de la géolocalisation des haplogroupes.....	69
3. Modification des fonctions mitochondriales.....	70
4. Impacts sur l'expression de pathologies .....	70
4.1. Distribution des haplogroupes dans les pathologies.....	70
4.2. Le paradoxe J .....	71
5. Objectif du projet.....	72
<b>IV. Matériels et méthodes.....</b>	<b>73</b>
1. Choix des haplogroupes de l'ADNmt .....	73
1.1. Haplogroupes européens.....	73
1.2. Focus sur l'haplogroupe J .....	73
2. Source de l'ADNmt : les plaquettes .....	74
2.1. Préparation des échantillons de plaquettes .....	74
2.2. Extraction et quantification de l'ADN.....	74
2.3. Caractérisation des ADNmt issus des plaquettes.....	75
3. Elaboration des modèles cellulaires : les cybrides.....	76
3.1. Culture cellulaire : identification et conditions de culture .....	77
3.2. Elaboration des lignées de cybrides .....	78
4. Caractérisation phénotypique des cybrides .....	79
4.1. Courbe de croissance .....	79

5.	Caractérisation biochimique des cybrides.....	79
5.1.	Détermination de la concentration protéique et de la masse mitochondriale .....	79
5.2.	Dosages de l'activité des complexes de la chaînes respiratoire .....	80
6.	Modélisation du métabolisme énergétique mitochondrial .....	80
6.1.	Principes de base des cinétiques enzymatiques .....	80
6.2.	Modèle cinétique des complexes OXPHOS .....	81
6.3.	Détermination des paramètres cinétiques des complexes I et IV pour les cellules 143B et les cybrides .....	83
6.4.	Estimation des paramètres cinétiques .....	84
6.5.	Modélisation des OXPHOS.....	85
<b>V.</b>	<b>Résultats .....</b>	<b>90</b>
1.	Collection de cybrides .....	90
2.	Courbe de croissance .....	91
3.	Caractéristique biochimique.....	92
3.1.	Détermination de la concentration protéique .....	92
3.2.	Détermination de la masse mitochondriale .....	93
3.3.	Détermination des paramètres cinétiques du complexe I .....	94
3.4.	Détermination des paramètres cinétiques du complexe IV .....	98
4.	Cybrides virtuels.....	100
4.1.	Etude des paramètres essentiels des OXPHOS .....	101
4.2.	Etude de la relation flux-force .....	101
4.3.	Etude de l'effet de seuil.....	104
5.	Etude préliminaire sur l'haplogroupe J : évaluation structurale de l'impact des polymorphismes m.T14798C et m.G15257A sur le complexe III.....	106
<b>VI.</b>	<b>Discussion .....</b>	<b>108</b>
1.	Création de la banque de plaquettes de différents haplogroupes de l'ADNmt .....	108
2.	Création et culture des cybrides.....	109
3.	Analyse des cybrides au niveau cellulaire .....	109
4.	Analyses biochimiques des cybrides : détermination des paramètres cinétiques des complexes I et IV de la chaîne respiratoire. ....	110
5.	Construction des cybrides virtuels et analyse théorique des propriétés de leur métabolisme énergétique mitochondrial (OXPHOS) .....	113
6.	Utilisation des cybrides virtuels .....	114
7.	Analyse structurale in silico .....	115
<b>VII.</b>	<b>Perspectives .....</b>	<b>117</b>
	<b>Conclusion Générale .....</b>	<b>123</b>
	<b>Listes.....</b>	<b>127</b>
	<b>Annexes.....</b>	<b>137</b>
	<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>151</b>









# La Mitochondrie

Introduction générale



## I. Origine, structure et rôles de la mitochondrie

### 1. Origine endosymbiotique des mitochondries

Du fait de sa taille, sa structure et son ADN, sa possible origine bactérienne a longtemps été discutée : quand, comment et pourquoi est-ce arrivé ? Quel impact sur l'origine des eucaryotes<sup>1</sup> ? En 1967, la biologiste L. Margulis démontre par ses travaux sur des fossiles de procaryotes et eucaryotes, une similitude structurale et fonctionnelle entre les procaryotes et les organites eucaryotes (ex. mitochondrie). Selon ses observations, l'hypothèse la plus cohérente serait l'assimilation d'une cellule procaryote dans une autre cellule procaryote plus grosse par un mécanisme d'endosymbiose, deux milliards d'années avant notre ère<sup>2</sup>. La théorie endosymbiotique de L. Margulis stipule que les mitochondries seraient un vestige de l'intégration d'une  $\alpha$ -protéobactérie aérobie dans une archaeobactérie anaérobie hétérotrophe suite à l'apparition d'une atmosphère riche en  $O_2$  ; cette intégration aurait aboutie à l'émergence des premiers organismes amiboïdes amitotiques aérobies<sup>3,4,5</sup>. Cette symbiose étant devenue obligatoire dans un tel environnement, chacun de ces organismes interagiraient de façon mutuelle afin d'optimiser leur relation symbiotique : l' $\alpha$ -protéobactérie aérobie neutraliserait l' $O_2$  toxique pour assurer la survie de son hôte anaérobie, et en contrepartie, l'archaeobactérie anaérobie fourniraient nutriments et protection à l'endosymbiote.

Des recherches plus récentes ont permis d'apporter plus de précisions quant à la nature des deux entités impliquées dans cette endosymbiose<sup>6,7</sup>. Une lignée archaïque récemment découverte, Lokiarchaeota (**Figure 1**), serait l'unique archaeobactérie présentant des gènes eucaryotes considérés comme essentiels pour permettre l'endosymbiose c'est-à-dire des gènes impliqués dans le remodelage membranaire, le trafic vésiculaire et l'endocytose (nécessaire pour la capture du précurseur mitochondrial). La découverte de cette Lokiarchaeota fournit ainsi un chaînon manquant dans l'histoire de l'évolution des eucaryotes. Quant à l'origine du mitochondrion, des études phylogéniques sur les gènes mitochondriaux suggèrent que l'ancêtre de cet organite appartiendrait à la famille des Rickettsiales. Ces organismes intracellulaires sont souvent appelés parasites énergétiques car ils codent une protéine responsable de l'importation unidirectionnelle d'ATP à partir du cytosol hôte. Il est probable que l'endocytose par les archaeobactéries, qui était réalisée à l'origine pour faciliter la récolte de macromolécules dans des milieux externes riches en nutriments, aurait accidentellement conduit à la capture de cette Rickettsiale.

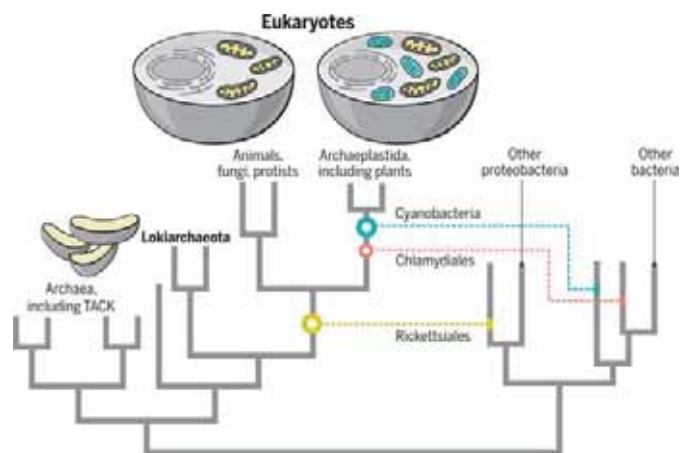
Au cours du temps, cette endosymbiose aurait permis de modifier les moyens bioénergétiques de base de cet eucaryote primitif et d'initier de grandes variations dans sa forme, sa taille et ses fonctions physiologiques. Ces variations auraient permis à cette cellule d'évoluer jusqu'à l'émergence d'organismes multicellulaires. Par la suite, la plupart des gènes du génome bactérien ancestral auraient été perdus ou transférés vers l'ADN nucléaire (ADNn), laissant ainsi un ADN mitochondrial (ADNmt) compact.

Dans tous les organismes étudiés, il y aurait une corrélation entre la présence

d'ADNmt et l'existence de mitochondries avec un système de phosphorylations oxydatives (OXPHOS) efficace mais cette corrélation n'est pas encore clairement définie. Cependant, elle pourrait être expliquée par l'histoire évolutive des mitochondries ou par une forte sélection pour certaines fonctions de régulation qui nécessitent la présence de l'ADNmt à proximité des OXPHOS. Il est possible que la régulation locale de l'expression des gènes soit importante pour le contrôle métabolique comme par exemple pour les mécanismes moléculaires qui régissent l'expression de l'ADNmt et qui pourraient être directement influencés par le potentiel de membrane mitochondriale ( $\Delta\psi$ ) ou par le potentiel rédox ( $\Delta E^0$ ), ou bien les deux<sup>8,9,10</sup>.

**Figure 1 : Origine des organites eucaryotes**

L'Archaeobactérie originale (cellule hôte) serait une Lokiarchaeota qui aurait subi une endosymbiose primaire (cercle jaune) avec une  $\alpha$ -protéobactérie : Rickettsiales (devenue par la suite, la mitochondrie). Parallèlement, l'ancêtre Archaeplastida aurait subi une endosymbiose primaire (cercle bleu) avec une cyanobactérie, via un processus d'infection par une chlamydia (cercle rouge).



D'après Ball et al. 2016

## 2. Structure et dynamique mitochondriales

### 2.1. Structuration des mitochondries

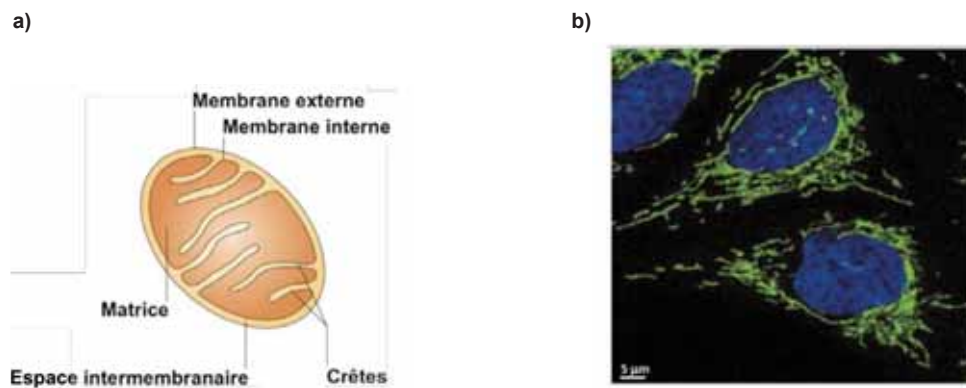
La mitochondrie est constituée de deux membranes : la membrane interne et la membrane externe. Ces 2 membranes lipidiques divisent la mitochondrie en deux compartiments distincts, la matrice et l'espace intermembranaire (**Figure 2**). La membrane interne présente une perméabilité sélective tandis que la membrane externe est relativement poreuse vis-à-vis des molécules de faible poids moléculaire (<5kDa). De cette manière, il est considéré que le dialogue métabolique entre la matrice mitochondriale, qui est délimitée par la membrane interne, et le cytoplasme soit essentiellement assuré par les transporteurs localisés dans la membrane interne<sup>11,12</sup>.

Les mitochondries sont des composants cytoplasmiques essentiels à l'ensemble des

différents types cellulaires d'un organisme. Ces organites particuliers s'organisent comme un réseau au niveau du cytoplasme de chaque cellule. Ce réseau est en constant équilibre entre une forme dite granuleuse et une autre qualifiée de filamenteuse<sup>13</sup>. Ce remodelage perpétuel est régi par deux mécanismes : (i) la fusion qui est à l'origine de l'état filamenteux et (ii) la fission qui entraîne la formation d'un réseau fragmenté (**Figure 2**).

**Figure 2 : Structure mitochondriale et organisation en réseau**

**a)** Structure simplifiée de la mitochondrie montrant les deux compartiments mitochondriaux (matrice et espace intermembranaire) délimités par les membranes mitochondriales internes et externes. **b)** Observation en microscopie confocale de mitochondries issues de cellules d'ostéosarcomes humain U-2OS marquées par immunofluorescence indirecte en utilisant des anticorps contre la protéine membranaire TOM20 (*translocase of outer membrane 20*). Les noyaux (en bleu) ont été colorés au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).



D'après Westermann 2010

## 2.2. Modulation de la dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont des organites dynamiques, qui fusionnent et se divisent, pouvant apparaître comme un réseau de filaments allongés et/ou interconnectés. La longueur et l'interconnectivité des mitochondries sont déterminées par l'équilibre entre la fusion et la fission. En effet, les mitochondries subissent d'importants changements morphologiques au cours du cycle cellulaire : leur taille est augmentée dans les cellules apoptotiques et peut devenir très allongée dans les cellules sénescents ou en cas de stress. Cela montre que ces changements morphologiques ne sont pas des épiphénomènes, mais sont dus aux processus cellulaires qui les déclenchent<sup>14</sup>.

Cette dynamique mitochondriale est régie par les processus suivants : la biogénèse et la dégradation (mitophagie), ainsi que la fusion et la fission comme précisé précédemment (**Figure 3**). Ces processus sont induits par l'état physiologique et bioénergétique de la cellule, et participent au maintien de l'homéostasie cellulaire<sup>15,16,17</sup>.

La biogénèse mitochondriale<sup>18</sup> permet la néo-synthèse de mitochondries afin d'augmenter la masse mitochondriale ou bien le remplacement d'organites défectueux éliminés par la cellule. Elle est principalement médiée par la protéine PGC-1α (*Peroxisome proliferator-*

*activated receptor-Gamma Coactivator-1 $\alpha$* )<sup>19,20</sup>, un co-activateur pour la transcription de facteurs impliqués dans la prolifération mitochondriale comme NFRs (*Nuclear Respiratory Factor 1*) et ERR (*Estrogen-Related Receptor*). PGC-1 $\alpha$  peut être activée sous différentes conditions, notamment en cas de stress<sup>21</sup> lors d'une diminution drastique de la quantité d'ATP ou de Ca<sup>2+</sup>.

La mitophagie est le processus permettant la destruction de l'organite par l'intermédiaire du mécanisme d'autophagie<sup>22</sup>. Celui-ci est engagé en cas de stress ou d'altération de l'organite. Les mitochondries à éliminer sont physiologiquement caractérisées par un potentiel de membrane faible qui permet un marquage par la protéine Pink-1 (*PTEN-induced putative kinase-1*)<sup>23</sup>. Pink-1 induit le recrutement de la protéine Parkin qui permet le déclenchement du mécanisme d'ubiquitination et la formation du protéasome, conduisant finalement à l'autophagocytose de la mitochondrie.

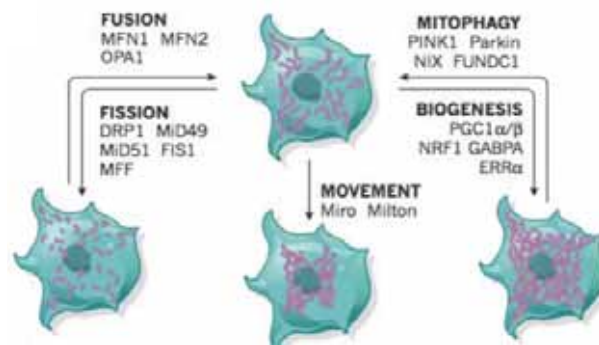
La fusion mitochondriale<sup>24</sup> est définie comme le rapprochement et la jonction de deux organites en un seul. La fusion est un processus coordonné nécessitant la fusion des membranes externes puis des membranes internes de chaque organite impliqué. La fusion des membranes externes est effectuée par les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et MFN2) localisées au niveau de ces membranes<sup>25</sup>. Quant à la fusion des membranes internes et des crêtes, elle nécessite l'action de la protéine OPA1 (*Optic Atrophy 1*) en étroite coopération avec MFN1 et MFN2. Toutes ces protéines sont membres de la superfamille des dynamines comportant un domaine effecteur GTPase.

Le processus opposé de la fusion, la fission, se réfère à la séparation d'un organite en deux organites distincts. Le médiateur principal de ce mécanisme est la protéine DRP1 (*dynamitin-1-like protein*) qui, une fois transloquée du cytoplasme vers la membrane externe mitochondriale, induit la fission des membranes mitochondriales et donc de la mitochondrie. Ce mécanisme est étroitement lié aux protéines membranaires FIS-1 (*mitochondrial Fission Factor 1*), MFF (*Mitochondria Fission Factor*) et MIEF1 (*Mitochondrial Elongation Factor 1*) qui permettent le recrutement de DRP1<sup>26</sup>. Il est intéressant de noter que les protéines de fusion et de fission mitochondriale appartiennent toutes à la même superfamille de protéines apparentées aux dynamines (*dynamine-like*).

Les mitochondries initiales ou néo-synthétisées (par biogénèse, fusion et/ou fission) sont stratégiquement orientées vers une région donnée de la cellule pour maintenir l'homéostasie cellulaire (ex. régulation locale, apport d'ATP, régulation du Ca<sup>2+</sup>). La motilité mitochondriale est effective via plusieurs protéines mitochondriales. Miro, une protéine de la membrane externe, interagit avec une autre protéine mitochondriale, Milton. Cette dernière est appariée par une kinésine-1 (moteur antérograde) et une dynéine (moteur rétrograde) permettant ainsi le déplacement des mitochondries sur le cytosquelette<sup>27,28</sup>.

### Figure 3 : Dynamique mitochondriale

Représentation des mécanismes impliqués dans la modification de la morphologie et de la masse mitochondriale. Les principaux facteurs impliqués dans la fusion mitochondriale sont les mitofusines MFN1 et MFN2, ainsi que OPA1. La fission est modulée par les protéines DRP1, FIS-1, MFF et MiD49. La mitophagie permettant l'auto-digestion de la mitochondrie est régie par les protéines PINK1, Parkin, NIX et FUNDC1. La biogénèse mitochondriale est stimulée principalement par PGC1 ainsi que par NRF1, GABPA et ERR. Une autre caractéristique de la dynamique mitochondriale est le déplacement des mitochondries dans le cytoplasme via les protéines mitochondriales Miro et Milton.



D'après Vafai et al. 2012

### 3. Rôles de la mitochondrie au sein de la cellule

La mitochondrie est au centre de nombreux processus physiologiques<sup>29</sup>. Elle prend notamment part aux phénomènes suivants :

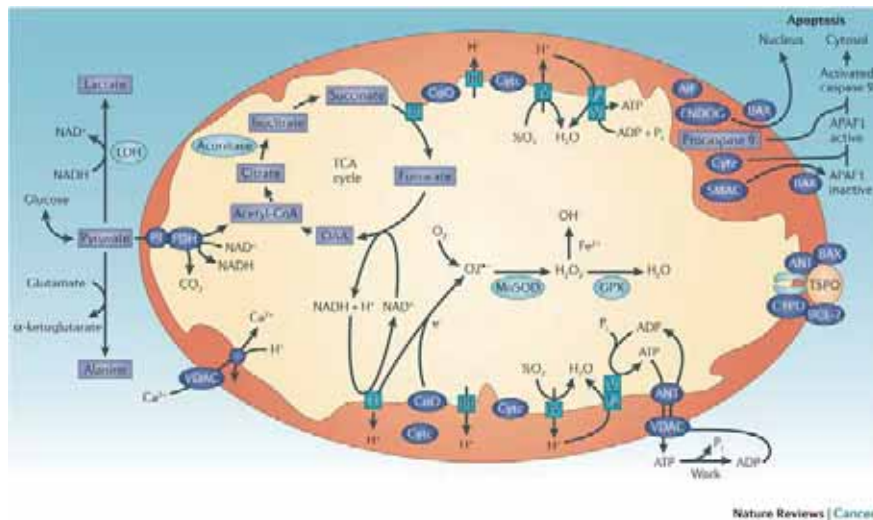
- Mort cellulaire programmée (apoptose) via l'activation des mtPTP (*Mitochondrial Permeability Transition Pore*)
- Homéostasie calcique
- Thermogénèse
- Certaines voies cataboliques comme la  $\beta$ -oxydation, le cycle de l'urée et le cycle de Krebs
- Certaines voies anaboliques comme la synthèse des hèmes (ex. cytochrome), des protéines fer-soufre (ex. protéines Rieske), des nucléotides pyrimidiques ou encore des stéroïdes<sup>30</sup> (**Figure 4**).

Cependant, le rôle principal de la mitochondrie est la production d'énergie sous forme d'ATP (Adénosine Tri-Phosphate) directement assimilable par l'organisme. Cet ATP est synthétisée suite à des réactions d'oxydoréductions ménagées (chaîne respiratoire) couplées à une synthèse d'ATP via l'ATP synthase. Ce mécanisme essentiel de production d'énergie cellulaire en aérobose est appelé oxydations phosphorylantes (OXPHOS)<sup>31</sup>. Ces réactions du métabolisme énergétique sont assurées par des enzymes ou par des complexes enzymatiques qui sont constitués de polypeptides codés à la fois par l'ADNn et par l'ADNmt. L'ATP ainsi produit est continuellement utilisé par la cellule pour de nombreuses réactions du métabolisme comme les synthèses biochimiques et le travail musculaire. Ainsi, de par son

implication dans ces nombreuses voies biochimiques, la mitochondrie est en constante interaction avec le métabolisme cellulaire. On comprend donc que tout défaut dans le fonctionnement des OXPHOS se traduira par un dysfonctionnement cellulaire et par l'apparition de pathologies regroupées sous le nom de cytopathies d'origine mitochondriale.

**Figure 4 : Principales voies métaboliques mitochondriales**

Représentation des différents processus physiologiques réalisés, tout ou en partie, par la mitochondrie. Les principaux processus représentés sur ce schéma sont le métabolisme du glucose (cycle de Krebs et métabolisme du pyruvate) et du calcium, les OXPHOS ainsi que la synthèse d'ATP, la génération d'espèces réactives de l'oxygène et le processus de mort cellulaire par apoptose.



D'après Wallace 2012

## II. Génétique mitochondriale

### 1. Organisation de l'ADN mitochondrial humain

#### 1.1. Structure de la molécule d'ADNmt

Les mitochondries de mammifères présentent un ADN circulaire et double brin (**Figure 5**). Les 16569 paires de base (pb) de l'ADNmt humain ont été séquencées pour la première fois en 1981<sup>32</sup> et réanalysées en 1999<sup>33</sup>. La molécule utilisée lors de ces analyses sert de référence pour l'ensemble des études axées sur l'ADNmt et porte le nom de séquence CRS (*Cambridge Reference Sequence*)<sup>34</sup>.

Chaque brin peut être caractérisé suivant sa densité sur un gradient de chlorure de césium, qui est fonction de leur composition en guanine et thymine. Ainsi il est possible de distinguer un brin lourd (heavy strand) ou brin H, et un brin léger (light strand) ou brin L. Ces brins codent les 37 gènes mitochondriaux qui sont répartis en deux gènes d'acide ribonucléique ribosomaux (ARNr 12S et 16S), 22 gènes d'ARN de transfert (ARNt) et 13

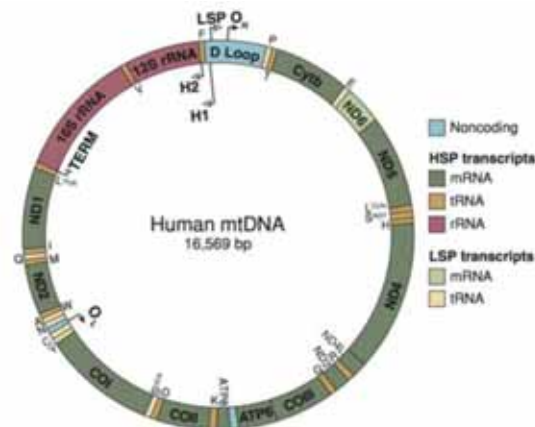
gènes codant certaines des sous-unités des complexes impliqués dans les OXPHOS<sup>35</sup> (**Figure 5**).

L'organisation de ce génome est compacte et seule une faible fraction de celui-ci n'est pas codante. Les gènes ne possèdent pas d'introns, peu ou pas de séquences intergéniques et certains de ces gènes sont chevauchants (entre ATPase6 et ATPase8 ainsi qu'entre ND4 et ND4L). De plus, presque tous les gènes de structure ainsi que les 2 gènes des ARNr sont ponctués par les gènes des ARNt.

Seule une région régulatrice de 1118pb n'est pas codante. Cette région, qui est située entre les gènes de ARNt<sup>phe</sup> et de l'ARNt<sup>Pro</sup>, est appelée D-Loop (*Displacement LOOP*) : un brin court d'ADN complémentaire au brin L forme en permanence, dans cette région, une structure en triple brin et va ainsi déplacer le brin H. La D-Loop contient également les sites d'initiation et les promoteurs de la transcription des deux brins ainsi que l'origine de réplication du brin H (**Figure 8**).

### Figure 5 : Structure de l'ADN mitochondrial

Organisation du génome mitochondrial humain. Le LSP (light-stand promotor) transcrit l'ARN messenger (ARNm) de la sous-unité ND6 (complexe I) et les amorces nécessaires à l'initiation de la synthèse d'ADNmt sur l'origine de réplication du brin H, O<sub>H</sub>. Il existe deux HSP (hight-stand promotor) : H1 et H2. H1 est situé à 16pb en amont de l'ARNt<sup>phe</sup> et produit un transcrit jusqu'à l'extrémité 3' de l'ARNr 16S (TERM). H2 est proche de l'extrémité 5' de l'ARNr 12S et produit un fragment polycistronique (soit presque la totalité du brin H). Les gènes des ARNt codés par chacun des deux brins sont indiqués par la lettre de l'acide aminé correspondant.



D'après Falkenberg et al. 2007

Une autre caractéristique du génome mitochondrial est son code génétique<sup>36</sup>. Il est légèrement différent du code universel puisque, par exemple, le codon STOP UGA est un codon tryptophane et les codons arginine AGA et AGG sont des codons STOP. De plus, la mitochondrie utilise seulement 22 ARNt pour son système de traduction alors que 32 sont requis pour le système cytoplasmique.

## 1.2. Distribution des molécules d'ADNmt

Par cellule, le nombre de molécules d'ADNmt a été estimé à plusieurs centaines. Chez les mammifères, les cellules somatiques peuvent contenir plusieurs milliers de ces molécules. Ce nombre varie en fonction du type cellulaire et de la demande énergétique de la cellule, ou du tissu plus généralement.

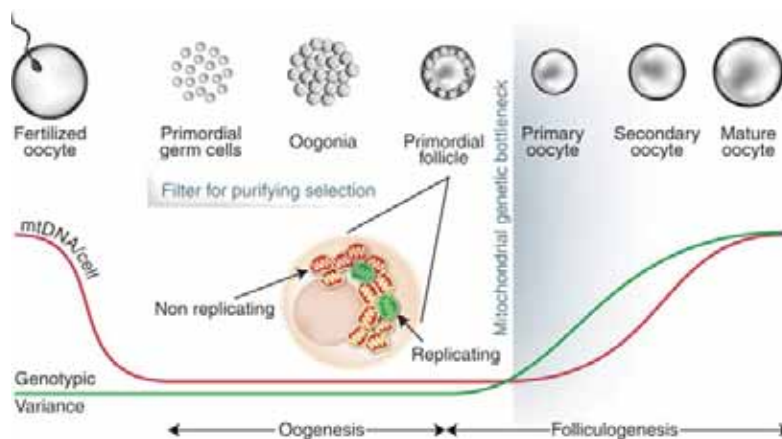
L'ovocyte peut abriter jusqu'à plusieurs centaines de milliers de copies d'ADNmt. En revanche, le faible nombre de copies provenant du spermatozoïde ayant pu pénétrer dans l'ovocyte durant la fécondation est activement éliminé par un mécanisme d'ubiquitination<sup>12</sup>. De cette manière, seule la mère transmettrait son ADNmt à sa descendance impliquant donc une hérédité strictement maternelle, et non mendélienne, des gènes mitochondriaux.

Au cours de l'embryogenèse, le noyau va se répliquer de nombreuses fois et le cytoplasme de l'œuf va se segmenter pour former le blastocyste. Lors de ce clivage du territoire cytoplasmique, la répartition des mitochondries à l'intérieur des différentes cellules blastocystaires se fait au hasard. Par la suite, des études ont montré une ségrégation rapide des ADNmt entre les générations, probablement obtenue grâce à un goulot d'étranglement génétique. Ce « bottleneck » résulterait de la réplication active d'une sous-population d'ADNmt au cours de la maturation ovocytaire, combinée à une purification sélective forte contre les mutations délétères dans les lignées germinales<sup>37,37</sup> (**Figure 6**).

Par la suite, ces mitochondries vont proliférer à l'intérieur du cytoplasme et chaque cellule va se diviser de manière mitotique, donnant naissance à deux cellules filles. Au cours de la cytokinèse, l'hypothèse la plus couramment admise est que la répartition des mitochondries entre les cellules filles a lieu de manière aléatoire. Ce phénomène porte le nom de ségrégation mitotique.

**Figure 6 : Modèle du bottleneck mitochondrial**

Le bottleneck mitochondrial postnatal (durant la folliculogenèse) permet la ségrégation rapide des ADNmt. Ces ADN sont ensuite sélectionnés par purification sélective via un goulot d'étranglement physique au niveau des cellules germinales primordiales.



D'après Wai et al. 2008

Lorsque l'ensemble des génomes mitochondriaux d'une cellule ou d'un tissu est identique, qu'ils soient mutés ou normaux, on parle d'homoplasme. A contrario, il est possible que plusieurs populations d'ADNmt coexistent au sein de la même cellule, on parle alors d'hétéroplasme (ou polyplasme si plus de deux populations). Les mutations les moins pathogènes peuvent apparaître de manière homoplasme, tandis que les mutations les plus délétères telle que les délétions (réarrangement de l'ADN) sont nécessairement associées à des génomes normaux permettant une complémentarité fonctionnelle. Le taux de molécules mutées ou le taux d'hétéroplasme d'une mutation est donc un critère essentiel pour évaluer son pouvoir pathogène<sup>38,39</sup>.

## 2. Réplication et expression de l'ADNmt

L'ADNmt code pour ses propres ARNm, ARNt, ARNr et participe également à la synthèse de certains complexes des OXPHOS (complexes I, III, IV et ATP synthase). L'ADNmt possède son propre système de maintenance impliquant différents niveaux de contrôle de la régulation. Ce système intervient pour l'entretien et la synthèse d'ADNmt, la modification et la stabilité des ARN, la coordination de la traduction mitochondriale et la régulation de l'import et de l'assemblage de protéines codées par l'ADN<sup>5</sup>.

### 2.1. Nucléoïdes mitochondriaux

Dans la matrice mitochondriale, les différentes molécules d'ADNmt (1 à 10 molécules) se retrouvent à l'intérieur d'une structure protéique appelée le nucléoïde<sup>40,41</sup>. Ces structures sont composées d'une trentaine de protéines telles que les protéines TFAM (*Mitochondrial Transcription Factor A*), mtSSB (*mitochondrial Single-Stranded DNA-Binding protein*), POL- $\gamma$  (*POLymerase- $\gamma$* ), TWINKLE et POLRmt (*mitochondrial DNA-directed RNA POLymerase*). Le nucléoïde semble jouer un rôle protecteur de l'ADNmt en l'isolant du reste de la matrice et en étant impliqué dans sa réparation. Le cœur catalytique du nucléoïde serait le lieu de la réplication et de la transcription de l'ADNmt, tandis que la traduction et l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire auraient lieu dans la zone périphérique du nucléoïde.

### 2.2. Réplication de l'ADNmt

#### 2.2.1. Mécanisme de la réplication

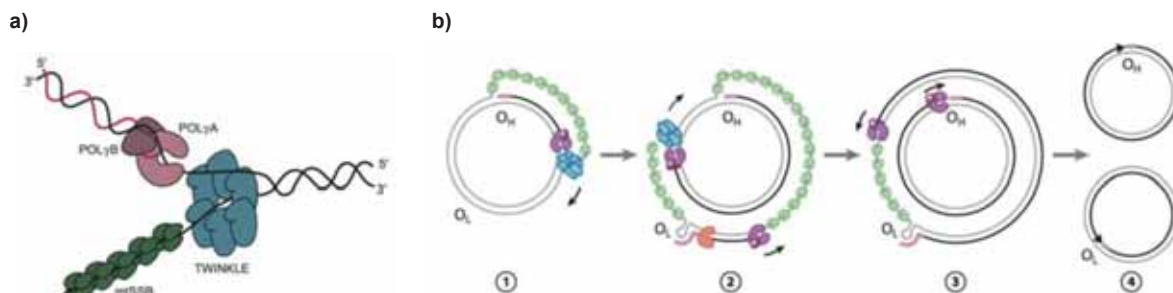
Selon le modèle de réplication SDM (*Strand-Displacement Model*), la synthèse d'ADNmt est asymétrique et asynchrone (**Figure 7**). Pour assurer la coordination de la synthèse d'ADNmt, chaque brin possède une origine de réplication dédiée ( $O_H$  et  $O_L$ )<sup>43,35</sup>.

La réplication débute par la séparation des deux brins d'ADNmt par l'hélicase TWINKLE. Malgré cette séparation, il n'y a pas de synthèse simultanée des brins H et L ; seul le brin H est répliqué à partir de son origine de réplication  $O_H$ , et ce de manière

unidirectionnelle. Durant cette première phase de réplication, des protéines mtSSB viennent recouvrir le brin parental H, bloquant ainsi la fixation de la POLRmt et donc l'initiation de la transcription sur ce brin libre. Lorsque la réplication atteint l'origine de réplication du brin L ( $O_L$ ), la réplication est alors initiée sur ce brin. Le brin L prend alors une conformation tridimensionnelle en tige-boucle. Cette structure empêche l'appariement des protéines mtSSB laissant ainsi le brin L parental accessible pour la fixation de la POLRmt et la synthèse d'amorce ARN pour la réplication. Après synthèse de l'amorce, la POLRmt est remplacée par la POL- $\gamma$  qui initie la réplication du brin complémentaire L.

**Figure 7 : Mécanisme de réplication de l'ADNmt**

**a)** L'hélicase TWINKLE (bleu) sépare les brins d'ADNmt dans le sens 5'→3'. Les protéines mtSSB (vert) protègent le brin parental libre afin de bloquer l'action de la POL- $\gamma$  (violet). **b)** La réplication est initiée sur  $O_H$  de manière unidirectionnelle et le brin parental H libre est protégé par les protéines mtSSB (vert). Lorsque la machinerie répliquative atteint  $O_L$ , une conformation tige-boucle se met en place et est reconnue par la POLRmt (orange). Une fois la réplication du brin L débutée, la POL- $\gamma$  (violet) remplace la POLRmt pour la synthèse du brin complémentaire L. La réplication se termine lorsque les 2 brins se rejoignent.



D'après (a) Falkenberg et al. 2007 et (b) Gustafsson et al. 2016

## 2.3. Transcription de l'ADNmt

### 2.3.1. Mécanisme de la transcription

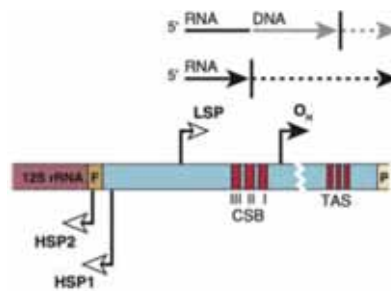
Il existe deux sites majeurs d'initiation de la transcription dans la D-loop (**Figure 8**), ITH1 et ITH2 situés à 150pb l'un de l'autre. ITH1 se trouve dans le promoteur de transcription du brin H (HSP) et ITH2 se trouve dans le promoteur du brin L (LPS). Pour la transcription du brin lourd, il existe un deuxième promoteur ITH2, moins actif que le premier, qui se trouve dans le gène de l'ARNt. La spécificité de fixation de l'ARN polymérase sur les différents promoteurs de transcription va lui être conférée par des cofacteurs comme le TFAM. Ce facteur va augmenter l'affinité de la polymérase pour le LSP par rapport au HSP. A partir du promoteur du brin léger, la transcription va générer un ARN polycistronique couvrant la totalité de l'ADNmt. En revanche, pour le promoteur du brin lourd, deux types de transcrits sont produits suivant le site d'initiation utilisé. H1, le plus actif, génère de courts transcrits qui se terminent en aval du gène de l'ARN 16S (au niveau du gène de l'ARNt<sup>leu</sup>). Cet arrêt est provoqué par un facteur de terminaison mtTERM, qui a également la capacité d'activer la réplication. Quant à H2, il va également produire, à une fréquence moindre, des transcrits

polycistroniques couvrant la totalité de l'ADNmt.

Une fois la transcription terminée, les ARNt qui flanquent pratiquement tous les autres gènes de l'ADNmt, vont être excisés en transcrits polycistroniques par des endonucléases. Les ARNt sont maturés par l'ajout de CCA en 3'<sup>44</sup>, alors que les ARNm et les ARNr sont eux maturés par une queue poly-A en 3'<sup>45,46,47</sup>.

### Figure 8 : La D-loop, site d'initiation de la transcription

Représentation de la région régulatrice de la D-Loop. Les séquences CSB I, CSB II et CSB III (*Conserved Sequence Blocks*) sont localisées en aval du promoteur du brin L (LSP). Les transitions entre l'amorce ARN vers l'ADN néo-synthétisé ont été mises en correspondance avec des séquences proches du CSB II. Les séquences de terminaison (TAS) sont situées à l'extrémité 3' des brins naissants de la D-Loop et sont un point de régulation majeur de la réplication de l'ADNmt.



D'après Falkenberg et al. 2007

## 2.4. Protéines mitochondriales

Seule une très faible proportion des protéines présentes dans la mitochondrie sont codées par l'ADNmt et fabriquées par les ribosomes mitochondriaux : les mitoribosomes. Ces mitoribosomes ont la particularité d'avoir une faible teneur en ARN et par conséquent un faible coefficient de sédimentation d'environ 55S. Les sous-unités ribosomales 39S et 28S, contiennent respectivement les ARNr 16S et 12S, codés par l'ADNmt. La faible teneur en ARN des mitoribosomes est compensée par une relativement grande teneur en protéines, ce qui a pour résultat de donner aux mitoribosomes une masse similaire aux ribosomes de bactéries.

La plupart des protéines mitochondriales sont donc codées par l'ADNn, traduites par les ribosomes cytoplasmiques et importées dans les mitochondries. La distribution de ces protéines dans les compartiments mitochondriaux appropriés est un processus complexe. Il existe différentes voies d'importation selon la destination des protéines, c'est-à-dire la matrice mitochondriale, la membrane interne, la membrane externe ou l'espace intermembranaire.

### 2.4.1. Production de protéines codées par l'ADNmt

Les ARNm mitochondriaux n'ont pas de séquence *leader* pour faciliter la fixation des ribosomes, comme c'est le cas pour les procaryotes et les messagers cytosoliques des

eucaryotes. De plus, ces messagers ne disposent pas non plus de coiffe en 5' qui leur permettrait de fixer des facteurs d'initiation<sup>48</sup>. Ainsi, le début de la traduction se fait au niveau ou très proche de l'extrémité 5' du codon initiateur N-formylméthionine. La petite sous-unité des mitoribosomes (28S) va se lier à l'ARNm. Cette interaction entre messenger et petite sous-unité ribosomique nécessite 30 à 80 nucléotides alors que 400 nucléotides, au minimum, sont nécessaires pour avoir une efficacité de liaison maximale. Ceci peut expliquer pourquoi les deux plus courts cadres ouverts de lecture de l'ADNmt (ATPase 8 et ND4L, tous les deux inférieurs à 300pb) sont des gènes chevauchants : ATPase 8/ATPase 6 et ND4L/ND4. Ces deux paires de gènes vont donner des messagers bicistroniques. En effet, des transcrits monocistroniques des gènes ATPase 8 et ND4L auraient été trop petits pour avoir une interaction efficace avec la petite sous-unité ribosomique. Une fois que la petite sous-unité des mitoribosomes est fixée sur le messenger, elle va se déplacer vers l'extrémité 5' de l'ARNm<sup>49</sup>.

#### 2.4.2. Importation des protéines codées par l'ADNn

Comme dit précédemment, la majorité des protéines mitochondriales est synthétisée dans le cytoplasme. Ces protéines doivent ensuite traverser la membrane externe et la membrane interne pour rejoindre la matrice mitochondriale, elles peuvent éventuellement s'intégrer aux membranes externes ou internes s'il s'agit de protéines transmembranaires.

Ces protéines sont adressées au compartiment mitochondrial via une séquence-cible d'une longueur de 10 à 80 acides aminés. Lorsque ces protéines atteignent leur destination finale, leur séquence-cible est clivée. Elles sont par la suite prises en charge par des protéines chaperonnes de type mtHSP (*mitochondrial Heat Shock Protein*), qui leur confèrent leur conformation tridimensionnelle finale. L'importation des protéines vers les différents compartiments mitochondriaux (membrane externe ou interne, espace intermembranaire, matrice) est médiée par deux translocases, TOM et TIM (**Figure 9**)<sup>50</sup> :

- Le complexe TOM (*Translocase Outer Membrane*) est situé dans la membrane externe mitochondriale. Il est composé de sept protéines dont une partie (TOM70, TOM22 et TOM20) est impliquée dans la reconnaissance des protéines destinées à l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. La seconde partie (TOM40, TOM7, TOM6 et TOM5) participe à la formation du pore transmembranaire au niveau de la membrane externe.
- Le complexe TIM (*Translocase Inner Membrane*) est localisé dans la membrane interne. Il est composé de sept protéines dont une partie (TIM50, TIM23, TIM21 et TIM17) est impliquée dans la reconnaissance des protéines destinées à la matrice mitochondriale. La seconde partie (TIM44, TIM6 et TIM4) participe à la formation du pore transmembranaire au niveau de la membrane interne permettant le transfert des protéines vers la matrice<sup>11,51</sup>.

Selon les caractéristiques des protéines (ex. taille, protéine transmembranaire, etc.) la

translocation par les complexes TOM et TIM est différente. Les protéines contenant plusieurs domaines transmembranaires sont transférées, via TOM et TIM23, qui gèrent l'insertion des protéines transmembranaires dans la membrane interne. La protéine est ensuite exportée dans la membrane interne par le complexe PAM (*Presequence translocase-Associated Motor*), partenaire de TIM23 pour l'insertion des protéines transmembranaires. Les protéines qui ne contiennent qu'un seul domaine transmembranaire sont importées via les TOM et le TIM23 uniquement.

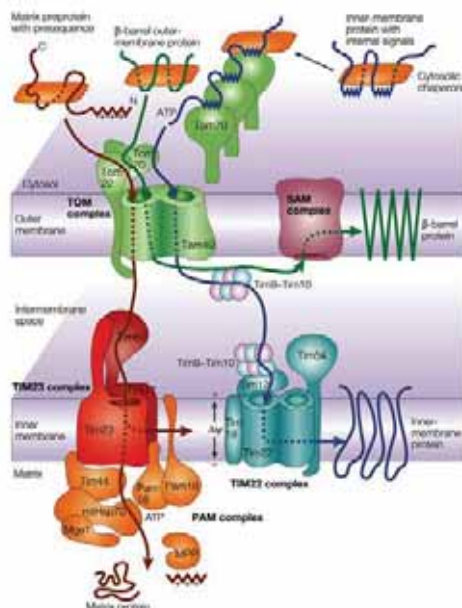
Les protéines contenant plusieurs résidus hydrophobes et plusieurs domaines transmembranaires sont d'abord transférées par le TOM. Elles sont ensuite interceptées par le TIM (TIM12, TIM10 et TIM9) présent dans l'espace intermembranaire, et transférées au complexe TIM22 (TIM54, TIM22 et TIM18) qui les insère dans la membrane interne.

Les protéines destinées à l'espace intermembranaire présentent deux séquences-cibles leurs permettant de voyager par les complexes TOM puis les TIM23. Une première protéolyse permet leur insertion dans la membrane interne tandis que la seconde permet leur insertion dans l'espace intermembranaire.

Les protéines de la membrane externe sont importées par le TOM dans la membrane externe, transférées vers les TIM (TIM10, TIM8, TIM13) afin d'être prises en charge par la protéine transmembranaire SAM (*Sorting and Assembly Machinery*) qui permet l'insertion de la protéine dans la membrane externe.

### Figure 9 : Mécanisme d'importation des protéines mitochondriales

Schématisation des différentes voies d'importation des protéines codées par l'ADNn. Ces protéines sont gérées dans le cytoplasme par des protéines chaperonnes qui les modifient et les aiguillent vers les différents pores (TOM/TIM) selon leur signal d'adressage (membrane externe ou interne, espace intermembranaire ou matrice mitochondriale).



D'après Rehling et al. 2004

## 2.5. Contrôle-Qualité mitochondrial

Les interactions entre les génomes nucléaire et mitochondrial ne se limitent pas uniquement à la traduction et l'import des protéines mitochondriales. En effet, il existe également une communication inter-génomes permettant un contrôle-qualité des fonctions mitochondriales. Le principe de cette communication repose sur un stimulus initial d'origine mitochondrial vers le génome nucléaire qui déclenche ou non, une réponse à ce stimulus.

De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence plusieurs de ces stimuli, couramment définis dans la littérature comme « signal rétrograde mitochondrial »<sup>52,53</sup>. Les principaux signaux, évidemment propres à la physiologie mitochondriale, peuvent être une variation du potentiel de membrane, un différentiel des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP/AMP, ROS ou  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Plusieurs catégories de réponses à ce signal rétrograde ont été démontrées comme pouvant réguler l'ensemble des fonctions mitochondriales par l'activation de facteurs ou de voies de signalisations particulières. Ces régulations peuvent impacter la capacité (ex. transcription, assemblage des complexes OXPHOS) et la dynamique mitochondriale (ex. fusion, fission) par l'activation de facteurs tels que TFAM, mTERF (*mitochondrial transcription TERmination Factor*), POLRmt, NRF1 (*Nuclear Respiratory Factor 1*), NFκB (*Nuclear Factor-kappa B*), ou bien la voie de signalisation mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*). Il est par ailleurs intéressant de noter que l'étude de cette voie de régulation mTOR semble indiquer que ce contrôle-qualité est très conservé au cours de l'évolution, et ce quelle que soit l'espèce étudiée. La régulation de la masse mitochondriale par l'activation de facteurs tels que PGC-1, le repliement des protéines CHOP (*CEBP Homologous Protein*) et JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) par mtUPR (*Unfolded Protein Response*), ainsi que le switch métabolique (ex. PI3K, gènes glycolytiques) semblent également être des voies de régulations efficaces pour le maintien de l'homéostasie mitochondriale et cellulaire. Bien que les réponses du génome nucléaire soient très spécifiques, elles ne semblent pourtant pas se limiter à l'activation d'un seul facteur (ou d'une seule voie de signalisation), mais plutôt d'une activation globale.

## 3. Phylogénie moléculaire et phylogéographie de l'ADNmt

Dans le domaine de la génétique des populations, il est possible de distinguer trois types d'évènements mutationnels en fonction de leur impact sur le phénotype : les mutations dites « positives » qui permettent d'augmenter le pouvoir reproducteur ; les mutations dites « pathogènes » qui diminuent le pouvoir reproducteur ; et les mutations dites « neutres » (polymorphisme) qui n'ont aucun impact. Par définition, les mutations positives se propagent alors que les mutations pathogènes tendent à disparaître.

### 3.1. Théorie de la coalescence

Les mutations « neutres » sont à la base de la théorie de la coalescence. En effet,

l'étude d'une même séquence d'ADN entre différents individus et espèces a permis de mettre en évidence l'existence d'une variabilité inter-séquences des polymorphismes de l'ADNmt. La théorie de la coalescence<sup>54</sup> stipule que les variations de polymorphismes sont liées à l'histoire évolutive de cet ADN. Cette théorie se base sur l'hypothèse que les séquences d'ADN de chaque individu peuvent être reliées entre elles par un arbre généalogique<sup>55,56</sup> (représentation graphique des liens de parenté et de filiation d'un groupe d'individus). Ainsi, il est possible de définir un ancêtre commun appelé MRCA (*Most Recent Common Ancestor*) à l'origine de cet arbre. Les polymorphismes observés sur ces séquences seraient alors issus d'événements mutationnels apparus régulièrement au cours de l'histoire évolutive de l'ADNmt étudié. Cette théorie permet également de reconstruire des arbres généalogiques à partir des études génétiques. Les arbres ainsi construits sont appelés arbres phylogénétiques. En effet, puisque les différences s'accumulent au fur et à mesure des ramifications de l'arbre phylogénétique, deux séquences très similaires seront donc très proches dans l'arbre.

Différentes méthodes sont utilisées afin de reconstruire des arbres phylogénétiques à partir des séquences génétiques mitochondriales<sup>57</sup>. Cependant, ces méthodes sont difficilement adaptables aux caractéristiques des études anthropologiques. En effet, les travaux portant sur la phylogénie mitochondriale humaine étudient de très nombreux échantillons (plusieurs centaines) génétiquement très proches. De plus, la phylogénie mitochondriale humaine laisse apparaître de nombreuses « multifurcations » (diverses branches) et des événements mutationnels identiques indépendants. Afin de s'adapter à ces caractéristiques, une nouvelle méthode basée sur les réseaux génétiques est apparue en 1995<sup>58</sup>. Cette méthode permet de construire un réseau phylogénétique laissant apparaître les différents liens possibles. Elle est essentiellement utilisée pour les données provenant des analyses par séquençage de la région D-loop et des études par enzymes de restriction des polymorphismes de l'ADNmt.

### 3.2. Hypothèse de l'horloge moléculaire

L'hypothèse de l'horloge moléculaire est une hypothèse selon laquelle la probabilité qu'une mutation apparaisse au cours du temps soit constante. Ainsi le nombre de mutations séparant deux individus d'un même ancêtre commun est corrélable au temps écoulé depuis cette divergence.

En comparant le nombre de mutations survenues entre deux individus ou deux espèces, dont la date de divergence est connue, il est possible de calibrer la datation. Ainsi, le taux de mutation de l'ADN mitochondrial des hominidés, calibré à partir d'une date estimée de divergence entre l'Homme et le chimpanzé à 6,5 millions d'années, est estimé pour la séquence codante à  $1,26 \cdot 10^{-8}$  substitutions par nucléotide et par an<sup>59</sup>. Cependant, ce taux moyen reste très controversé et peut varier en fonction du type de polymorphisme étudié (polymorphisme synonyme, non-synonyme, transition, ou transversion), ou du locus étudié

(D-Loop ou zone codante) ou bien même de la lignée étudiée. Grâce à cette hypothèse, il a été possible de proposer des datations concernant les événements phylogéniques obtenus par l'hypothèse de la coalescence.

Cette hypothèse est régulièrement remise en question. En effet, des études ont montré que des mutations avantageuses se fixent plus rapidement lors de la formation de nouvelles espèces, rendant ainsi cette théorie finalement inconstante<sup>60</sup>. De plus, les événements mutationnels seraient épisodiques<sup>61,62</sup>, c'est-à-dire que les mutations ne se produiraient pas de façon indépendante au cours de l'évolution mais apparaîtraient par épisodes d'accumulation suivis d'un arrêt évolutif. Bien qu'elle soit critiquable, l'utilisation de l'horloge moléculaire est aujourd'hui limitée à l'étude de locus particuliers associés à une période temporelle délimitée.

### 3.3. Haplotype, haplogroupe et nomenclature de l'ADNmt

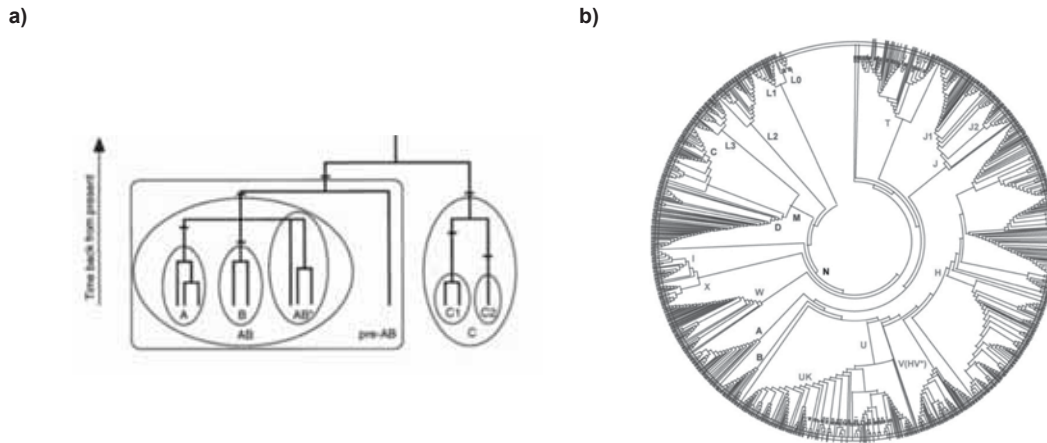
Afin de faciliter l'étude des ADNmt, il a été proposé de caractériser ces ADN en mettant en évidence les variations de composition par rapport à la séquence de référence (CRS). Chaque combinaison de polymorphismes présente sur un ADNmt est appelée haplotype (séquence d'ADNmt d'un individu), et lorsque plusieurs haplotypes se partagent plusieurs polymorphismes, cohérents en terme d'événements mutationnels, il est possible de créer un groupe d'haplotypes, nommé haplogroupe.

La première classification des haplogroupes a été proposée par A. Torroni en 1993. Cette classification permet de regrouper les différents haplotypes dont les polymorphismes les définissant ont été obtenus par RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) dans des haplogroupes, et à partir d'un nombre limité de polymorphismes. Cette classification a été ultérieurement implémentée par les différents travaux sur l'étude du peuplement du même auteur<sup>63,64</sup>.

Par la suite, Richards et Macaulay, proposent en 1998 une autre nomenclature des ADNmt basée cette fois-ci sur la distinction de lignées mitochondriales monophylétiques qu'ils nomment « clusters »<sup>65,66</sup>. Cette nouvelle nomenclature est une version plus affinée que celle proposée en 1993. Les principaux clusters sont désignés par une lettre majuscule (ex. haplogroupe J) et pour la plupart reprennent les lettres déjà proposées initialement (**Figure 10**). Les branches secondaires sont définies par une alternance de chiffres et de lettres minuscules (ex. haplogroupe J1c). Les regroupements de clusters sont désignés par le regroupement de leurs noms, ainsi on nomme AB le plus petit cluster regroupant les clusters A et B. Lorsque l'origine monophylétique d'un cluster n'est pas certaine, on appose un astérisque (\*). Si des clusters définis et des lignées isolées ont un même ancêtre commun, ils sont regroupés dans un cluster désigné par le préfix "pre-" suivi du nom des clusters déjà définis.

**Figure 10 : Principe de classification des haplogroupes**

a) Chaque cluster est défini par une lettre. Les clusters dont l'origine monophylétique est incertaine sont identifiés par un \*. Les clusters définis et isolés dont l'origine monophylétique est commune, sont regroupés dans un cluster désigné par le préfixe « pre- »<sup>66</sup>. b) Arbre phylogénétique des séquences codantes de l'ADNmt obtenu par la méthode du « neighbor joining »<sup>67</sup>. Chaque cluster est désigné par une lettre, toutes les ramifications situées en bas de branche sont une sous-catégorie du cluster.



D'après (a) Wallace 2007 et (b) Macaulay et al. 1999

### 3.4. Phylogéographie

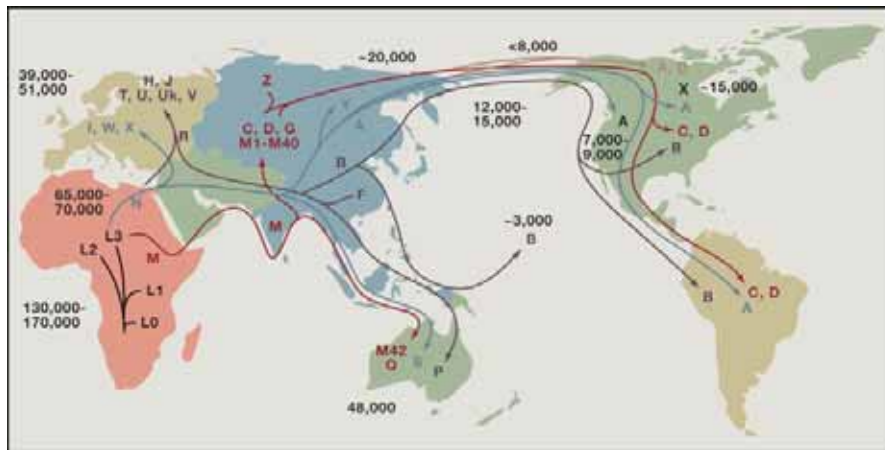
L'hypothèse de neutralité est à la base des études de phylogéographie. En effet, l'absence de différence phénotypique des polymorphismes mitochondriaux implique qu'il ne peut pas exister de sélection entre les différents haplotypes et haplogroupes. Ainsi, la présence ou l'absence de certains haplogroupes dans un espace géographique serait due à des phénomènes de migration ou des phénomènes démographiques (**Figure 11**)<sup>68</sup>. En effet, le fait que la population européenne soit uniquement constituée d'individus appartenant au super-haplogroupe N s'explique en phylogéographie par une diffusion exclusive de cet haplogroupe africain en Europe. La faible diversité d'haplogroupes et d'haplotypes dans une population peut être expliquée par deux phénomènes, souvent associés : l'effet fondateur et la dérive génétique.

L'effet fondateur désigne le peuplement d'une aire géographique par un nombre limité d'individus provenant d'une population source. D'un point de vue probabiliste, le tirage aléatoire d'un faible échantillon au sein d'une population source aboutit majoritairement à l'absence de certains haplogroupes dans la population migrante. Ainsi, la diversité de population migrante est toujours égale ou inférieure à la population source. Il est à noter que cette caractéristique explique non seulement la faible diversité génétique de certaines zones géographique, mais permet aussi de différencier les populations sources et migrantes. Ce phénomène est particulièrement adapté au peuplement insulaire où la nouvelle population migrante est « coupée » de la population source.

La dérive génétique désigne la perte de diversité génétique d'une population au cours du temps. Cette dérive génétique est due à la variation aléatoire des fréquences de chaque haplotype à chaque nouvelle génération. Ce phénomène est très rapide au sein des petites populations et peut être accentué par des événements démographiques comme la réduction drastique de population appelés goulots d'étranglements ou « bottleneck ». Cette réduction aléatoire de la taille d'une population va diminuer la diversité génétique. Ainsi, lorsque la population va retrouver sa taille initiale, elle aura perdu de la diversité. Ce scénario s'applique là encore très bien dans le cas insulaire d'une population isolée des autres populations.

**Figure 11 : Migrations des populations humaines**

Carte représentant les migrations des populations humaines depuis leur origine africaine. Les lignées africaines sont regroupées dans le super-haplogroupe L. Des haplogroupes issus de L, M et N, représentent les populations sorties d'Afrique pour la colonisation de l'Eurasie (N) et de l'Amérique (M).



D'après Wallace 2015

### III. Phosphorylations oxydatives

Comme vu précédemment, la mitochondrie participe à une partie de l'oxydation des glucides, des acides aminés, et la totalité de celle des acides gras. Au cours de ces réactions cataboliques, l'énergie contenue dans les glucides, les lipides et les protides permet la réduction de coenzymes tels que le  $\text{NAD}^+$  (*Nicotinamide Adénine Ddinucléotide*) et le FAD (*Flavine Aadénine Dinucléotide*). L'énergie potentiellement contenue dans ces équivalents réducteurs, essentiellement  $\text{NADH}$  et  $\text{FADH}_2$ , est transformée en une forme d'énergie directement utilisable pour le travail cellulaire, l'ATP. Cette transformation porte le nom de phosphorylation oxydative et elle repose sur une série de réactions d'oxydoréduction au niveau de la chaîne respiratoire couplée à l'ATP synthase.

## 1. Chaîne respiratoire mitochondriale

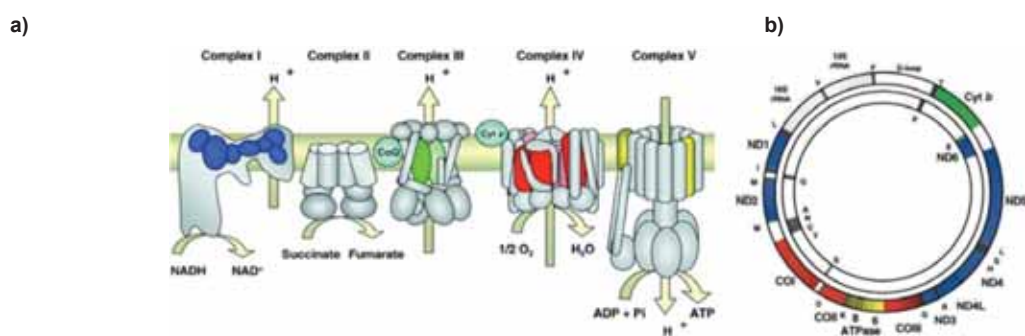
La chaîne respiratoire est constituée d'une suite de réactions d'oxydo-réduction reliant l'oxydation du NADH et du  $\text{FADH}_2$  à la réduction de l'oxygène (**Figure 12**)<sup>69</sup>. La chaîne principale de transfert d'électrons comporte 3 complexes multi-enzymatiques (I, III et IV) et deux transporteurs mobiles (coenzyme Q et cytochrome  $c$ ).

Le complexe II fournit des électrons provenant du succinate qui rejoint cette chaîne principale au niveau du coenzyme Q (Co-Q). A l'intérieur des complexes I, III et IV, les électrons transférés du NADH vers l'oxygène sont relayés par des transporteurs spécifiques (flavine mononucléotide, centres fer-soufre, et hèmes présents dans les cytochromes) dont les potentiels rédox vont croissants, les potentiels standards extrêmes étant ceux des couples  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ( $E'^0 = -0,3\text{V}$ ) et  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  ( $E'^0 = +0,8\text{V}$ ).

Parallèlement à ces réactions d'oxydo-réduction, des protons  $\text{H}^+$  sont expulsés de la matrice vers l'espace intermembranaire (au niveau des complexes I, III et IV) ce qui crée, de part et d'autre de la membrane interne, un gradient électrochimique d'ions  $\text{H}^+$  qui contient l'énergie d'oxydation. Il est constitué d'un gradient de pH (la matrice devient plus basique) et d'un gradient de charges (la face matricielle de la membrane interne est chargée négativement).

**Figure 12 : Phosphorylations Oxydatives (OXPHOS)**

**a)** Schématisation partielle des mécanismes des complexes I à V des OXPHOS. Chacun des complexes est activé par son substrat, permettant ainsi le transfert d'électrons du complexe I jusqu'au complexe IV pour la réduction de l' $\text{O}_2$  moléculaire et la translocation de protons  $\text{H}^+$  de manière concomitante au travers la membrane interne mitochondriale permettant la phosphorylation de l'ADP en ATP. **b)** Représentation de la molécule d'ADNmt mettant en correspondance les régions codantes de l'ADNmt et les sous-unités de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase codées par le génome mitochondrial<sup>69</sup>.



D'après Zeviani et al. 2004

### 1.1. Complexe I : NADH-Ubiquinone oxydoréductase

Le complexe I (EC 1.6.6.3) est composé de quarante-trois sous-unités dont six sont codées par l'ADNmt (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L et ND5) et possède une masse de 900kDa, faisant de lui le plus gros des complexes de la chaîne respiratoire. Le complexe se présente en forme de « L » dont la base est ancrée dans la membrane interne mitochondriale tandis que le bras porteur du site de fixation du NADH est orienté dans la

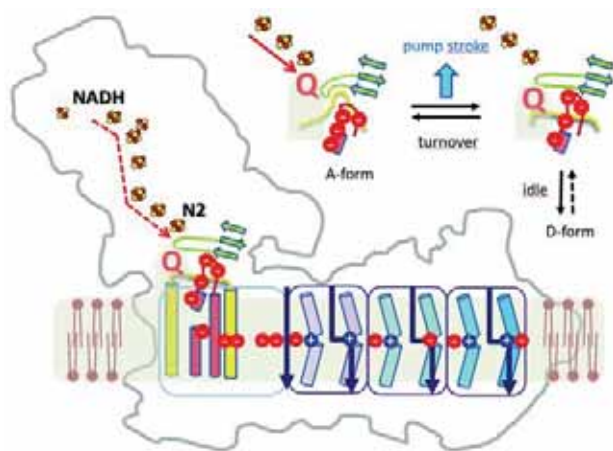
matrice<sup>70</sup>.

Le complexe I est un point d'entrée dans la chaîne respiratoire pour les électrons. Ceux-ci, provenant du cycle de Krebs et de la  $\beta$ -oxydation, permettent l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  via des groupes rédox comprenant une flavine mononucléotide (FMN) et plusieurs centres fer-soufre au sein du complexe. L'énergie libre dégagée par cette réaction permet la translocation de protons  $\text{H}^+$  de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial. Parallèlement, le complexe I réalise la réduction du coenzyme Q (Co-Q). Cette réaction de réduction nécessite l'apport de 2 protons  $\text{H}^+$ , impliquant donc deux réactions de pompage de protons. Il a récemment été montré que la première translocation de protons  $\text{H}^+$  permet la formation d'une semi-quinone et modifie la conformation du complexe, rendant celui-ci temporairement inactif (**Figure 13**)<sup>71</sup>. La seconde translocation permet la réduction totale de la semi-quinone en  $\text{Co-QH}_2$  et la réactivation du complexe I. La réaction globale du complexe I est la suivante :



### Figure 13 : Mécanisme réactionnel du complexe I

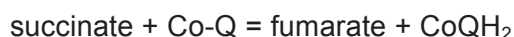
Les électrons sont transférés (flèche rouge) via les centres fer-soufre du NADH vers l'ubiquinone (Q). Dans trois sous-unités de type antiport (cadre violet) et les autres sous-unités ND du complexe, un modèle de résidus titrables définit un axe central dans la membrane reliant l'espace intermembranaire à la matrice par la translocation de protons (bleu foncé). La boucle TMH5-6ND1 (rouge), la boucle  $\beta 1$ - $\beta 249$ -kDa (vert) et l'extrémité de la boucle TMH1-2ND3 (jaune) composent les sites d'échange du Q. Lors du renouvellement, ces boucles effectuent un réarrangement coordonné qui entraîne un déplacement du site de liaison et un mouvement du faisceau de charges négatives dans la boucle TMH5-6ND1, ce qui peut déclencher une impulsion électrostatique vers le bras de la membrane. La stabilisation des espèces anioniques sur le site conduit à une transition de l'état E (gauche) à l'état P (droite), entraînant le pompage de protons. En cas de ralentissement de l'enzyme, elle peut se transformer de façon réversible de la forme active A en une forme D désactivée via une structure similaire à l'état P.



D'après Zickermann et al. 2015

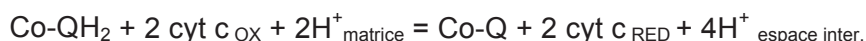
### 1.2. Complexe II : Succinyl-CoQ oxydoréductase

Le complexe II (EC 1.3.5.1) est composé de quatre sous-unités codées par l'ADNn uniquement et possède une masse de 124kDa. Deux d'entre-elles forment un complexe soluble dans l'eau (sous-unités 27 et 70 kD) et correspond à la succinate deshydrogénase (SDH) tandis que les deux autres sous-unités sont associées à la membrane interne<sup>72</sup>. Le complexe II se situe à l'interface du cycle de Krebs et de la chaîne respiratoire. Il réalise l'oxydation du succinate en fumarate pour réduire le FAD en FADH<sub>2</sub> puis il prend en charge les électrons du FADH<sub>2</sub> et les transmet au pool quinonique situé dans la membrane interne mitochondriale :



### 1.3. Complexe III : CoQH<sub>2</sub>-Cytochrome c oxydoréductase

Le complexe III (EC 1.10.2.2) est un dimère composé chacun de onze chaînes polypeptidiques de 240kDa dont une sous-unité est codée par l'ADNmt (Cytochrome b)<sup>73</sup>. Le complexe III récupère les électrons transmis par le complexe I et II via le Co-Q. Ces électrons permettent la réduction du cytochrome c via un centre fer-soufre et dans un second temps, la réoxydation du Co-QH<sub>2</sub> via des groupements d'hèmes. L'énergie libre de cette réaction permet, comme pour le complexe I, la translocation de protons H<sup>+</sup> de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial. La réaction globale du complexe III est la suivante :



### 1.4. Complexe IV : Cytochrome c oxydase

Le complexe IV (EC 1.9.3.1) est composé de treize sous-unités dont trois sont codées par l'ADNmt (COI, COII, COIII) d'une masse de 130kDa<sup>74</sup>. Il assure l'oxydation du cytochrome c réduit, couplé à la réduction de l'oxygène moléculaire dans la matrice mitochondriale. Les trois sous-unités codées par l'ADNmt constituent le noyau catalytique de l'enzyme qui contient les sites de fixation de l'oxygène et du cytochrome c. Les dix sous-unités codées par l'ADNn interviendraient dans la régulation de l'activité enzymatique ainsi que dans la formation du complexe. La cytochrome c oxydase contient trois centres redox qui sont le centre cuivre a (Cu<sub>A</sub>), l'hème a et le centre cuivre B-hème a<sub>3</sub> (Cu<sub>B</sub>-hème a<sub>3</sub>). L'énergie libre de cette réaction permet également la translocation de protons H<sup>+</sup> de la matrice vers l'espace intermembranaire mitochondrial. La réaction globale du complexe IV est la suivante :

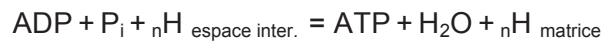


## 2. ATP synthase

L'ATP synthase ou complexe V ou complexe  $F_1-F_0$  (EC 3.6.1.34) est, comme les complexes de la chaîne respiratoire, localisée dans la membrane interne mitochondriale<sup>75</sup>. Elle possède une masse proche de 450kD et est constituée de seize sous-unités, dont deux sont codées par l'ADNmt (ATPase 6 et ATPase 8), et dont certaines sont présentes en plusieurs exemplaires. L'ATP synthase comporte 2 sous-complexes :

- Le sous-complexe  $F_1$  contient le site catalytique (exposé du côté de la matrice mitochondriale)
- Le sous-complexe  $F_0$  sert au transfert vectoriel des protons (intramembranaire)

La réaction globale de l'ATP synthase est la suivante :



## 3. Théorie chimio-osmotique

L'oxydation des substrats réduits ( $\text{NADH}$  et  $\text{FADH}_2$ ) provenant du cycle de Krebs ou de la  $\beta$ -oxydation des acides gras par les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, génère une cascade d'électrons qui s'achève par la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Ce transfert d'électrons au travers les différents complexes est couplé à l'excrétion de protons  $\text{H}^+$  par les complexes I, III et IV de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, conduisant ainsi à la création d'un gradient électrochimique de protons ( $\Delta\mu\text{H}^+$ ). Etant donné l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale, le transfert est rendu possible par l'ATP synthase. Cette force protomotrice représente l'intermédiaire énergétique qui est finalement utilisé par l'ATP synthase pour phosphoryler l'ADP en ATP. Ainsi, selon les principes de la théorie chimio-osmotique énoncée en 1961 par P. Mitchell<sup>31</sup>, la production d'énergie au niveau de la mitochondrie s'effectue grâce à un couplage entre la respiration et la synthèse d'ATP par l'intermédiaire du gradient électrochimique de protons.

## IV. Les cytopathies mitochondriales

Les cytopathies mitochondriales ont longtemps été appelées myopathies mitochondriales. Ce terme décrit un groupe hétérogène de désordres métaboliques qui sont caractérisés par des anomalies aussi bien de l'ultra-structure mitochondriale que du fonctionnement des OXPHOS (**Figure 14**)<sup>76</sup>.

Le terme de myopathie mitochondriale a été utilisé pour la première fois par R. Luft en 1962, chez un adulte qui présentait un hypermétabolisme non thyroïdien avec découplage permanent des OXPHOS et existence de mitochondries d'aspect anormal dans le muscle<sup>77,78</sup>.

Le terme a ensuite été employé de façon très large pour toutes sortes de tableaux cliniques ayant en commun l'existence d'altérations du nombre ou de l'aspect des mitochondries du muscle strié squelettique. Il a rapidement été étendu à des syndromes variés comportant des myopathies associées à d'autres signes neurologiques : syndrome de Leigh, maladie d'Alpers, MERRF (*Myoclonus-Epilepsy-Ragged Red Fibers*), MELAS (*Mitochondrial-Encephalopathy-Lactic Acidosis-Stroke like episodes*), syndrome de Kearns-Sayre, CPEO (*Chronic-Progressive-External-Ophthalmoplegia*), maladie de Leber (LHON).

Afin de distinguer les différents désordres du métabolisme oxydatif en fonction de leur étiologie, certains auteurs ont établi une classification biochimique des défauts conduisant à des cytopathies d'origine mitochondriale. Ainsi, il est possible de distinguer les atteintes au niveau du transport des substrats énergétiques, de leur transformation, de leur catabolisme dans le cycle de Krebs et de la production d'ATP par les OXPHOS. Ces atteintes fonctionnelles correspondent en fait à des défauts dans l'activité de certaines enzymes impliquées dans les voies métaboliques précitées. Par exemple, les atteintes au niveau du transport des substrats peuvent être dues à un défaut d'activité des carnitine-palmitoyl-transférases (CPT1 et CPT2) et celles au niveau de la transformation des substrats à un défaut de la pyruvate déshydrogénase. Des défauts d'activité de la fumarase ou de l'alpha-cétoglutarate déshydrogénase conduisent à une altération du catabolisme au niveau du cycle de Krebs et un défaut d'activité de la cytochrome c oxydase est généralement responsable d'une déficience de la production énergétique par les OXPHOS.

La deuxième façon de classer les cytopathies d'origine mitochondriale est de les regrouper en fonction de l'origine génétique du défaut qui les caractérise. En effet, plus de 200 mutations ponctuelles dans des ARNt ou des ARNr ainsi que sur des gènes codant des protéines, et des réarrangements comprenant des délétions, des insertions, des duplications, des triplications, des inversions et des déplétions de l'ADNmt sont aujourd'hui reconnus comme étant la cause de pathologies d'origine mitochondriale<sup>79</sup>. De plus, l'absence de mutation dans l'ADNmt chez des patients présentant un déficit au niveau de la cytochrome c oxydase<sup>80</sup> ainsi que les mutations dans des gènes nucléaires impliqués dans l'import des peptides à l'intérieur de la mitochondrie, ou dans l'assemblage de certains complexes enzymatique ont permis de mettre l'accent sur de nouveaux mécanismes conduisant à des pathologies mitochondriales.

L'ensemble de ces données a été compilé par l'équipe de D. Wallace sur le site MITOMAP (<http://www.mitomap.org>), et a organisée la classification des mutations mitochondriales suivant deux entrées : le phénotype et le type de mutation.

Schématisation de la coopération en l'ADNmt et l'ADNn dans la biogénèse mitochondriale. Correspondances entre les mutations de l'ADNmt et l'ADNn (code couleur) menant à un défaut des OXPHOS et au développement de pathologies mitochondriales<sup>81</sup>.









## **Problématique et objectifs du projet de thèse**



## I. Modèles pour les pathologies mitochondriales

A cause de leur tableau clinique hétérogène, la mise au point d'un traitement pour les pathologies mitochondriales est difficile. Les traitements prescrits sont essentiellement des traitements symptomatiques permettant d'améliorer la qualité de vie des patients. Du fait de l'atteinte progressive des organes, la greffe est très rarement évoquée. Il est donc primordial de comprendre les mécanismes moléculaires et biochimiques (origine et évolution) afin de pouvoir proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. L'acquisition de ces connaissances implique forcément l'utilisation de modèles stables, ciblés sur une pathologie. Actuellement, il existe des modèles dédiés aux pathologies mitochondriales. Mais cela n'est malheureusement pas suffisant pour caractériser l'ensemble des symptômes et mécanismes impliqués dans toutes les pathologies mitochondriales.

La souris est le modèle classiquement utilisé pour étudier les fonctions physiopathologiques de l'humain<sup>82,83,84</sup>. Ils permettent d'avoir une vision intégrée des mécanismes impliqués dans l'apparition de pathologies et de tester de nouvelles thérapies. Cependant, la construction d'un modèle murin par mutagenèse dirigée est difficile à concevoir. Afin de retrouver les caractéristiques d'une pathologie sans pour autant devoir modifier l'ADNmt, les modèles murins par intoxication chimique semblent être de bons modèles alternatifs.

Généralement utilisé avant le modèle murin, il existe les modèles cellulaires. Ces modèles permettent l'utilisation de cellules humaines. Comme pour le modèle murin, la modification de l'ADNmt est compliquée. Pour pallier cela, la technique la plus couramment utilisée pour étudier les pathologies mitochondriales est la technique des cybrides (*CYtoplasmic HYBRID*)<sup>85</sup>. Cette technique consiste à fusionner une cellule dépourvue d'ADNmt (cellule immortalisée, tumorale) avec le contenu cytoplasmique (dont l'ADNmt) de cellules de patients. Cette méthode permet d'obtenir rapidement des lignées cellulaires stables et immortelles spécifiquement dédiée à l'ADNmt du patient avec la mutation souhaitée.

Récemment, ce sont les modèles mathématiques et informatiques qu'il est possible de voir émerger. Le principe repose sur le paramétrage mathématique de fonctions mitochondriales précises (ex. équation de Mickaelis-Menten pour les enzymes de la chaîne respiratoire) sur lesquelles sera appliquée une condition particulière (ex. pénurie ou saturation de substrat)<sup>86</sup>. L'objectif de ces modèles est de pouvoir simuler et prévoir le comportement d'une molécule ou l'impact d'une mutation sur les fonctions mitochondriales. Cependant, la confirmation par un modèle cellulaire puis animal reste la norme.

## **II. Travaux de recherche : développement de nouveaux modèles ciblés sur le métabolisme énergétique mitochondrial**

### **1. Caractérisation d'un modèle pour le syndrome de Leigh**

Parmi la grande diversité de syndromes mitochondriaux, nous avons choisi de nous focaliser sur le syndrome de Leigh, une maladie neurologique progressive. Il existe déjà quelques modèles murins et cellulaires de ce syndrome, permettant d'étudier certains mécanismes de neuropathogénèse<sup>87,88</sup>. Comme dit précédemment, la mise au point de modèle murin par modification ciblée de l'ADNmt est difficile. Pour cela, nous avons étudié un modèle murin par intoxication chimique au MPTP (neurotoxine) qui permet d'observer une dégénérescence neurologique caractéristique de ce syndrome. Dans le cadre de ce projet, nous avons caractérisé biochimiquement les causes de cette neuro-dégénérescence.

Ce modèle murin a deux objectifs. Il permet d'une part, de provoquer et mimer les mêmes symptômes que ceux observés chez les patients sans remaniement de l'ADNmt et ce, en quelques heures de traitement. D'autre part, il permet d'étoffer nos connaissances sur les mécanismes d'inhibition des complexes OXPHOS menant à la dégénérescence neurologique et musculaire comme observée chez les patients.

### **2. Caractérisation d'un modèle d'haplogroupe de l'ADNmt**

Le second projet de cette thèse est la mise au point d'un modèle cellulaire permettant l'étude des haplogroupes de l'ADNmt. Ce modèle fait appel à la technique des cybrides qui permet de placer un ADNmt d'intérêt dans une cellule dépourvue de cet ADN. Comme vu précédemment, il existe déjà des modèles cellulaires similaires cependant, ceux-ci ont été construits pour étudier des pathologies mitochondriales précises.

Pour construire notre modèle, nous sommes partis du postulat que les haplogroupes de l'ADNmt sont capables soit d'avoir un effet protecteur soit être un facteur de risque pour l'apparition de pathologie. Nous avons donc construit une collection de cybrides constituée des principaux haplogroupes européens (H, J, K, T) sur lesquels nous avons réalisé une caractérisation biochimique et phénotypique.

L'objectif de notre modèle est de rechercher si les haplogroupes de l'ADNmt sont neutres et peuvent influencer le métabolisme énergétique mitochondrial. Il permettra également de proposer une vision modulée des pathologies mitochondriales tant pour leur étude que pour leur diagnostic, en faisant ressortir la notion de médecine personnalisée.







# **Caractérisation de l'effet du MPTP sur la chaîne respiratoire**

Travaux de recherche, partie 1



## I. Introduction

### 1. Le syndrome de Leigh

#### 1.1. Définition du syndrome de Leigh

Décrit pour la 1<sup>ère</sup> fois par D. Leigh chez un nourrisson atteint d'une neuropathie<sup>89</sup>, le syndrome de Leigh (OMIM : 256000), ou encéphalomyopathie nécrosante subaigüe, est une maladie neurologique progressive caractérisée par des lésions neuropathologiques impliquant une atteinte du tronc cérébral et des ganglions de la base<sup>90</sup>. Les critères diagnostiques de ce syndrome comprennent un ensemble de symptômes tels que des retards psychomoteurs, hypotonie (baisse du tonus musculaire), ataxie (trouble de la coordination), faiblesse, perte visuelle, anomalies des mouvements oculaires, convulsions, dysphagie (difficulté à avaler) et acidose lactique (augmentation du taux de lactate sanguin)<sup>87</sup>. La maladie débute typiquement chez le nourrisson de moins d'un an ; l'apparition précoce des symptômes étant généralement associée à un critère pronostique défavorable<sup>91</sup>.

#### 1.2. Atteintes neurologiques

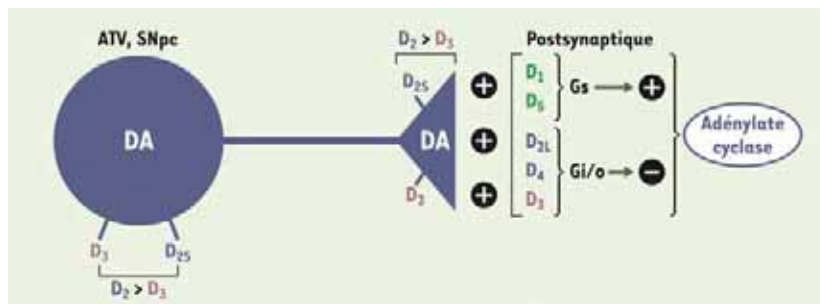
Le syndrome de Leigh est défini par des lésions (tissus nécrotiques) du système nerveux central (SNC)<sup>87</sup>. Ces lésions peuvent être observées par IRM où l'on détecte fréquemment des taux élevés de lactate. Ce syndrome se caractérise essentiellement par l'implication du tronc cérébral et/ou des ganglions de la base. Dans quelques cas, le thalamus, le cervelet et la moelle épinière peuvent également être touchés. Les ganglions de la base du striatum et de la substance noire jouent un rôle clé dans la régulation des mouvements volontaires ainsi que dans le contrôle comportemental et les fonctions cognitives<sup>92</sup>. Lors du développement pré- et post-natal du cerveau, il a été montré que ces ganglions de la base représentent des structures vulnérables, impliquant une destruction partielle ou totale du réseau dopaminergique dans diverses affections infantiles comme certaines formes de maladies mitochondriales<sup>93</sup>. Cette vulnérabilité serait liée à un stress énergétique, montrant ici que l'altération de l'activité mitochondriale est une voie pathogène commune dans plusieurs maladies liées aux ganglions de la base (ex. syndrome de Leigh)<sup>94</sup>.

L'ensemble des neurones dopaminergiques (qui utilisent la dopamine comme neurotransmetteur) compose le réseau dopaminergique impliqué dans la libération de dopamine dans les systèmes nerveux centraux (dont la substance noire) et périphériques<sup>95</sup> (**Figure 14**). La dopamine ( $C_8H_{11}NO_2$ ) est une monoamine issue de la tyrosine et est le neurotransmetteur majeur, de type catécholamine (i.e. substance sympathomimétique), du système nerveux central<sup>96,97</sup>. Les neurones dopaminergiques sont associés aux mouvements musculaires, la croissance des tissus, le fonctionnement du système immunitaire et interviennent dans la sécrétion de l'hormone de croissance. Il a été montré qu'une insuffisance de dopamine dans cette voie dopaminergique, comme retrouvé chez les patients atteints par la maladie de Parkinson, entraîne des symptômes extrapyramidaux

(akinésie, hypertonie, tremblement au repos)<sup>98,99</sup>. A l'inverse, une forte activité favorise l'apparition de dyskinésies (mouvements involontaires non contrôlés et troubles comportementaux). La perte du réseau dopaminergique au niveau des ganglions de la base entraîne une dégénérescence du tissu cérébral qui est la caractéristique pathologique du syndrome de Leigh.

### Figure 15 : Mécanisme d'action de la dopamine

Les voies mésolimbiques issues de l'aire tegmentale ventrale (ATV) et de la substance noire (SNpc) projettent vers le noyau accumbens et d'autres structures limbiques. Sur le plan neuronal, les récepteurs D<sub>1</sub>, D<sub>4</sub> et D<sub>5</sub> sont concentrés uniquement au niveau post-synaptique. Le récepteur D<sub>2</sub> existe sous 2 isoformes : l'isoforme « short » (S) qui est concentrée au niveau pré-synaptique et l'isoforme « long » (L) qui est concentrée au niveau post-synaptique. Le récepteur D<sub>3</sub> se trouve à la fois au niveau pré- et post-synaptique. Par l'intermédiaire de différentes protéines G (Gs, Gi, Go), les récepteurs dopaminergiques modulent l'activité du messager secondaire, l'adénylate cyclase.



D'après Millan. 2005

### 1.3. Origine génétique du syndrome de Leigh

Le syndrome de Leigh est le plus souvent transmis selon un mode récessif autosomique. Dans certains cas, la transmission peut être liée au chromosomes X (ex. déficits en sous-unité E1 $\alpha$  de la pyruvate déshydrogénase) ou à l'ADNmt (ex. mutation).

Les causes du syndrome de Leigh sont multiples mais impactent toujours la production d'énergie, secondaire à une altération de la pyruvate déshydrogénase, de la pyruvate carboxylase ou d'un des complexes de la chaîne respiratoire (déficit d'activité du complexe I et/ou IV et/ou protéine impliquée dans l'assemblage)<sup>90,100</sup>. Les mutations les plus fréquentes sont les mutations m.T8993G ou m.T8993C du gène mtATP6, codant pour l'une des sous-unités de l'ATP synthase. La maladie provoquée est souvent appelée MILS (*Maternally Inherited Leigh Syndrome*). Lorsque ces mutations sont présentes en moindre proportion, elles donnent des maladies moins sévères dont le syndrome NARP (*Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa*). Actuellement, il n'existe pas de modèle animal qui pourrait permettre de mieux comprendre les mécanismes génétiques et biochimiques de l'apparition du syndrome de Leigh. Cela est dû à la difficulté de transformer, par mutation ou par remaniement, l'ADNmt de façon ciblée afin de déclencher les processus neuropathogènes.

## 2. Développement d'un modèle animal applicable au syndrome de Leigh

### 2.1. Mutants et inhibiteurs mitochondriaux

Afin d'étudier les mécanismes d'apparition et de développement d'une maladie mitochondriale, un modèle murin est indispensable. Ce modèle peut être obtenu de deux manières différentes : soit une mutation est introduite dans son ADNmt, soit l'animal est traité par un inhibiteur des OXPHOS. A ce jour, il est encore difficile de modifier une position précise de l'ADNmt. L'alternative est donc d'utiliser des inhibiteurs spécifiques des OXPHOS permettant, le temps du traitement, de mimer les effets d'une mutation de l'ADNmt. Cela provoquera un déficit d'activité d'un ou plusieurs complexes des OXPHOS afin d'obtenir un modèle murin présentant un phénotype spécifique.

Le modèle murin que nous avons utilisé dans l'étude présentée ci-après, a été construit en utilisant un inhibiteur mitochondrial, et plus précisément la neurotoxine 1-méthyle-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine (MPTP).

### 2.2. La neurotoxine MPTP

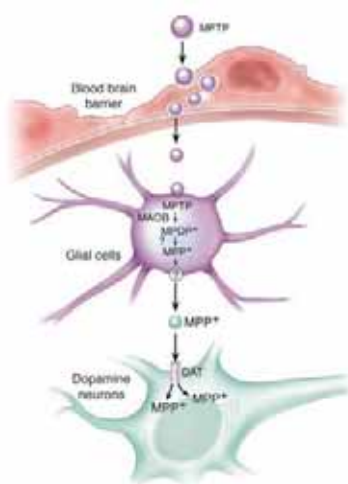
Le 1-méthyle-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine (MPTP) est une neurotoxine liposoluble, capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (**Figure 16**). Une fois à l'intérieur du cerveau, le MPTP est métabolisé en une substance toxique, le 1-méthyl-4-phenylpyridinium ( $MPP^+$ ) par des monoamines oxydase (MAO) dans les cellules gliales<sup>101</sup>. Le  $MPP^+$  détruit principalement les neurones dopaminergiques dans une partie du cerveau nommée la substance noire. Le  $MPP^+$  est transféré dans les cellules dopaminergiques par des transporteurs spécifiques de la dopamine pour lesquels il a une forte affinité<sup>102,103</sup>. Dans la cellule, une partie du  $MPP^+$  est séquestré dans des vésicules par l'action de transporteurs vésiculaires monoaminés et une autre partie se diffuse dans la matrice mitochondriale. Le mode d'action du MPTP est assez complexe et est mal connu, mais son implication dans l'inhibition de la chaîne respiratoire à être démontrée<sup>104</sup>. En effet, les 3 principaux complexes de la chaîne respiratoire, les complexes I, III et IV, ont été reportés comme pouvant être inhibés soit par le MPTP soit par le  $MPP^+$ , par effet direct sur les mitochondries ou les cellules isolées<sup>105,106</sup>, ou par traitement sur les cellules ou injection dans des primates<sup>105,68,107</sup>.

Bien qu'associé à la maladie de Parkinson<sup>108</sup>, le MPTP a récemment été utilisé dans un contexte de maladie mitochondriale. En effet, une étude a mis en évidence une dégénérescence des ganglions de la base associée à une diminution de densité des tyrosines hydroxylases et des transporteurs de dopamine dans le striatum de souris intoxiquées par le MPTP<sup>109</sup>. Dans cette même étude, il a été proposé que ces souris intoxiquées pourraient être un modèle potentiel pour le syndrome de Leigh, la dégénérescence des ganglions de la base étant une des caractéristiques pathologiques<sup>110</sup>. Cependant, la caractéristique biochimique du syndrome de Leigh est un déficit de la

production d'énergie, qui dans certains cas, est dû à une inhibition d'un des complexes de la chaîne respiratoire (I, III ou IV), mais ce point n'a pas été développé durant cette étude. Ainsi, et afin de déterminer si le traitement par le MPTP pourrait être utilisé comme modèle pour le syndrome de Leigh, nous avons utilisé le même protocole d'intoxication aiguë au MPTP afin de collecter plusieurs types de tissus cérébraux (substance noire, striatum, cortex, cervelet) et de tissus périphériques (muscle, cœur, foie, rein). Par la suite, et sur chaque échantillon, nous avons déterminé l'effet de l'intoxication au MPTP sur les activités de chaque complexe de la chaîne respiratoire afin d'en conclure quant à sa capacité à induire un stress mitochondrial.

**Figure 16 : Métabolisme du MPTP**

Schématisation du métabolisme du MPTP. Après une administration systémique, le MPTP traverse la barrière hémato-encéphalique. Une fois dans le cerveau, le MPTP est convertie en MPDP par la MAO-B dans une cellule gliale, puis en MPP<sup>+</sup>. Par la suite, le MPP<sup>+</sup> est libéré dans l'espace extracellulaire du neurone dopaminergique via un transporteur de dopamine (DAT).



D'après Dauer 2003

### 3. Objectif de ce projet

L'objectif de ce travail est de montrer que le modèle murin intoxiqué au MPTP reproduit les symptômes neurologiques et biochimiques observés chez les patients atteints du syndrome de Leigh. Par ce travail, nous avons donc recherché une dégénérescence des tissus cérébraux, et plus particulièrement celle du striatum, causée par l'inhibition d'un ou plusieurs complexes de la chaîne respiratoire.

## II. Publication scientifique

Author's personal copy

J Bioenerg Biomembr (2016) 48:483–491  
DOI 10.1007/s10863-016-9683-7



## Respiratory chain inhibition: one more feature to propose MPTP intoxication as a Leigh syndrome model

Barbara Da Costa<sup>1,2</sup> · Elodie Dumon<sup>1,2</sup> · Laurence Le Moigno<sup>3</sup> · Sylvie Bodard<sup>3</sup> · Pierre Castelnau<sup>3</sup> · Thierry Letellier<sup>2</sup> · Christophe Rocher<sup>1,2</sup>

Received: 31 May 2016 / Accepted: 14 October 2016 / Published online: 27 October 2016  
© Springer Science+Business Media New York 2016

**Abstract** 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) intoxicated mice have been widely used to model the loss of dopaminergic neurons. As this treatment leads to basal ganglia degeneration, it was proposed that MPTP mice could be used as a model of Leigh syndrome. However, this mitochondrial pathology is biochemically characterized by a respiratory chain dysfunction. To determine if MPTP can affect *in vivo* mitochondria function, we measured the activities of mitochondrial respiratory chain complexes in several tissues. Our results show that MPTP affects mainly mitochondrial respiratory chain complex IV, as found in Leigh Syndrome, confirming that acute MPTP intoxicated mice are a good model of Leigh Syndrome.

**Keywords** Mice model · MPTP · Respiratory chain · Mitochondrial diseases

### Introduction

The chemical 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) is widely used to model the loss of dopaminergic

neurons in Parkinson's disease. As MPTP is a lipophilic component, it can freely cross the blood brain barrier. Where it then is converted to a toxic metabolite, 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>), by monoamine oxidase B (MAO-B), mainly localized in glial cells (Ransom et al. 1987). MPP<sup>+</sup> is transferred into dopaminergic cells by dopamine transporters for which it has a high affinity (Smeyne and Jackson-Lewis 2005). Once in the cell, a part of MPP<sup>+</sup> will be sequestered into cytoplasmic vesicles by action of Vesicular Monoamine Transporter and another part will diffuse in mitochondria matrix (Smeyne and Jackson-Lewis 2005). Mode of action of MPTP is complex and not well described but it could imply an inhibition of respiratory chain complexes activities (Duty and Jenner 2011; Smeyne and Jackson-Lewis 2005). The three main respiratory chain complexes I, III and IV have been reported to be inhibited by MPP<sup>+</sup> or MPTP either by direct effect on isolated mitochondria or cells (Desai et al. 1996; Mazzio and Soliman 2003; Smeyne and Jackson-Lewis 2005), or by treatment on cells or primates (Battino et al. 1996; Pastoris et al. 1995; Smeyne and Jackson-Lewis 2005; Sundar Boyalla et al. 2011).

Recently, Lagrue et al. showed basal ganglia degeneration with a decrease of densities for both tyrosine hydroxylase and dopamine transporter, in the striatum of mice intoxicated by MPTP (Lagrue et al. 2009). Then, they proposed that this intoxicated mouse could be a potential model for the Leigh Syndrome, which is an encephalopathy of infancy or childhood due to respiratory chain complexes dysfunction (DiMauro and Schon 2003; Lagrue et al. 2009). Lake NJ et al. proposed three criteria for a specific diagnosis of Leigh syndrome: Two of them are : i) basal ganglia dysfunction, ii) defect in OXPHOS system and iii) intellectual and motor developmental delay (Lake et al. 2016). These deficiency of energy production, in some case,

Barbara DA COSTA and Elodie DUMON contributed equally to the work

✉ Christophe Rocher  
christophe.rocher@u-bordeaux.fr

<sup>1</sup> Métabolisme Énergétique Cellulaire, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095 CNRS/Univ. de Bordeaux, 1 Rue Camille Saint Saëns, CS 61390, F- 33000 Bordeaux, Cedex, France

<sup>2</sup> Equipe de Médecine Evolutive, AMIS, UMR 5288 CNRS/Univ. Paul Sabatier, F-31073 Toulouse, France

<sup>3</sup> UMR INSERM U 930, CNRS FRE 2448, François-Rabelais University, Child Neurology Unit, University Hospital, Tours, France

can be due to an inhibition of a respiratory chain complex (I, III or IV) (DiMauro and Schon 2003). But this particular point has not been well demonstrated on the proposed MPTP mouse model (Lagrue et al. 2009). Thus, in order to determine whether MPTP treatment could affect respiratory chain complex activities, we used acute MPTP intoxication protocol, identical to the one used by Lagrue et al. (Lagrue et al. 2009), then we collected several types of tissues (brain areas: substantia nigra, striatum, cortex, cerebellum and peripheral tissues: muscle, heart, liver, kidney) on which we evaluated MPTP treatment effect on respiratory chain complex activities as well as citrate synthase activity, a mitochondrial matrix enzyme.

## Materials and methods

### Animals and treatment

Animals used in this study were 5 weeks old, consanguineous male C57BL/6NRj mice (average weight:  $19 \pm 1$  g). They were kept in a controlled environment (room temperature:  $23 \pm 1$  °C, humidity:  $40.3 \pm 7.1$  %, 12-h light/dark cycle, food and water ad libitum). All mice experiments were carried out in compliance with appropriate European Community Commission directive guidelines (86/609/EEC). This strain is highly susceptible to MPTP neurotoxicity.

Animals ( $n = 7$ ) were given 4 intraperitoneal (ip) injections of at MPTP (12.5 mg/kg) one-hour intervals on a single day. Control mice ( $n = 7$ ) were treated in an identical fashion but with saline solution in the place of MPTP. Both groups of mice were sacrificed six hours after the last injection.

### Enzymatic assays

Control and intoxicated mice were sacrificed by cervical dislocation 6 h after the last injection. Various tissues were immediately dissected: (i) brain tissues: substantia nigra, striatum, cortex, cerebellum and (ii) peripheral tissues: muscle, liver, kidney, heart.

From each tissue, we first prepared a 10 % (w/v) homogenate. Each sample was homogenized, in a potter, in 9 volumes of Mannitol buffer (225 mM mannitol, 75 mM saccharose, 10 mM TrisHCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.2). Homogenate was centrifuged to 650 g for 20 min at 4 °C. Supernatant was collected. The pellet was resuspended in the same volume of Mannitol buffer than previously to make a second homogenization in the same conditions. The supernatant from the second centrifugation was added to the previous to obtain a 5 % (w/v) final supernatant that we used for enzymatic activity determinations. Protein concentration was determined by the

Biuret method using BSA as standard as described elsewhere (Rossignol et al. 2000).

Then we determined several respiratory chain complexes and citrate synthase enzymatic activities, as described in (Medja et al. 2009) and detailed after:

**Complex I (NADH ubiquinone oxidoreductase):** each sample was incubated at 37 °C, with 100  $\mu$ M decylubiquinone, 50 mM potassium phosphate (pH 7.5) and 3.75 mg/mL BSA. Reaction was started by the addition of 100  $\mu$ M NADH. NADH absorbance decrease was followed at 340 nm during 3 min, either in presence or in absence of 12.5  $\mu$ M of rotenone, a specific complex I inhibitor. The difference between these 2 activities, gave the rotenone sensitive activity, which correspond to the specific activity of respiratory chain complex I.

**Complex II (succinate ubiquinone oxido-reductase),** each sample was incubated at 37 °C, with, 25 mM K Phosphate pH 7.5, 20 mM succinate, 50  $\mu$ M 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP), 1 mM KCN, 100  $\mu$ M ATP, 2 mg/mL BSA. Reaction was started by adding 100  $\mu$ M decylubiquinone. DCIP reduction rate was measured at 660 nm during 5 min.

**Complex III (ubiquinol cytochrome c oxidoreductase),** each sample was incubated at 37 °C, with 50  $\mu$ M cytochrome c, 100 mM potassium phosphate (pH 7.5) and 250  $\mu$ M EDTA. The reaction was started by the addition of 200  $\mu$ M decylubiquinol. Cytochrome c reduction rate was measured at 550 nm during 3 min, with and without 12.5  $\mu$ g/ml antimycin A, a specific complex III inhibitor. The difference between these 2 activities, gave the specific activity of respiratory chain complex III. Decylubiquinol was obtained as described: add a few crystals of potassium borohydride in 600  $\mu$ l of a 25 mM decylubiquinone solution with gentle mixing until the solution becomes colorless. Then, add 21  $\mu$ l of 3 M HCl, centrifuge at 12,000 RPM for 5 min, 4 °C. The supernatant was decanted into a fresh tube and these operations (HCl addition and centrifugation) were repeated and finally decanted in fresh tube.

**Complex IV (cytochrome c oxidase),** assay medium was composed of 50 mM potassium phosphate (pH 7) and 100  $\mu$ M cytochrome c reduced to 95 %. It was incubated at 37 °C. Reaction was triggered by the addition of the sample. The cytochrome c oxidation rate was measured at 550 nm during 5 min.

**Citrate synthase (CS),** each sample was incubated at 37 °C, with 300  $\mu$ M acetylCoA, 100  $\mu$ M DTNB, 100 mM TrisHCl (pH 8.1) and 0.1 % triton. The reaction was started by the addition of 10 mM oxaloacetic acid. Increase of TNB absorbance was followed at 412 nm during 4 min.

The results were analyzed by Student's t-test. A  $p$ -value  $< 0.05$  was considered to be statistically significant.

## Results

In our study, the enzymatic activity for each respiratory chain complex and a mitochondrial matrix enzyme, citrate synthase (CS) was determined on 8 different tissues divided into two groups: (i) brain areas: substantia nigra, striatum, cerebellum and cortex; and (ii) peripheral tissues: muscle, heart, kidney and liver.

### Brain areas study

Results obtained on brain areas are presented in Table 1. We observed that MPTP treatment led to a significantly decreased ( $p < 0.05$ ) complex IV activity in all studied areas except substantia nigra. Moreover complex III is significantly decreased in cerebellum of MPTP group animals as well. All other activities in all areas from MPTP treated group were at the same level as the control group.

As CS activity, a mitochondrial matrix enzyme, is a marker of the mitochondrial mass, we used it to normalize all the respiratory chain activities. The results found are comparable to those found before the normalization. Thus, MPTP intoxication affected only complex IV activity (i) in striatum: in MPTP-treated mice, normalized activity was  $0.55 \pm 0.09$  compared to  $0.73 \pm 0.14$  for control mice (Fig. 1b) and (ii) in cortex: normalized activity of MPTP-treated mice was  $0.86 \pm 0.06$  whereas complex IV normalized activity of control mice was  $1.07 \pm 0.08$  (Fig. 1c). In these 2 areas, complex IV normalized activity was significantly ( $p < 0.05$ ) reduced by 25 % and 20 % respectively. Moreover, normalized activities of other complexes showed no difference between MPTP and control mice. In cerebellum, two complexes, III and IV, were affected by MPTP treatment. Complex IV normalized activity of MPTP-treated mice was  $0.53 \pm 0.09$  versus  $0.71 \pm 0.12$  for control group and complex III normalized activity of MPTP-treated mice was  $0.38 \pm 0.07$  in comparison to

$0.51 \pm 0.11$  for control mice. Both complex IV and complex III normalized activities were significantly ( $p < 0.05$ ) decreased by 25 % (Fig. 1d) while complex I activity was not changed. For substantia nigra (Fig. 1a), the results showed no difference between MPTP and control group.

Complex II activity can be assumed, like citrate synthase activity, to be a marker of the mitochondrial mass in the cell (Rocher et al. 2008). We used this activity to normalize all the respiratory chain activities. Complex IV is decreased in striatum ( $3.62 \pm 0.48$  compare to  $5.01 \pm 0.54$  for control mice, Fig. 2a) and in cortex ( $5.10 \pm 0.25$  compare to  $6.73 \pm 0.59$  for control mice, Fig. 2b). Normalized activity was significantly reduced in these brain areas ( $p < 0.05$ ) by 28 % and 24 % respectively. On these brain areas, other respiratory chain activities showed no difference between MPTP and control groups. In cerebellum, both complex activities III and IV were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) by approximately 25 % (Fig. 2c). Complex IV normalized activity was  $3.39 \pm 0.31$  for MPTP treated mice in comparison to  $4.47 \pm 0.29$  for control mice. And for complex III, normalized activity for MPTP group was  $2.62 \pm 0.22$  whereas for control group normalized activity was  $3.60 \pm 0.54$ . There was no complex I activity difference between MPTP and Control group in this brain area. Due to the few amount of material obtain for Substantia Nigra; we were not able to determine complex II activity on this brain area. However, when it was possible normalization by complex II confirm results found by CS activity normalization.

### Peripheral tissues study

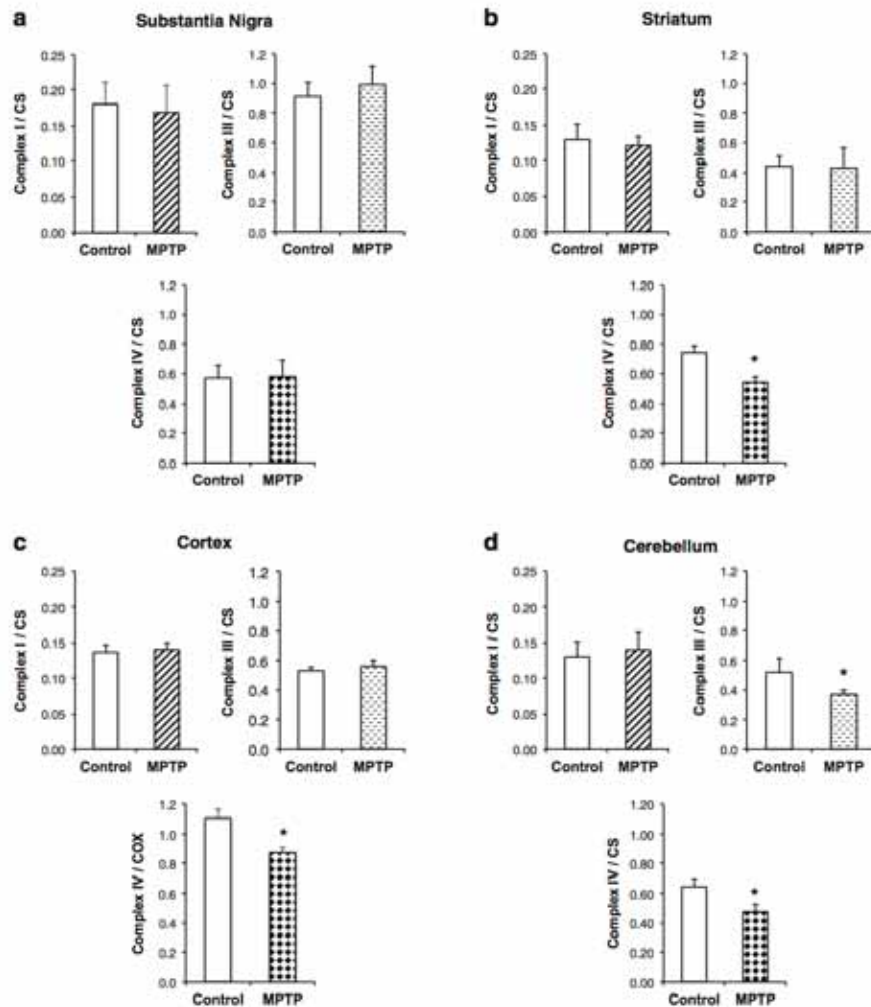
Respiratory chain complexes and citrate synthase activities obtained for peripheral tissues are summarized in Table 2. We showed that MPTP intoxication led to a

**Table 1** Brain tissues enzymatic activities

	Substantia Nigra		Striatum		Cerebellum		Cortex	
	Control	MPTP	Control	MPTP	Control	MPTP	Control	MPTP
Complex I	45 ± 6	40 ± 3	58 ± 4	57 ± 3	67 ± 7	80 ± 7	73 ± 2	74 ± 1
Complex II	ND ± ND	ND ± ND	65 ± 3	72 ± 5	72 ± 4	79 ± 2	88 ± 5	93 ± 1
Complex III	244 ± 29	234 ± 13	194 ± 17	202 ± 22	256 ± 9	208 ± 10 *	287 ± 7	305 ± 7 *
Complex IV	138 ± 15	135 ± 10	324 ± 17	255 ± 11 *	322 ± 17	268 ± 14 *	588 ± 19	476 ± 6 *
Citrate Synthase	232 ± 27	237 ± 12	436 ± 17	470 ± 10	507 ± 33	566 ± 25	532 ± 13	545 ± 5

Results expressed as mean ± SEM in nmol/min/mg prot

\* is significantly different ( $p < 0.05$ ) from control according to Student's t-test ( $n = 7$ )



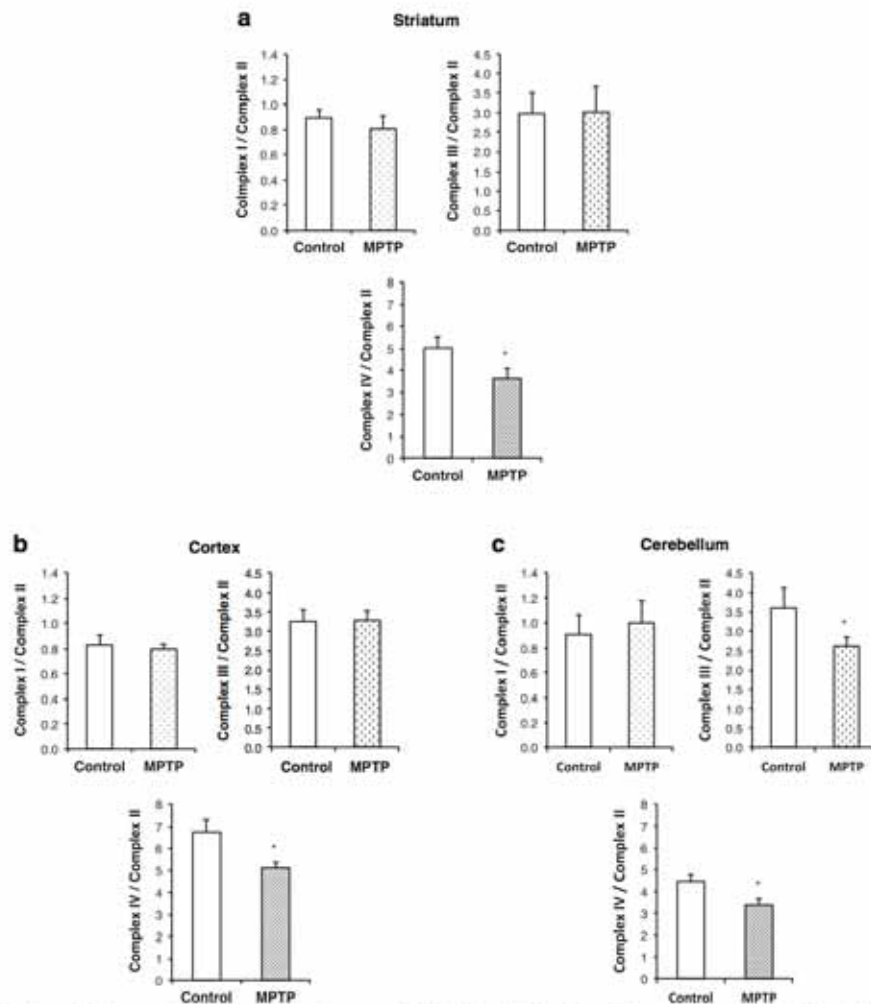
**Fig. 1** Respiratory chain enzymatic activities of brain tissues normalized by citrate synthase (CS). **a** Substantia Nigra; **b** Striatum; **c** Cortex; **d** Cerebellum. \* indicates that activity is significantly different ( $p < 0.05$ ) from control according to Student's *t*-test ( $n = 7$ )

significantly ( $p < 0.05$ ) combined decreased of complexes III and IV on liver. No other complexes were affected on any other tissues, except on muscle where an increase of all the respiratory chain complexes and CS activities was observed on MPTP treated muscle.

Results normalized by CS activity, showed an effect of MPTP intoxication, only on the respiratory chain complexes activities of the liver. Indeed, complex III normalized activity was significantly ( $p < 0.05$ ) decreased by 19 % with  $0.83 \pm 0.14$  and  $1.02 \pm 0.08$  for MPTP-treated mice and

control mice respectively. Whereas, complex IV normalized activity was slighter but significantly reduced by 16 % ( $p < 0.05$ ) with  $1.40 \pm 0.15$  for MPTP-treated mice compared to  $1.66 \pm 0.12$  for control mice (Fig. 3b). Complex I activity for this tissue was not changed. For all other tissues, muscle (Fig. 3a), kidney (Fig. 3c) and heart (Fig. 3d), the results showed no difference for the three enzymatic complexes between MPTP and control group.

Normalization by complex II showed a significantly decrease ( $p < 0.05$ ) of complex III and IV by 24 % and



**Fig. 2** Respiratory chain enzymatic activities of brain tissues normalized by Complex II activity. **a** Striatum; **b** Cortex; **c** Cerebellum. \* indicates that activity is significantly different ( $p < 0.05$ ) from control according to Student's *t*-test ( $n = 7$ )

29 % respectively. Normalized complex III activity for MPTP group was  $0.79 \pm 0.13$  and  $1.04 \pm 0.26$  for Control group. For complex IV, normalized activity was  $1.25 \pm 0.21$  for MPTP mice compare to  $1.75 \pm 0.45$  for Control mice (Fig. 4b). On the contrary, complex I normalized activity presented no change between MPTP and control group. Complex II normalization of all the respiratory chain complex activities for the other peripheral tissues, revealed no change between the two populations

of mice. As for brain areas, normalization by complex II activity gave similar results to normalization by CS.

## Discussion

Recently, Lagrue et al. proposed that acute MPTP intoxication on mice could be considered as a model of the most common mitochondrial diseases in childhood: the

**Table 2** Peripheral Tissues enzymatic activities

	Muscle		Heart		Kidney		Liver	
	Control	MPTP	Control	MPTP	Control	MPTP	Control	MPTP
Complex I	80 ± 5	92 ± 6 *	998 ± 48	941 ± 58	170 ± 8	195 ± 6	57 ± 4	53 ± 5
Complex II	60 ± 3	81 ± 6 *	747 ± 8	732 ± 32	230 ± 8	259 ± 5	104 ± 7	101 ± 8
Complex III	217 ± 10	287 ± 12 *	815 ± 120	823 ± 83	211 ± 11	200 ± 6	97 ± 8	86 ± 8 *
Complex IV	352 ± 17	496 ± 20 *	549 ± 42	549 ± 45	288 ± 16	270 ± 12	177 ± 10	127 ± 12 *
Citrate Synthase	237 ± 10	328 ± 12 *	1696 ± 51	1635 ± 82	356 ± 17	380 ± 7	96 ± 4	98 ± 4

Results expressed as mean ± SEM in nmol/min/mg prot

\* is significantly different ( $p < 0.05$ ) from control according to Student's t-test ( $n = 7$ )

Leigh Syndrome (Lagrué et al. 2009). Indeed, authors demonstrated that these treated mice led to a basal ganglia degeneration (Lagrué et al. 2009), which is a pathological feature of Leigh syndrome (DiMauro and Schon 2003). However the main biochemical feature of this syndrome is a respiratory chain complex inhibition, not well demonstrated in their study. Here, we studied, on this same mouse model, all the respiratory chain complexes activities in several brain areas and peripheral tissues, in order to determine the presence of the inhibition of the respiratory chain.

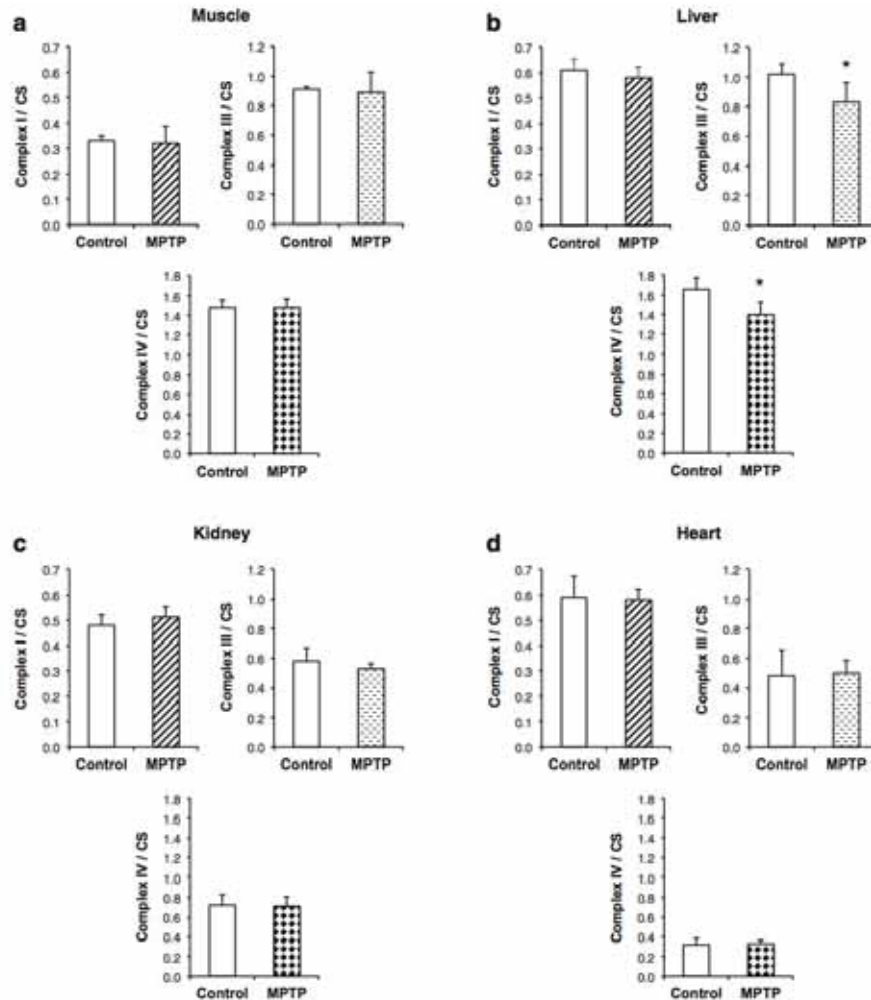
In acute model, MPTP treatment seems to have a direct effect on respiratory chain complexes. Indeed, for peripheral tissues, MPTP treatment affected only one tissue on the four studied, by inhibiting respiratory chain complexes III and IV in liver. The liver is the main organ of detoxification of the organism for several compounds. MPTP, one of these, is catalyzed in MPP+. Indeed, MAO-B is present in this organ and it has been shown that its concentration is until five times higher than the other peripheral tissues (Billett 2004). Moreover MAO-B activity and affinity for MPTP is the highest (until 8 times) regarding the 3 other tissues included in our study (Billett 2004). Thus, we can hypothesized that the tissue specificity found for respiratory chain complex inhibition in peripheral tissues, could be due to the MPP+ level in each tissue, and therefore their level of MOA-B activity and/or affinity.

Another particularity found in peripheral tissues, is an increase of citrate synthase activity and complex II activity only in muscle. As these activities are markers of mitochondrial mass, MPTP treatment seems to increase mitochondria quantity in muscle, which is confirmed by an increase of activity of all respiratory chain complexes, in the same range than the increase of CS and complex II activities. In the literature, it has been shown that MPTP treatment could lead to hyperactivity in mice (Rousselet et al. 2003). Moreover, it has been demonstrated that 4 h after training, CS activity increases (Perry et al. 2010). Putting these two points together, one could hypothesize that the increase of respiratory chain

complexes and CS activities in muscle could be explained by an increase of mitochondria in muscle due to hyperactivity of MPTP-treated mice.

For brain tissues, our results showed an inhibition of complex IV in striatum, but, surprisingly, no inhibition on any respiratory chain complexes in substantia nigra. This result seems to correlate with observations proposed in several studies, which showed that dopaminergic neuron degeneration induced by MPTP was earlier and more severe in the striatal nerve endings than in cell bodies in (Burke and O'Malley 2013; Korecka et al. 2013; Lagrué et al. 2009; Pain et al. 2013). This suggests that nerve endings are the first targets of the neurodegenerative process and there would be a different sensitivity threshold between neural endings and cell bodies to MPTP intoxication, as proposed by Stephenson et al. (Stephenson et al. 2007). A longer treatment, over several days, with repeated administrations of high doses of MPTP may be necessary to cause a mitochondrial defect in substantia nigra, as suggested by Pain et al. (Pain et al. 2013). On the 2 other studied brain areas, we showed a complex IV inhibition in cortex and a combined inhibition of complex III and IV in cerebellum. Although these areas are not involved in dopaminergic system, MAO-B is present in both with a similar affinity for MPTP (Osman and Osman and Osman 2008). However, MPTP affects differently cerebellum than cortex (e.g. complex III activity). We can hypothesize, as for liver, that MPP+ inhibition could reach several level depending on its quantity in the target cell. Following this assumption, MPP+ level should be lower in cortex than in cerebellum. As MAO-B affinity is equivalent in both areas, the difference could be due to a difference of MPTP concentration maybe due to the ability of MPTP to be transported through glial cell or neurons.

With the same hypothesis, we can propose another interpretation of the delay in dopaminergic neuron degeneration between cell bodies and nerve endings proposed by Stephenson et al. (Stephenson et al. 2007). Indeed, if we hypothesize a difference of MPP+ concentration between these two parts of the dopaminergic neurons, MPP+ concentration

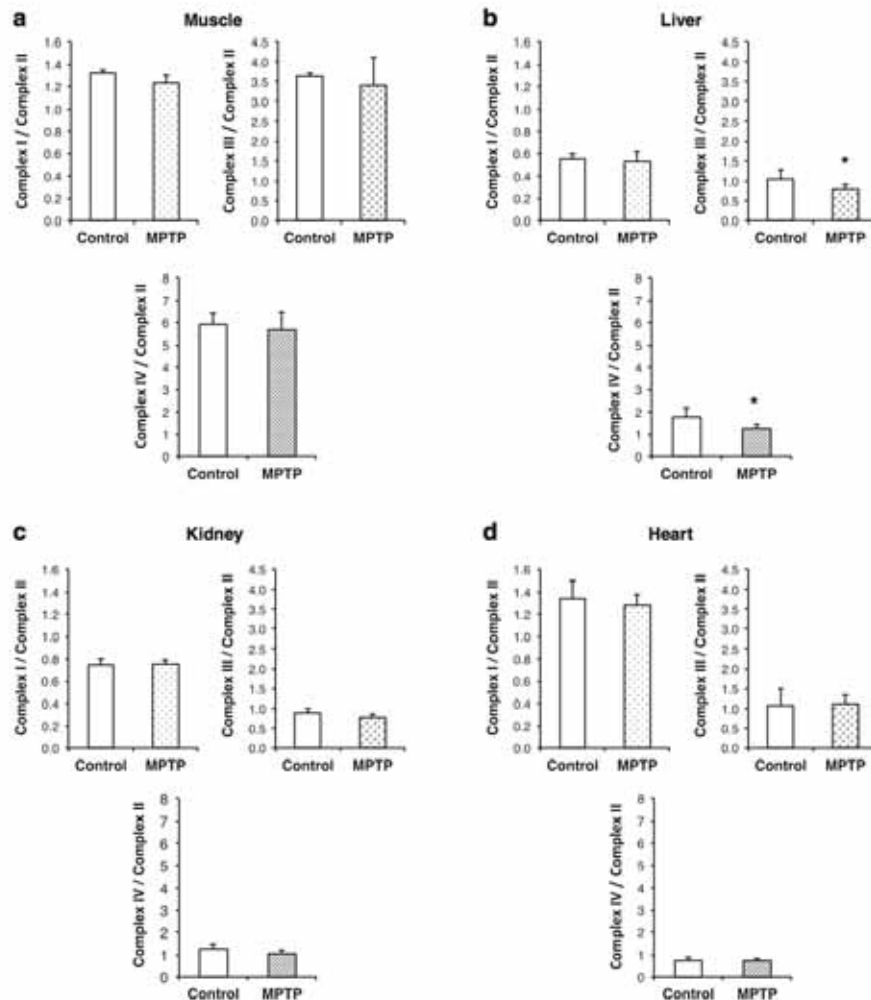


**Fig. 3** Respiratory chain enzymatic activities of peripheral tissues normalized by citrate synthase (CS). **a** Muscle; **b** Liver; **c** Kidney; **d** Heart. \* indicates that activity is significantly different ( $p < 0.05$ ) from control according to Student's t-test ( $n = 7$ )

in substantia nigra could be not enough at the beginning of the treatment and need several day to reach a level efficient to affect respiratory chain complexes. Thus, treatment in our acute model is not long enough to allow us to measure some effect on substantia nigra. However, all these assumptions need to be demonstrated by a MPP+ dosage in each brain area, which has not been carried out in this study.

Leigh syndrome is a subacute necrotizing encephalomyopathy. The causes of this syndrome are multiple, but imply a defect of the energy production, which may be due to a

deficiency of any of the respiratory chain complexes and be the result of mutations in either mitochondrial or nuclear genes. However, due to the high clinical and genetic heterogeneity of this syndrome, Rahman et al. in 1996 (Rahman et al. 1996), updated in 2016 by Lake NJ et al. (Lake et al. 2016), defined criteria for an accurate diagnosis. Two of the three main criteria proposed are, briefly, basal ganglia dysfunction and a defect in OXPHOS function. Lagrue et al., previously proposed that an acute MPTP intoxication on mouse which lead to a basal ganglia degeneration, could be



**Fig. 4** Respiratory chain enzymatic activities of peripheral tissues normalized by Complex II activity. **a** Muscle; **b** Liver; **c** Kidney; **d** Heart. \* indicates that activity is significantly different ( $p < 0.05$ ) from control according to Student's  $t$ -test ( $n = 7$ )

a model of Leigh Syndrome (Laguerre et al. 2009). However, in such mouse model, energy production defect via a deficiency of respiratory chain, which is a key biochemical feature, was not well defined. In our study, using the same acute MPTP treatment, we highlight inhibitions of complex III or complex III + IV in several brain areas and in liver. These respiratory chain complex inhibitions are significant and high enough to provoke a dysfunction of the OXPHOS system and therefore a dysfunction of the organ affected. This is confirmed by the basal ganglia degeneration found in this mouse model and

well documented in a previous study (Laguerre et al. 2009). If we draw a parallel between MPTP treatment action on brain and liver, one could make the assumption that the liver function should be affected in MPTP intoxicated mice, due to the inhibition of complex III + IV. This hypothesis is consolidated by liver dysfunction described in several patients with Leigh syndrome (Gerards et al. 2016).

Therefore, as acute MPTP intoxication presents the main pathological and biochemical features of the Leigh syndrome, these MPTP-treated mice appear to be a good model for this

particular mitochondrial pathology, even if this model has some limits, (e.g. it does not reflect the complexity of the clinical features found in some patients). But such a model could be essential to better understand this disease, and also to test potential therapies, like neuroprotective therapies. All these therapies could in a long term, maybe, cure mitochondrial diseases or at least improve some of the symptoms of these diseases.

**Acknowledgments** This work was supported by Association contre les Maladies Mitochondriales (A.M.M.I.). The authors wish to thank Dr. S. Schriener for stimulating discussion.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

**Ethical approval** All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors.

**Author contribution statement** BD and ED carried out experiments, collected and analyzed data, prepared the manuscript. LL and SB participated in experiments related to animal handling. PC participated in designing the experiments and reviewing the manuscript. TL contributed for data analysis and reviewed the manuscript. CR conceived experiments and contributed for analyzing data, preparing and reviewing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### References

- Battino M, Littarru GP, Gorini A, Villa RF (1996) Coenzyme Q, peroxidation and cytochrome oxidase features after parkinson's-like disease by MPTP toxicity in intra-synaptic and non-synaptic mitochondria from *Macaca fascicularis* cerebral cortex and hippocampus: action of dihydroergocryptine. *Neurochem Res* 21:1505–1514
- Billett EE (2004) Monoamine oxidase (MAO) in human peripheral tissues. *Neurotoxicology* 25:139–148. doi:10.1016/S0161-813X(03)00094-9
- Burke RE, O'Malley K (2013) Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 246:72–83. doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.011
- Desai VG, Feuers RJ, Hart RW, Ali SF (1996) MPP(+)-induced neurotoxicity in mouse is age-dependent: evidenced by the selective inhibition of complexes of electron transport. *Brain Res* 715:1–8. doi:10.1016/0006-8993(95)01255-9
- DiMauro S, Schon EA (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348:2656–2668. doi:10.1056/NEJMra022567
- Duty S, Jenner P (2011) Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br J Pharmacol* 164:1357–1391. doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01426.x
- Genards M, Sallevelt SC, Smeets HJ (2016) Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Mol Genet Metab* 117:300–312. doi:10.1016/j.ymgme.2015.12.004
- Korecka JA, Eggers R, Swaab DF, Bossers K, Verhaagen J (2013) Modeling early Parkinson's disease pathology with chronic low dose MPTP treatment. *Restor Neurol Neurosci* 31:155–167. doi:10.3233/RNN-110222
- Laguerre E et al (2009) MPTP intoxication in mice: a useful model of Leigh syndrome to study mitochondrial diseases in childhood. *Metab Brain Dis* 24:321–335. doi:10.1007/s11011-009-9132-y
- Lake NJ, Compton AG, Rahman S, Thorburn DR (2016) Leigh syndrome: one disorder, more than 75 monogenic causes. *Ann Neurol* 79:190–203. doi:10.1002/ana.24551
- Mazzio EA, Soliman KF (2003) Cytoprotection of pyruvic acid and reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide against hydrogen peroxide toxicity in neuroblastoma cells. *Neurochem Res* 28:733–741
- Medja F et al (2009) Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis. *Mitochondrion* 9:331–339. doi:10.1016/j.mito.2009.05.001
- Osman MY, Osman HM (2008) Inhibitory effect of acetylcholine on monoamine oxidase A and B activity in different parts of rat brain. *Arzneimittel-Forschung* 58:493–496. doi:10.1055/s-0031-1296546
- Pain S, Gochard A, Bodard S, Guilhan Z, Prunier-Aesch C, Chalon S (2013) Toxicity of MPTP on neurotransmission in three mouse models of Parkinson's disease: Experimental and toxicologic pathology: official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie 65:689–694. doi:10.1016/j.tsp.2012.09.001
- Pastoris O, Dossena M, Foppa P, Catapano M, Ferrari R, Dagani F (1995) Biochemical evaluations in skeletal muscles of primates with MPTP Parkinson-like syndrome. *Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society* 31:361–369
- Perry CG, Lally J, Holloway GP, Heigenhauser GJ, Bonen A, Spriet LL (2010) Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J Physiol* 588:4795–4810. doi:10.1113/jphysiol.2010.199448
- Rahman S et al (1996) Leigh syndrome: clinical features and biochemical and DNA abnormalities. *Ann Neurol* 39:343–351. doi:10.1002/ana.410390311
- Ransom BR, Kunis DM, Irwin I, Langston JW (1987) Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP+. *Neurosci Lett* 75:323–328
- Rocher C et al (2008) Influence of mitochondrial DNA level on cellular energy metabolism: implications for mitochondrial diseases. *J Bioenerg Biomembr* 40:59–67. doi:10.1007/s10863-008-9130-5
- Rosignol R, Letellier T, Malgat M, Rocher C, Mazat JP (2000) Tissue variation in the control of oxidative phosphorylation: implication for mitochondrial diseases. *Biochem J* 347(Pt 1):45–53
- Rousselet E et al (2003) Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. *Neurobiol Dis* 14:218–228
- Smeyne RJ, Jackson-Lewis V (2005) The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol* 134:57–66. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.09.017
- Stephenson D et al (2007) Quantification of MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in the mouse substantia nigra by laser capture microdissection. *J Neurosci Methods* 159:291–299. doi:10.1016/j.jneumeth.2006.07.027
- Sundar Boyalla S, Barbara Victor M, Roemgens A, Beyer C, Arnold S (2011) Sex- and brain region-specific role of cytochrome c oxidase in 1-methyl-4-phenylpyridinium-mediated astrocyte vulnerability. *J Neurosci Res* 89:2068–2082. doi:10.1002/jnr.22669

### III. Discussion

#### 1. La fonction hépatique pourrait instaurer un environnement enrichi en MPP<sup>+</sup>

Nos analyses sur les tissus périphériques ont permis de mettre en évidence une altération du métabolisme mitochondrial uniquement dans le foie, et plus particulièrement, une diminution d'activité des complexes III et IV. Ces résultats sont à mettre en lien avec la fonction physiologique de l'organe qui permet une détoxification de l'organisme. En effet, il a été montré que la concentration en MAO-B, qui métabolise le MPTP en MPP<sup>+</sup>, pouvait être cinq fois plus élevée que dans les autres tissus étudiés dans cette étude<sup>111</sup>. De plus, l'affinité du MAO-B pour le MPTP est également plus élevée, jusqu'à être huit fois plus forte que dans les autres tissus<sup>112,113</sup>. De ce fait, la conversion du MPTP vers sa forme active toxique, le MPP<sup>+</sup>, est plus rapide et sa concentration devient donc plus élevée. La chaîne respiratoire est alors placée dans un environnement enrichi en MPP<sup>+</sup>, d'où l'altération tissu-spécifique retrouvée durant nos analyses.

#### 2. Le MPTP augmente la masse mitochondriale des tissus musculaires

La particularité trouvée dans l'analyse de ces tissus périphériques est l'activité élevée de tous les complexes du tissu musculaire. En corrélant l'ensemble des résultats, nous avons pu constater une activité accrue de la citrate synthase (enzyme du cycle de Krebs) et du complexe II (enzyme de la chaîne respiratoire faisant lien avec le cycle de Krebs) montrant une augmentation réelle de la masse mitochondriale mais une activité de la chaîne respiratoire finalement proportionnelle. Ce phénomène serait lié à l'administration du MPTP qui provoquerait de l'hyperactivité chez les souris<sup>114</sup> et une augmentation de la citrate synthase dès 4h suivant l'injection<sup>115</sup>. Ces études semblent être corrélées avec nos résultats obtenus sur le tissu musculaire.

#### 3. Les terminaisons nerveuses du striatum sont plus sensibles à l'intoxication

L'analyse des tissus cérébraux nous a permis de mettre en évidence une altération des complexes III et IV dans tous les tissus étudiés sauf celui de la substance noire. Le striatum et la substance noire sont impliqués dans le réseau dopaminergique : les corps cellulaires des neurones dopaminergiques sont localisés au niveau de la substance noire et les terminaisons nerveuses sont projetées dans le striatum. Nous avons mis en évidence un déficit du complexe IV dans le striatum mais étonnamment, aucune altération dans la substance noire. Toutefois, ces observations semblent se corréliser avec celles proposées dans d'autres études qui ont montré que la dégénérescence dopaminergique des neurones induite par le MPTP est plus précoce et plus grave au niveau des terminaisons nerveuses striatales que dans les corps cellulaires<sup>116,117,109,118</sup>. Cela montre également que les terminaisons nerveuses sont les premières cibles du processus neuro-dégénératif, et que le

seuil de sensibilité de ces terminaisons nerveuses est plus sensible au MPTP<sup>119</sup>. Pour pouvoir observer une altération du métabolisme mitochondrial et un début de dégénérescence dans la substance noire, l'intoxication au MPTP aurait dû être plus longue (de l'ordre de plusieurs jours), avec des doses plus élevées et répétées<sup>118</sup>.

Afin d'expliquer le retard de dégénérescence entre les terminaisons nerveuses et les corps cellulaires du striatum, une étude a émis l'hypothèse que ce phénomène serait dû à un épuisement de la dopamine striatale<sup>119</sup>. Avec notre étude, nous proposons une autre hypothèse pour expliquer ce retard. Si l'on suppose une différence de concentration en MPP<sup>+</sup> entre les deux parties des neurones dopaminergiques, la concentration en MPP<sup>+</sup> dans la substance noire pourrait ne pas être assez élevée au début du traitement pour affecter l'un des complexes de la chaîne respiratoire. Ainsi, le schéma de traitement utilisé dans notre étude ne serait pas assez long pour nous permettre de mesurer un quelconque effet sur les complexes de la substance noire.

#### **4. L'inhibition du cervelet et le cortex est différente malgré des caractéristiques tissulaires similaires**

Les résultats obtenus sur les deux autres tissus nous montrent une inhibition du complexe III dans le cortex et une inhibition du complexe III+IV dans le cervelet. Bien que ces zones cérébrales ne soient pas impliquées dans le réseau dopaminergique, la MAO-B y est toutefois présente avec une affinité classique pour le MPTP<sup>120</sup>. Puisque le métabolisme mitochondrial est impacté différemment entre le cervelet et le cortex, l'hypothèse avancée pour le tissu hépatique pourrait également être appliquée ici : selon la nature de la cellule cible, la concentration et l'affinité de la MAO-B pour le MPTP pourrait être différente avec une concentration plus faible dans le cortex que dans le cervelet. Dans le cas où la concentration et l'affinité seraient similaires, l'hypothèse pourrait être réorientée vers la capacité du MPTP à être transporté par les cellules gliales et les neurones, ce qui provoquerait une différence de concentration en MPTP entre ces deux tissus cérébraux.

#### **5. Le modèle murin par intoxication au MPTP peut être utilisé comme modèle du syndrome de Leigh**

Le syndrome de Leigh peut être caractérisé par une dégénérescence des ganglions de la base et un déficit de la production d'énergie via la chaîne respiratoire. Il a déjà été proposé qu'une intoxication aiguë par le MPTP chez la souris pourrait être un modèle du syndrome de Leigh<sup>109</sup>. Cependant, dans ce modèle de souris, le défaut de production d'énergie causé par une déficience de la chaîne respiratoire, caractéristique biochimique obligatoire, n'était pas bien définie. Dans notre étude, nous avons donc utilisé le même schéma d'intoxication au MPTP pour mettre en évidence les inhibitions du complexe III ou des complexes III+IV dans plusieurs régions du cerveau et du foie. L'inhibition de ces

complexes est assez sévère pour provoquer un dysfonctionnement des OXPHOS et donc un dysfonctionnement général des organes affectés. Ceci est confirmé par la dégénérescence des ganglions de la base observée dans ce modèle murin, et qui est aussi bien documenté dans l'étude précédente. Si nous établissons un parallèle entre l'action du traitement au MPTP sur le cerveau et le foie, nous pouvons donc supposer que la fonction hépatique devrait être affectée chez les souris intoxiquées par le MPTP, en raison de l'inhibition du complexe III+IV. Il a été montré qu'un dysfonctionnement hépatique est retrouvé chez certains patients atteints du syndrome de Leigh. Ainsi, l'inhibition des complexes I et IV de la chaîne respiratoire des cellules hépatiques est un élément supplémentaire confirmant que l'intoxication aiguë au MPTP peut être considérée comme un modèle de ce syndrome<sup>121</sup>.

Par conséquent, comme l'intoxication aiguë par le MPTP présente la principale caractéristique neurologique et biochimique du syndrome de Leigh, ces souris traitées par le MPTP semblent donc être un bon modèle pour cette pathologie mitochondriale. Le développement d'un tel modèle est essentiel pour mieux comprendre le syndrome de Leigh mais aussi pour tester des thérapies potentielles, comme les thérapies neuroprotectrices. Toutes ces thérapies pourraient, à long terme, guérir les maladies mitochondriales ou améliorer la qualité de vie des patients atteints de cette maladie.







# Influence des haplogroupes de l'ADNmt sur la bioénergétique de la mitochondrie

Travaux de recherche, partie 2



## **1. Les haplogroupes peuvent-ils modifier le métabolisme mitochondrial ?**

Les haplogroupes de l'ADNmt ont longtemps été considérés comme génétiquement neutres, c'est-à-dire n'ayant pas d'effet sur le phénotype des individus. Grâce à cette caractéristique et à celle de l'horloge moléculaire, de nombreuses études sur le peuplement ont contribué à mieux comprendre l'origine de l'Homme moderne. Bien que cet outil soit couramment utilisé en génétique des populations, sa pertinence est de plus en plus remise en question. En effet, depuis plus d'une quinzaine d'années, de nombreuses études épidémiologiques montrent un lien entre haplogroupe et phénotype ; remettant en cause le principe même de neutralité.

## **2. Hypothèse de la géolocalisation des haplogroupes**

La présence d'un haplogroupe dans un espace géographique peut être le produit de trois processus distincts : (i) une différenciation de cet haplogroupe à partir de l'haplogroupe parent au sein de cet espace, (ii) une migration d'un groupe humain porteur de cet haplogroupe dans cet espace ou bien (iii) une diffusion de l'haplogroupe par échange génétique entre populations de proche en proche. Ces processus, régis soit par un effet fondateur ou bien la dérive génétique, peuvent expliquer l'absence d'un haplogroupe dans un espace donnée. Pourtant, l'absence de certains haplogroupes ne signifie pas que ces haplogroupes n'aient pas migré et n'aient jamais été présents dans cet espace. En effet, si les haplogroupes influencent le phénotype, il devient alors possible que des phénomènes de sélection aient favorisé certains haplogroupes plus que d'autres. La place centrale qu'occupe la mitochondrie dans la vie de la cellule peut en faire une cible particulièrement privilégiée de ces phénomènes de sélection.

Plusieurs études ont démontré que l'ADNmt semble être soumis à deux processus de sélection<sup>59,122,62</sup> : la sélection adaptative et la sélection purificatrice. La sélection purificatrice tend à éliminer les gènes délétères. La sélection adaptative tend à conserver les gènes positifs en apportant un avantage fonctionnel chez un individu. En étudiant les haplogroupes des zones climatiques plus froides (zones tempérées et arctiques), il apparaît que ceux-ci soient plutôt influencés par la sélection adaptative. Il a été montré que la séquence protéique de certains gènes mitochondriaux connus pour être très conservés au cours de l'évolution, présentent une forte variabilité selon la zone géographique étudiée. C'est le cas des séquences des gènes ATP6, cytochrome b et COI dont leurs séquences sont, respectivement, retrouvées particulièrement variable dans les zones arctiques, tempérées et tropicales. Cette variabilité semble répondre à un besoin d'adaptation environnementale (climatique et alimentaire). Par exemple, la variabilité de la séquence protéique de l'ATP6 participe à réduire l'efficacité du couplage des OXPHOS permettant ainsi une plus forte production de chaleur dans l'organisme. Cette modification est donc un avantage fonctionnel

pour les populations vivants dans les zones froides<sup>123,124</sup>.

### **3. Modification des fonctions mitochondriales**

D'autres éléments viennent étayer le fait que les polymorphismes ne sont pas neutres. Des études ont montré que la présence ou l'absence de certains polymorphismes sur l'ADNmt peuvent moduler l'ensemble des fonctions mitochondriales, sans pour autant que cela ne devienne pathologique<sup>125</sup>.

Une étude comparant l'haplogroupe européen H et l'haplogroupe africain L (dans un contexte non pathologique) a mis en évidence un certain nombre de différences entre ces deux haplogroupes<sup>126</sup>. Il a été montré que le nombre de copies d'ADNmt est plus faible dans l'haplogroupe L mais celui-ci montre un taux d'expression plus important des gènes codant pour les complexes des OXPHOS. D'autre part, cet haplogroupe présente également une capacité de production d'ATP associée à une production de ROS plus faible, signe d'une efficacité de couplage optimisée.

D'autres études ont également montré que la vitesse et la stabilité de l'assemblage des complexes OXPHOS peuvent varier en fonction de l'haplogroupe et être déterminantes dans un contexte pathologique (ex. syndrome de LHON)<sup>127</sup>. Ainsi, la vitesse d'assemblage du complexe I et IV est plus faible pour l'haplogroupe U que pour l'haplogroupe H.

Les fonctions intrinsèques comme la  $VO_{2max}$  peuvent également être modulées, notamment en prenant en considération le fonctionnement de la chaîne respiratoire et le mécanisme de génération de ROS des haplogroupes étudiés<sup>128,129</sup>. Ainsi, la  $VO_{2max}$  de l'haplogroupe H est plus forte que celle de l'haplogroupe J.

### **4. Impacts sur l'expression de pathologies**

De nombreuses études épidémiologiques font état d'un lien entre certaines pathologies et le fonds génétique mitochondrial. Chacune de ces études s'attache à comparer la distribution des haplogroupes au sein d'un groupe de personnes saines (non atteintes) et d'un groupe de patients atteints d'une pathologie. Si le fonds génétique mitochondrial est neutre, alors la distribution des haplogroupes doit être identique entre les deux groupes car aucune force particulière ne s'exerce. La majorité des résultats montre une distribution différente entre groupe d'individus sains et groupes d'individus malades. Actuellement, les études tendent à s'intéresser de manière plus approfondie aux pathologies, en essayant d'associer une fonction à un haplogroupe, voire un polymorphisme particulier, dans le contexte pathologique.

#### **4.1. Distribution des haplogroupes dans les pathologies**

De plus en plus d'études s'intéressent au lien entre haplogroupe et pathologie puisqu'il est régulièrement démontré que la distribution des haplogroupes au sein d'une même pathologie n'était pas équivalente (en regard de la fréquence de distribution de

l'haplogroupe dans la région géographique étudiée). Il a été montré que les haplogroupes Uk, H et IWX étaient moins sujets à la progression du VIH-1 que les haplogroupes J et U5, pour qui la progression vers le SIDA et le décès est plus rapide<sup>130,131,132</sup>. Une autre étude a montré que l'haplogroupe T est plus représenté chez les hommes atteints d'asthénozoospermie contrairement à l'haplogroupe H<sup>133,134</sup>. Enfin, l'influence du fonds génétique mitochondrial est de plus en plus documenté dans les pathologies cancéreuses<sup>30,135</sup>. Toutes ces études montrent que les haplogroupes de l'ADNmt peuvent influencer tous types de pathologies (infectieuses, cancers, maladies neurodégénératives, etc.) et que, selon la pathologie, cette influence peut être modulée différemment selon les haplogroupes. Ceci montre que chaque haplogroupe peut avoir :

- Un rôle positif et protecteur pour son hôte en compensant l'effet néfaste de la mutation pathogène responsable de la maladie.
- Un risque aggravant contribuant à l'apparition d'une pathologie plus sévère que d'ordinaire.

#### 4.2. Le paradoxe J

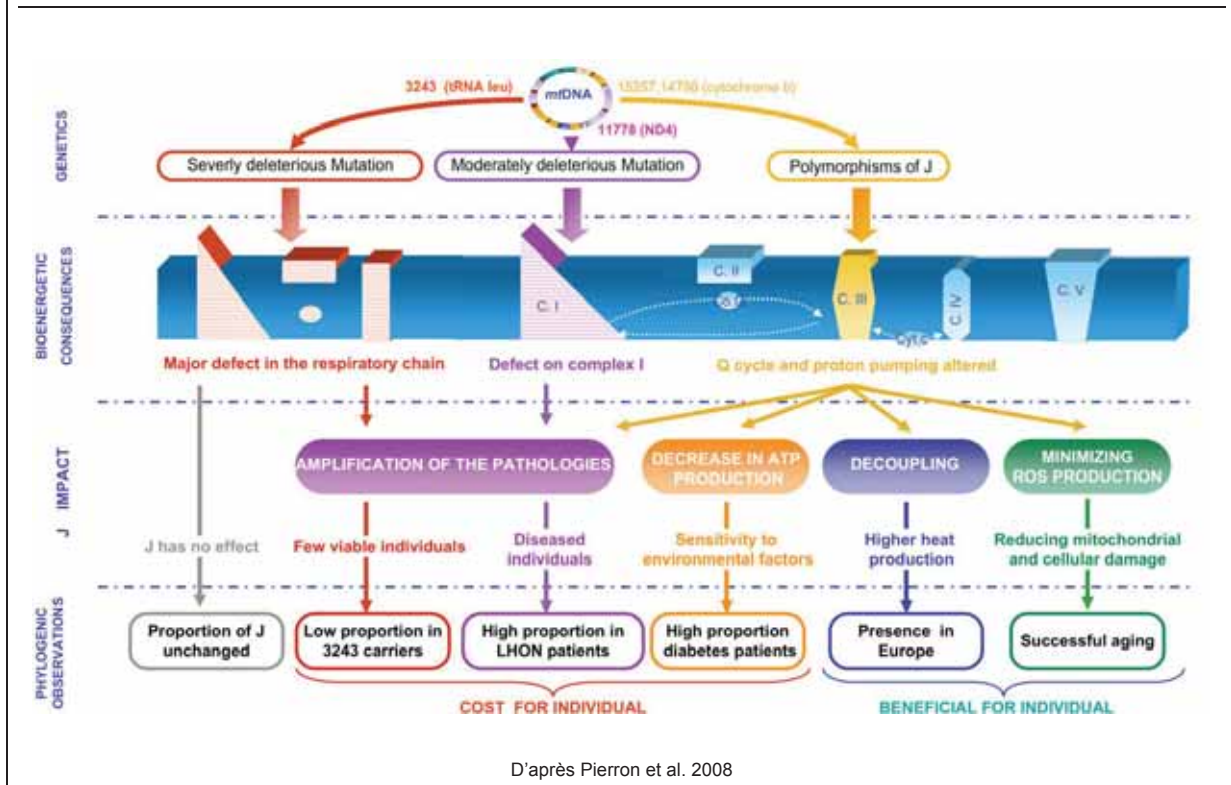
Malgré toutes les études qui mettent en évidence une relation entre une modification physiologique ou une pathologie à un haplogroupe particulier, il est encore difficile de bien définir le rôle de chaque haplogroupe. L'haplogroupe J (9% de la population européenne) est un bon exemple pour illustrer la complexité apparente de l'influence à la fois positive (effet protecteur) ou négative (facteur de risque) que peuvent avoir les haplogroupes (**Figure 17**).

Une précédente étude réalisée par notre laboratoire s'est intéressée à une population de patients porteurs de la mutation m.A3243G<sup>136</sup>. Cette mutation localisée sur le gène ARNt<sub>Leu</sub> est considérée comme une mutation hétéroplasmique responsable d'une pathologie sévère<sup>137</sup>. En étudiant la répartition des haplogroupes dans cette population, aucune diminution évidente de la diversité des haplogroupes n'avait été observée. Cependant, en corrélant plus précisément la répartition de l'haplogroupe J et celle de la population générale française, une diminution drastique a été mise en évidence. Initialement considéré comme « protecteur » car absent de la population de patients, l'explication est tout autre : la m.A3243G associée à l'haplogroupe J est mortelle dès le stade embryonnaire, éliminant de ce fait les individus porteurs de cette combinaison des statistiques descriptives.

A l'inverse, l'haplogroupe J est sur-représenté chez les individus centenaires<sup>138,139</sup>. Il a été montré que l'activité du complexe III est améliorée et corrélée avec un taux de production de ROS plus faible, réduisant ainsi les dommages cellulaires. Dans un contexte pathologique, il a été démontré que cet haplogroupe réduit significativement le risque de développer la maladie de Parkinson<sup>140</sup>. Il est intéressant de remarquer que l'effet protecteur de l'haplogroupe J n'est pas forcément applicable à l'ensemble des maladies neurodégénératives (i.e. maladie d'Alzheimer)<sup>141</sup>. Ceci démontre encore une fois les limites de la compréhension de ces mécanismes.

**Figure 17 : Mécanisme hypothétique du paradoxe J**

L'impact des polymorphismes associés à l'haplogroupe J peut différer selon l'environnement mitochondrial. En effet, certains polymorphismes présents dans l'haplogroupe J provoquent un découplage des OXPHOX. Ce découplage peut avoir un effet bénéfique pour l'individu puisqu'il peut favoriser la production de chaleur (corréléable avec la présence de cet haplogroupe dans les régions tempérées/froides) et minimiser la production des ROS (corréléable avec la présence de cet haplogroupe chez les individus centenaires). A l'inverse, ce découplage peut aussi impliquer une diminution de la production d'énergie sous forme d'ATP qui, associée à une mutation pathogène, pourrait accentuer l'expression de la pathologie.



## 5. Objectif du projet

Afin de mettre en évidence les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la non-neutralité des haplogroupes, nous avons mis au point un modèle cellulaire permettant l'étude et la caractérisation biochimique des mitochondries pour les principaux haplogroupes européens. Ce modèle fait appel à la construction de cybrides afin d'isoler un ADNmt d'intérêt dans une cellule dont le fonds génétique nucléaire est connu.

Nous avons donc construit une collection de cybrides constituée des principaux haplogroupes européens (H, U, J, K, T) sur lesquels nous avons réalisé une caractérisation biochimique et phénotypique. Pour cela, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux différents complexes de la chaîne respiratoire en déterminant leurs paramètres cinétiques. L'ensemble des résultats obtenus a servi à réaliser un premier modèle de cybrides virtuels pour chaque haplogroupe et à tester *in silico* l'effet de perturbations (pathologies) sur ces derniers.

## IV. Matériels et méthodes

### 1. Choix des haplogroupes de l'ADNmt

#### 1.1. Haplogroupes européens

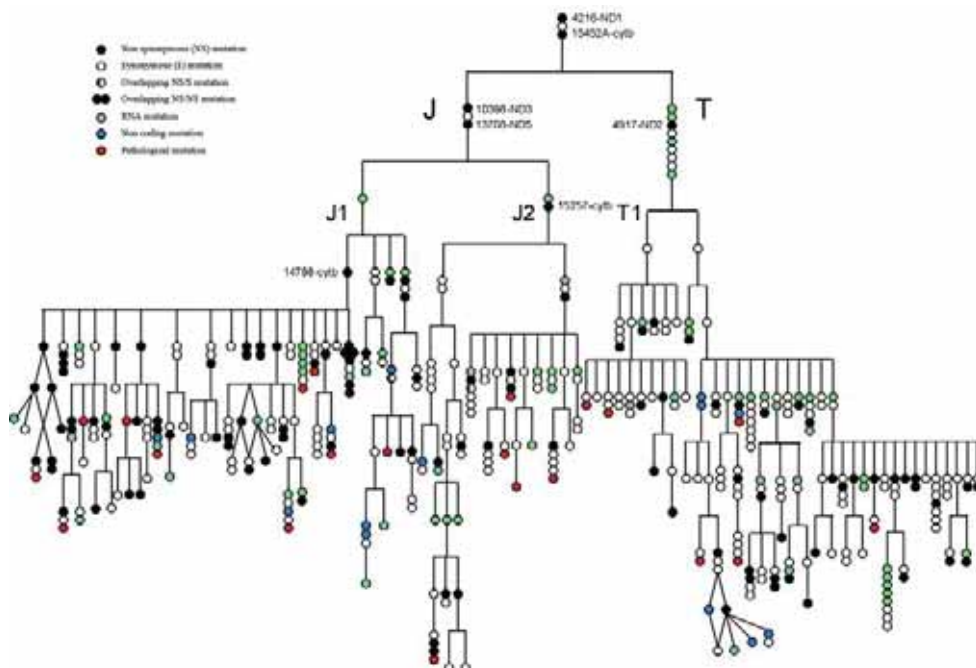
Dans le cadre de ce projet de recherche, nous nous sommes intéressés aux haplogroupes H, J, T, U et K qui représentent les haplogroupes les plus fréquemment retrouvés en Europe<sup>63</sup>. Ces haplogroupes ont été recherchés dans la population générale française qui reflète de manière significative la distribution des haplogroupes européens<sup>142,143,144</sup>.

#### 1.2. Focus sur l'haplogroupe J

Parallèlement, et pour faire suite à de précédents travaux au sein de notre laboratoire, nous nous sommes intéressés à l'haplogroupe J (**Figure 18**).

**Figure 18 : Phylogénie des haplogroupes J et T**

Représentation schématique des différents types de mutations retrouvées dans l'arbre phylogénétique JT. Les mutations localisées en haut de branches permettent la définition des haplogroupes. Il s'agit principalement de mutations synonymes, non-synonymes ou modifications de certains ARN. Les mutations clés permettant la dichotomie de l'arbre sont indiquées avec le nom du gène et son emplacement sur l'ADNmt. Les mutations localisées en bas de branche définissent les haplotypes (lignée mitochondriale d'un individu). Comme pour la définition des haplogroupes, les haplotypes sont caractérisés par des mutations synonymes, non-synonymes ou modifications de certains ARN, cependant ceux-ci sont présents en plus forte proportion. A noter également que les mutations non codantes et les mutations pathogènes sont présentes uniquement en bas de branche.



D'après Ruiz-Pesini 2004.

Nous avons réalisé une analyse ciblée sur les polymorphismes m.T14798C et m.G15257A qui sont tous deux retrouvés dans la structure du complexe III<sup>122</sup>. Il a été montré que ces polymorphismes sont des mutations dites « secondaires », c'est-à-dire qu'elles sont fréquemment associées à une mutation pathogène responsable de l'apparition d'une pathologie mais que seules, elles ne causent pas de pathologie. Des travaux ont montré que ces polymorphismes présentent un indice de conservation fort de 77% et 95% respectivement. Ceci sous-entend qu'une variation au niveau de l'une de ces localisations résulterait d'un besoin et donc d'une adaptation de la physiologie du complexe III à un environnement particulier.

L'effet structural potentiel des polymorphismes m.T14798C et m.G15257A sur la structure du complexe III a été évalué via le logiciel de visualisation des macromolécules PyMOL (<http://www.pymol.org>). A partir du crystal 3D du complexe III (1NTZ)<sup>145</sup>, issu de la banque de données protéiques RCSB-PDB ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org))<sup>146,147</sup>, nous avons comparé la séquence non-mutée avec celle présentant les 2 polymorphismes à l'étude.

## **2. Source de l'ADNmt : les plaquettes**

### **2.1. Préparation des échantillons de plaquettes**

Afin d'établir des lignées présentant différents fonds génétiques mitochondriaux, nous avons choisi d'utiliser des plaquettes sanguines (ou thrombocytes) comme cellules donneuses d'ADNmt. Toutes les cellules de l'organisme, exceptée les hématies, contiennent des mitochondries mais pour des raisons pratiques ce sont les plaquettes qui ont été retenues. En effet, ces cellules sont naturellement très riches en mitochondries à cause de leur fonction au sein de l'organisme (ex. hémostasie, signalisation cellulaire) et sont aussi naturellement anucléées.

Les plaquettes utilisées dans le cadre de ce projet ont été obtenues au laboratoire grâce à une convention inter-établissement avec l'Etablissement Français du Sang. Elles sont reçues au laboratoire sous forme de poche de prélèvement anonymisée. Le volume de plaquette est aliquoté et congelé en azote (-196°C) jusqu'à leur utilisation lors de la fusion avec les 143Bp<sup>0</sup>. Pour optimiser la mise en évidence des haplogroupes, et notamment ceux retrouvés à faible fréquence, nous avons estimé une taille d'échantillon de 100 plaquettes. Ainsi, et selon la fréquence établie de chaque haplogroupe, nous avons estimé pouvoir détecter environ 40 plaquettes associées à l'haplogroupe H, 18 associées à l'haplogroupe U, 9 associées à l'haplogroupe J, 8 associées à l'haplogroupe T et 5 associées à l'haplogroupe K. L'objectif étant de disposer d'au moins 3 échantillons différents par haplogroupe.

### **2.2. Extraction et quantification de l'ADN**

#### *2.2.1. Extraction de l'ADN*

Les ADN de l'ensemble des 70 échantillons de plaquettes ont été extraits via le kit

d'extraction Genomic DNA from tissue - NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel).

### 2.2.2. Quantification des ADN extraits

Les ADN extraits sont quantifiés par NanoDrop® ND-100. Ce spectrophotomètre nous a permis de quantifier de manière précise les différents ADN des plaquettes extraits à 260nm et d'apprécier la pureté de chaque l'échantillon en analysant le ratio  $A_{260nm}/A_{280nm}$ .

## 2.3. Caractérisation des ADNmt issus des plaquettes

### 2.3.1. Amplification des ADN par PCR

L'ensemble des 70 échantillons de plaquettes a été amplifié en vue des analyses par RFLP. Les ADN à amplifier (10-20 ng) sont mis en présence de 300nM d'amorce sens (F), 300nM d'amorce anti-sens (R), 200 µM de dNTP, 1,25 unités d'ADN Taq polymérase, 1x de tampon PCR, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub> et de l'H<sub>2</sub>O stérile nucléase-free (qsp 50µL). Nous avons choisi d'amplifier les fragments d'ADNmt susceptibles de contenir les polymorphismes fréquemment retrouvés dans les haplogroupes d'intérêt : m.C7028T (haplogroupe H), m.G15257A (haplogroupe J, U et K), m.T14798C (haplogroupe J, U et K) et m.A4917G (haplogroupe T). Les conditions de PCR de chacune des amorces sont détaillées ci-dessous **Tableau 1**.

**Tableau 1 : Conditions pour l'amplification des ADN par PCR**

Polymorphisme	Amorces	Séquences des amorces	Taille du fragment	Conditions PCR
m.C7028T	L6909 H7115	TCTACCATCTTTGCAGGCAC GTGTTAGTCATGTTAGCTTG	242pb	94°C - 4min 94°C - 30s / 49°C - 30s / 72°C - 45s (x35) 72°C - 5min
m.G15257A	L14637 H16029	AACCCACAAACCCATTAC CCAAATCTGCTTCCCCATGA	1431pb	94°C - 4min 94°C - 30s / 65°C - 30s / 72°C - 45s (x35) 72°C - 5min
m.T14798C	L14637 H14799mis	AACCCACAAACCCATTAC TGTTGGATGGGGTGGGAGGTCGCTGA	208pb	94°C - 4min 94°C - 30s / 60°C - 30s / 72°C - 45s (x35) 72°C - 5min
m.A4917G	L4519 H5174	AAGCAATATGAAATGATCTG CGTAGGTTTGGTCTAGG	694pb	94°C - 4min 94°C - 30s / 63°C - 30s / 72°C - 45s (x35) 72°C - 5min

### 2.3.2. Digestions enzymatiques des ADN par RFLP

L'ensemble des produits de PCR des 70 échantillons de plaquettes a été digéré par la technique RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*). Ces ADN amplifiés (10µL) sont mis en présence de 0,01% de BSA, 1x de tampon de digestion, 1 unité d'enzyme de restriction et de l'H<sub>2</sub>O stérile nucléase-free (qsp 20µL). Les enzymes de digestion et les résultats attendus sont détaillés dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2 : Conditions des digestions enzymatiques par RFLP**

Polymorphisme	Enzyme de restriction	Site de restriction	Fragment(s) recherché(s)	Conditions RFLP
m.C7028T	Alu I	5' AG ↓ CT 3' TC ↑ G A	167 + 75	1h à 37°C
m.G15257A	Acc I	5' GT ↓ MKAC 3' CAKM ↑ TG	1431pb	1h à 37°C
m.T14798C	Dde I	5' C ↓ TNAG 3' GANT ↑ C	181pb + 27pb	1h à 37°C
m.A4917G	Bfa I	5' C ↓ TAG 3' GAT ↑ C	279pb + 39pb + 90pb + 67pb + 15pb	1h à 37°C

### 2.3.3. Séquençage de la D-loop

La zone hypervariable de l'ADNmt (D-loop : HVS2) des plaquettes ont été séquencées afin de confirmer l'haplogroupe et définir l'haplotype de chaque individu. Nous avons dans un premier temps amplifié les ADNmt des plaquettes. Ces ADN (10-200 ng) sont mis en présence de 300nM d'amorces sens (HmtL15997 : CACCATTAGCACCCAAAGCT) et 300nm d'amorce anti-sens (HmtH112 : ACAGATACTGCGACATAGGG) permettant la synthèse l'amplification entre 15978pb et 131pb (fragment de 723pb), 200μM de dNTP, 1,25 unités d'ADN Taq polymérase et à 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>. Le cycle de PCR suivant a été réalisé : 94°C - 4min, 94°C - 30s / 59°C - 30s / 72°C -1min (x35) et 72°C - 5min. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés par un traitement à l'Exo-SAP-IT® (usb) afin d'éliminer les résidus de dNTP pouvant interférer avec la réaction de séquençage.

La réaction de séquençage a été réalisée via la technologie ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit® (Applied Biosystems) en complément des amorces utilisées pour l'amplification. Le cycle d'extension a été réalisé en suivant : 96°C – 1min puis cycles de 96°C - 10s / 50°C - 5s / 60°C - 4min (x25). Les réactions de précipitation et de purification ont également été réalisées selon les recommandations du fournisseur.

L'analyse des séquences a ensuite été réalisée par un Séquenceur AB1 3130XL de la Plateforme Pôle Génotypage - Séquençage de l'Université Bordeaux 2. Chacune des séquences a été comparée à la séquence de référence CRS via le logiciel MITOMASTER disponible sur mitomap.org afin de mettre en évidence les variations nucléotidiques et déterminer l'haplogroupe de chaque plaquette.

## 3. Elaboration des modèles cellulaires : les cybrides

Afin de pouvoir caractériser phénotypiquement et biochimiquement les haplogroupes, nous avons choisi d'utiliser la technique des cybrides afin d'obtenir des lignées cellulaires stables d'haplogroupes différents, et ce de manière illimitée.

### 3.1. Culture cellulaire : identification et conditions de culture

#### 3.1.1. Conditions générales de culture

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées dans un incubateur de biologie cellulaire thermostaté à 37°C, en présence de 5% de CO<sub>2</sub> et un taux d'humidité proche de 100%. Les cellules ainsi que les milieux de culture sont manipulés de manière stérile sous hotte à flux laminaire afin d'éviter toute contamination microbienne et fongique. Les lignées cellulaires sont maintenues en phase exponentielle de croissance soit par ajout/changement de milieu de culture, soit par passage (ou trypsination). Leur fréquence est dépendante du niveau d'acidification du milieu de culture (virage au jaune de l'indicateur de pH coloré : rouge de phénol), de la confluence et de l'adhérence de cellules observable par microscopie. En moyenne, les cellules sont passées 2 fois par semaine (**Annexe 1**).

#### 3.1.2. Types de cellules utilisées

##### a. Les 143B

Les cellules 143B sont issues d'une lignée d'ostéosarcomes (143B ATCC® CRL-8303<sup>TM</sup>)<sup>148</sup>. Ces cellules sont adhérentes et sont cultivées en milieu DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) GlutaMax supplémenté avec 4,5g/L de glucose, 10% de SVF (sérum de vœux fœtal) et 1% d'antibiotique-antimycotique (mélange de 10 000 unités/ml de pénicilline, 10 000 µg/ml de streptomycine et 25µg/ml d'antimycosique Fungizone®) (= milieu DMEM<sup>+S/A</sup>).

##### b. Les 143Bp<sup>0</sup>

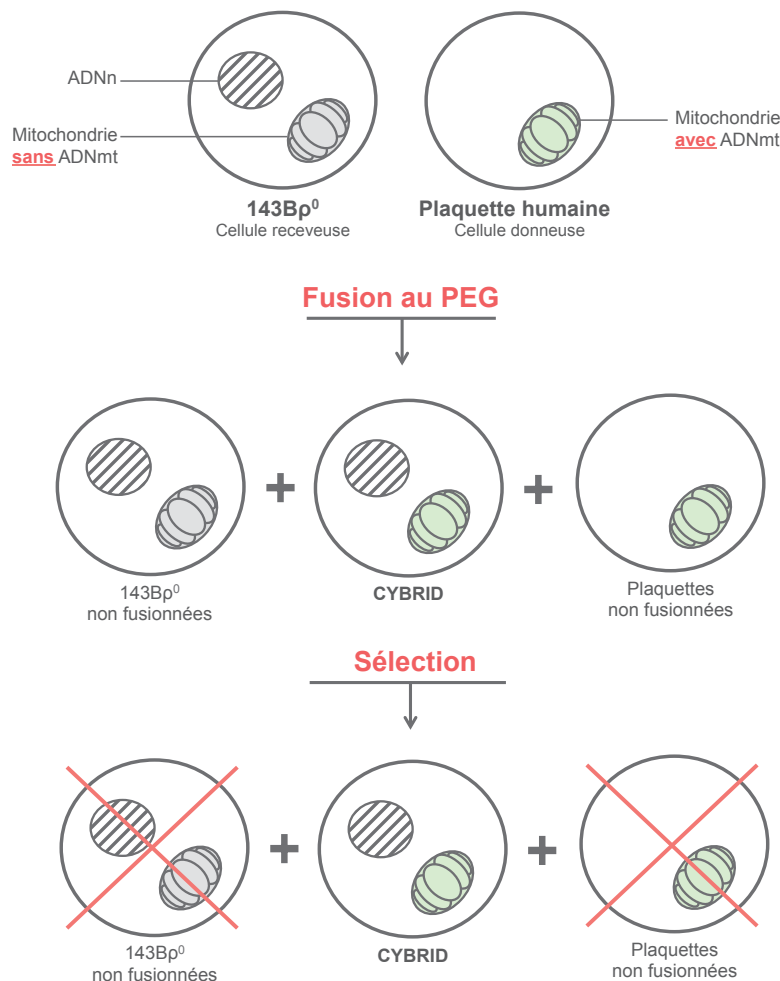
Les 143Bp<sup>0</sup> sont des cellules 143B décrites précédemment et dont leur ADNmt a été « déplété » par traitement au bromure d'éthidium qui permet d'inhiber la réplication de l'ADNmt<sup>149</sup>. Les cellules 143Bp<sup>0</sup> sont cultivées dans le même milieu de culture que les cellules 143B. Cependant, l'absence d'ADNmt rend ces cellules auxotrophes à l'uridine et au pyruvate. En effet, l'absence de l'ADNmt induit de forts changements métaboliques dans la mitochondrie<sup>85</sup>. Dans des conditions physiologiques, la glycolyse cellulaire augmente le taux de NADH tandis que la respiration mitochondriale augmente le taux de NAD<sup>+</sup>. Par conséquent, l'absence de chaîne respiration modifie le rapport NADH/NAD<sup>+</sup>, en faveur du NADH, ce qui interfère avec la fonction glycolytique de la cellule. L'ajout de pyruvate, qui entraîne la formation de lactate, va donc permettre la génération de NAD<sup>+</sup>, maintenant ainsi la fonction glycolytique cellulaire et la production d'ATP par la chaîne respiratoire. Ensuite, l'absence de chaîne respiratoire fonctionnelle, impacte la fonction de la dihydroorotate dihydrogenase (DHODH). Cette dihydrogenase est nécessaire pour la synthèse de pyrimidine. L'ajout d'uridine dans le milieu de culture rétablit la fonction de la DHODH et relance la synthèse de pyrimidine également nécessaire à la survie de la cellule. C'est donc pour cela que le milieu de culture est également supplémenté avec 50µg/mL d'uridine et 1mM de pyruvate (= milieu DMEM<sup>+S/A/U/P</sup>).

### 3.2. Elaboration des lignées de cybrides

La technique des cybrides est largement utilisée pour l'étude des mutations impliquées dans les pathologies mitochondriales<sup>85</sup>. Elle consiste en la fusion d'une cellule donneuse d'ADN exogène et une cellule receveuse ( $p^0$ ) dépourvue de cet ADN (**Figure 19**)<sup>150</sup>. Dans le cadre de notre étude, les cellules donneuses sont les plaquettes que nous avons sélectionnées, qui fournissent l'ADNmt et un haplotype particulier, qui seront fusionnées aux cellules receveuses 143Bp<sup>0</sup> (**Annexe 2**). Cette technique permet l'obtention d'une collection de cellules stables et immortelles comportant chacune un haplogroupe particulier. A partir de ces cellules, il est possible d'étudier les variations dues à l'ADNmt exogène associé à un fonds génétique nucléaire commun afin de n'étudier que les effets propres de ce fonds génétique mitochondrial.

**Figure 19 : Construction des Cybrides**

La construction de cybride consiste à fusionner une cellule donneuse d'ADNmt (plaquette) avec une cellule dépourvue de cet ADN (143Bp<sup>0</sup>) en présence de PEG à 42%. Les produits résultant de la fusion sont cultivés pendant quelques jours dans un milieu de culture non sélectif afin d'assurer l'intégration fonctionnelle des mitochondries. Les cellules sont ensuite placées dans un milieu sélectif pour favoriser uniquement le développement des cybrides.



#### **4. Caractérisation phénotypique des cybrides**

##### **4.1. Courbe de croissance**

Afin de visualiser si les haplogroupes peuvent avoir un effet sur les paramètres de croissance, nous avons réalisé des courbes de croissance en milieu non renouvelé. Les différentes lignées sont mises en culture à une densité de  $3.10^3$  cellules/cm<sup>2</sup> dans des plaques de 6 puits (soit une surface de 9,5cm<sup>2</sup>) auxquels sont ajoutés 6mL de milieu de culture (DMEM<sup>+S/A</sup>). La croissance cellulaire est évaluée par comptage journalier (jusqu'à 5 jours) en cellule de Malassez et en présence de bleu trypan (colorant vital) (n=3).

#### **5. Caractérisation biochimique des cybrides**

Afin de mieux visualiser l'effet des haplogroupes sur le fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire et ainsi de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués, nous avons réalisé une caractérisation biochimique de ces cybrides. Les dosages décrits ci-dessous permettent une analyse de chaque complexe de manière isolée afin de mettre en évidence des variations biochimiques inter-cybrides.

Pour cela, les différents protocoles utilisés dans cette étude sont basés sur les protocoles consensus utilisés pour le diagnostic des cytopathies mitochondriales par les différentes équipes de recherche habilitées à faire ce diagnostic (réseau français contre les maladies mitochondriales). Grâce à l'expertise apportée, ces protocoles sont adaptés à l'étude des mitochondries et plus particulièrement à l'étude de la chaîne respiratoire<sup>151</sup>. Cependant, dans le cadre de ce projet de recherche, ces protocoles ont été adaptés pour l'étude des cybrides (ex. variations des différents substrats et produits) mais les consignes de réalisations (ex. principe de réaction, concentrations des réactifs) ont été respectées. L'objectif de ces analyses est de pouvoir étudier les différents paramètres cinétiques de chaque complexe et de chaque cybride.

L'ensemble des études biochimiques décrites dans cette partie est réalisée est réalisé via un spectrophotomètre UV-mc2 thermostaté, SP2000 version 6.12.30.0

##### **5.1. Détermination de la concentration protéique et de la masse mitochondriale**

###### *5.1.1. Détermination de la teneur en protéines*

La détermination de la concentration en protéines totales des cybrides est effectuée par la méthode de LOWRY<sup>152</sup> (n=3).

### 5.1.2. Détermination de la masse mitochondriale

La citrate synthase est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétyl-coenzyme A (CoA-SH). Le dosage de cette enzyme permet d'évaluer la masse mitochondriale (ou nombre de mitochondrie) de chaque cellule. Le CoA-SH formé lors de la réaction réagit avec le 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoïc acid (DTNB) pour former du 5,5' thiobis-2-nitrobenzoïc acid (TNB) qui absorbe spécifiquement à 412nm. L'activité de la citrate synthase est mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412nm (n=3) (**Annexe 3**).

## 5.2. Dosages de l'activité des complexes de la chaines respiratoire

### 5.2.1. Etude du complexe I

Le complexe I de la chaine respiratoire permet l'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  parallèlement à la réduction du CoQ et  $\text{CoQH}_2$ . Son activité est évaluée en suivant la disparition du NADH qui absorbe à 340nm (**Annexe 4**).



### 5.2.2. Etude du complexe IV

Le complexe IV de la chaine respiratoire permet l'oxydation du cytochrome c, son activité est évaluée en suivant la disparition du cytochrome c réduit qui absorbe à 550nm (**Annexe 5**).



## 6. Modélisation du métabolisme énergétique mitochondrial

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans le maintien du métabolisme mitochondrial, et en tenant compte de la complexité de la physiologie des mitochondries et plus particulièrement celle des complexes OXPHOS, les modèles mathématiques sont des outils importants pour appréhender le fonctionnement du métabolisme énergétique. Dans le cadre de ce projet de recherche, nous avons étudié les complexes I et IV de manière isolée par un modèle d'équations cinétiques et étudié le métabolisme énergétique mitochondrial global de chaque cybride à l'aide du modèle informatique développé par M. Heiske<sup>153,154</sup> au sein de notre laboratoire.

### 6.1. Principes de base des cinétiques enzymatiques

Les enzymes sont des catalyseurs biologiques capables d'accélérer des réactions chimiques spécifiques et retrouvés dans leur état initial à l'issue de la réaction catalysée. Le

schéma général de la cinétique enzymatique proposée par Michaelis et Menten<sup>155</sup> suppose que la réaction enzymatique menant le substrat (S) à la formation de produit (P) nécessite la formation réversible d'un complexe enzyme-substrat (ES) par l'intermédiaire d'une enzyme (E). Il s'établit la relation suivante :



où  $k$  = constant de formation/dissociation et  $k_{cat}$  = constante catalytique

De cette représentation, il est possible de déduire la vitesse de réaction en analysant  $[P] = f([t])$  (avec  $[E]$  constant) permettant de définir la vitesse comme suit :  $v = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} \approx \frac{d[P]}{dt}$ . Dans un modèle où  $[E]$  est modulée, la relation suivante peut être établie :  $v = [E] \times constante$ . Dans un contexte où  $[E]$  est constant mais  $[S]$  est variée, il est admis que l'augmentation de  $[S]$  augmente la formation de complexes  $[ES]$  mais cette formation est limitante lorsque  $[S]=[E]$ . On parle alors de saturation de l'enzyme par le substrat : la vitesse de la réaction est alors maximale et atteint un plateau ( $V_{max}$ ) qui peut être défini comme suit :  $v = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m}$ .

Le  $K_m$  est la constante de Michaelis-Menten qui représente l'affinité de l'enzyme pour le substrat S. De cette équation, il est possible de déterminer le  $K_m$  de l'enzyme. En effet, le  $K_m$  correspondant à la concentration du substrat pour laquelle  $v = \frac{V_{max}}{2}$ .

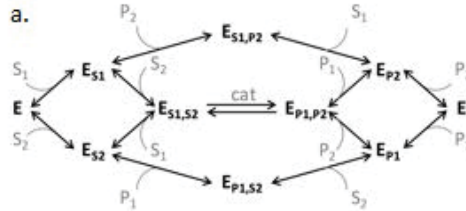
## 6.2. Modèle cinétique des complexes OXPHOS

Les cinétiques de la plupart des enzymes ne peuvent pas être décrites par cette simple équation de Michaelis-Menten car les réactions impliquent souvent plus d'un substrat et/ou plus d'un produit, et peuvent de plus être réversibles. Il existe des modèles cinétiques de type Michaelis-Menten plus complexes qui tiennent compte des principales constantes  $K_m$  (un pour chaque substrat et produit) et des  $V_{max}$  ( $V_{max}$  aller et  $V_{max}$  retour). Cependant les cinétiques des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase sont encore plus complexes, ces enzymes étant également affectées par le potentiel électrochimique à travers la membrane interne mitochondriale.

Pour décrire les cinétiques des complexes I et IV, nous avons utilisé des équations de type Michaelis-Menten basées sur le type « Random binding », qui attribue un ordre de liaison des substrats à l'enzyme et de libération des produits de manière aléatoire (**Figure 20**). Il a été montré que ce type d'équation s'applique très bien aux cinétiques des complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire en absence et présence du gradient électrochimique<sup>153,154</sup>. En effet, ce type d'équation prend en compte les  $V_{max}$  (aller-retour) et les  $K_m$  de chaque substrat et produit. Il tient compte également de l'impact du gradient membranaire sur ces paramètres en respectant des contraintes thermodynamiques.

**Figure 20 : Cinétique Michaelis-Menten basée sur le type « Random binding »**

a) Représentation schématique d'une catalyse enzymatique de type « Random Binding » pour une réaction avec deux substrats (S1 et S2) et deux produits (P1 et P2), avec l'enzyme E.



Dans le cadre de ce travail, nous avons mesuré les activités du complexe I et IV afin de déterminer leurs  $K_m$  et  $V_{max}$  à l'aide des modèles cinétiques basés sur le « Random binding ».

☞ Pour rappel, la réaction du complexe I est classiquement définie par l'équation suivante :



En suivant le modèle de cinétique Michaelis-Menten de type « Random Binding », nous obtenons l'équation suivante (=Eq. c1) :

$$v_{C1} = \frac{k_f \cdot \frac{[\text{NADH}]_x}{K_{m\text{NADH}}} \cdot \frac{[\text{Q}]_{\text{im}}}{K_{m\text{Q}}} - k_b \cdot \frac{[\text{NAD}]_x}{K_{m\text{NAD}}} \cdot \frac{[\text{QH}_2]_{\text{im}}}{K_{m\text{QH}_2}}}{\left(1 + \frac{[\text{NADH}]_x}{K_{m\text{NADH}}} + \frac{[\text{NAD}]_x}{K_{m\text{NAD}}}\right) \cdot \left(1 + \frac{[\text{Q}]_{\text{im}}}{K_{m\text{Q}}} + \frac{[\text{QH}_2]_{\text{im}}}{K_{m\text{QH}_2}}\right)}$$

Où :

$$\begin{aligned} K_{m\text{NADH}} &= K_{m\text{NADH}}^0 \cdot e^{\gamma_{KN} \cdot \zeta_{KN} \cdot \frac{\Delta G_H}{RT}} & K_{m\text{Q}} &= K_{m\text{Q}}^0 \cdot e^{\gamma_{KQ} \cdot \zeta_{KQ} \cdot \frac{\Delta G_H}{RT}} \\ K_{m\text{NAD}} &= K_{m\text{NAD}}^0 \cdot e^{-(1-\gamma_{KN}) \cdot \zeta_{KN} \cdot \frac{\Delta G_H}{RT}} & K_{m\text{QH}_2} &= K_{m\text{QH}_2}^0 \cdot e^{-(1-\gamma_{KQ}) \cdot \zeta_{KQ} \cdot \frac{\Delta G_H}{RT}} \\ \Delta G_H &= RT \ln \left( \frac{[\text{H}^+]_{\text{int}}}{[\text{H}^+]_x} \right) + 4 \Delta \mu_H \end{aligned}$$

☞ Pour rappel, la réaction du complexe IV est classiquement définie par l'équation suivante :



En suivant le modèle de cinétique Michaelis-Menten de type « Random Binding », nous obtenons l'équation suivante (=Eq. cIV) :

$$v_{C4} = \frac{k_f \cdot \frac{[Cred]_{is}}{K_{mCred}} \cdot \left( \frac{[O_2]_i}{K_{mO_2}^*} \right)^{0.25} - k_b \cdot \frac{[Cox]_{is}}{K_{mCox}}}{\left( 1 + \frac{[Cox]_{is}}{K_{mCox}} + \frac{[Cred]_{is}}{K_{mCred}} \right) \cdot \left( 1 + \frac{[O_2]_i}{K_{mO_2}^*} \right)^{0.25}}$$

Où :

$$\begin{aligned} K_{mCox} &= K_{mCox}^0 \cdot e^{-(1-\gamma K_C) \cdot \zeta K_C \cdot \frac{\Delta G_H}{RT}} & K_{mO_2}^* &= K_{mO_2}^{*0} \cdot e^{\frac{\zeta K_O}{0.25} \cdot \frac{\Delta G_H}{RT}} \\ K_{mCred} &= K_{mCred}^0 \cdot e^{\gamma K_C \cdot \zeta K_C \cdot \frac{\Delta G_H}{RT}} & \Delta G_H &= RT \ln \left( \frac{H_{ref}}{[H]_x} \right) + \Delta \mu_H + F \Delta \Psi \end{aligned}$$

Dans ces deux équations, les  $K_m^0$  correspondent aux  $K_m$  et les  $k_f^0$  et  $k_b^0$  aux constantes de vitesses  $V_{max}$  aller et  $V_{max}$  retour, en absence du gradient membranaire. Les paramètres  $\gamma$  et  $\zeta$  repartissent l'impact du gradient membranaire, représenté par  $\Delta G_H$ . En effet,  $\Delta G_H$  prend en compte (i) le nombre de charges transférées pour le potentiel électrique ( $\Delta \Psi$ ) et (ii) des protons transportés pour le potentiel chimique de protons (pH) ou bien les deux, c'est-à-dire le potentiel électrochimique ( $\Delta \mu_H$ ) et respecte ainsi la thermodynamique de la translocation de protons par les complexes.

### 6.3. Détermination des paramètres cinétiques des complexes I et IV pour les cellules 143B et les cybrides

La détermination des  $K_m$  et  $V_{max}$  est réalisée en l'absence du potentiel membranaire mitochondrial ( $K_m^0$  et  $K_f^0$ ). En effet, les membranes cellulaires des cybrides et des cellules 143B ont été détériorées de manière irréversible lors de la congélation des cellules, rendant le gradient de proton inopérant. Dans cette condition, les réactions des complexes I et IV sont irréversibles et les  $V_{max}$  retour sont donc considérées comme négligeables lors de la détermination des  $K_m$  et de la  $V_{max}$  aller. Cependant, la présence du gradient membranaire mitochondrial de la  $V_{max}$  retour est nécessaire pour la simulation de ces cinétiques. De ce fait, le rapport de Haldane est appliqué pour mettre en relation les paramètres cinétiques avec la constante d'équilibre de la réaction :

$$K_{eq} = \frac{k_f}{k_b} \cdot \frac{\prod_{i=1}^n K_{mP_i}^{\eta_i}}{\prod_{i=1}^n K_{mS_i}^{\eta_i}}$$

où  $\eta_i$  est le facteur stoechiométrique du substrat  $S_i$  et produit  $P_i$ .

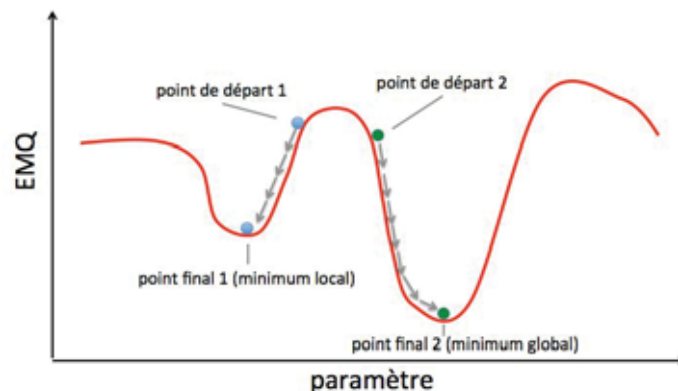
#### 6.4. Estimation des paramètres cinétiques

L'estimation des paramètres cinétiques a été réalisée via le logiciel Scilab (<http://www.scilab.org>). Les valeurs des paramètres ont été évaluées en calculant l'erreur moyenne quadratique (EMQ) entre les données théoriques et les données expérimentales. Afin de trouver les valeurs optimales des différents paramètres, définies par l'EMQ minimale, deux stratégies ont été utilisées : une méthode locale et une méthode globale.

Afin de déterminer les vitesses initiales, la méthode « locale » (Scilab built-in function `leastsq`, algorithme : quasi-Newton) qui recherche l'EMQ minimale à partir d'un point de départ défini dans l'espace des paramètres, a été utilisée. La méthode est dite « locale » car elle permet de chercher le minimum en suivant le gradient d'EMQ, jusqu'au minimum local. Cette méthode ne permet pas de trouver le minimum d'un autre espace de paramètres qui pourrait être le minimum global de l'espace de paramètres définis (**Figure 21**). Dans le cas des représentations de Michaelis-Menten, il est possible de donner une bonne estimation du  $K_m$  et de la  $V_{max}$  à l'œil nu. Le point de départ est ainsi bien approximé pour déterminer le minimum global.

**Figure 21 : Recherche locale de l'EMQ**

Représentation graphique permettant la recherche dite « locale » de l'EMQ.



D'après Heiske 2016

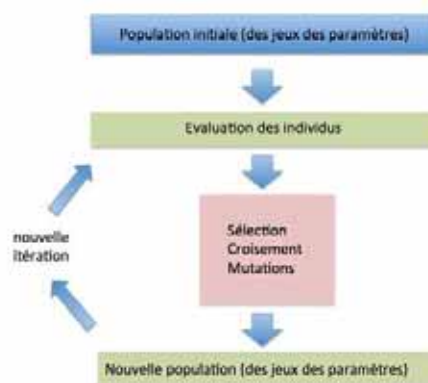
Dans le cas d'une cinétique de type « Random Binding », il est beaucoup plus difficile de déterminer une valeur de départ pour chaque paramètre de l'équation à partir des courbes  $v = f(t)$ . En effet, la variation de concentrations de plusieurs substrats et produits intervient. Un algorithme génétique, encodé sur Scilab, a donc été utilisé. Il s'agit d'une méthode globale, c'est-à-dire une méthode permettant de rechercher l'EMQ minimale en prenant en compte tout l'espace des paramètres, borné par des limites réalistes (i.e. physiologiques).

Les algorithmes génétiques utilisent la notion de sélection naturelle et s'appliquent à une population (ex. jeux de paramètres cinétiques). Nous avons utilisé pour la population initiale plus de mille jeux de paramètres (1 jeu =  $V_{max}$ ,  $K_m$ , substrats et produits), choisis au hasard dans l'espace borné des paramètres. De ces jeux, nous avons retenu les cinquante jeux de paramètres menant au moindre EMQ que nous avons utilisé pour créer la génération suivante. Deux jeux de paramètres tirés au hasard (parent 1 et parent 2) sont combinés par « croisement », ainsi, pour la valeur d'un paramètre X, une seule valeur est retenue, choisie au hasard entre parent 1 et parent 2 ; un nouveau jeu de paramètres naît. L'expérience est répétée deux cents fois, ce qui correspond à la taille des populations générées suivantes.

Parallèlement, l'algorithme applique une « mutation », avec un taux fixé à 0,1, imposant une valeur au hasard sur un paramètre. L'algorithme est arrêté après trente générations (**Figure 22**).

**Figure 22 : Principe de l'algorithme génétique**

Le meilleur jeu de paramètres de la dernière génération est sélectionné et pris comme point de départ pour la méthode « locale », permettant d'affiner ces paramètres. Cette méthode permet également d'estimer une marge d'erreur (déviations standard) pour chaque paramètre.



D'après Heiske 2017

## 6.5. Modélisation des OXPHOS

Différents modèles mathématiques ont été mis au point pour traiter les différentes problématiques liées à la physiologie mitochondriale. Le modèle de Bohnensack<sup>156</sup> décrit les OXPHOS avec deux équations (chaîne respiratoire et ATP synthase) en tenant compte du potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) et du ratio ATP/ADP. Le modèle de Magnus<sup>157</sup> utilise deux autres équations complémentaires pour décrire la chaîne respiratoire : la capacité de transfert des protons et la génération de l'ATP. La génération de l'ATP a été décrite par une approche similaire<sup>158</sup>, une équation tenant compte de la production d'ATP et une seconde calculant le flux complémentaire de protons. Toutes les équations incluent une dépendance du potentiel membranaire.

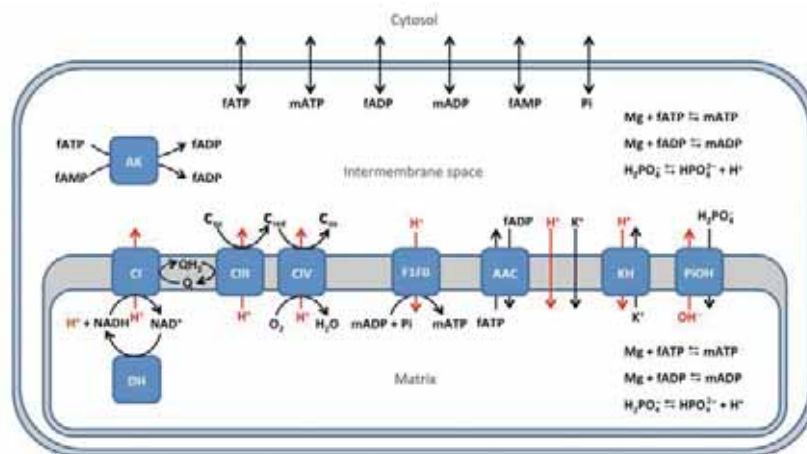
Dans les modèles plus complets de Korzeniewski<sup>159</sup> et de Beard<sup>160</sup>, chaque complexe des OXPHOS est décrit par une équation spécifique, basée respectivement sur la thermodynamique proche de l'équilibre ou sur la loi d'action de masse. Les deux modèles tiennent compte d'une influence du  $\Delta\psi$  sur les taux catalytiques. Cependant, les cinétiques utilisées par Beard et Korzeniewski ne présentent pas de cinétique de saturation ( $V_{max}$ ,  $K_m$ ) que l'on retrouve généralement dans les cinétiques des complexes OXPHOS. Elles ne permettent donc pas d'analyser les conséquences d'un changement sur l'affinité du substrat et les taux catalytiques maximums dus aux variations physiologiques (ex. spécificités tissulaires, état métabolique) ou aux variations pathologiques (ex. mutations).

#### 6.5.1. Particularités du modèle mathématique développé

Afin d'étudier l'effet de variations locales (physiologiques ou pathologiques) sur le flux respiratoire, la génération de l'ATP mitochondrial et de mettre en évidence des mécanismes de compensation, l'objectif au sein de notre laboratoire est de développer un modèle ciblé sur les complexes OXPHOS intégrant l'ensemble des paramètres impliqués dans la mécanique de ces complexes (**Figure 23**).

**Figure 23 : Modélisation des OXPHOS**

Représentation schématique du modèle OXPHOS. En plus des complexes de la chaîne respiratoire (CI, CIII, CIV) et de l'ATP synthase (F1F0), la membrane interne contient également les transporteurs ADP/ATP (AAC), l'antiport  $\text{Pi}/\text{OH}$  ( $\text{PiOH}$ ) et l'échangeur  $\text{K}^+/\text{H}^+$  (KH), la fuite de  $\text{H}^+$  et  $\text{K}^+$  à travers la membrane. Ces paramètres sont également pris en compte dans le modèle. Le cycle de Krebs dans la matrice est représenté par une réaction de déshydrogénase (DH) et l'adénylate kinase (AK) située dans l'espace intermembranaire. Pour la membrane externe, le passage des phosphates inorganiques ( $\text{Pi}$ ) et des adénines sont pris en compte. L'ATP et ADP apparaissent sous forme libre et liée à  $\text{Mg}^{2+}$  (fATP, mATP, fADP, mADP).



D'après Heiske 2017

Chaque complexe OXPHOS est décrit par une équation unique et spécifique (cf. paragraphe 6.2), qui reproduit la cinétique enzymatique sur une large gamme de concentrations de substrats et de produits, ainsi que du  $\Delta\psi$ .

Notre modèle, basé sur les modèles de Korzeniewski et Beard, intègre l'influence du

$\Delta\psi$  dans le respect de la thermodynamique et applique les équations aux complexes I, III, IV et la génération de l'ATP. Il fait également appel à l'échangeur de l'ADP/ATP, de l'antiport  $\text{PiOH}$ , au flux de proton et à l'adénylate kinase. Ce modèle ciblé sur les OXPHOS est capable de reproduire les caractéristiques essentielles de la chaîne respiratoire et de la production d'ATP pour la respiration des états 3 et 4 (**Annexe 6**), en conditions normales et pathologiques. Etant validé sur une large gamme de concentrations de substrats et de produits ainsi qu'une large gamme de potentiel membranaire, ce modèle permet d'analyser les conséquences d'un changement sur l'affinité du substrat et des taux catalytiques maximums, et est donc un outil capable d'analyser les conséquences des différences dues aux cybrides au niveau local ( $K_m$  et  $V_{max}$ ) et à l'échelle globale du système OXPHOS ( $\text{JO}_2$ , production d'ATP, potentiel membranaire, état redox du NADH, cytochrome c, Co-Q, etc.). Pour cela, nous avons créé des « cybrides virtuels ».

#### 6.5.2. Construction des cybrides virtuels

Nous avons paramétré les équations des complexes I et IV du modèle OXPHOS (cf. paragraphe 6.2) avec les paramètres obtenus par les analyses expérimentales des cybrides. Ainsi, nous avons obtenu quatre « cybrides virtuels » : un pour les cellules 143B, et un pour chaque haplogroupe, CCP6 (U), CCP15 (K) et CCP23 (HV).

A noter que l'objectif ici est d'initier la mise au point des premiers cybrides virtuels et d'évaluer la capacité de notre modèle à prédire des phénomènes précis de la physiologie mitochondriale liés aux différents haplogroupes. Les conclusions sur ces cybrides virtuels sont limitées et préliminaires. En effet, les paramètres cinétiques  $K_m$  et  $V_{max}$  du modèle ont été mis au point sur des mitochondries de cœur (bovine et porcine), de ce fait les paramètres cinétiques sont exprimés en mg de protéines mitochondriales. Pour les cybrides, les paramètres cinétiques expérimentaux ont été normalisés soit par mg de protéines cellulaires ou soit par la citrate synthase qui représente la quantité de mitochondries par cellule. Afin d'utiliser les données expérimentales des cybrides dans ce modèle OXPHOS, nous avons ramené nos paramètres cinétiques des cybrides en mg de protéines mitochondriales via la relation suivante :

$$V_{max} (\text{cybrid} > \text{mito}) = \frac{(V_{max \text{ mito}} \times V_{max \text{ cybrid}})}{\frac{V_{max \text{ mito}}}{VCS \text{ mito}}}$$

Le paramétrage complet du modèle aux cybrides nécessite des analyses expérimentales supplémentaires.

#### 6.5.3. Analyse des cybrides virtuels

Par ce modèle, nous avons étudié différents paramètres physiologiques des OXPHOS tels que  $\text{JO}_2$  et  $J_{\text{ATP}}$ , les relations flux-force et les effets de seuils biochimiques des

cybrides CCP6, CCP15, CCP23 et des cellules 143B.

#### a. Etude des paramètres essentiels des OXPHOS

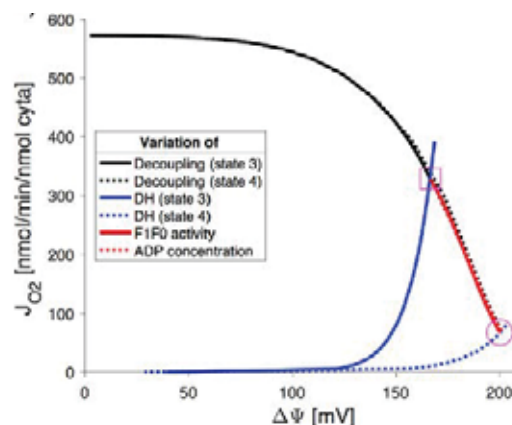
Pour étudier les paramètres essentiels de la physiologie mitochondriale, nous avons simulé les états respiratoires 3 (ajout d'ADP) et 4 (sans ADP) sur les OXPHOS afin de suivre les variations de  $J_{O_2}$ , de  $J_{ATP}$ , des substrats et du potentiel membranaire de chaque haplogroupe testé. Dans le cadre des autres simulations du modèle (flux-force, effet de seuil), le système OXPHOS sera étudié à l'état stationnaire.

#### b. Etude de la relation flux-force

L'étude des relations flux-force permet de décrire le rapport entre 2 paramètres fondamentaux de la physiologie des mitochondries : la respiration mitochondriale ( $J_{O_2}$ ) et le potentiel électrique ( $\Delta\Psi$ ), et ce, dans des conditions normales et extrêmes. Nous avons simulé un système OXPHOS en présence de (i) différentes concentrations d'un agent découplant, que nous avons imité en augmentant la constante de vitesse du flux de fuite de protons ( $d_{HLeak}$ ), (ii) de différentes concentrations de substrats respiratoires qui sont imitées en variant la constante de vitesse de l'activité de la déshydrogénase, (iii) de différentes concentrations d'ADP (de 0 à 1,3mM), et (iv) en présence de différents niveaux d'activité du système de phosphorylation en inhibant l'ATP synthase (**Figure 24**)<sup>161,162,163</sup>.

**Figure 24 : Relation flux-force**

Courbe de titration d'un agent découplant, d'ADP, d'un inhibiteur de l'ATP synthase et d'un substrat de la chaîne respiratoire. Les points de départ de chaque titration sont désignés par un carré rouge (état 3) et un cercle rouge (état 4).



D'après Heiske 2017

#### c. Etude des effets de seuil biochimique

L'effet de seuil mitochondrial permet d'évaluer la sensibilité de la respiration mitochondriale ( $J_{O_2}$ ) à une inhibition (variation extrême ou pathologique) de l'un des complexes OXPHOS. L'effet de seuil phénotypique est caractérisé par le fait que dans

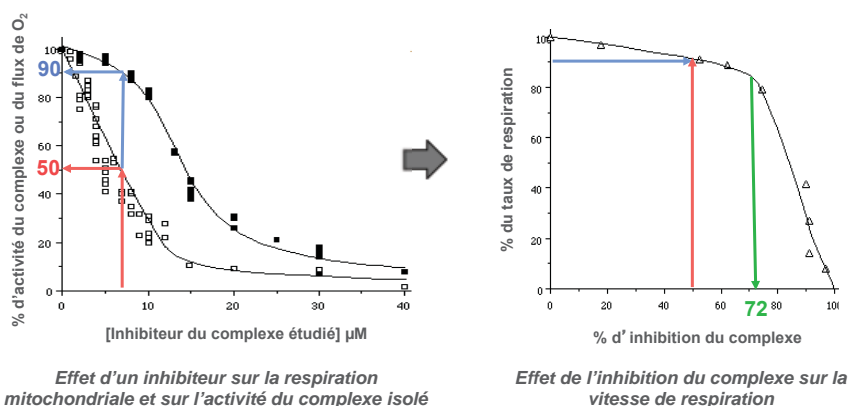
certaines tissus, un niveau élevé de molécules d'ADNmt mutées coexistant avec des molécules d'ADNmt non mutées sans pour autant avoir un effet sur les activités des complexes OXPHOS et conserver un phénotype normal. Cependant, si ce niveau dépasse un seuil spécifique à chaque tissu, une diminution de l'activité des OXPHOS et un phénotype pathologique apparaît.

L'effet de seuil au niveau biochimique se traduit par le fait que l'on peut inhiber l'activité d'un complexe des OXPHOS sans avoir d'effet sur les flux de respiration et de synthèse d'ATP. De précédents travaux, au sein de notre laboratoire ont montré que cet "effet de seuil biochimique" est basé à la fois sur l'existence d'une réserve de macromolécules diverses et sur la possibilité d'une transcompensation mitochondriale. Il a été montré que certains complexes des OXPHOS présentent une réserve d'activité caractérisée par l'existence de complexes inactifs qui peuvent être mobilisés et activés pour compenser une déficience<sup>164,165</sup>.

Par notre modèle, nous avons simulé des courbes d'effet seuil biochimique pour les différents cybrides virtuels, afin de comparer le comportement global ( $\text{JO}_2$ ) des différentes haplogroupes mitochondriales face à des perturbations locales (ex. mutation pathogène), caractérisées par des modifications de la  $V_{\text{max}}$  (aller et retour) ou du  $K_m$  d'un des complexes OXPHOS. Les courbes de seuil consistent à reporter le taux de respiration ( $\text{JO}_2$ ) en fonction du taux d'inhibition du complexe étudié de manière isolé (**Figure 25**). Pour calculer l'inhibition relative du complexe, nous avons utilisé les mêmes concentrations de substrat et de produit, ainsi que la même valeur de  $\Delta\Psi$  obtenue lors des simulations du système OXPHOS global non inhibé et à l'état d'équilibre.

**Figure 25 : Effet de seuil mitochondrial**

La construction des courbes à effet de seuil biochimique consiste à reporter le taux de respiration en fonction (bleu) du taux d'inhibition du complexe (rouge). La valeur seuil correspond au pourcentage d'inhibition (vert) pour le quel le taux de respiration diminue significativement.



## V. Résultats

### 1. Collection de cybrides

Nous avons dans un premier temps souhaité rechercher les principaux haplogroupes européens H, U, J, T et K sur un échantillon de 100 plaquettes afin de nous assurer la mise en évidence d'au moins 3 individus associés à un des haplogroupes d'intérêt.

A ce jour, nous avons réceptionné 70 échantillons. Nous avons recherché la présence de polymorphismes particuliers par RFLP sur l'ensemble de cette population. Ces résultats sont présentés dans le **Tableau 3**. Il a été mis en évidence 35 polymorphismes m.C7028T associés à l'haplogroupe H, corrélés avec la forte fréquence de cet haplogroupe en Europe. Nous avons également mis en évidence 4 polymorphismes m.A4917G. Nous avons détecté 8 polymorphismes m.T14798C dont 2 ont été retrouvés associés au polymorphisme m.G15257A. Ce dernier n'a pas été retrouvé seul.

**Tableau 3 : Polymorphismes d'intérêt**

	Polymorphisme			
	m.T14798C	m.G15257A	m.A4917G	m.C7028T
<b>Echantillonnage</b> n=70	8	2	4	35

Les plaquettes ont été séquencées. Les résultats sont présentés dans le **Tableau 4 (Annexe 7)**. A partir de ces informations, nous avons pu faire une description préliminaire de notre population (n=70). Nous avons pu mettre en évidence 35 haplogroupes H/HV, 3 haplogroupes U, 3 haplogroupes J, 3 haplogroupes T et 3 haplogroupes K. L'objectif initial est atteint (3 individus/haplogroupe). Notre population à l'étude réelle (n=47) correspond uniquement aux haplogroupes HUJTK ; les haplogroupes « Autre » et « NE » (correspond aux échantillons non-exploitable) ne sont pas comptabilisés.

**Tableau 4 : Haplogroupes européens**

	Haplogroupe Européen						
	H/HV	U	J	T	K	Autre	NE
<b>Echantillonnage</b> n=70	35	3	3	3	3	19	4

\*NE = Non exploitable

A partir de ce dépistage, nous avons utilisé les plaquettes d'intérêt afin de construire nos lignées cellulaires, les cybrides. Le nombre et l'identification de ces plaquettes sont présentés en **Tableau 5**. A noter que l'ensemble des plaquettes associées à l'haplogroupe H n'a pas fait l'objet d'un cybride (en regard de sa forte proportion).

**Tableau 5 : Construction des cybrides**

	Haplogroupes d'intérêt				
	H/HV	U	J	T	K
<b>Nombre de cybrides</b>	3	3	3	3	3
<b>Identification</b>	CCP17 CCP23 CCP44	CCP6 CCP12 CCP21	CCP4 CCP26 CCP27	CCP16 CCP46 CCP53	CCP1 CCP3 CCP15

Dans la suite de ce manuscrit, nous avons étudié les cybrides CCP6 (haplogroupe U), CCP15 (haplogroupe K) et CCP23 (haplogroupe HV), en parallèle de la lignée 143B. Les cellules 143B sont les cellules originelles utilisées pour la fusion des cybrides et sont associées à un haplogroupe H. Nous avons donc utilisé cette lignée comme référence pour l'analyse des cybrides.

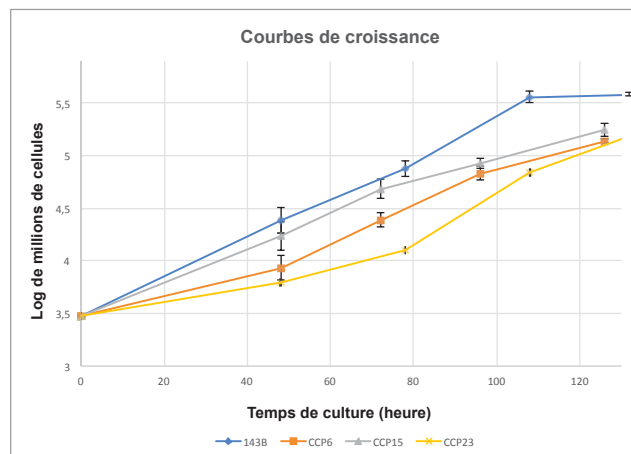
## 2. Courbe de croissance

La caractérisation phénotypique des cybrides CCP6, CCP15, CCP23 et 143B a été effectuée par l'étude de la croissance cellulaire. Les résultats présentés sont préliminaires et devront être étoffés par des analyses complémentaires.

La croissance cellulaire est étudiée en milieu non renouvelé pour les cybrides CCP6, CCP15, CCP23 et les cellules 143B (**Figure 26**). Les courbes de croissances des cellules 143B (H) et CCP15 (K) montrent des profils de croissance similaires, avec un début de croissance plus rapides (sans phase de latence) que les cybrides CCP6 (U) et CCP23 (HV). A noter que la phase stationnaire de croissance est atteinte vers 100 heures de culture pour l'ensemble des cellules malgré un profil d'initiation de croissance différent.

**Figure 26 : Courbes de croissance**

Les données expérimentales ont été exprimées en  $\log(C) = f(t)$  afin de construire les courbes de croissance des cybrides.



A partir de ces courbes de croissance (données logarithmiques), il est possible de calculer le temps de doublement de la population cellulaire dont les résultats sont présentés dans le **Tableau 6**. Ce paramètre est calculé par la formule suivante :

$$t_d = \frac{t \times \log(2)}{\log(C_2) - \log(C_1)}$$

**Tableau 6 : Temps de doublement**

Cybride	Haplogroupe	Temps de doublement Heure
CCP6	U	20,93 ± 0,42
CCP15	K	18,02 ± 1,42
CCP23	HV	16,45 ± 1,64
143B	H	15,17 ± 1,23

En étudiant le temps de doublement, il est possible de regrouper le super-haplogroupe HV et les haplogroupes UK. Les cybrides CCP23 (HV) et les cellules 143B (H) présentent un temps de doublement plus rapide que celui observé dans les haplogroupes U et K. A noter que les cybrides U (CCP6) présentent une variation de temps de croissance allant de 4 à 5 heures plus lent que pour les cybrides CCP23 et les cellules 143B.

### 3. Caractéristique biochimique

La caractérisation biochimique des cybrides CCP6, CCP15, CCP23 et de la lignée 143B a été effectuée par l'étude enzymatique de la chaîne respiratoire. L'ensemble des résultats présentés dans ce rapport sont des résultats préliminaires qui devront être confirmés et étoffés par des analyses complémentaires.

#### 3.1. Détermination de la concentration protéique

Les résultats obtenus lors du dosage des protéines par la méthode de Lowry sont présentés dans le **Tableau 7**. Les concentrations protéiques s'étendent de 6,56mg/mL (CCP15/K) à 7,63mg/mL (143B/H) et montrent une constance de la concentration en protéine totale dans les différents types cellulaires étudiés. L'ensemble de ces résultats ne montre pas de différence significative en terme de concentration protéique entre les cybrides et les cellules 143B.

**Tableau 7 : Concentrations protéiques**

Cybride	Haplogroupe	Concentration protéique mg/mL
CCP6	U	6,59 ± 0,41
CCP15	K	6,56 ± 0,23
CCP23	HV	6,94 ± 0,02
143B	H	7,63 ± 0,48

Ce résultat montre qu'il n'y a pas d'effets notoires de la construction des cybrides sur ce paramètre (absence d'« effet cybride ») et qu'il n'y a pas non plus de variation en fonction des haplogroupes (absence d'« effet haplogroupe »). Cependant la concentration en protéine étant un paramètre général de la cellule, nous avons utilisé un marqueur spécifique de la masse mitochondriale.

### 3.2. Détermination de la masse mitochondriale

La citrate synthase est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs permettant d'évaluer la masse mitochondriale. Les activités de la citrate synthase des différents cybrides sont résumées dans le **Tableau 8** et s'étendent de 88,11 nmol/min/mg (CCP15/K) à 124,91 nmol/min/mg (CCP23/H). Il est possible de distinguer deux groupes : CCP15/143B et CCP6/CC23. Les cybrides CCP6 et CCP23 montrent une activité CS plus élevée par rapport aux cellules 143B, traduisant une masse mitochondriale plus importante (i.e. nombre de mitochondries par cellule plus élevé).

**Tableau 8 : Masse mitochondriale**

Cybride	Haplogroupe	Citrate Synthase nmol/min/mg
CCP6	U	102,54 ± 3,27
CCP15	K	88,11 ± 4,91
CCP23	HV	124,91 ± 7,07
143B	H	82,75 ± 1,29

Il est à noter que l'activité de la citrate synthase reflète les adaptations du nombre de mitochondrie au métabolisme de la cellule et que ce paramètre doit être interprété au regard des activités des complexes OXPHOS.

### 3.3. Détermination des paramètres cinétiques du complexe I

Les activités (vitesses initiales) du complexe I ont été mesurées pour différentes concentrations en substrats (NADH, Co-Q) et produits (NAD, Co-QH<sub>2</sub>) par spectrophotométrie en suivant l'absorbance du NADH à 340nm. Les courbes générées sont du type  $v_{CI} = f([S])$  et  $v_{CI} = f([P])$ . Celles-ci sont ensuite utilisées pour déterminer les paramètres du modèle cinétique choisi pour le complexe I.

Pour obtenir le meilleur résultat, les paramètres cinétiques ont été ajustés en même temps sur l'ensemble des courbes de variation de substrats et produits avec l'équation du modèle « Random Binding » (Eq. C<sub>1</sub>).

Pour chaque cybride, le jeu de paramètres (K<sub>m</sub> et V<sub>max</sub>) qui décrit le mieux les données expérimentales (vitesses initiales) a été retenu. Les courbes théoriques ainsi que les points expérimentaux sont illustrés en **Figure 27 et 28**, les paramètres cinétiques obtenus sont résumés dans le **Tableau 9**.

**Tableau 9 : Paramètres cinétiques du complexe I**

Cybride	Haplogroupe	Protéine mg	CS nmol/min/mg	KM NADH μM	KM NAD μM	KM Co-Q μM	KM Co-QH <sub>2</sub> μM	Vmax CI nmol/min/mg	Vmax CI/CS nmol/min/mg
CCP6	U	6,59 ± 0,41	102,54 ± 3,27	4,96	4,80	4,57	2,57	42,85	0,42
CCP15	K	6,56 ± 0,23	88,11 ± 4,91	7,80	25,50	5,62	3,68	32,17	0,37
CCP23	HV	6,94 ± 0,02	124,91 ± 7,07	6,58	11,18	2,60	1,43	36,34	0,29
143B	H	7,63 ± 0,48	82,75 ± 1,29	7,48	16,72	6,46	3,88	35,28	0,43

En comparant les résultats des cybrides avec ceux obtenus sur les cellules 143B, nous avons constaté de très faibles variations sur les valeurs de chaque paramètre. En effet, les cybrides CCP6 (U) montrent les K<sub>m</sub><sub>NADH</sub> et K<sub>m</sub><sub>NAD</sub> les plus faibles, ainsi qu'une diminution légère des K<sub>m</sub><sub>Co-Q</sub> et K<sub>m</sub><sub>Co-QH<sub>2</sub></sub>, correspondant à une augmentation d'affinité pour tous les substrats et produits. Etant dépendante de la concentration du substrat et du produit, le changement de l'affinité peut être bénéfique ou désavantageux. Pour ces cellules, l'effet serait plutôt négatif aux vues (i) du K<sub>m</sub><sub>NAD</sub> qui est relativement plus diminué que le K<sub>m</sub><sub>NADH</sub> et que (ii) la masse mitochondriale est augmentée ; signe d'une tentative de compensation. Cependant, ces observations sur les cybrides CCP6 doivent donc être réanalysées dans un contexte plus globale et sous des états différents (physiologique, état 3, état 4, etc.).

Les cybrides CCP15 (K) présentent des valeurs très proches de celles des cellules 143B, seul le K<sub>m</sub><sub>NAD</sub> est un peu plus élevé. Cette affinité diminuée pour le produit NAD peut être bénéfique pour l'activité du complexe I, ce qui pourrait expliquer la valeur légèrement plus faible de l'activité du complexe I normalisée par la masse mitochondriale, probablement causé par un faible nombre de complexe I.

Les K<sub>m</sub> obtenus pour le CCP23 (H) sont globalement plus faibles que ceux observés pour les cellules 143B, les K<sub>m</sub><sub>NADH</sub> et K<sub>m</sub><sub>NAD</sub> qui sont légèrement diminués alors que la

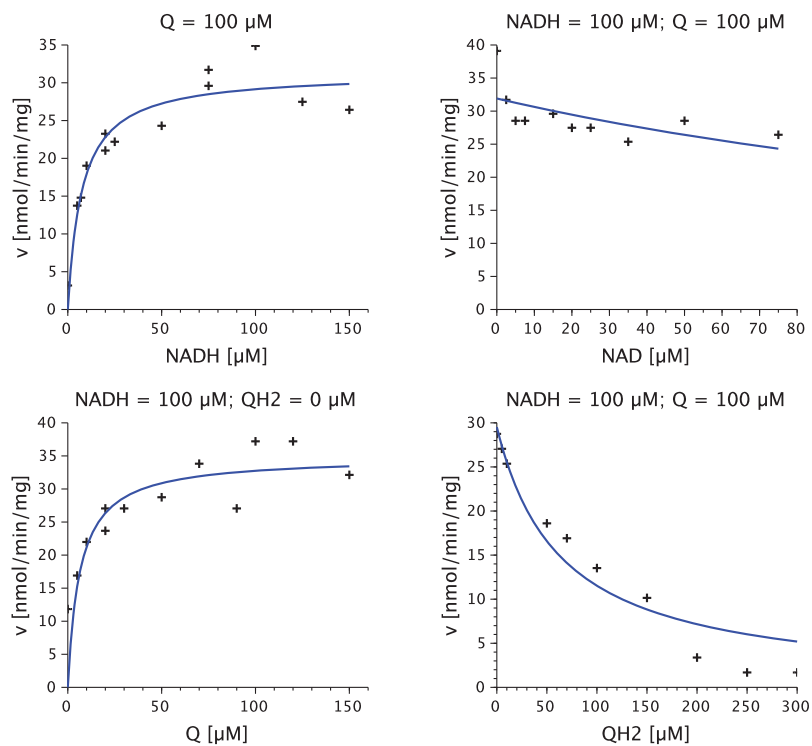
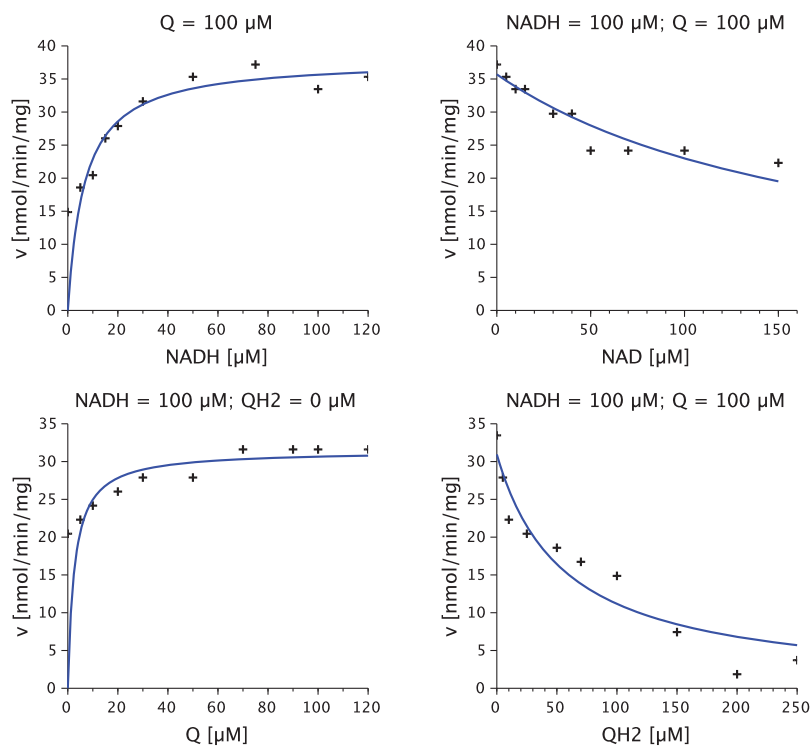
diminution des  $K_{m_{Co-Q}}$  et un  $K_{m_{Co-QH_2}}$  est plus prononcée. De plus, la  $V_{max} C_i/CS$  est diminuée par rapport aux cellules 143B. Cependant, elle est compensée par une masse mitochondriale plus forte, ramenant la  $V_{max}$  normalisée par la masse des protéines cellulaires au niveau des cellules 143B.

Il est à remarquer, que pour tous les cybrides, le rapport  $K_{m_{Co-Q}}/K_{m_{Co-QH_2}}$  est quasi le même, avec une valeur allant de 1,5 à 1,8. Il est étonnant que l'affinité de complexe I pour le produit  $Co-QH_2$  soit globalement plus élevée que pour le substrat  $Co-Q$ , confirmant ce qui a été trouvé auparavant pour les mitochondries de cœur en utilisant également le modèle « Random Binding »<sup>153</sup>. Ce rapport pourrait jouer un rôle régulateur par rapport à l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire au niveau des complexes I et complexes II. Ces derniers ont été montrés pour les mitochondries de cœur, les  $K_{m_{Co-Q}}$  et  $K_{m_{Co-QH_2}}$  sont dans le même ordre de grandeur, mais le rapport étant inversé.

Les résultats des paramètres cinétiques sont préliminaires et sont à confirmer par des analyses expérimentales complémentaires. L'ensemble de ces paramètres cinétiques obtenus sur le complexe I pour chaque cybride a été intégré au modèle OXPHOS pour la construction de cybrides virtuels, par lequel il est possible de prédire si les variations observées sur les haplogroupes H, HV, U et K peuvent modifier le métabolisme mitochondrial. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le paragraphe « 4. Cybrides virtuels ».

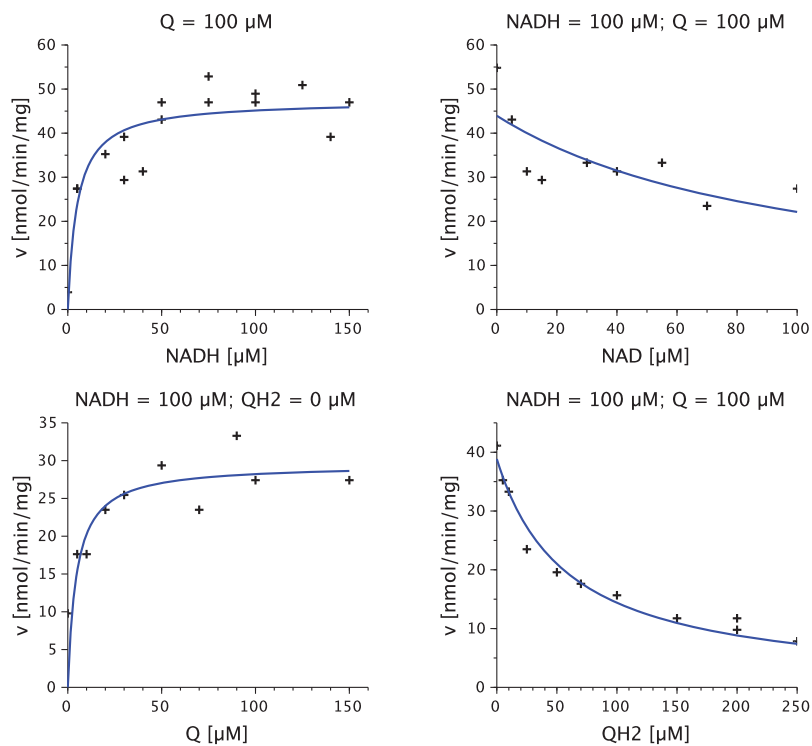
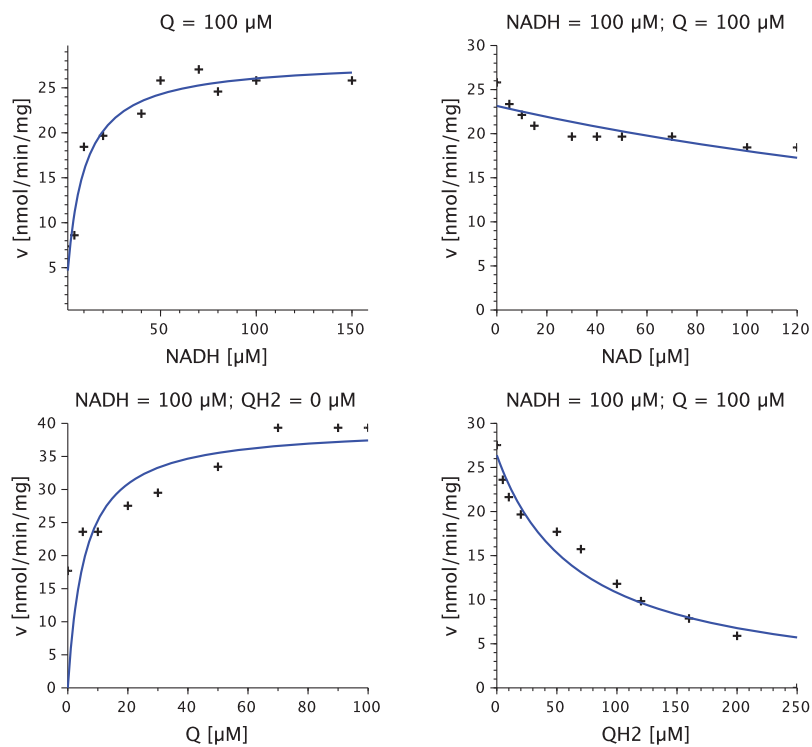
**Figure 27 : Courbes théoriques pour le complexe I (143B et CCP23)**

Les points expérimentaux (vitesses initiales) sont indiqués par un « + ». La courbe théorique optimale (bleue) représente le meilleur jeu de paramètre pour le modèle cinétique du complexe I.

**Cellules 143B (H)****Cybride CCP23 (HV)**

**Figure 28 : Courbes théoriques pour le complexe I (CCP6 et CCP15)**

Les points expérimentaux (vitesses initiales) sont indiqués par un « + ». La courbe théorique optimale (bleue) représente le meilleur jeu de paramètre pour le modèle cinétique du complexe I.

**Cybride CCP6 (U)****Cybride CCP15 (K)**

### 3.4. Détermination des paramètres cinétiques du complexe IV

Les activités (vitesses initiales) du complexe IV ont été mesurées pour différentes concentrations en substrat (cytochrome c réduit) et produit (cytochrome c oxydé) par spectrophotométrie en suivant l'absorbance du cytochrome c réduit à 550nm. Les courbes générées sont du type  $v_{CIV} = f([S])$  et  $v_{CIV} = f([P])$ . Celles-ci sont ensuite utilisées pour déterminer les paramètres du modèle cinétique choisi pour le complexe IV.

Pour obtenir le meilleur résultat, les paramètres cinétiques ont été ajustés en même temps sur l'ensemble des courbes de variation de substrats et produits avec l'équation du modèle « Random Binding » (Eq. C<sub>IV</sub>).

Comme pour le complexe I, le jeu de paramètres (K<sub>m</sub> et V<sub>max</sub>) qui décrit le mieux les données expérimentales (vitesses initiales) a été retenu pour chaque cybride. Les courbes théoriques ainsi que les points expérimentaux sont illustrés en **Figure 29 et 30**, les paramètres cinétiques obtenus sont résumés dans le **Tableau 10**.

**Tableau 10 : Paramètres cinétiques du complexe IV**

Cybride	Haplogroupe	Protéine mg	CS nmol/min/mg	KM Cyt c RED μM	KM Cyt c OX μM	Vmax CIV nmol/min/mg	Vmax CIV/CS nmol/min/mg
CCP6	U	6,59 ± 0,41	102,54 ± 3,27	21,09	172,44	28,97	0,28
CCP15	K	6,56 ± 0,23	88,11 ± 4,91	21,96	95,96	31,55	0,36
CCP23	HV	6,94 ± 0,02	124,91 ± 7,07	23,79	327,54	65,37	0,52
143B	H	7,63 ± 0,48	82,75 ± 1,29	18,77	401,78	37,75	0,46

En comparant les résultats des cybrides avec ceux obtenus sur les cellules 143B, nous constatons un K<sub>m</sub><sub>Cyt RED</sub> légèrement élevé pour les cybrides CCP6 et CCP15, et un peu plus élevé encore pour les cybrides CCP23.

Les variations de K<sub>m</sub><sub>Cyt OX</sub> sont beaucoup plus prononcées. Il est possible de distinguer deux groupes : CCP23/143B et CCP6/CCP15. Les cybrides CCP6 (U) présentent des valeurs de K<sub>m</sub><sub>Cyt OX</sub> deux fois moins élevées et le K<sub>m</sub><sub>Cyt OX</sub> des cybrides CCP15 (K) est encore plus diminué que ceux obtenus sur les cybrides CCP23 (HV) et les cellules 143B (H). Leurs V<sub>max</sub><sub>CIV/CS</sub> sont significativement plus faibles que celles des cellules 143B. Cependant, les cybrides CCP15 ne semblent pas ou peu compenser par leur masse mitochondriale par rapport aux cybrides CCP6 qui possèdent une masse mitochondriale plus importante. Malgré cela, la compensation n'est pas totale car elle mène à une activité du complexe IV significativement plus faible par rapport aux cellules 143B. Selon ces résultats, il semblerait que les cybrides CCP6 (U) et CCP15 (K) présentent une activité du complexe IV plus faible au niveau cellulaire mais cela reste dans les normes physiologiques.

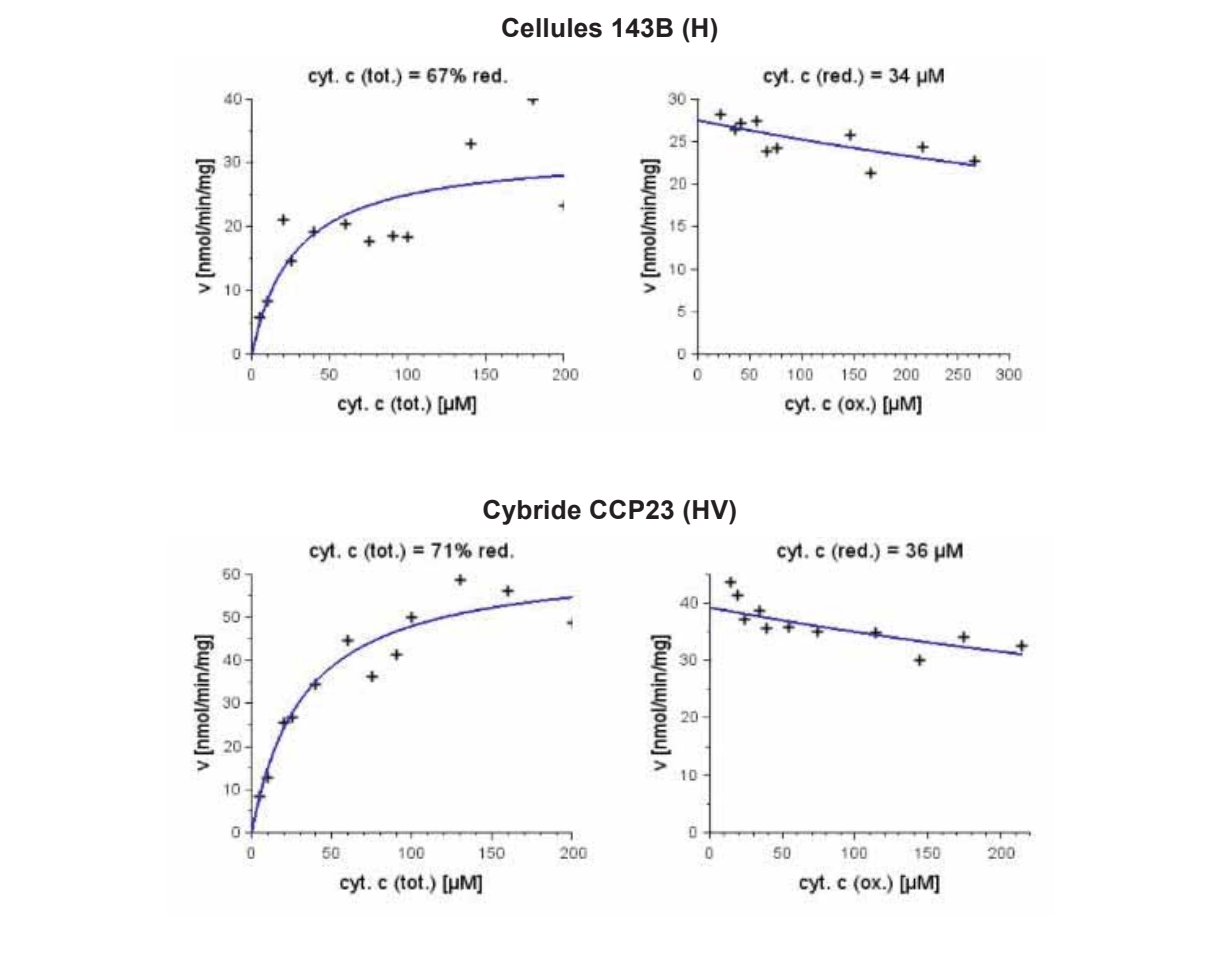
Les cybrides CCP23 montrent une V<sub>max</sub><sub>CIV</sub> très élevée au niveau cellulaire qui est

due à une masse mitochondriale élevée. Comme expliqué plus haut, celle-ci est nécessaire pour compenser la vitesse faible du complexe I au niveau mitochondriale, à un niveau cellulaire comparable aux cellules 143B.

Les résultats des paramètres cinétiques sont préliminaires et sont à confirmer par des analyses expérimentales complémentaires. L'ensemble de ces paramètres cinétiques obtenus sur complexe IV pour chaque cybride a été intégré au modèle OXPHOS pour la construction de cybrides virtuels, par lequel il est possible de prédire si les variations observées sur les haplogroupes H, HV, U et K peuvent modifier le métabolisme mitochondrial. Les résultats de cette analyse sont présentés dans le paragraphe « 4. Cybrides virtuels ».

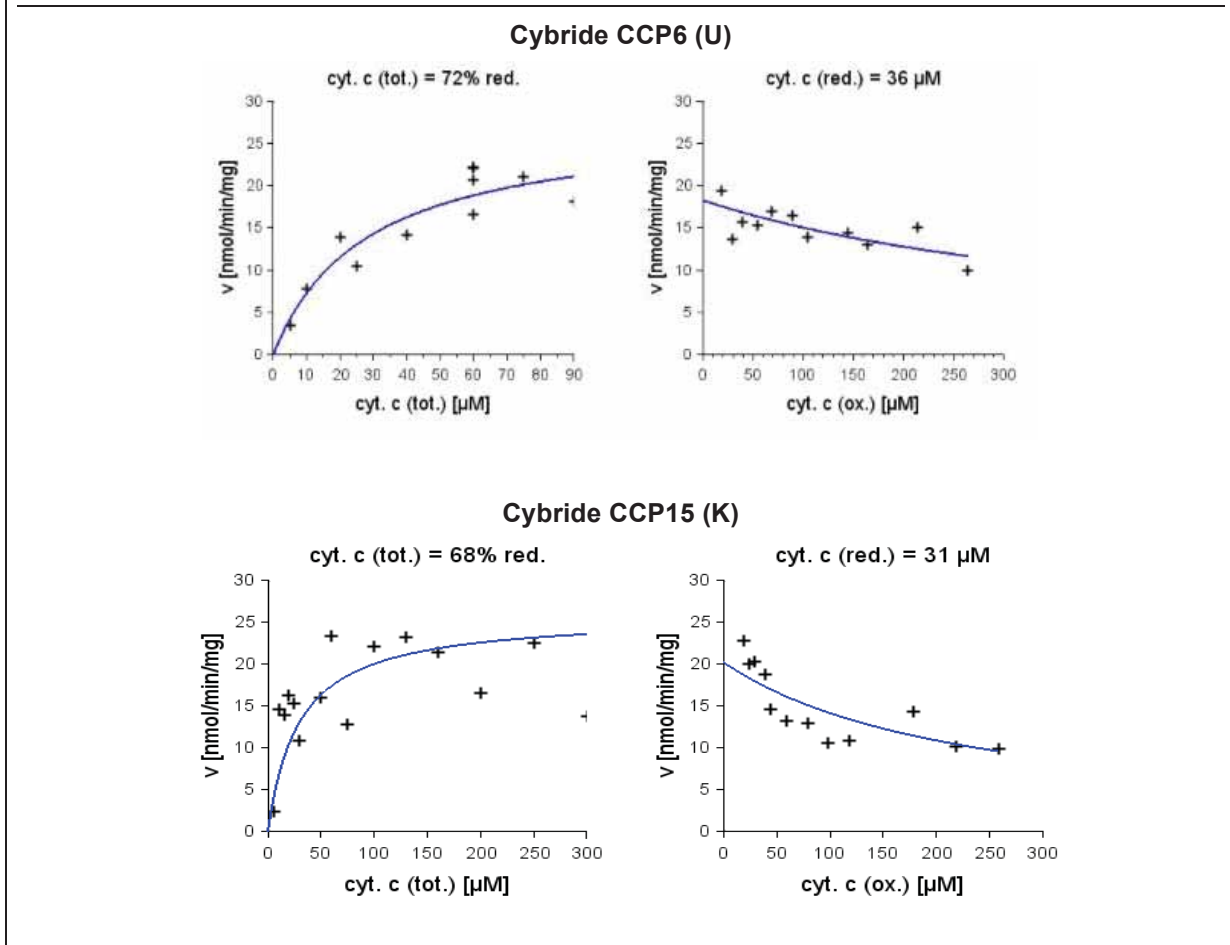
**Figure 29 : Courbes théoriques pour le complexe IV (143B et CCP23)**

Les points expérimentaux (vitesses initiales) sont indiqués par un « + ». La courbe théorique optimale (bleue) représente le meilleur jeu de paramètre pour le modèle cinétique du complexe I.



**Figure 30 : Courbes théoriques pour le complexe IV (CCP6 et CCP15)**

Les points expérimentaux (vitesses initiales) sont indiqués par un « + ». La courbe théorique optimale (bleue) représente le meilleur jeu de paramètre pour le modèle cinétique du complexe I.

**4. Cybrides virtuels**

Nous avons construit des « cybrides virtuels » en intégrant au sein d'un modèle mathématique d'OXPHOS développé dans notre laboratoire, les paramètres cinétiques obtenus pour les complexes I et IV sur les cellules 143B et les cybrides CCP6, CCP15 et CCP23. Il s'agit là de la première version de cybrides virtuels. Ces résultats sont préliminaires et devront être confirmés et affinés par des analyses expérimentales complémentaires sur les cybrides afin d'éprouver et d'alimenter ce modèle de mitochondrie de manière plus exhaustive. En effet, tous les paramètres, autres que ceux du complexe I et IV, ne proviennent pas de nos cybrides mais sont issue des mitochondries du cœur (bovine et porcine), sur lequel le modèle original d'OXPHOS a été précédemment paramétré.

Sachant cela, notre objectif dans le cadre de cette thèse est d'évaluer la capacité de ces cybrides virtuels à simuler le comportement global du système OXPHOS ( $JO_2$ ,  $J_{ATP}$ ,  $\Delta\Psi$ , etc.) et de mettre en évidence des différences dues à des variations locales apportés par les haplogroupes testés (H, HV, U et K), en intégrant les valeurs des paramètres cinétiques

préalablement définis. Cela apportera également une première indication de l'effet potentiel des cybrides CCP6, CCP15 et CCP23 sur le métabolisme mitochondrial. Nous avons donc analysé des paramètres essentiels des OXPHOS ( $JO_2$ ,  $J_{ATP}$ ,  $\Delta\Psi$ ) à l'état de respiration 3 et 4, ainsi que des relations flux-force et les effets seuils biochimiques.

#### 4.1. Etude des paramètres essentiels des OXPHOS

Pour l'ensemble des cybrides virtuels CCP6, CCP15 et CCP23 ainsi pour le 143B virtuel, nous avons étudié les paramètres essentiels des OXPHOS ( $JO_2$ ,  $J_{ATP}$ ,  $\Delta\Psi$ ) en simulant les états respiratoires 3 et 4. Ces simulations intègrent les paramètres cinétiques des complexes I et IV préalablement définis par les équations du complexe I (Eq.  $C_I$ ) et IV (Eq.  $C_{IV}$ ), faisant partie du modèle OXPHOS. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous dans le **Tableau 11**.

**Tableau 11 : Prédiction du  $JO_2$ ,  $J_{ATP}$  et  $\Delta\Psi$  à l'état 3 et 4**

Cybride	Haplogroupe	$JO_2$ - Etat 3 nmol $O_2$ /min/mg	$JO_2$ - Etat 4 nmol $O_2$ /min/mg	$J_{ATP}$ - Etat 3 nmol ATP/min/mg	$\Delta\Psi$ - Etat 3 mV	$\Delta\Psi$ - Etat 4 mV
143B	H	68,74	20,92	363,26	163,31	203,87
CCP6	U	52,33	15,31	275,64	160,18	198,31
CCP15	K	56,11	14,22	295,83	160,99	197,00
CCP23	HV	64,66	19,89	341,48	162,61	202,97

Les résultats prédits par le modèle OXPHOS mettent en évidence deux groupes : 143B/CCP23 et CCP6/CCP15. Ces derniers présentent les valeurs les plus faibles en terme de taux respiratoire ( $JO_2$  à l'état 3 et 4), de vitesse de génération d'ATP ( $J_{ATP}$  à l'état 3) et de potentiel de membrane ( $\Delta\Psi$  à l'état 3). Ces résultats confirment les hypothèses sur la répercussion d'une activité cytochrome oxydase plus faible pour CCP6/CCP15 sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Il est à noter que les variations attendues dues aux haplogroupes sont faibles et dans la limite de la normale (non pathogénique).

#### 4.2. Etude de la relation flux-force

Pour l'ensemble des cellules virtuelles CCP6, CCP15, CCP23 et 143B, nous avons simulé des relations flux-force ( $JO_2$  vs  $\Delta\Psi$ ) dans des conditions normales et extrêmes, en variant l'apport de substrat de la chaîne respiratoire, le découplage des OXPHOS, la concentration d'ADP et l'activité de la synthase d'ATP. L'interprétation particulière de cette courbe est rappelée en **Figure 31a**.

Nous avons étudié les relations flux-force de ces cellules virtuelles sous trois conditions : (i) en intégrant dans le modèle OXPHOS uniquement les paramètres du complexe I, (ii) en intégrant uniquement ceux du complexe IV et finalement (iii) en intégrant les paramètres des deux complexes.

La variation de l'apport en substrat respiratoire est représentée par la variation de la constante de vitesse de la déshydrogénase (DH), qui correspond à une simplification du cycle de Krebs. Les résultats montrent que les quatre cellules virtuelles présentent la même relation flux-force pour l'état 3 et l'état 4, suivant une forme exponentielle typiquement trouvée dans des expériences similaires<sup>166</sup>. A noter cependant que pour les quatre cellules virtuelles, les niveaux de flux-force sont différents alors que l'activité de la DH est la même. Autrement dit, l'activité de la DH est modulée pour arriver au même niveau flux-force dans les quatre cellules virtuelles. Ceci indique qu'un léger déficit d'un des complexes OXPHOS pourrait être compensé par une activité DH forte (i.e. une activité du cycle de Krebs forte). Pour la suite de nos analyses, la valeur de l'activité DH attribuée à l'état 3 et 4 est normale ( $k_{f,DH} = 0,0184$ ).

L'analyse de la relation flux-force intégrant uniquement les paramètres cybrides du complexe I (**Figure 31b**) montre que la respiration et le potentiel de membrane des cybrides virtuels CCP6 sont plus faibles à l'état 3 comparés aux cybrides virtuels CCP15, CCP23 et les cellules 143B, qui présentent un profil de relation flux-force similaire. En comparant ces résultats avec les valeurs des paramètres cinétiques du complexe I présentée dans le **Tableau 9**, il est possible de relier le faible  $K_{m_{NAD}}$  du CCP6 comme cause principale du faible rapport de flux-force de ce cybride. A l'état 4, il n'y a pas de différence en terme de respiration et de potentiel de membrane, ce qui se caractérise par une marge plus petite entre l'état 3 et l'état 4 pour les cybrides CCP6. Pour l'ensemble des cellules virtuelles, la relation flux-force est quasi linéaire entre l'état 3 et le découplage total, indiquant ici que même les très petites variations du potentiel de membrane ont encore un impact sur le taux de respiration.

En intégrant uniquement les données du complexe IV dans le modèle (**Figure 31c**), les taux respiratoires à l'état 3 et pendant la variation du découplage sont augmentés alors que les taux respiratoires à l'état 4 sont généralement plus faibles, en particulier pour CCP15 et CCP6. Ici, les changements du  $\Delta\Psi$  sont très faibles à l'état 3 et l'état 4 (<3mV), à l'exception de CCP15 et CCP23 qui montrent une diminution du  $\Delta\Psi$  de 7mV. Il est possible de distinguer 2 groupes : les cybrides CCP15 (K) et CCP6 (U) présentent une respiration et un  $\Delta\Psi$  similaires à l'état 3, plus faible que pour les cybrides CCP23 (HV) et les cellules 143B (H). A l'état 4, ces 2 groupes sont également retrouvés avec des taux de respiration et de  $\Delta\Psi$  élevés pour les cybrides CCP23 (HV) et les 143B (H).

Ce classement en deux groupes correspond au classement que nous avons déjà mis en évidence lors de l'analyse des paramètres cinétiques du complexe IV pour les différentes cellules virtuelles. Contrairement à la simulation précédente (complexe I seul), en découplant à partir de l'état 3, le plafond de  $JO_2$  est atteint vers 100mV pour l'ensemble des cellules, indiquant que, en dessous de 100mV, l'influence du  $\Delta\Psi$  sur le taux respiratoire devient négligeable.

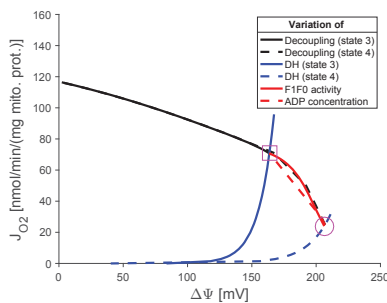
En intégrant les données des complexes I et IV dans le modèle OXPHOS (**Figure**

**31d)**, nous retrouvons une combinaison des résultats trouvés dans les deux simulations précédentes. En effet, pour un potentiel membranaire  $<100\text{mV}$ , la dépendance quasi linéaire  $\text{JO}_2 = f(\Delta\Psi)$  observée lors de la simulation avec le complexe I seul est retrouvée, ainsi que des respirations plus faibles lors du découplage et à l'état 3. Comme pour les simulations intégrant les données du complexe IV seul, la dichotomie 143B/CCP23 et CCP6/CCP15 est retrouvée à l'état 3 et l'état 4.

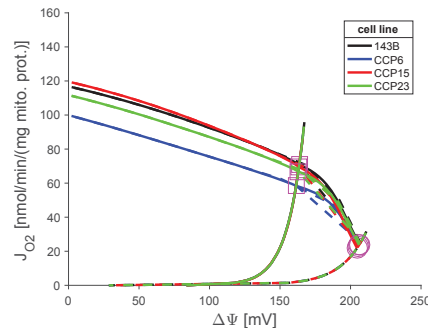
**Figure 31 : Relation flux-force**

Les relations flux-force des cellules virtuelles ont été simulées sous différentes conditions (découplage, variation de substrats respiratoires, variation de la concentration d'ADP et de l'activité de l'ATP synthase). Les carrés et cercles roses indiquent l'état 3 et l'état 4 de la respiration correspondant à l'activité de référence de la réaction dehydrogenase ( $k_f, \text{DH} = 0,0184$ ).

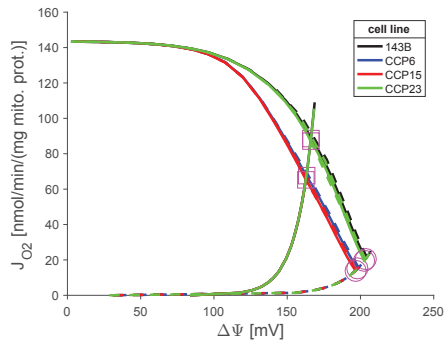
**a) Interprétation (courbe modèle)**



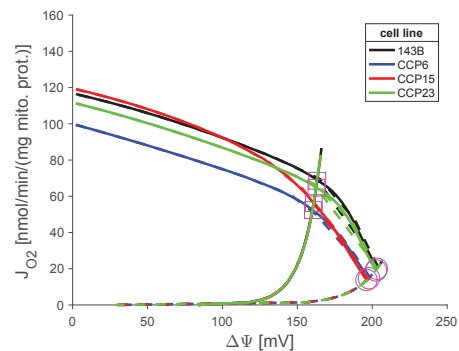
**b) Complexe I seul**



**c) Complexe IV seul**



**d) Complexes I+IV combinés**



Ces résultats montrent que le comportement de la  $\text{JO}_2$  et du  $\Delta\Psi$  face à une variation des fonctions mitochondriales est différent selon l'haplogroupe étudié. Il est également intéressant de remarquer que dans ces simulations, les haplogroupes génétiquement proches présentent des profils de flux-force similaires :  $\text{H} \approx \text{HV}$  et  $\text{U} \approx \text{K}$ .

Bien que la plupart des paramètres utilisés pour cette modélisation ne sont pas issus de nos cybrides (mitochondries de cœur), nous avons pu montrer que de petites différences sur les cinétiques des complexes I et IV ( $V_{\text{max}}$ ,  $K_m$ ) apportées par les haplogroupes peuvent mener à un comportement global ( $\text{JO}_2$ ,  $\Delta\Psi$ ) différent. Le modèle prédit aussi que

dans des conditions normales, ces différences pourraient être compensées (partiellement) par d'autres composants du système OXPHOS, comme une activité augmentée du cycle de Krebs (activité de la DH). Cependant, face à une variation extrême ou pathologique localisée sur la chaîne respiratoire, et selon l'haplogroupe, la capacité de compensation de la physiologie mitochondriale pourrait être différente.

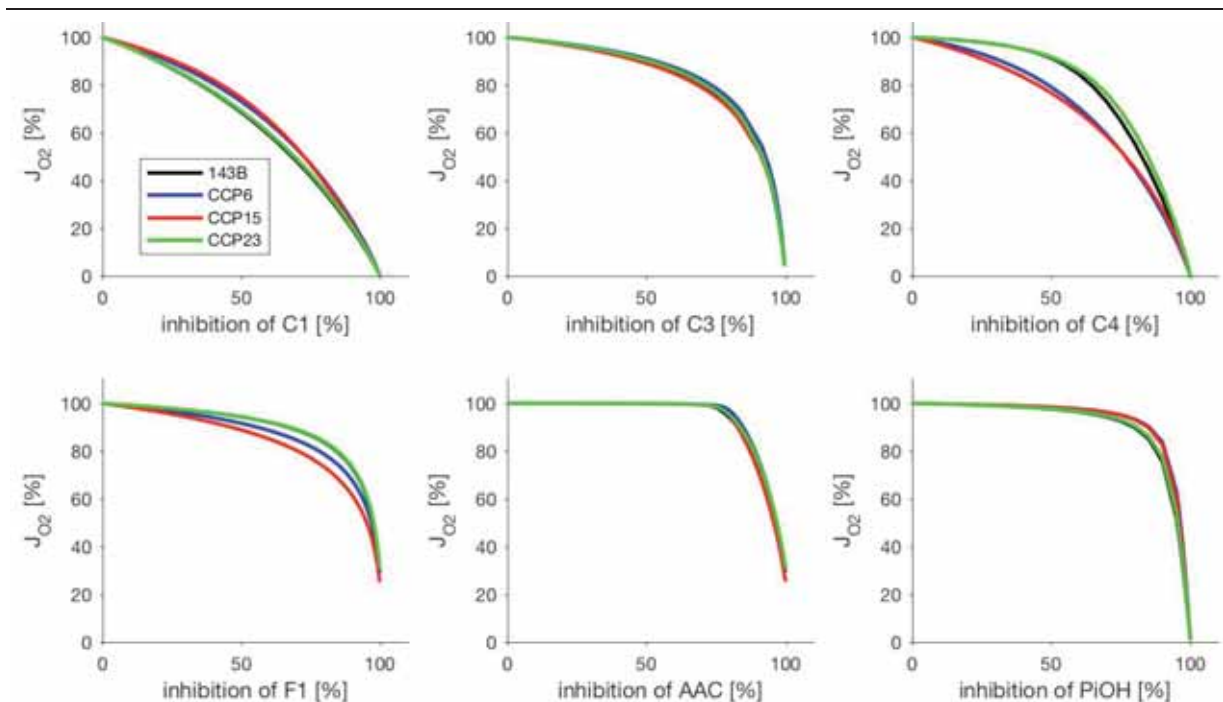
#### 4.3. Etude de l'effet de seuil

Nous avons simulé et comparé les courbes de seuil biochimique des cellules virtuelles. Ces courbes décrivent de manière générale, la réaction de la respiration mitochondriale (flux global à travers les OXPHOS) face à des perturbations locales. Pour cela, nous avons choisi d'analyser le taux respiratoire ( $J_{O_2}$ ) en réponse à des concentrations différentes d'inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire (**Figure 32**).

A la vue des résultats de l'analyse des relations flux-force, nous avons choisi de présenter les courbes de seuil biochimique correspondant au modèle intégrant les paramètres des complexes I+IV combinés.

**Figure 32 : Effet de seuil biochimique**

Les courbes de seuil consistent à reporter le taux de respiration ( $J_{O_2}$ ) en fonction du taux d'inhibition du complexe étudié (Complexe I, III, IV, ATP synthase, AAS et antiport  $PiOH$ ) de manière isolée. Pour calculer l'inhibition relative du complexe, nous avons utilisé les mêmes concentrations de substrat et de produit, ainsi que la même valeur de  $\Delta\Psi$  obtenue lors des simulations du système OXPHOS global non inhibé et à l'état d'équilibre.



La courbe de seuil du complexe I montre que le  $J_{O_2}$  de l'ensemble des cellules

virtuelles est très sensible à une inhibition du complexe I. En effet, les répercussions de l'inhibition du complexe I sont quasi linéaires sur la respiration ( $JO_2$ ), par exemple la respiration mitochondriale est diminuée de 30% lorsque 50% du complexe I est inhibée. Ceci montre que le complexe I contrôle fortement la  $JO_2$  de ces cellules virtuelles.

Bien que la comparaison des courbes montrent de très faibles différences de  $JO_2$  entre les cellules virtuelles, nous retrouvons toutefois la même dichotomie que pour les analyses de la relation flux-force : 143B/CCP23 et CCP6/CCP15, ces deux dernières ayant un contrôle légèrement plus fort. Malgré son rôle essentiel dans la chaîne respiratoire (entrée des électrons), le complexe I ne semble pas être présent en abondance dans les mitochondries pour compenser les variations qui lui sont appliquées, et les complexes OXPHOS ne semblent pas compenser l'inhibition du complexe I (sans augmenter l'abondance des autres complexes OXPHOS). Cependant, ces résultats doivent être modulés par le fait que les paramètres des autres composants de notre modèle (à l'exception du complexe IV) et notamment l'apport en substrat sont encore adaptés aux mitochondries de cœur de bœuf et ne reflètent pas la composition réelle des cybrides.

Les courbes de seuil du complexe III sont similaires pour l'ensemble des cellules virtuelles et présentent un seuil fort, c'est à dire que, avec un taux d'inhibition de 50% du complexe III, la  $JO_2$  n'est diminuée que de 10%. La similarité des courbes peut être expliquée par le fait que toutes les cellules virtuelles possèdent les mêmes paramètres du complexe III (celles des mitochondries du cœur) et que leur capacité de compensation face à une perturbation du complexe III est comparable pour toutes les cellules virtuelles.

La dichotomie 143B/CCP23 et CCP6/CCP15 est retrouvée au niveau des courbes de seuil du complexe IV. Les simulations montrent un seuil d'inhibition significativement différent au niveau de ce complexe. Selon ces observations, la respiration mitochondriale est réduite de 10% dès 20% d'inhibition du complexe IV pour les cybrides CCP6 (U) et CCP15 (K) alors que la respiration des cybrides CCP23 (HV) et des cellules 143B (H) est diminuée de 10% seulement dès 50% d'inhibition. Cela signifie que les cybrides CCP6 (U) et CCP15 (K) sont plus sensibles à un dysfonctionnement du complexe IV que les autres cellules étudiées.

Pour les courbes de seuil de l'ATP synthase, il est également possible de regrouper les cellules 143B et les cybrides CCP23. Les deux courbes sont superposées et présentent une  $JO_2$  de 95% lorsque 50% de l'ATP synthase est inhibée. Les cybrides CCP15 sont les plus sensibles, avec une  $JO_2$  à 90% lorsque 50% de l'ATP synthase est inhibée. Les cybrides CCP6 présentent un seuil intermédiaire entre les cellules CCP23/143B et les cybrides CCP15. A noter que les courbes de seuil de l'ATP synthase et l'échangeur ADP/ATP (AAC) n'atteignent pas une  $JO_2$  nulle lorsque l'enzyme est inhibée à 100%. Cette  $JO_2$  correspond à la respiration à l'état 4, alimentée par la fuite des protons à travers la membrane interne.

Les courbes de seuil de l'AAC et de l'échangeur  $Pi/OH$  ( $PiOH$ ) sont très similaires pour les cybrides et les cellules 143B virtuelles, montrant un seuil très fort, avec une  $JO_2$

supérieure à 90% malgré une inhibition de 75% de l'AAC et du PiOH.

Les résultats obtenus sur le complexe IV montrent que les seuils peuvent varier de manières significatives entre les différentes cellules virtuelles testées. Ces observations rejoignent celles obtenues lors de l'analyse des relations flux-force à savoir que les haplogroupes génétiquement proches présentent un profil similaire :  $H \approx HV$  et  $U \approx K$ .

A travers ces deux types d'analyses du système OXPHOX (relations flux-force et courbes à effet de seuil biochimique), nous avons pu montrer qu'il est difficile de conclure, seulement à partir des changements des paramètres cinétiques, leurs impacts au niveau de la physiologie globale (comme le  $JO_2$  et le  $\Delta\Psi$ ). Pour cela, les cybrides virtuels sont des outils très précieux qui prennent en compte l'intégrité et la dynamique du système OXPHOS. Cela permet ainsi de prédire et d'analyser les effets d'un changement sur les paramètres cinétiques au niveau de l'activité globale des OXPHOS. Bien sûr, ces résultats théoriques devraient être confirmés expérimentalement comme par exemple pour la mesure de la respiration mitochondriale par polarographie ou la synthèse d'ATP sur ces cybrides.

Ce constant va-et-vient entre mesures expérimentales-paramétrage-modélisation-simulation devrait nous permettre, à court terme, de disposer d'un modèle fiable permettant de tester différentes hypothèses sur l'ensemble des cybrides virtuels (ex. effet de mutation pathologique, effet d'admixture etc.). Ainsi, la modélisation permettrait de « combler des déficits » par rapport aux approches expérimentales.

## 5. Etude préliminaire sur l'haplogroupe J : évaluation structurale de l'impact des polymorphismes m.T14798C et m.G15257A sur le complexe III

Un autre type d'approche in silico est l'analyse structurale des différents complexes des OXPHOS. En effet, certains logiciels permettent, lorsque l'on dispose de la structure cristallographique du complexe, de visualiser l'influence d'une mutation ou d'un polymorphisme sur la structure du complexe et donc de faire des hypothèses sur des changements éventuels de son activité. Pour cela nous avons visualisé et modifié la structure cristallographique du complexe III de mammifère dont la référence est 1NTZ dans la banque PDB et grâce au logiciel PyMol<sup>146,147</sup>.

Le polymorphisme m.T14798C (p.MT-CYB:Phe18Leu) remplace une phénylalanine (jaune) par une leucine (rouge) en position 18 (**Figure 33a**). Il est situé dans le cytochrome b, et plus précisément à l'entrée du site de fixation de Co-Q, le site  $Q_i$ . Par comparaison avec la forme non-mutée du cytochrome b, nous avons pu voir que l'encombrement stérique de la leucine est moins important que celui de la phénylalanine de la forme non-mutée. Par conséquent, l'entrée de la cavité du site  $Q_i$  semble plus ouverte.

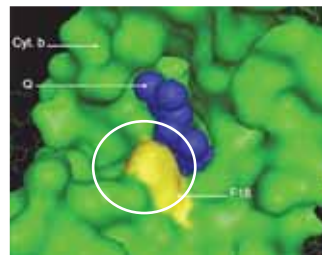
Le polymorphisme m.G15257A (p.MT-CYB:Asp171ASn) remplace une aspartate (jaune) par une asparagine (rouge) en position 171. Il est situé dans le cytochrome b, et plus

précisément à proximité bras de la protéine Rieske (turquoise) (**Figure 33b**). Ce changement d'acide aminé va entraîner une augmentation de la distance entre ce résidu et ceux de la protéine Rieske.

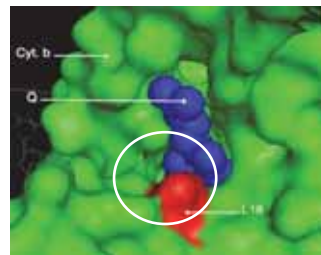
**Figure 33 : Etude structurale des polymorphismes m.T14798C et m.G15257A**

**a)** Visualisation du site de fixation du Co-Q (bleu), le site Q<sub>i</sub> en absence (jaune) et en présence (rouge) du polymorphisme m.T14798C. **b)** Visualisation de l'environnement de la protéine Rieske (bleu) en absence (jaune) et en présence (rouge) du polymorphisme m.G15257A.

**a) m.T14798C**

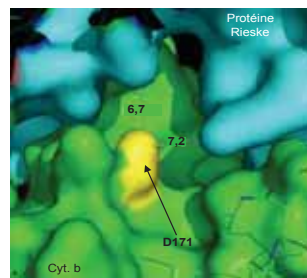


Site Q<sub>i</sub> sans polymorphisme

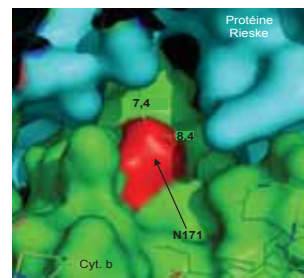


Site Q<sub>i</sub> avec m.14798T>C

**b) m.G15257A**



Cytochrome b sans polymorphisme



Cytochrome b avec m.15257G>A

Images générées via PyMOL

## VI. Discussion

Les polymorphismes et les haplogroupes de l'ADNmt ont longtemps été considérés comme génétiquement neutres et sans modification possible du phénotype des individus. Au cours des quinze dernières années, un certain nombre de travaux ont mis en évidence des liens entre les haplogroupes, les variations des fonctions mitochondriales et l'expression de pathologies. Cependant, ces études, basées sur des études épidémiologiques, ne proposent que rarement des bases moléculaires expliquant ce phénomène. Mon travail de thèse avait donc pour objectif de mettre en évidence les premières bases de ces mécanismes moléculaires et cellulaires permettant ainsi de mieux comprendre l'influence des haplogroupes sur le métabolisme énergétique mitochondrial.

### 1. Création de la banque de plaquettes de différents haplogroupes de l'ADNmt

Nous avons dans un premier temps souhaité rechercher les principaux haplogroupes européens H, U, J, T et K sur un échantillon estimé à 100 plaquettes afin de nous assurer de disposer d'au moins trois individus associés à un des haplogroupes d'intérêt. A ce jour, sur les 70 échantillons que nous avons analysés, nous avons obtenu 35 haplogroupes H, 3 haplogroupes U, 3 haplogroupes J, 3 haplogroupes T et 3 haplogroupes K. Cette collection de plaquette nous a donc permis de construire trois lignées de cybride pour chaque haplogroupe.

L'étude des fréquences de ces haplogroupes dans notre échantillon, nous montre qu'elles sont proches des fréquences européennes publiées par Mitomap<sup>144</sup> pour les haplogroupes H, U, J, T et K (**Tableau 12**). Cependant, l'haplogroupe H est sur-représenté (53% au lieu de 40%) alors que J, T et K sont eux, légèrement sous-représentés. Il est à noter que l'haplogroupe U est quant à lui très fortement sous-représenté (5% au lieu de 18%). Ces différences de fréquence peuvent être expliquées par le fait que notre échantillon, qui provient de donneurs de plaquette, n'est pas tout à fait représentatif de la population européenne et notamment par le fait que nous avons une forte proportion d'haplogroupes mineurs (I, V) ou non-européens (D, M, N, W, X) (29% au lieu de 20%).

Notre échantillonnage a été réalisé à Bordeaux, la sur-représentation de l'haplogroupe H dans notre échantillon peut donc être expliquée par l'histoire du peuplement de la zone bordelaise. En effet, Bordeaux est proche des zones refuges du sud de la France et de la péninsule ibérique au cours du Dernier Maximum Glaciaire (entre 26.500 à 19.000 ans), correspondant aux seules régions en Europe où H est supérieure à 50% de la population<sup>167</sup>.

Bien qu'ils ne soient pas utilisés dans le cadre du projet de thèse présenté ici, les haplogroupes « Autre » (correspondant aux échantillons non-européens) pourront néanmoins être utilisés ultérieurement afin d'étudier d'autres haplogroupes (essentiellement africains) et de comparer les mécanismes moléculaires et cellulaires entre haplogroupes

européens et non-européens.

**Tableau 12 : Fréquence des haplogroupes de la population à l'étude**

	Haplogroupe Européen					
	H/HV	U	J	T	K	Autre
<b>Echantillonnage</b> n=66	35	3	3	3	3	19
	53%	5%	5%	5%	5%	29%
<b>Fréquence Europe</b> Mitomap	40%	18%	9%	8%	5%	20%

En tout état de cause, la méthode utilisée pour évaluer le nombre d'échantillon à prélever pour obtenir 3 lignées de chaque haplogroupe semble être appropriée et nous a permis de construire notre banque de cybrides.

## 2. Création et culture des cybrides

Chaque ADNmt de plaquette porteur d'un des haplogroupes d'intérêt a été utilisé pour la construction de cybride, excepté pour l'haplogroupe H où nous nous sommes limités à trois cybrides. A ce jour, nous n'avons pas pu étudier les haplogroupes J et T. En effet, nous avons rencontrés des difficultés de culture pour les cybrides T. Aucun cybride T (n=4) n'a pu être remis en culture pour les différentes analyses prévues dans le projet. Il a pourtant été testé diverses conditions d'ensemencement (ex. taille de boîte, volume de milieu de culture) pour tenter de comprendre ce phénomène. Anomalies techniques exclues, il serait donc possible d'être en présence d'un cas d'incompatibilité cytoplasmique entre le génome nucléaire du donneur (143B/haplogroupe H) et l'ADNmt (plaquette/haplogroupe T). Plusieurs études ont mis en évidence ce phénomène d'incompatibilité, rendant certaines lignées non viables<sup>168,169</sup>. Par conséquent, les cybrides T n'ont pas pu être incluses dans ce projet de thèse. Malheureusement, nous n'avons également pas pu intégrer les cybrides J à notre étude ; l'ensemble des échantillons ayant été irréversiblement dégradés (dysfonctionnement de stockage et contamination des échantillons) au cours de l'installation de la nouvelle salle de culture.

Une liste des cybrides que nous avons construits est présentée en **Annexe 7**. Dans ce manuscrit, nous ne détaillerons que les premiers résultats de l'analyse cellulaire et biochimique des cybrides CCP6 (U), CCP15 (K) et CCP23 (HV) comparés aux cellules 143B (cellules donneuses du fonds nucléaire) d'haplogroupe H.

## 3. Analyse des cybrides au niveau cellulaire

L'étude phénotypique des cellules nous a permis de mettre en évidence plusieurs profils de culture. Les cellules 143B (H) et les cybrides CCP15 (K) montrent des profils de

croissance (courbe) similaires, avec un début de croissance plus rapide (sans phase de latence) que les cybrides CCP6 (U) et CCP23 (HV). En étudiant le temps de doublement, il est possible de regrouper les haplogroupes H/HV et les haplogroupes U/K, qui appartiennent à la même branche phylogénétique<sup>144</sup>. Les cybrides H/HV présentent des temps de doublement plus rapides que ceux observés pour les haplogroupes U/K. A noter que les cybrides CCP6 (U) présentent une croissance allant de 4 à 5 heures plus lent que pour les cybrides CCP23 (HV) et les cellules 143B (H). Ces résultats nous montrent qu'il y a un léger « effet haplogroupe » sur les paramètres de croissance (temps de doublement) puisque les haplogroupes phylogénétiquement proches U et K croissent moins rapidement que les cellules H et HV, qui représentent l'haplogroupe majoritaire en Europe. D'autre part, le fait que les cybrides CCP23 et les cellules 143B présentent des résultats similaires (appartenant au super-haplogroupe HV) peut nous indiquer qu'il n'y a pas d'effet de la construction des cybrides (« effet cybride »), c'est-à-dire une altération des paramètres de croissance (et biochimiques) qui serait due à la technique de fusion des plaquettes avec les cellules 143Bp<sup>0</sup>. Toutefois, il est important de rappeler que les cellules 143B utilisées pour la construction de cybrides sont associées à un haplogroupe H. Le génome nucléaire des cellules 143Bp<sup>0</sup> issue de cette lignée est donc physiologiquement acclimaté à héberger un génome mitochondrial de type H. Cependant, comme nous l'avons vu avec l'haplogroupe T, la cohabitation des deux génomes peut conduire à la mort d'une lignée de cybride si celle-ci n'est pas adaptée. La faiblesse des résultats observés sur les haplogroupes U et K pourrait également être associée à ce phénomène de compatibilité cytoplasmique, auquel cas la cohabitation des deux génomes ne serait pas létale mais nécessiterait un temps d'adaptation qui expliquerait un temps de latence au niveau de la courbe de croissance.

#### **4. Analyses biochimiques des cybrides : détermination des paramètres cinétiques des complexes I et IV de la chaîne respiratoire.**

Les analyses biochimiques réalisées sur les cybrides CCP6, CCP15, CCP23 et les cellules 143B, sont des résultats préliminaires qui mettent en évidence un « effet haplogroupe » sur le métabolisme des OXPHOS. Pour cela, nous avons comparé les différents paramètres cinétiques des complexes I et IV de la chaîne respiratoire.

Les paramètres cinétiques ont été déterminés à l'aide des courbes de vitesse de chaque complexe en fonction de différentes concentrations de substrat et de produit, ainsi que d'un modèle cinétique basé sur une équation de Michaelis-Menten de type « Random binding » (Eq. C<sub>I</sub> et Eq. C<sub>IV</sub>). Nous avons choisi ce modèle cinétique car il comprend un Km pour chaque substrat et chaque produit, ainsi qu'une Vmax aller et une Vmax retour (jeu de paramètres minimales pour décrire correctement des cinétiques d'enzymes de ce type). De plus, ce modèle, qui a été développé et validé dans notre laboratoire, reproduit le comportement des complexes I et IV. Les modèles basés sur des mécanismes autres que le « Random Binding » ne donnent pas de meilleurs résultats, les équations qui les composent

sont plus complexes et par conséquent possèdent plus de paramètres difficiles à ajuster. Cela mène donc à des jeux de paramètres mal définis et à des prédictions non fiables.

Comme nous pouvons le voir dans les **Figures 27 à 30**, les équations définissent bien les courbes expérimentales des activités des complexes I et IV pour toutes les lignées cellulaires et génèrent des paramètres cinétiques de manière reproductive.

Les valeurs des paramètres cinétiques ( $V_{max}$  et  $K_m$ ) que nous avons déterminées en utilisant ce modèle pour les cybrides CCP6, CCP15 et CCP23 ainsi pour les cellules de 143B sont relativement homogènes, c'est-à-dire que pour un même paramètre, les résultats sont tous dans un ordre de grandeur comparable et nous n'avons pas trouvé de valeurs extrêmes entre les haplogroupes. Cependant, nous avons mis en évidence de faibles différences quant à l'ensemble des paramètres étudiés, au niveau des  $K_m$  pour les substrats et les produits, ainsi que pour les  $V_{max}$  normalisées par la quantité de cellules ou bien normalisées par la masse mitochondriale. Ces variations doivent être confirmées par une étude statistique qui utilisera les déterminations sur plusieurs cultures cellulaires de cybrides et sur plusieurs cybrides du même haplogroupe. Cependant, le fait d'observer de faibles variations sur les paramètres cinétiques des complexes I et IV montre que l'effet des haplogroupes sur le métabolisme mitochondrial est plutôt modéré comme attendu ; l'effet d'un polymorphisme devant rester dans des variations physiologiques normales.

Les variations que nous avons observées sont essentiellement retrouvées au niveau du complexe IV. Nous avons pu montrer que les cybrides CCP6 et CCP15 présentent une activité intrinsèque diminuée ( $V_{max} C_{IV}/CS$ ) par rapport aux cybrides CCP23 et aux cellules 143B, et que cette différence d'activité est accompagnée d'une diminution du  $K_{m_{Cyt\ ox}}$  (augmentation de l'affinité pour le produit de la réaction). Les valeurs de ces deux paramètres devraient conduire à une diminution de l'activité du complexe IV dans ces deux cybrides (qui devra être confirmée par les mesures de respiration). Il est à remarquer que les cybrides CCP6 et CCP15 appartiennent au super-haplogroupe UK et que les cybrides CCP23 et les cellules 143B appartiennent au super-haplogroupe HV et que par conséquent, ces variations pourraient être dues à l'« effet haplogroupe » que nous recherchons. Ces résultats obtenus lors de l'analyse enzymologique du complexe IV isolé ont été retrouvés lors de l'étude théorique des courbes flux-force et des courbes à effet de seuil biochimique, montrant ainsi que la variation des paramètres cinétiques du complexe IV des cybrides CCP6 et CCP15, conduit à une faible diminution de l'activité du complexe IV qui pourrait impacter la totalité de la chaîne respiratoire et des OXPHOS.

Au niveau cellulaire, ce léger déficit du complexe IV ne se répercute pas de la même manière pour les cybrides CCP6 (U) que pour les cybrides CCP15 (K). En effet, les cybrides CCP6 présentent une activité CS élevée. Ce résultat pourrait laisser penser que les cybrides CCP6 compensent cette perte d'activité au niveau du complexe IV par une augmentation du nombre de mitochondries. Cette augmentation permet de ramener l'activité du complexe IV à

une valeur normale et donc de maintenir une activité des OXPHOS normale. Ce phénomène a déjà été observé chez les patients où un défaut de complexe IV se traduit par une augmentation de la citrate synthase<sup>114</sup>. Ces observations montrent également que la masse mitochondriale est un critère déterminant à prendre en compte dans l'étude des OXPHOS et que la quantité de mitochondries peut jouer un rôle majeur dans la régulation des OXPHOS.

Ce phénomène de compensation a aussi pu être observé lors de l'analyse du complexe I. En effet, si les variations dans la valeur des paramètres cinétiques sont plus difficiles à interpréter, les cybrides CCP23 et CCP6 présentent une affinité plus élevée pour les produits de la réaction (NAD et CO-QH<sub>2</sub>) pouvant aboutir à une diminution de la vitesse du complexe I. Cette diminution est corrélée à une augmentation de la masse mitochondriale. Si cette augmentation de la masse mitochondriale va dans le sens de ce que nous avons observé au niveau du complexe IV pour CCP6, pour CCP23 en revanche cette augmentation de la masse mitochondriale va se traduire par une activité du complexe IV dans la cellule très largement supérieure à la normale ( $V_{\max} C_{IV}/\text{mg protéine}$ ) qui pourrait être délétère.

Ainsi, et pour résumer, malgré le fait que ces résultats soient préliminaires, nous avons pu clairement montrer un « effet haplogroupe » pour le super-haplogroupe UK qui se traduit par une diminution de l'activité du complexe IV, qui reste toutefois dans les limites physiologiques. En comparant les paramètres cinétiques des cybrides avec ceux des cellules 143B, nous avons pu révéler des effets de compensation au niveau cellulaire, notamment par l'augmentation de la masse mitochondriale. Cependant, plusieurs autres mécanismes d'adaptation peuvent être impliqués, en particulier au niveau des  $V_{\max}$ , comme par exemple : (i) une augmentation du rapport  $V_{\max}/CS$  du complexe concerné correspondant à une augmentation de la quantité de ce complexe dans la mitochondrie ou une régulation du complexe le rendant plus efficace (ex. méthylation, formation de supercomplexe, chaneling, etc.), (ii) une augmentation d'un autre complexe des OXPHOS (ex. quantité, régulation, mutation) qui rétablit le flux à travers la chaîne respiratoire, et enfin comme nous l'avons observé (iii) une augmentation de la masse mitochondriale pour rétablir la production d'ATP au niveau cellulaire. Ces compensations peuvent être partielles ou complètes, et ne peuvent souvent pas être étudiées de manière isolée car un changement local peut avoir des conséquences multiples au niveau du système global. Par exemple, une différence au niveau des concentrations en substrats (induite par un changement d'un paramètre cinétique) peut (i) jouer sur l'activité des autres enzymes qui utilisent également ces substrats et/ou produits dans leur catalyse, ou (ii) avoir un rôle régulateur sur d'autres complexes. Les mécanismes impliqués dans ces compensations peuvent être très différents allant des mécanismes génétiques (ex. OXPHOS REBOX<sup>170</sup>), épigénétiques ou métaboliques (ex. régulateur, effets de seuils<sup>165</sup>, etc.). Il est donc possible, que sans ces mécanismes de compensation, certains haplogroupes mitochondriaux pourraient avoir un effet pathogénique sur le métabolisme énergétique.

Afin de comprendre les mécanismes impliqués dans cette variation des paramètres cinétiques pour ces deux haplogroupes U et K, il sera nécessaire d'étudier de manière plus approfondie les arbres phylogénétiques et de mettre en évidence les polymorphismes responsables de ces modifications d'activité. De là, une étude structurale devra être réalisée, comme pour les polymorphismes m.C14798T et m.G15257A, afin d'en déduire des mécanismes moléculaires et de les corrélérer avec les résultats obtenus lors des différents dosages des complexes de la chaîne respiratoire.

### **5. Construction des cybrides virtuels et analyse théorique des propriétés de leur métabolisme énergétique mitochondrial (OXPHOS)**

Nous avons construit des cybrides virtuels à partir du modèle OXPHOS de M. Heiske<sup>154</sup> en intégrant les jeux de paramètres du complexe I et/ou complexe IV, que nous avons déterminé pour les cybrides et les cellules 143B. Ces premiers cybrides virtuels sont préliminaires, car pour toutes les autres enzymes du modèle nous avons gardé les paramètres du modèle original paramétrés en grande partie avec des données de mitochondries de cœur. Les simulations que nous avons faites à partir de ces cybrides virtuels ne permettent donc pas de conclure de manière définitive de l'impact des haplogroupes sur le métabolisme énergétique, mais elles permettent toutefois de donner un exemple de résultats qualitatif et quantitatif de l'effet que pourraient avoir les haplogroupes.

D'après ces simulations, il apparaît que pour un même cybride virtuel, quel que soit le jeu de paramètres (intégrant les paramètres du complexe I ou complexe IV seul et paramètres combinés des complexes I et IV), le comportement du cybride au niveau du fonctionnement des OXPHOS reste le même (JO<sub>2</sub>, production d'ATP, relations flux/force, courbes de seuil biochimique). Lorsque l'on regarde les simulations entre cybrides de différents haplogroupes, l'ensemble des respirations à l'état 4 et 3, ainsi que la production d'ATP reste dans le même ordre de grandeur, montrant que les haplogroupes ne changent pas de manière significative les principales fonctions des OXPHOS. Cette observation n'est pas en faveur d'un « effet haplogroupe » et va dans le sens de leur neutralité. Elle explique pourquoi de nombreuses études concluent à cette neutralité lorsque ces paramètres fonctionnels sont étudiés uniquement à l'état 3<sup>171,172</sup>.

Cependant, si l'on étudie l'effet de perturbations sur ces cybrides virtuels en s'intéressant aux relations flux/force ou aux courbes d'effet de seuil biochimique, nous avons trouvé que, selon le cybride virtuel, il peut y avoir des différences significatives au niveau du fonctionnement global des OXPHOS. En effet, nous avons pu montrer un comportement très similaire des cellules 143B (H) et cybrides CCP23 (HV), qui se différencient clairement des deux autres haplogroupes des cybrides CCP6 (U) et CCP15 (K), en se montrant plus performants au niveau des relations flux-force et plus résistants vis-à-vis de perturbations du complexe IV ou de l'inhibition de l'ATP synthase (i.e. effet de seuil biochimique). Cette observation est en faveur d'un « effet haplogroupe » qui ne se révélerait qu'en présence d'une perturbation du

métabolisme mitochondrial. Cette perturbation pourrait être, dans le cadre des pathologies, (i) une mutation modifiant l'activité mitochondriale (mutation pathogène dans l'ADNmt ou de l'ADNn) ou (ii) un paramètre indirect modifiant l'état stationnaire de la cellule et par conséquent le métabolisme mitochondrial (ex. traitement, cancer, etc.). Ce résultat pourrait expliquer la mise en évidence, depuis une quinzaine d'année, d'association de certains haplogroupes avec l'évolution ou les signes cliniques de pathologies (cf. Introduction Partie 2, Chapitre 1). D'un point de vue anthropologique, le changement de milieu écologique ou nutritionnel par exemple, pourrait être à l'origine d'un changement de l'état physiologique des individus qui se traduirait par un changement de l'état stationnaire cellulaire et pourrait induire un « effet haplogroupe » sur le métabolisme énergétique. Ce phénomène pourrait être à l'origine de sélection positive ou négative d'individus et donc de population<sup>122</sup>.

Là encore, ces résultats préliminaires doivent être considérés comme une preuve de concept et non comme l'effet réel des haplogroupes au niveau du métabolisme mitochondrial. En effet, dans nos simulations, et quel que soit le cybride, l'étape la plus sensible à des perturbations est le complexe I. Cette particularité pourrait être interprétée comme le fait que le complexe I est une étape limitante de la chaîne respiratoire mais en réalité, ce résultat doit s'expliquer par le fait que nous avons maintenu un apport en NADH à la chaîne respiratoire relativement important en gardant les paramètres cinétiques de la déshydrogénase (cycle de Krebs) utilisés pour les mitochondries de cœur de bœuf, rendant ainsi le complexe I contrôlant.

## 6. Utilisation des cybrides virtuels

Lors de ce travail, nous avons pu montrer qu'il n'est pas possible de conclure seulement à partir des études enzymologiques des cybrides (changements des paramètres cinétiques) de l'impact des haplogroupes au niveau du fonctionnement global des OXPHOS (comme le  $\text{JO}_2$ ,  $\Delta\Psi$  ou synthèse d'ATP). De la même manière, l'étude seule de la valeur de ces paramètres globaux ne peut être suffisante car l'effet des haplogroupes ne se traduit que par une faible variation de ces valeurs (proche des valeurs normales). A contrario, l'étude de l'effet de perturbations sur le métabolisme mitochondrial de ces cybrides peut montrer un « effet d'haplogroupe ». Cependant, ces études s'avèrent coûteuses en matériel et en temps, pour cela, les cybrides virtuels basés sur le modèle d'OXPHOS de M. Heiske, sont des outils très précieux qui prennent en compte l'intégrité et la dynamique du système OXPHOS. Ce modèle permet ainsi de prédire et d'analyser des effets de changements en paramètres cinétiques au niveau global et lors de perturbations des OXPHOS.

L'approche que nous avons entreprise est de produire des résultats théoriques (à partir de déterminations expérimentales des paramètres cinétiques) qui doivent être confirmés expérimentalement ( $\text{JO}_2$ ,  $\Delta\Psi$  ou synthèse d'ATP, courbes de seuil biochimique) si cela est possible, car toutes les conditions testées par le modèle ne seront pas réalisable au niveau technique (ex. modèle de maladie, mutations). Ainsi, le modèle devra être

« alimenté » et validé par des expériences. De plus, un modèle ne reflète jamais 100% de la réalité, il faut toujours être conscient des limites du modèle utilisé (aucun modèle ne peut prendre en compte l'environnement biologique complet) et toujours considérer si les résultats théoriques sont cohérents et ne dépassent pas les limites d'utilisation du modèle. Ainsi lorsque le modèle de cybride virtuel sera complètement implémenté, il devrait fournir un outil bien adapté à l'étude et à la simulation des effets des haplogroupes mitochondriaux chez des individus sains et malades.

En ce qui concerne les applications médicales, le modèle sera utile pour (i) faciliter le diagnostic, en tenant compte du rôle délétère ou compensateur des haplogroupes, (ii) faciliter la prédiction de la progression et de la gravité des pathologies liées au métabolisme mitochondrial, en tenant compte du risque ou de l'influence des haplogroupes, (iii) élaborer et affiner les approches thérapeutiques pour ces pathologies en envisageant les spécificités métaboliques des différents haplogroupes.

## 7. Analyse structurale in silico

Dans mon travail de thèse, nous nous sommes attachés à réaliser une étude structurale in silico sur les polymorphismes m.T14798C et m.G15257A qui participent à la définition de l'haplogroupe J. Ces polymorphismes sont localisés dans le cytochrome b du complexe III de la chaîne respiratoire. L'objectif est de pouvoir visualiser un impact fonctionnel sur le mécanisme de ce complexe<sup>173,174,175</sup> (**Figure 35a**).

Le mécanisme du complexe III est basé sur le cycle des quinones, également appelé cycle Q de Mitchell (**Figure 34**). Ce cycle commence par l'oxydation d'un Co-QH<sub>2</sub> sur le site Q<sub>o</sub> qui permet la libération de deux électrons. L'un de ces électrons est transféré vers la protéine Rieske, le cytochrome c<sub>1</sub>, et vers la réduction du cytochrome c. Le second électron est transféré vers les hèmes b<sub>L</sub> et b<sub>H</sub> pour la réduction d'une Co-Q ou d'une semiquinone sur le site Q<sub>i</sub>. Ces réactions contribuent à la formation du gradient de protons qui sera utilisé pour la production d'énergie sous forme d'ATP par l'ATP synthase.

Le polymorphisme m.T14798C remplace une phénylalanine en position 18 par une leucine, située à l'entrée de la cavité du site Q<sub>i</sub>. D'un point de vue structurel, la leucine est un acide aminé dont l'encombrement stérique est moins important que la phénylalanine. Par conséquent, l'entrée du site du Q<sub>i</sub> est plus ouverte en présence de la leucine qu'avec la phénylalanine. Notre hypothèse serait que le Co-Q pourrait être moins retenu sur le site de Q<sub>i</sub>, et par conséquent, la probabilité pour que le Co-Q soit présent sur le site Q<sub>i</sub> est diminuée. De ce fait, la probabilité que Co-Q reçoive un électron provenant des hèmes b<sub>H</sub> et b<sub>L</sub> est également diminuée. L'électron est alors redirigé vers la réduction du cytochrome c<sub>1</sub> et non vers la réduction du Co-Q sur le site Q<sub>i</sub>. En conséquence, l'efficacité du couplage entre la translocation des protons et le transfert des électrons pourrait être modifiée puisque pour le même nombre d'électrons, moins de protons sont transférés (**Figure 34b**).

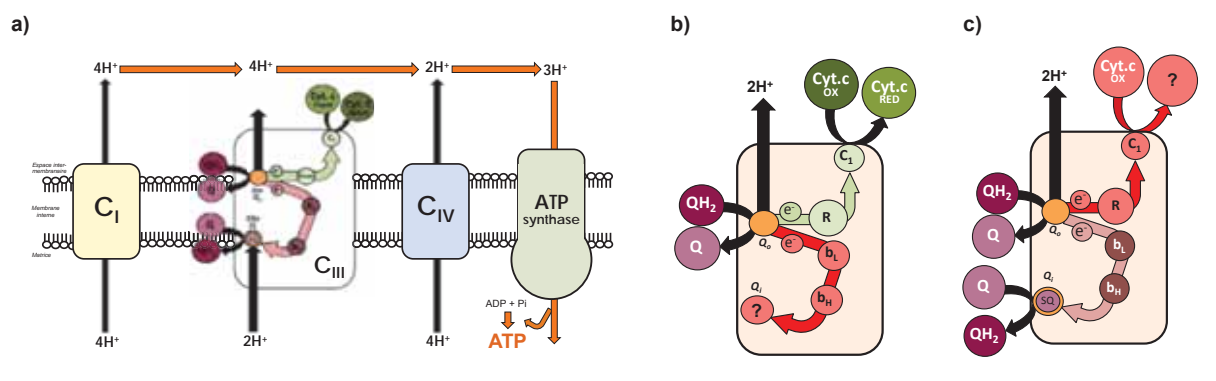
Dans le cas du polymorphisme m.G15257A, un acide aspartique en position 171 est

remplacé par une asparagine, ce qui entraîne une augmentation de la distance entre ce résidu et le bras mobile de la protéine Rieske lorsque ce dernier est orienté vers le cytochrome  $c_1$ . Notre hypothèse serait que cette augmentation de distance pourrait diminuer les interactions entre ces deux sous-unités du complexe III. Une conséquence pourrait être que le bras de la protéine Rieske resterait moins longtemps orienté vers le cytochrome  $c_1$ , car moins « freiné » et pourrait donc changer d'orientation vers le site  $Q_0$  plus rapidement. Ainsi, la probabilité pour que le second électron soit pris en charge par la protéine Rieske au niveau de  $Q_0$  au lieu de l'hème  $b_L$  est augmentée. Ce plus grand nombre d'électron pris en charge pourrait augmenter la vitesse de réduction du cytochrome  $c_1$  et donc du cytochrome  $c$  (**Figure 34c**). Comme moins d'électrons vont se diriger vers le site  $Q_i$ , le nombre de Co-QH<sub>2</sub> formés sera lui aussi diminué. Le résultat de l'ensemble de ce processus aura pour conséquence, dans le cas de la présence du polymorphisme, de diminuer le nombre d'H<sup>+</sup> extrudés dans l'espace inter-membranaire par rapport au nombre de cytochrome  $c$  réduit. Ainsi, pour un même nombre d'électron qui va parcourir la chaîne respiratoire, l'établissement du gradient de protons sera moins efficace. Cela va donc créer un découplage.

La présence de polymorphismes non-synonymes dans la structure du complexe III pourrait donc avoir une influence. Bien que cet effet soit infime, il pourrait influencer la physiologie du complexe III. Ces observations *in silico* devront être confirmées par des analyses biochimiques dans lesquels il serait possible d'observer une variation, même légère, de l'activité du complexe III qui serait due au fonds génétique de l'haplogroupe J.

### Figure 34 : Mécanisme du complexe III, le cycle des quinones

**a)** Le mécanisme du complexe III est basé sur le cycle des quinones, également appelé cycle Q de Mitchell. **b)** Le polymorphisme m.T14798C, localisé à l'entrée du site  $Q_i$  impacterait la formation de Co-QH<sub>2</sub>. **c)** Le polymorphisme m.G15257A, localisé proche de la protéine Rieske, favoriserait la réduction du cytochrome  $c$ .



## VII. Perspectives

Dans le cadre de cette thèse, nous avons réalisé les premières analyses de l'influence des haplogroupes mitochondriaux sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Pour cela, nous avons construits des cybrides qui permettent d'étudier leurs effets indépendamment du fonds génétique nucléaire. Nous avons étudié ces cybrides à différents niveaux : (i) au niveau cellulaire par l'analyse de courbes de croissance des cultures cellulaires et de la masse mitochondriale, (ii) au niveau biochimique (enzymologie) par l'étude des activités des complexes I, IV et la détermination pour chaque haplogroupe de leurs paramètres cinétiques, et (iii) au niveau biologie des systèmes par la construction de cybrides virtuels pour analyser l'influence d'effets locaux (différences en paramètres cinétiques) au niveau du système globale (i.e. flux respiratoire et le potentiel membranaire). Si les premières études montrent un « effet haplogroupe », ils sont à confirmer à chaque niveau de notre analyse et sur plusieurs lignées de cybrides d'un même haplogroupe (n=3).

Au niveau biochimique et enzymologique, il sera important d'étudier également les cinétiques des autres complexes des OXPHOS comme le complexe III et l'ATP synthase (paramètres cinétiques correspondants) afin d'avoir une vue intégrale du fonctionnement des complexes OXPHOS, qui peut être directement influencés par l'ADNmt. Il sera aussi très utile de connaître les paramètres cinétiques des autres enzymes impliquées dans les OXPHOS (ex. l'échangeur ADP/ATP, l'échangeur Pi/OH) ainsi que les enzymes clés du cycle de Krebs (ex. complexe II, déshydrogénases) pour identifier de possibles mécanismes de compensation de l'effet des haplogroupes à un autre niveau que celui de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase. L'étude devrait aussi s'élargir sur des paramètres globaux du fonctionnement des OXPHOS (ex. vitesse de respiration, gradient membranaire et production d'ATP) afin de paramétrer le modèle de cybride virtuel. La détermination expérimentale des courbes de seuils (i.e. titration par des inhibiteurs spécifiques des complexes OXPHOS) et des relations flux/force permettra d'ajuster et de valider les cybrides virtuels. Au niveau du métabolisme, et à plus long terme, nous comptons aussi réaliser, sur l'ensemble des cybrides, une étude métabolomique en déterminant les concentrations et l'état redox des métabolites intermédiaires mitochondriaux (NADH, quinones, cytochrome c, AMP, ADP, ATP, charge énergétique mitochondriale et cellulaire). Cette étude nous permettra de mieux paramétrer les modèles de cybrides virtuels.

Tout au long de ce travail, la détermination des paramètres cinétiques et paramètres globaux de chaque lignée cellulaire permettra de construire de nouveaux cybrides virtuels simulant des systèmes OXPHOS beaucoup plus réalistes et de valider chaque cybride virtuel à l'aide des paramètres globaux, des courbes de seuil et de la métabolomique. A terme, ces cybrides virtuels « 2.0 » seront des outils précieux pour approfondir les analyses en simulant l'influence des haplogroupes sur le métabolisme mitochondrial sous différentes conditions

physiologiques (de l'état 4 à l'état 3, disponibilité du substrat respiratoire, association avec une mutation pathogène, etc.). Cela nous permettra de mieux comprendre les mécanismes d'action et de compensation impliqués dans ces phénomènes et de prédire le rôle des haplogroupes comme facteur de risque ou de protection face à des mutations pathologiques.

Au niveau cellulaire, outre les études de métabolomique, nous nous intéresserons plus particulièrement à (i) la production des radicaux libres (ROS) qui peuvent être à la fois délétères pour l'ADNmt et les autres structures, mais jouer un rôle important dans la signalisation, et à (ii) la thermogénèse. Il y a un lien fort entre la production des ROS, la production d'ATP, la thermogénèse et le gradient membranaire. Ainsi par exemple, un faible découplage des OXPHOS pourrait être bénéfique, réduisant ainsi la production de ROS et augmentant la thermogénèse, mais en même temps désavantageux pour la production de l'ATP. Ce faible découplage est la base de notre hypothèse du paradoxe J (cf.III.4.2) et pourrait alors jouer un rôle au niveau de l'adaptation à de nouvelles zones climatiques ou conditions nutritives au cours de l'évolution et des migrations humaines. Cette approche nécessitera une extension du modèle OXPHOS à la production de ROS et à la production de chaleur (cybrides virtuels « 3.0 »).

Parallèlement à ces approches, il serait intéressant de mesurer (i) le nombre de copies des molécules d'ADNmt, (ii) les taux de transcription et traduction mitochondriaux et (iii) l'assemblage, la formation de supercomplexes et la quantité de protéines des complexes de la chaîne respiratoire. La mesure de ces paramètres pourrait indiquer des effets de compensation renforçant la « production » d'un des complexes OXPHOS en réponse à la « faiblesse » d'un de ces complexes dans un haplogroupe donné. Le taux de la synthèse de protéines dans les mitochondries ainsi que leur importation devront être étudiés. Ainsi, l'augmentation de la citrate synthase dans les cybrides CCP6 et CCP23, nous fait penser que le niveau des protéines exprimées pourrait être influencé par les haplogroupes.

Enfin, l'étude du méthylome des différents cybrides, cultivés dans des différentes conditions (ex. riche et faible en glucose) pourrait permettre d'identifier d'éventuelles régulations épigénétiques et clarifier l'hypothèse de l'impact de l'ADNmt sur la reprogrammation du génome nucléaire. La structure du réseau mitochondrial ainsi que la fusion et la fission mitochondriales pourraient aussi être entreprise.

Si nous disposons des principaux cybrides européens (H, HV, U, K), il manque à notre banque le super-haplogroupe JT. Ce super-haplogroupe JT est important car il a été retrouvé impliqué dans de nombreuses pathologies et le paradoxe J. L'ensemble de cette étude devra donc être effectué sur les haplogroupes J et T, pour cela de nouveaux cybrides seront reconstruits.

D'après nos premiers résultats, les principaux haplogroupes européens présentent des différences significatives au niveau de leur métabolisme mitochondrial, il est à noter que ces haplogroupes sont proches phylogénétiquement et sont relativement récents (entre

40.000 et 10.000 ans). Nous devrions donc s'attendre à des différences encore plus importantes au niveau des haplogroupes mondiaux comme par exemple entre les haplogroupes africains ou asiatiques qui sont génétiquement plus éloignés et qui divergent plus tôt (entre 150.000 et 60.000 ans). Notre équipe possède déjà quelques plaquettes des haplogroupes non-européens qui pourraient servir pour une première comparaison de ces haplogroupes.







# Conclusion Générale

Dans ce travail nous nous sommes intéressés à deux types de modèles présentant des modifications du métabolisme énergétique mitochondrial. Tout d'abord, nous avons montré que des animaux traités par une molécule neurotoxique développaient plusieurs symptômes à la fois neurologiques et biochimiques comparable au syndrome de Leigh, pathologie mitochondriale humaine. Ensuite, par la construction de cybrides humains portant différents haplogroupes retrouvés dans la population européenne, nous avons pu mettre en évidence que le fonds génétique mitochondrial, défini par un ensemble de polymorphismes, pourrait avoir une influence sur le fonctionnement des OXPHOS.

Nos résultats montrent que chacun des modèles modifie le métabolisme énergétique mitochondrial. Soit de façon drastique, c'est-à-dire à un niveau comparable à ce que l'on retrouve dans les pathologies mitochondriales et notamment le syndrome de Leigh. Soit de façon plus modérée entraînant des variations phénotypiques plus fines, confirmant l'influence du fonds génétique mitochondrial sur la bioénergétique de la mitochondrie.

Ces derniers résultats ouvrent de nouvelles perspectives car ils proposent une vision modulée de l'étude et du diagnostic des pathologies mitochondriales en avançant la notion de médecine personnalisée. En effet, comme chaque haplogroupe semble modifier le métabolisme énergétique mitochondrial, chaque individu doit avoir une réponse qui lui est propre pour chaque mutation de l'ADNmt ou pathologie mitochondriale.







# Listes

Figures, Tableaux et Abréviations



## Liste des figures

Figure 1 : Origine des organites eucaryotes .....	16
Figure 2 : Structure mitochondriale et organisation en réseau.....	17
Figure 3 : Dynamique mitochondriale.....	19
Figure 4 : Principales voies métaboliques mitochondriales.....	20
Figure 5 : Structure de l'ADN mitochondrial .....	21
Figure 6 : Modèle du bottleneck mitochondrial.....	22
Figure 7 : Mécanisme de réplication de l'ADNmt .....	24
Figure 8 : La D-loop, site d'initiation de la transcription.....	25
Figure 9 : Mécanisme d'importation des protéines mitochondriales .....	27
Figure 10 : Principe de classification des haplogroupes .....	31
Figure 11 : Migrations des populations humaines.....	32
Figure 12 : Phosphorylations Oxydatives (OXPHOS).....	33
Figure 13 : Mécanisme réactionnel du complexe I.....	34
Figure 14 : Biogénèse et caractéristiques cliniques des pathologies mitochondriales.....	38
Figure 15 : Mécanisme d'action de la dopamine.....	50
Figure 16 : Métabolisme du MPTP.....	52
Figure 17 : Mécanisme hypothétique du paradoxe J .....	72
Figure 18 : Phylogénie des haplogroupes J et T.....	73
Figure 19 : Construction des Cybrides.....	78
Figure 20 : Cinétique Michaelis-Menten basée sur le type « Random binding » .....	82
Figure 21 : Recherche locale de l'EMQ.....	84
Figure 22 : Principe de l'algorithme génétique .....	85
Figure 23 : Modélisation des OXPHOS.....	86
Figure 24 : Relation flux-force .....	88
Figure 25 : Effet de seuil mitochondrial .....	89
Figure 26 : Courbes de croissance .....	91
Figure 27 : Courbes théoriques pour le complexe I (143B et CCP23).....	96
Figure 28 : Courbes théoriques pour le complexe I (CCP6 et CCP15).....	97
Figure 29 : Courbes théoriques pour le complexe IV (143B et CCP23).....	99
Figure 30 : Courbes théoriques pour le complexe IV (CCP6 et CCP15) .....	100
Figure 31 : Relation flux-force .....	103
Figure 32 : Effet de seuil biochimique .....	104
Figure 33 : Etude structurale des polymorphismes m.T14798C et m.G15257A.....	107
Figure 34 : Mécanisme du complexe III, le cycle des quinones.....	116



## Liste des tableaux

Tableau 1 : Conditions pour l'amplification des ADN par PCR .....	75
Tableau 2 : Conditions des digestions enzymatiques par RFLP .....	76
Tableau 3 : Polymorphismes d'intérêt .....	90
Tableau 4 : Haplogroupes européens .....	90
Tableau 5 : Construction des cybrides .....	91
Tableau 6 : Temps de doublement.....	92
Tableau 7 : Concentrations protéiques .....	93
Tableau 8 : Masse mitochondriale .....	93
Tableau 9 : Paramètres cinétiques du complexe I .....	94
Tableau 10 : Paramètres cinétiques du complexe IV .....	98
Tableau 11 : Prédiction du $JO_2$ , $J_{ATP}$ et $\Delta\Psi$ à l'état 3 et 4 .....	101
Tableau 12 : Fréquence des haplogroupes de la population à l'étude.....	109



## Listes des abréviations

<b>A</b> : Adénine	<b>MILS</b> : Maternally Inherited Leigh Syndrome
<b>AAC</b> : Transporteur ADP/ATP	<b>MPDP</b> : 1-méthyl-4-phenylpyridinium ions
<b>ADNn</b> : Acide désoxyribonucléique nucléaire	<b>MPP<sup>+</sup></b> : 1-méthyl-4-phenylpyridinium
<b>ADNmt</b> : Acide désoxyribonucléique mitochondriale	<b>MPTP</b> : 1-méthyle-4-phényl-1, 2, 3, 6-tétrahydropyridine
<b>ADP</b> : Adénosine diphosphate	<b>MRCA</b> : Most recent commun ancestor
<b>AMP</b> : Adénosine monophosphate	<b>MTERF</b> : Mitochondrial transcription termination factor
<b>ARN</b> : Acide ribonucléique	<b>mtHSP</b> : Mitochondrial heat shock proteins
<b>ARNm</b> : Acide ribonucléique messenger	<b>mTOR</b> : mammalian target of rapamycin
<b>ARNr</b> : Acide ribonucléique ribosomal	<b>mtPTP</b> : Mitochondrial permeability transition pore
<b>ARNt</b> : Acide ribonucléique de transfert	<b>mtSSB</b> : Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein
<b>ATP</b> : Adénosine triphosphate	<b>mtUPR</b> : Unfolded protein response
<b>BSA</b> : Sérum albumine bovin	<b>NAD/NADH</b> : Nicotinamide adénine dinucléotide
<b>C</b> : Cytosine	<b>NARP</b> : Neurogenic Ataxia and Retinitis Pigmentosa
<b>CHOP</b> : CEBP Homologous Protein	<b>NFR</b> : Negative Regulator of Resistance
<b>CoA-SH</b> : Acétyl-coenzyme A	<b>NFR1</b> : Nuclear Respiratory Factor 1
<b>Co-Q</b> : Coenzyme Q ou ubiquinone	<b>NFκB</b> : Nuclear factor-kappa B
<b>Co-QH<sub>2</sub></b> : Coenzyme Q réduit ou ubiquinol	<b>ND</b> : NADH déshydrogénase
<b>CPEO</b> : Chronic-Progressive-External-Ophtalmoplegia	<b>O<sub>H</sub></b> : Origine de réplication du brin lourd
<b>CPT</b> : carnitine-palmitoyl-transférases	<b>O<sub>L</sub></b> : Origine de réplication du brin léger
<b>CRS</b> : Cambridge Reference Sequence	<b>OPA1</b> : Optic atrophy 1
<b>CS</b> : Citrate synthase	<b>OXPHOS</b> : Oxidative phosphorylation / Phosphorylations oxydatives
<b>CSB</b> : Conserved sequence blocks	<b>O<sub>2</sub></b> : Dioxygène
<b>CYBRIDE</b> : Cytoplasmic hydrid	<b>PAM</b> : Presequence translocase-associated motor
<b>Da</b> : Dalton	<b>Pb</b> : Paire de base
<b>DAPI</b> : 4',6-diamidino-2-phénylindole	<b>Pink-1</b> : PTEN-induced putative kinase-1
<b>DAT</b> : Dopamine transporter	<b>PGC-1α</b> : Peroxisome proliferator-activated receptor-Gamma Coactivator-1α
<b>DHODH</b> : Dihydroorotate dihydrogenase	<b>pH</b> : Potentiel d'hydrogène
<b>dNTP</b> : Mélange de désoxyribonucléotides	<b>POLRmt</b> : Mitochondrial DNA-directed RNA polymerase
<b>DRP1</b> : Dynamin-1-like protein	<b>POL-γ</b> : Polymérase γ
<b>DTNB</b> : 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoïc acid	<b>RFLP</b> : Restriction fragment lenght polymorphism
<b>D-Loop</b> : Displacement loop	<b>ROS</b> : Reactive oxygen species
<b>EMQ</b> : Erreur moyenne quadratique	<b>S</b> : Constante de sédimentation
<b>ERR</b> : Estrogen-Related Receptor	<b>SDM</b> : Strand-displacement model
<b>FAD</b> : Flavine adénine dinucléotide	<b>SHD</b> : Succinate deshydrogénase
<b>FIS-1</b> : Mitochondrial fission factor 1	<b>SNC</b> : Système nerveux central
<b>FNM</b> : Flavine mononucléotide	<b>T</b> : Thymine
<b>G</b> : Guanine	<b>TAS</b> : Termination-associated sequence
<b>GABPA</b> : GA-binding protein A	<b>TERM</b> : Terminal
<b>GTP</b> : Guanosine triphosphate	<b>TFAM</b> : Mitochondrial transcription factor A
<b>HSP</b> : High-stand promotor	<b>TIM</b> : Translocase of inner membrane
<b>ITH</b> : Site d'initiation de la transcription du brin lourd	<b>TOM</b> : Translocase of outer membrane
<b>ITL</b> : Site d'initiation de la transcription du brin léger	<b>TNB</b> : 5,5' thiobis-2-nitrobenzoïc acid
<b>JNK</b> : c-Jun N-terminal kinase	<b>Vmax</b> : Vitesse maximale
<b>Km</b> : Constante de Michaelis	<b>ΔE<sup>0</sup></b> : Potentiel rédox
<b>LSP</b> : Light-stand promotor	<b>Δψ</b> : Potentiel de membrane
<b>MAO</b> : Monoamines oxydase	<b>ΔμH<sup>+</sup></b> : Potentiel électrochimique de proton H <sup>+</sup>
<b>MELAS</b> : Mitochondrial-Encephalopathy-Lactic Acidosis-Stroke like episodes	
<b>MERRF</b> : Myoclonus-Epilepsy-Ragged Red Fibers	
<b>MFF</b> : Mitochondria fission factor	
<b>MFN</b> : Mitofusine	
<b>MID49</b> : Mitochondrial dynamics proteins	
<b>MIEF1</b> : Mitochondrial elongation factor 1	







## **Annexes**



## Annexe 1 : Protocole de trypsination

---

Communément appelé « passage », la trypsination est une méthode obligatoire pour le maintien et la survie des lignées cellulaires. Ce protocole est utilisé pour l'ensemble des types cellulaires utilisés dans le projet de recherche 2.

### ⊙ Protocole de trypsination :

1. **Rinçage du tapis cellulaire** par ajout et retrait de PBS (*Phosphate Buffered Saline*, Gibco™) afin d'éliminer le milieu de culture (et notamment les agents anti-trypsine présents dans le SVF) ;
2. **Trypsination** par ajout d'un volume de trypsine (0,25% de trypsine et 0,02% d'EDTA, Gibco™). La trypsine permet de protéolyser les domaines extracellulaires des protéines membranaires afin de permettre aux cellules de ne plus adhérer au support de la boîte de culture, et que les cellules n'adhèrent plus entre elles. Incubation de 5 minutes dans l'incubateur thermostaté à 37°C pour optimiser l'action de la trypsine ;
3. **Arrêt de l'action de la trypsine** par ajout d'un volume de milieu de culture (2 fois celui de la trypsine) et donc de SVF inactivant la trypsine. Centrifugation à 120g pendant 5 minutes pour éliminer les résidus de trypsine ;
4. **Élimination du surnageant et resuspension du culot cellulaire** avec du milieu de culture. A ce niveau, les cellules peuvent être soit remises en culture, soit comptées pour la préparation d'échantillon cellulaire pour les différents dosages enzymatiques ou bien pour les sauvegardes cellulaires en azote.
  - **Préparation des échantillons pour les dosages enzymatiques** : la concentration cellulaire est calculée et un volume de suspension est recentrifugé à 120g pendant 5 minutes afin d'atteindre la concentration finale de  $25 \cdot 10^3$  cellules/mL de PBS. Ces tubes sont ensuite congelés à -80°C ;
  - **Préparation des sauvegardes en azote liquide** : la concentration cellulaire est calculée et un volume de suspension est recentrifugé à 120g pendant 5 minutes afin d'atteindre la concentration finale de  $5 \cdot 10^6$  cellules/mL de milieu de congélation (DMEM supplémenté avec 20% de SVF et 1% de diméthylsulfoxyde (DMSO)). La température des cellules est progressivement diminuée à -80°C en isopropanol, cette étape permet de conserver l'intégrité des membranes cellulaires sans formation de cristaux lors de la congélation. Après 72 heures, les cellules sont transférées en azote liquide à -196°C pour une conservation à long terme.

## Annexe 2 : Protocole de fusion des plaquettes et des cellules 143Bp<sup>0</sup>

---

Dans le cadre de notre étude, les cellules donneuses sont les plaquettes que nous avons sélectionnées, qui fournissent l'ADNmt et donc un haplotype particulier, qui seront fusionnées aux cellules receveuses 143Bp<sup>0</sup>. Cette technique permet l'obtention de lignées cellulaires stables et immortelles comportant chacune un haplogroupe particulier.

### ⊙ Protocole de fusion plaquette-143Bp<sup>0</sup> :

#### 1. Prérequis pour la fusion :

- La culture des 143Bp<sup>0</sup> est débutée quelques jours avant la fusion afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance (physiologie optimale).

#### 2. Préparation des cellules pour la fusion :

- Les 143Bp<sup>0</sup> sont trypsinisées, comptées (à hauteur de  $1.10^6$  cellules) et centrifugées à 180g pendant 5 minutes. Les cellules sont reprises dans 2mL de milieu de culture DMEM<sup>+S/A/U/P</sup>.
- Les plaquettes sont décongelées et lavées au PBS. 7mL de la suspension sont culotées par centrifugation à 1500g pendant 15 minutes.

#### 3. Fusion des 143p<sup>0</sup> et des plaquettes :

- Sur le culot de plaquettes, ajouter lentement la suspension cellulaire de 143Bp<sup>0</sup> sans mélanger les deux phases ;
- Centrifuger à 180g pendant 10 minutes à température ambiante et éliminer le surnageant ;
- Ajout de 100μL de polyéthylène glycol (PEG) à 42% et resuspension des deux culots cellulaires. Lorsque les deux phases sont homogénéisées, la resuspension est continuée pendant 1 minute supplémentaire. Cette étape permet de déstabiliser de façon réversible les membranes plasmiques et de favoriser le rapprochement et la fusion des membranes cellulaires.

#### 4. Mise en culture des produits de fusion dans un milieu de culture DMEM<sup>+S/A/U/P</sup>. Cette étape de culture sans sélection, s'étend sur trois jours et permet d'assurer la fusion et l'intégration fonctionnelle des mitochondries (ADNmt du donneur) dans les cellules 143Bp<sup>0</sup>.

#### 5. Sélection des cybrides s'effectue durant une dizaine de jours. Les produits issus de la fusion sont cultivés dans un milieu de culture DMEM<sup>+S/A</sup>. Cette étape de sélection permet de favoriser uniquement la croissance des cybrides puisque les plaquettes non fusionnées meurent naturellement au bout de quelques jours, et les 143Bp<sup>0</sup> sont auxotrophes à l'uridine et au pyruvate.

### Annexe 3 : Dosage de la citrate synthase (CS)

---

La citrate synthase est une enzyme impliquée dans le cycle de Krebs qui forme du citrate à partir de l'oxaloacétate et de l'acétyl-coenzyme A. Le dosage de cette enzyme permet d'évaluer la masse mitochondriale (ou nombre de mitochondrie) de chaque cellule. L'acétyl-coenzyme A formé lors de la réaction réagit avec le 5,5' dithiobis-2-nitrobenzoïc acid (DTNB) pour former du 5,5' thiobis-2-nitrobenzoïc acid (TNB) absorbe spécifiquement à 412nm. L'activité de la citrate synthase est mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412nm.

⊙ **Protocole :**

1. **Préparation du milieu réactionnel** contenant 100μM de DTNB, 100mM Tris HCL, 300μM d'acétyl-coenzyme A, 0,001% de Triton ;
2. **Ajout de l'enzyme** correspondant à des volumes compris entre 10 et 20μL de cellule. Incubation de 5 minutes à 37°C dans le spectrophotomètre ;
3. **Activation de la réaction** par ajout de 500μM d'oxaloacétate ;
4. **Suivi de la réaction enzymatique** à 412nm pendant 5 minutes à 37°C. Mesure de l'augmentation de l'absorbance correspondant à l'apparition du TNB dans le milieu réactionnel.

## Annexe 4 : Dosage de la NADH-Ubiquinone Oxydoréductase (C<sub>I</sub>)

---

Le complexe I de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du NADH en NAD<sup>+</sup>. Son activité est évaluée en suivant la disparition du NADH qui absorbe à 340nm.



### a. Variation du NADH

Cette étape permet d'étudier l'effet de la variation de concentration d'un des substrats, le NADH, sur la vitesse de réaction du complexe I.

#### ☉ Protocole :

1. **Préparation du milieu réactionnel** contenant 50mM de tampon phosphate, 100μM de Co-Q et 3,75mg/mL de BSA ;
2. **Ajout de l'enzyme** correspondant à 40μl de cellules, qsp 1mL d'H<sub>2</sub>O. Incubation de 5 minutes à 37°C dans le spectrophotomètre ;
3. **Activation de la réaction** par ajout de différentes concentrations de NADH. La gamme de concentrations de NADH est comprise entre 0 et 300μM.
4. **Suivi de la réaction enzymatique** à 340nm pendant 30 minutes à 37°C. Mesure de la diminution de l'absorbance correspondant à la disparition du NADH dans le milieu réactionnel pour chaque concentration de NADH testée.

### b. Variation du NAD

Cette étape permet d'étudier l'effet de la variation de concentration d'un des produits, le NAD, sur la vitesse de réaction du complexe I et de déterminer l'inhibition potentielle du complexe I par l'un de ses produits.

#### ☉ Protocole :

1. **Préparation du milieu réactionnel** contenant 50mM de tampon phosphate, 100μM de Co-Q, 3,75mg/mL de BSA et une gamme de concentration de NAD comprise entre 0 et 150μM.
2. **Ajout de l'enzyme** correspondant à 40μl de cellules, qsp 1mL d'H<sub>2</sub>O ;
3. Incubation de 5 minutes à 37°C dans le spectrophotomètre ;
4. **Activation de la réaction** par ajout de 100μM de NADH.
5. **Suivi de la réaction enzymatique** à 340nm pendant 30 minutes à 37°C. Mesure de la diminution de l'absorbance correspondant à la disparition du NADH dans le milieu réactionnel pour chaque concentration de NAD testée.

### c. Variation du Co-Q

Cette étape permet d'étudier l'effet de la variation de concentration d'un des substrats, le Co-Q, sur la vitesse de réaction du complexe I.

☉ **Protocole :**

1. **Préparation du milieu réactionnel** contenant 50mM de tampon phosphate, 3,75mg/mL de BSA et une gamme de concentration de Co-Q comprise entre 0 et 150µM.
2. **Ajout de l'enzyme** correspondant à 40µl de cellules, qsp 1mL d'H<sub>2</sub>O ;
3. Incubation de 5 minutes à 37°C dans le spectrophotomètre ;
4. **Activation de la réaction** par ajout de 100µM de NADH.
5. **Suivi de la réaction enzymatique** à 340nm pendant 30 minutes à 37°C. Mesure de la diminution de l'absorbance correspondant disparition du NADH dans le milieu réactionnel pour chaque concentration de Co-Q testée.

d. Variation du Co-QH<sub>2</sub>

Cette étape permet d'étudier l'effet de la variation de concentration d'un des produits, le Co-QH<sub>2</sub>, sur la vitesse de réaction du complexe I et de déterminer l'inhibition potentielle du complexe I par l'un de ses produits.

☉ **Protocole :**

1. **Préparation du milieu réactionnel** contenant 50mM de tampon phosphate, 100µM de Co-Q, 3,75mg/mL de BSA et une gamme de concentration de Co-QH<sub>2</sub> comprise entre 0 et 300µM.
2. **Ajout de l'enzyme** correspondant à 40µl de cellules, qsp 1mL d'H<sub>2</sub>O ;
3. Incubation de 5 minutes à 37°C dans le spectrophotomètre ;
4. **Activation de la réaction** par ajout de 100µM de NADH.
5. **Suivi de la réaction enzymatique** à 340nm pendant 30 minutes à 37°C. Mesure de la diminution de l'absorbance correspondant à la disparition du NADH dans le milieu réactionnel pour chaque concentration de Co-QH<sub>2</sub> testée.

## Annexe 5 : Dosage de l'activité de la Cytochrome c Oxydase (C<sub>IV</sub>)

---

Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome c. Son activité est évaluée en suivant la disparition du cytochrome c réduit qui absorbe à 550nm.



### e. Préparation du cytochrome c réduit

Le protocole nécessite la préparation de deux solutions distinctes de cytochrome c : Cyt<sub>c</sub><sup>RED 90-95</sup> et Cyt<sub>c</sub><sup>OX</sup>.

#### ⊙ Protocole 1 : préparation de la solution initiale de Cyt<sub>c</sub><sup>OX</sup>

1. **Préparation d'un volume de cytochrome c à 1mM** dilué dans un tampon de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 50mM dont une moitié est conservée tel quel et est appelée Cyt<sub>c</sub><sup>OX</sup>, la seconde est réduite entre 90 et 95% et appelée Cyt<sub>c</sub><sup>RED 90-95</sup>.

#### ⊙ Protocole 2 : réduction de la solution Cyt<sub>c</sub><sup>RED 90-95</sup>

1. **Préparation de deux cuves de spectrophotomètre contenant 100µM de Cyt<sub>c</sub>** (non réduite à ce stade du protocole) dans un tampon de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> à 50mM ;
2. **Préparation d'une solution 100% oxydée** par ajout de grains de ferricyanure de potassium dans la cuve 1. La solution devient orange et l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 550nm préalablement initialisée sur l'air. L'absorbance obtenue est proche de 0,7 ;
3. **Préparation d'une solution 100% réduite** par ajout de grains de dithionite de sodium dans la cuve 2. La solution devient rose et l'absorbance est lue au spectrophotomètre à 550nm, préalablement initialisée sur la solution 100% oxydée. L'absorbance obtenue est proche de 0,9 ;
4. **Détermination des bornes pour la réduction de la solution de Cyt<sub>c</sub><sup>RED 90-95</sup>** comprise en 90 et 95%. Ce pourcentage de réduction nous permet de contrôler la réduction de la solution Cyt<sub>c</sub><sup>RED 90-95</sup> et de vérifier que cette solution n'est pas saturante en réducteur (dithionite de sodium) ce qui perturberait fortement les expériences. Les bornes de réduction sont calculées à partir de l'absorbance obtenue pour la solution 100% réduite :
  - Borne à 90% réduit :  $0,9 \times 0,90 = 0,810$
  - Borne à 95% réduit :  $0,9 \times 0,95 = 0,855$
5. **Réduction de la solution de Cyt<sub>c</sub><sup>RED 90-95</sup>** par ajout progressif de dithionite de sodium et contrôle de l'absorbance à 550nm jusqu'à obtention d'une absorbance comprise entre les bornes à 90 et 95% réduites (soit 0,810 et 0,855 selon l'exemple) précédemment déterminées.

f. Variation du cytochrome c réduit

Cette étape permet d'étudier l'effet de la variation de concentration du substrat, le  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$ , sur la vitesse de réaction du complexe IV.

☉ **Protocole :**

1. **Préparation du milieu réactionnel** contenant différentes concentrations de  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$  diluées dans un tampon de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 50mM. La gamme de concentration de  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$  est comprise entre 0 et 250 $\mu\text{M}$  ;
2. **Activation de la réaction par ajout de l'enzyme** correspondant à 30 $\mu\text{l}$  de cellules.
3. **Suivi de la réaction enzymatique** à 550nm pendant 1 heure à 37°C. Mesure de la diminution de l'absorbance correspondant à la disparition du  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$  dans le milieu réactionnel pour chaque concentration de  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$  testée.

g. Variation du cytochrome c oxydé

Cette étape permet d'étudier l'effet de la variation de concentration du produit, le  $\text{Cyt}_c \text{OX}$ , sur la vitesse de réaction du complexe IV et de déterminer l'inhibition potentielle du complexe IV par son produit.

☉ **Protocole :**

1. **Préparation du milieu réactionnel** contenant une concentration fixe de 100 $\mu\text{M}$  de  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$  et différentes concentrations de  $\text{Cyt}_c \text{OX}$ , le tout dilué dans un tampon de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  à 50mM. La gamme de concentration de  $\text{Cyt}_c \text{OX}$  est comprise entre 0 et 250 $\mu\text{M}$ .
2. **Activation de la réaction par ajout de l'enzyme** correspondant à 30 $\mu\text{l}$  de cellules.
3. **Suivi de la réaction enzymatique** à 550nm pendant 1 heure à 37°C. Mesure de la diminution de l'absorbance correspondant à la disparition du  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$  dans le milieu réactionnel pour chaque concentration de  $\text{Cyt}_c \text{RED}^{90-95}$  testée.

## Annexe 6 : Modélisation du métabolisme - Réactions impliquées

Extrait de l'article Heiske et al, 2017<sup>154</sup>.

**Table 1.** Overview of all reactions. The reactions marked with '\*' are only taken into account in the system of differential equations when time courses are simulated. Note that  $P_i = H_2PO_4 + HPO_4$ .

<b>Matrix</b>		
DH	Dehydrogenase reaction	$NAD_x + H_x \rightleftharpoons NADH_x$
MgATP <sub>x</sub>	Mg <sup>2+</sup> binding on fATP	$fATP_x + Mg_x \rightleftharpoons mATP_x$
MgADP <sub>x</sub>	Mg <sup>2+</sup> binding on fADP	$fADP_x + Mg_x \rightleftharpoons mADP_x$
Pdiss <sub>x</sub>	Pi dissociation	$H_2PO_{4x} \rightleftharpoons HPO_{4x} + H_x$
<b>Inner membrane</b>		
C1	Complex I	$NADH_x + Q_{im} + 5H \rightleftharpoons NAD_x + QH_{2im} + 4H_{is}$
C3	Complex III	$QH_{2im} + 2CoX_{is} + 2H_x \rightleftharpoons Q_{im} + 2Cred_{is} + 4H_{is}$
C4	Complex IV	$Cred_{is} + 0.25 O_2 + 2H_x \rightleftharpoons Cox_{is} + 0.5H_2O + H_{is}$
F1F0	ATP synthase	$mADP_x + P_{ix} + n_A H_{is} + H_x \rightleftharpoons mATP_x + n_A H_x$
AAC	ADP/ATP carrier	$fATP_x + fADP_{is} \rightleftharpoons fATP_{is} + fADP_x$
PiOH	Pi/OH antiporter	$H_2PO_{4is} + OH_x \rightleftharpoons H_2PO_{4x} + OH_{is}$
KH	K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter	$K_{is} + H_x \rightleftharpoons K_x + H_{is}$
Hleak	H <sup>+</sup> leak	$H_{is} \rightleftharpoons H_x$
Kleak	K <sup>+</sup> leak	$K_{is} \rightleftharpoons K_x$
<b>Intermembrane space</b>		
AK	Adenylate kinase	$mATP_{is} + fAMP_{is} \rightleftharpoons mADP_{is} + fADP_{is}$
MgATP <sub>is</sub>	Mg <sup>2+</sup> binding on fATP	$fATP_{is} + Mg_{is} \rightleftharpoons mATP_{is}$
MgADP <sub>is</sub>	Mg <sup>2+</sup> binding on fADP	$fADP_{is} + Mg_{is} \rightleftharpoons mADP_{is}$
Pdiss <sub>is</sub>	Pi dissociation	$H_2PO_{4is} \rightleftharpoons HPO_{4is} + H_{is}$
<b>Outer membrane</b>		
fATP <sub>om</sub>	fATP diffusion	$fATP_e \rightleftharpoons fATP_{is}$
mATP <sub>om</sub>	mATP diffusion	$mATP_e \rightleftharpoons mATP_{is}$
fADP <sub>om</sub>	fADP diffusion	$fADP_e \rightleftharpoons fADP_{is}$
mADP <sub>om</sub>	mADP diffusion	$mADP_e \rightleftharpoons mADP_{is}$
fAMP <sub>om</sub>	fAMP diffusion	$fAMP_e \rightleftharpoons fAMP_{is}$
Pi <sub>om</sub>	Pi diffusion	$P_{ie} \rightleftharpoons P_{is}$
Mg <sub>om</sub> *	Mg <sup>2+</sup> diffusion	$Mg_e \rightleftharpoons Mg_{is}$
<b>External space/cytosol</b>		
MgATP <sub>e</sub> *	Mg <sup>2+</sup> binding on fATP	$fATP_e + Mg_e \rightleftharpoons mATP_e$
MgADP <sub>e</sub> *	Mg <sup>2+</sup> binding on fADP	$fADP_e + Mg_e \rightleftharpoons mADP_e$

**Table 2.** Differential equation system of the OXPHOS model, where  $W_x$ , matrix water space;  $W_{is}$ , intermembrane water space;  $W_e$ , extern/cytosolic water space;  $W_{im}$ , inner membrane volume;  $C$ , membrane capacity;  $x_{buff}$ , H<sup>+</sup> buffer constant. The activities of the respiratory chain complexes  $vC1$ ,  $vC3$ , and  $vC4$  refer to the transfer of two electrons.

$$\begin{aligned} \frac{d[H]_x}{dt} &= x_{buff} \cdot \left( +v_{DH} - 5v_{C1} - 2v_{C3} - 4v_{C4} + (n_A - 1)v_{F1F0} + 2v_{PiOH} + v_{Hleak} - v_{OH} \right) / W_x \\ \frac{d[K]_x}{dt} &= (+v_{KH} + v_K) / W_x \\ \frac{d[Mg]_x}{dt} &= -v_{MgATP_x} - v_{MgADP_x} \\ \frac{d[NADH]_x}{dt} &= (+v_{DH} - v_{C1}) / W_x \\ \frac{d[fATP]_x}{dt} &= -v_{AAC} / W_x - v_{MgATP_x} \\ \frac{d[mATP]_x}{dt} &= +v_{F1F0} / W_x + v_{MgATP_x} \\ \frac{d[fADP]_x}{dt} &= +v_{AAC} / W_x - v_{MgADP_x} \\ \frac{d[mADP]_x}{dt} &= -v_{F1F0} / W_x + v_{MgADP_x} \\ \frac{d[P_i]_x}{dt} &= (-v_{F1F0} + v_{PiOH}) / W_x \\ \frac{d[OH]_{im}}{dt} &= (+v_{C1} - v_{C3}) / W_{im} \\ \frac{d[Cred]_{im}}{dt} &= (+2v_{C3} - 2v_{C4}) / W_{im} \\ \frac{d[fATP]_{is}}{dt} &= (+v_{ATP_{om}} + v_{AAC_{om}} - v_{AK_{is}}) / W_{is} - v_{MgATP_{is}} \\ \frac{d[mATP]_{is}}{dt} &= +v_{mATP_{om}} / W_{is} + v_{MgATP_{is}} \\ \frac{d[fADP]_{is}}{dt} &= (+v_{ADP_{om}} - v_{AAC_{om}} + 2v_{AK_{is}}) / W_{is} - v_{MgADP_{is}} \\ \frac{d[mADP]_{is}}{dt} &= +v_{mADP_{om}} / W_{is} + v_{MgADP_{is}} \\ \frac{d[fAMP]_{is}}{dt} &= (+v_{AMP_{om}} - v_{AK_{is}}) / W_{is} \\ \frac{d[P_i]_{is}}{dt} &= (-v_{PiOH} + v_{Pi_{om}}) / W_{is} \\ \frac{d\Delta\Psi}{dt} &= (+4v_{C1} + 2v_{C3} + 4v_{C4} - n_A \cdot v_{F1F0} - v_{AAC} - v_{Hleak} - v_K) / C \end{aligned}$$

## Annexe 7 : Caractérisation des plaquettes et construction de cybrides

id.	Polymorphismes				Haplogroupe	Cybrids
	m.T14798C	m.G15257A	m.C7028T	m.A4917G		
CP1	+	+			K	CCP1
CP2			+		H/HV	
CP3	+				K	CCP3
CP4	+				J	CCP4
CP5			+		H/HV	
CP6	+				U	CCP6
CP7			+		H/HV	
CP8					Autre	
CP9					Autre	
CP10			+		H/HV	
CP11			+		H/HV	
CP12	+				U	CCP12
CP13			+		H/HV	
CP14					Autre	
CP15	+	+			K	CCP15
CP16				+	T	CCP16
CP17			+		H/HV	CCP17
CP18			+		H/HV	
CP19			+		H/HV	
CP20			+		H/HV	
CP21		+			U	CCP21
CP22			+		H/HV	
CP23			+		H/HV	CCP23
CP24			+		H/HV	
CP25					Autre	
CP26	+				J	CCP26
CP27	+				J	CCP27
CP28			+		H/HV	
CP29			+		H/HV	
CP30					Autre	
CP31					Autre	
CP32					Autre	
CP33			+		H/HV	
CP34			+		H/HV	
CP35			+		H/HV	
CP36			+		H/HV	
CP37					Autre	
CP38					Autre	
CP39			+		H/HV	
CP40					Autre	
CP41			+		H/HV	
CP42			+		H/HV	
CP43			+		H/HV	
CP44			+		H/HV	CP44
CP45					Autre	
CP46				+	T	CCP46
CP47			+		H/HV	
CP48					Autre	
CP49					Autre	
CP50					Autre	
CP51					Autre	
CP52					Autre	
CP53				+	T	CCP53
CP54					Autre	
CP55			+		H/HV	
CP56			+		H/HV	
CP57			+		H/HV	
CP58					Autre	
CP59					Autre	
CP60			+		H/HV	
CP61			+		H/HV	
CP62			+		H/HV	
CP63			+		H/HV	
CP64			+		H/HV	
CP65			+		H/HV	
CP66			+		H/HV	
CP67	Echantillons non exploitables					
CP68						
CP69						
CP70						







## **Références bibliographiques**



1. López-García, P. & Moreira, D. Open Questions on the Origin of Eukaryotes. *Trends Ecol. Evol.* **30**, 697–708 (2015).
2. Sagan, L. On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* **14**, 255–274 (1967).
3. Martin, W. F., Garg, S. & Zimorski, V. Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **370**, 20140330 (2015).
4. Blackstone, N. W. An Evolutionary Framework for Understanding the Origin of Eukaryotes. *Biology* **5**, (2016).
5. Gustafsson, C. M., Falkenberg, M. & Larsson, N.-G. Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Biochem.* (2016). doi:10.1146/annurev-biochem-060815-014402
6. Ball, S. G., Bhattacharya, D. & Weber, A. P. M. EVOLUTION. Pathogen to powerhouse. *Science* **351**, 659–660 (2016).
7. Spang, A. *et al.* Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* **521**, 173–179 (2015).
8. Wallace, D. C. Colloquium paper: bioenergetics, the origins of complexity, and the ascent of man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107 Suppl 2**, 8947–8953 (2010).
9. Rand, D. M., Haney, R. A. & Fry, A. J. Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 645–653 (2004).
10. Bar-Yaacov, D., Blumberg, A. & Mishmar, D. Mitochondrial-nuclear co-evolution and its effects on OXPHOS activity and regulation. *Biochim. Biophys. Acta* **1819**, 1107–1111 (2012).
11. MacKenzie, J. A. & Payne, R. M. Mitochondrial protein import and human health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* **1772**, 509–523 (2007).
12. Dolezal, P., Likic, V., Tachezy, J. & Lithgow, T. Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria. *Science* **313**, 314–318 (2006).
13. Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P. & Rojo, M. Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 558–565 (2010).
14. Galloway, C. A., Lee, H. & Yoon, Y. Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics. *Free Radic. Biol. Med.* **53**, 2218–2228 (2012).
15. Gottlieb, R. A. & Bernstein, D. Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming. *Cell Calcium* (2016). doi:10.1016/j.ceca.2016.04.006
16. Mishra, P. Interfaces between mitochondrial dynamics and disease. *Cell Calcium* (2016). doi:10.1016/j.ceca.2016.05.004
17. Vafai, S. B. & Mootha, V. K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **491**, 374–383 (2012).

18. Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Mitochondrial homeostasis: the interplay between mitophagy and mitochondrial biogenesis. *Exp. Gerontol.* **56**, 182–188 (2014).
19. Jones, A. W. E., Yao, Z., Vicencio, J. M., Karkucinska-Wieckowska, A. & Szabadkai, G. PGC-1 family coactivators and cell fate: roles in cancer, neurodegeneration, cardiovascular disease and retrograde mitochondria-nucleus signalling. *Mitochondrion* **12**, 86–99 (2012).
20. Villena, J. A. New insights into PGC-1 coactivators: redefining their role in the regulation of mitochondrial function and beyond. *FEBS J.* **282**, 647–672 (2015).
21. Finley, L. W. S. & Haigis, M. C. The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res. Rev.* **8**, 173–188 (2009).
22. Yamano, K., Matsuda, N. & Tanaka, K. The ubiquitin signal and autophagy: an orchestrated dance leading to mitochondrial degradation. *EMBO Rep.* **17**, 300–316 (2016).
23. Voigt, A., Berlemann, L. A. & Winklhofer, K. F. The mitochondrial kinase PINK1: functions beyond mitophagy. *J. Neurochem.* (2016). doi:10.1111/jnc.13655
24. Chan, D. C. Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 265–287 (2012).
25. de Brito, O. M. & Scorrano, L. Mitofusin 2: a mitochondria-shaping protein with signaling roles beyond fusion. *Antioxid. Redox Signal.* **10**, 621–633 (2008).
26. Losón, O. C., Song, Z., Chen, H. & Chan, D. C. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* **24**, 659–667 (2013).
27. Schwarz, T. L. Mitochondrial trafficking in neurons. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
28. Frederick, R. L. & Shaw, J. M. Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic Cph. Den.* **8**, 1668–1675 (2007).
29. Duchon, M. R. Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol. Aspects Med.* **25**, 365–451 (2004).
30. Wallace, D. C. Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 685–698 (2012).
31. Mitchell, P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
32. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
33. Andrews, R. M. *et al.* Reanalysis and revision of the Cambridge reference

sequence for human mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* **23**, 147 (1999).

34. Andrews, R. M. *Revisited Cambridge Reference Sequence (CRS)*. (1999).

35. Falkenberg, M., Larsson, N.-G. & Gustafsson, C. M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 679–699 (2007).

36. Bezerra, A. R., Guimarães, A. R. & Santos, M. A. S. Non-Standard Genetic Codes Define New Concepts for Protein Engineering. *Life Basel Switz.* **5**, 1610–1628 (2015).

37. Wai, T., Teoli, D. & Shoubridge, E. A. The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat. Genet.* **40**, 1484–1488 (2008).

38. Howell, N., Chinnery, P. F., Ghosh, S. S., Fahy, E. & Turnbull, D. M. Transmission of the human mitochondrial genome. *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* **15 Suppl 2**, 235–245 (2000).

39. Carelli, V. *et al.* Mitochondria: Biogenesis and mitophagy balance in segregation and clonal expansion of mitochondrial DNA mutations. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 21–24 (2015).

40. Bogenhagen, D. F., Rousseau, D. & Burke, S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J. Biol. Chem.* **283**, 3665–3675 (2008).

41. Kukat, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 13534–13539 (2011).

42. Uhler, J. P. & Falkenberg, M. Primer removal during mammalian mitochondrial DNA replication. *DNA Repair* **34**, 28–38 (2015).

43. Holt, I. J., Lorimer, H. E. & Jacobs, H. T. Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**, 515–524 (2000).

44. Rossmannith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R. & Sbisà, E. Human mitochondrial tRNA processing. *J. Biol. Chem.* **270**, 12885–12891 (1995).

45. Rose, K. M., Morris, H. P. & Jacob, S. T. Mitochondrial poly(A) polymerase from a poorly differentiated hepatoma: purification and characteristics. *Biochemistry (Mosc.)* **14**, 1025–1032 (1975).

46. Amalric, F., Merkel, C., Gelfand, R. & Attardi, G. Fractionation of mitochondrial RNA from HeLa cells by high-resolution electrophoresis under strongly denaturing conditions. *J. Mol. Biol.* **118**, 1–25 (1978).

47. Dubin, D. T., Montoya, J., Timko, K. D. & Attardi, G. Sequence analysis and precise mapping of the 3' ends of HeLa cell mitochondrial ribosomal RNAs. *J. Mol. Biol.* **157**, 1–19 (1982).

48. Taanman, J. W. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**, 103–123 (1999).
49. Denslow, N. D., Michaels, G. S., Montoya, J., Attardi, G. & O'Brien, T. W. Mechanism of mRNA binding to bovine mitochondrial ribosomes. *J. Biol. Chem.* **264**, 8328–8338 (1989).
50. Rehling, P., Brandner, K. & Pfanner, N. Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 519–530 (2004).
51. Neupert, W. & Brunner, M. The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 555–565 (2002).
52. Cagin, U. & Enriquez, J. A. The complex crosstalk between mitochondria and the nucleus: What goes in between? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **63**, 10–15 (2015).
53. da Cunha, F. M., Torelli, N. Q. & Kowaltowski, A. J. Mitochondrial Retrograde Signaling: Triggers, Pathways, and Outcomes. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2015**, 482582 (2015).
54. Kingman, J. F. Origins of the coalescent. 1974–1982. *Genetics* **156**, 1461–1463 (2000).
55. Fitch, W. M. & Margoliash, E. Construction of phylogenetic trees. *Science* **155**, 279–284 (1967).
56. De Bruyn, A., Martin, D. P. & Lefeuvre, P. Phylogenetic reconstruction methods: an overview. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1115**, 257–277 (2014).
57. Liu, L., Yu, L., Kubatko, L., Pearl, D. K. & Edwards, S. V. Coalescent methods for estimating phylogenetic trees. *Mol. Phylogenet. Evol.* **53**, 320–328 (2009).
58. Bandelt, H. J., Forster, P., Sykes, B. C. & Richards, M. B. Mitochondrial portraits of human populations using median networks. *Genetics* **141**, 743–753 (1995).
59. Mishmar, D. *et al.* Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 171–176 (2003).
60. Goodman, M. Decoding the pattern of protein evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **38**, 105–164 (1981).
61. Gillespie, J. H. The molecular clock may be an episodic clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 8009–8013 (1984).
62. Pierron, D. *et al.* Mutation rate switch inside Eurasian mitochondrial haplogroups: impact of selection and consequences for dating settlement in Europe. *PLoS One* **6**, e21543 (2011).
63. Torroni, A. *et al.* Classification of European mtDNAs from an analysis of three European populations. *Genetics* **144**, 1835–1850 (1996).

64. Torroni, A. *et al.* Asian affinities and continental radiation of the four founding Native American mtDNAs. *Am. J. Hum. Genet.* **53**, 563–590 (1993).
65. Richards, M. B., Macaulay, V. A., Bandelt, H. J. & Sykes, B. C. Phylogeography of mitochondrial DNA in western Europe. *Ann. Hum. Genet.* **62**, 241–260 (1998).
66. Macaulay, V. *et al.* The emerging tree of West Eurasian mtDNAs: a synthesis of control-region sequences and RFLPs. *Am. J. Hum. Genet.* **64**, 232–249 (1999).
67. Wallace, D. C. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 781–821 (2007).
68. Wallace, D. C. Mitochondrial DNA variation in human radiation and disease. *Cell* **163**, 33–38 (2015).
69. Zeviani, M. & Donato, S. D. Mitochondrial disorders. *Brain* **127**, 2153–2172 (2004).
70. Sharma, V. *et al.* Redox-induced activation of the proton pump in the respiratory complex I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11571–11576 (2015).
71. Zickermann, V. *et al.* Structural biology. Mechanistic insight from the crystal structure of mitochondrial complex I. *Science* **347**, 44–49 (2015).
72. Sun, F. *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. *Cell* **121**, 1043–1057 (2005).
73. Xia, D. *et al.* Crystal structure of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**, 60–66 (1997).
74. Brändén, G., Gennis, R. B. & Brzezinski, P. Transmembrane proton translocation by cytochrome c oxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1052–1063 (2006).
75. von Ballmoos, C., Wiedenmann, A. & Dimroth, P. Essentials for ATP synthesis by F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthases. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 649–672 (2009).
76. Magner, M., Kolářová, H., Honzik, T., Švandová, I. & Zeman, J. Clinical manifestation of mitochondrial diseases. *Dev. Period Med.* **19**, 441–449 (2015).
77. Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L. & Afzelius, B. A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J. Clin. Invest.* **41**, 1776–1804 (1962).
78. Luft, R. Luft's disease revisited. Severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control. *Mt. Sinai J. Med. N. Y.* **59**, 140–145 (1992).
79. Ruiz-Pesini, E. *et al.* An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational

- phylogeny. *Nucleic Acids Res.* **35**, D823–828 (2007).
80. Parfait, B. *et al.* No mitochondrial cytochrome oxidase (COX) gene mutations in 18 cases of COX deficiency. *Hum. Genet.* **101**, 247–250 (1997).
  81. Chinnery, P. F. Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? *EMBO Mol. Med.* **7**, 1503–1512 (2015).
  82. Torraco, A., Peralta, S., Iommarini, L. & Diaz, F. Mitochondrial Diseases Part I: mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in respiratory complex subunits or assembly factors. *Mitochondrion* **21**, 76–91 (2015).
  83. Iommarini, L., Peralta, S., Torraco, A. & Diaz, F. Mitochondrial Diseases Part II: Mouse models of OXPHOS deficiencies caused by defects in regulatory factors and other components required for mitochondrial function. *Mitochondrion* **22**, 96–118 (2015).
  84. Peralta, S., Torraco, A., Iommarini, L. & Diaz, F. Mitochondrial Diseases Part III: Therapeutic interventions in mouse models of OXPHOS deficiencies. *Mitochondrion* **23**, 71–80 (2015).
  85. Wilkins, H. M., Carl, S. M. & Swerdlow, R. H. Cytoplasmic hybrid (cybrid) cell lines as a practical model for mitochondriopathies. *Redox Biol.* **2C**, 619–631 (2014).
  86. Mazat, J.-P., Fromentin, J., Heiske, M., Nazaret, C. & Ransac, S. Virtual mitochondrion: towards an integrated model of oxidative phosphorylation complexes and beyond. *Biochem. Soc. Trans.* **38**, 1215–1219 (2010).
  87. Lake, N. J., Bird, M. J., Isohanni, P. & Paetau, A. Leigh syndrome: neuropathology and pathogenesis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 482–492 (2015).
  88. Chen, B. *et al.* Loss of Mitochondrial Ndufs4 in Striatal Medium Spiny Neurons Mediates Progressive Motor Impairment in a Mouse Model of Leigh Syndrome. *Front. Mol. Neurosci.* **10**, 265 (2017).
  89. Leigh, D. Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **14**, 216–221 (1951).
  90. Orphanet. Orphanet: Syndrome de Leigh. (2017). Available at: [http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search.php?lng=FR&data\\_id=532&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseGroup=Leigh&Disease\\_Disease\\_Search\\_diseaseType=Pat&Maladie\(s\)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Leigh&title=Syndrome-de-Leigh](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search.php?lng=FR&data_id=532&Disease_Disease_Search_diseaseGroup=Leigh&Disease_Disease_Search_diseaseType=Pat&Maladie(s)/groupes%20de%20maladies=Syndrome-de-Leigh&title=Syndrome-de-Leigh). (Accessed: 20th October 2017)
  91. Lee, J. S. *et al.* Leigh Syndrome in Childhood: Neurologic Progression and Functional Outcome. *J. Clin. Neurol. Seoul Korea* **12**, 181–187 (2016).
  92. Di Filippo, M. *et al.* Pathways of neurodegeneration and experimental models of basal ganglia disorders: downstream effects of mitochondrial inhibition. *Eur. J.*

*Pharmacol.* **545**, 65–72 (2006).

93. Klawitter, V. *et al.* Plasticity of basal ganglia neurocircuitries following perinatal asphyxia: effect of nicotinamide. *Exp. Brain Res.* **180**, 139–152 (2007).

94. Byrne, E. Does mitochondrial respiratory chain dysfunction have a role in common neurodegenerative disorders? *J. Clin. Neurosci. Off. J. Neurosurg. Soc. Australas.* **9**, 497–501 (2002).

95. Arias-Carrión, O., Stamelou, M., Murillo-Rodríguez, E., Menéndez-González, M. & Pöppel, E. Dopaminergic reward system: a short integrative review. *Int. Arch. Med.* **3**, 24 (2010).

96. Henny, P. *et al.* Structural correlates of heterogeneous in vivo activity of midbrain dopaminergic neurons. *Nat. Neurosci.* **15**, 613–619 (2012).

97. Millan, M. J. [Dopamine D3 receptors as a novel target for improving the treatment of schizophrenia]. *Med. Sci. MS* **21**, 434–442 (2005).

98. Lee, Y., Kim, M.-S. & Lee, J. Neuroprotective strategies to prevent and treat Parkinson's disease based on its pathophysiological mechanism. *Arch. Pharm. Res.* **40**, 1117–1128 (2017).

99. Warren, N., O'Gorman, C., Lehn, A. & Siskind, D. Dopamine dysregulation syndrome in Parkinson's disease: a systematic review of published cases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* (2017). doi:10.1136/jnnp-2017-315985

100. Giachin, G., Bouverot, R., Acajjaoui, S., Pantalone, S. & Soler-López, M. Dynamics of Human Mitochondrial Complex I Assembly: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Front. Mol. Biosci.* **3**, 43 (2016).

101. Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889–909 (2003).

102. Ransom, B. R., Kunis, D. M., Irwin, I. & Langston, J. W. Astrocytes convert the parkinsonism inducing neurotoxin, MPTP, to its active metabolite, MPP<sup>+</sup>. *Neurosci. Lett.* **75**, 323–328 (1987).

103. Smeyne, R. J. & Jackson-Lewis, V. The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **134**, 57–66 (2005).

104. Duty, S. & Jenner, P. Animal models of Parkinson's disease: a source of novel treatments and clues to the cause of the disease. *Br. J. Pharmacol.* **164**, 1357–1391 (2011).

105. Desai, V. G., Feuers, R. J., Hart, R. W. & Ali, S. F. MPP(+)-induced neurotoxicity in mouse is age-dependent: evidenced by the selective inhibition of complexes of electron transport. *Brain Res.* **715**, 1–8 (1996).

106. Mazzio, E. A. & Soliman, K. F. A. Cytoprotection of pyruvic acid and reduced beta-nicotinamide adenine dinucleotide against hydrogen peroxide toxicity in

neuroblastoma cells. *Neurochem. Res.* **28**, 733–741 (2003).

107. Battino, M., Littarru, G. P., Gorini, A. & Villa, R. F. Coenzyme Q, peroxidation and cytochrome oxidase features after parkinson's-like disease by MPTP toxicity in intra-synaptic and non-synaptic mitochondria from *Macaca fascicularis* cerebral cortex and hippocampus: action of dihydroergocriptine. *Neurochem. Res.* **21**, 1505–1514 (1996).

108. Przedborski, S. *et al.* The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. *Restor. Neurol. Neurosci.* **16**, 135–142 (2000).

109. Lagrue, E. *et al.* MPTP intoxication in mice: a useful model of Leigh syndrome to study mitochondrial diseases in childhood. *Metab. Brain Dis.* **24**, 321–335 (2009).

110. DiMauro, S. & Schon, E. A. Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2656–2668 (2003).

111. Saura, J. *et al.* Localization of monoamine oxidases in human peripheral tissues. *Life Sci.* **59**, 1341–1349 (1996).

112. Kindt, M. V., Youngster, S. K., Sonsalla, P. K., Duvoisin, R. C. & Heikkila, R. E. Role for monoamine oxidase-A (MAO-A) in the bioactivation and nigrostriatal dopaminergic neurotoxicity of the MPTP analog, 2'Me-MPTP. *Eur. J. Pharmacol.* **146**, 313–318 (1988).

113. Herraiz, T. & Guillén, H. Inhibition of the bioactivation of the neurotoxin MPTP by antioxidants, redox agents and monoamine oxidase inhibitors. *Food Chem. Toxicol. Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **49**, 1773–1781 (2011).

114. Rousselet, E. *et al.* Behavioral changes are not directly related to striatal monoamine levels, number of nigral neurons, or dose of parkinsonian toxin MPTP in mice. *Neurobiol. Dis.* **14**, 218–228 (2003).

115. Perry, C. G. R. *et al.* Repeated transient mRNA bursts precede increases in transcriptional and mitochondrial proteins during training in human skeletal muscle. *J. Physiol.* **588**, 4795–4810 (2010).

116. Burke, R. E. & O'Malley, K. Axon degeneration in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* **246**, 72–83 (2013).

117. Korecka, J. A., Eggers, R., Swaab, D. F., Bossers, K. & Verhaagen, J. Modeling early Parkinson's disease pathology with chronic low dose MPTP treatment. *Restor. Neurol. Neurosci.* **31**, 155–167 (2013).

118. Pain, S. *et al.* Toxicity of MPTP on neurotransmission in three mouse models of Parkinson's disease. *Exp. Toxicol. Pathol. Off. J. Ges. Toxikol. Pathol.* **65**, 689–694 (2013).

119. Stephenson, D. *et al.* Quantification of MPTP-induced dopaminergic neurodegeneration in the mouse substantia nigra by laser capture microdissection. *J.*

*Neurosci. Methods* **159**, 291–299 (2007).

120. Osman, M. Y. & Osman, H. M. Y. Inhibitory effect of acetylcholine on monoamine oxidase A and B activity in different parts of rat brain. *Arzneimittelforschung*. **58**, 493–496 (2008).

121. Gerards, M., Sallevelt, S. C. E. H. & Smeets, H. J. M. Leigh syndrome: Resolving the clinical and genetic heterogeneity paves the way for treatment options. *Mol. Genet. Metab.* **117**, 300–312 (2016).

122. Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V. & Wallace, D. C. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* **303**, 223–226 (2004).

123. Daanen, H. A. M. & Van Marken Lichtenbelt, W. D. Human whole body cold adaptation. *Temp. Austin Tex* **3**, 104–118 (2016).

124. Gnaiger, E. *et al.* Mitochondrial coupling and capacity of oxidative phosphorylation in skeletal muscle of Inuit and Caucasians in the arctic winter. *Scand. J. Med. Sci. Sports* **25 Suppl 4**, 126–134 (2015).

125. Kenney, M. C. *et al.* Inherited mitochondrial DNA variants can affect complement, inflammation and apoptosis pathways: insights into mitochondrial-nuclear interactions. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 3537–3551 (2014).

126. Kenney, M. C. *et al.* Molecular and bioenergetic differences between cells with African versus European inherited mitochondrial DNA haplogroups: implications for population susceptibility to diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1842**, 208–219 (2014).

127. Pello, R. *et al.* Mitochondrial DNA background modulates the assembly kinetics of OXPHOS complexes in a cellular model of mitochondrial disease. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 4001–4011 (2008).

128. Larsen, S. *et al.* Increased intrinsic mitochondrial function in humans with mitochondrial haplogroup H. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 226–231 (2014).

129. Martínez-Redondo, D. *et al.* Human mitochondrial haplogroup H: the highest VO<sub>2</sub>max consumer—is it a paradox? *Mitochondrion* **10**, 102–107 (2010).

130. Hendrickson, S. L. *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups influence AIDS progression. *AIDS Lond. Engl.* **22**, 2429–2439 (2008).

131. Guzmán-Fulgencio, M. *et al.* Mitochondrial haplogroups are associated with clinical pattern of AIDS progression in HIV-infected patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* **63**, 178–183 (2013).

132. Azar, A. *et al.* Mitochondrial Haplogroup Influences Motor Function in Long-Term HIV-1-Infected Individuals. *PloS One* **11**, e0163772 (2016).

133. Ruiz-Pesini, E. *et al.* Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 682–696 (2000).

134. Demain, L. a. M., Conway, G. S. & Newman, W. G. Genetics of mitochondrial dysfunction and infertility. *Clin. Genet.* **91**, 199–207 (2017).
135. Cocoş, R., Schipor, S., Badiu, C. & Raicu, F. Mitochondrial DNA haplogroup K as a contributor to protection against thyroid cancer in a population from southeast Europe. *Mitochondrion* (2017). doi:10.1016/j.mito.2017.08.012
136. Pierron, D. *et al.* New evidence of a mitochondrial genetic background paradox: impact of the J haplogroup on the A3243G mutation. *BMC Med. Genet.* **9**, 41 (2008).
137. Wallace, D. C. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 8739–8746 (1994).
138. Rose, G. *et al.* Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **9**, 701–707 (2001).
139. Chen, A., Raule, N., Chomyn, A. & Attardi, G. Decreased reactive oxygen species production in cells with mitochondrial haplogroups associated with longevity. *PloS One* **7**, e46473 (2012).
140. Pyle, A. *et al.* Mitochondrial DNA haplogroup cluster UKJT reduces the risk of PD. *Ann. Neurol.* **57**, 564–567 (2005).
141. Maruszak, A., Canter, J. A., Styczyńska, M., Żekanowski, C. & Barcikowska, M. Mitochondrial haplogroup H and Alzheimer's disease—Is there a connection? *Neurobiol. Aging* **30**, 1749–1755 (2009).
142. Richard, C. *et al.* An mtDNA perspective of French genetic variation. *Ann. Hum. Biol.* **34**, 68–79 (2007).
143. Dubut, V. *et al.* mtDNA polymorphisms in five French groups: importance of regional sampling. *Eur. J. Hum. Genet. EJHG* **12**, 293–300 (2004).
144. MITOMAP : a human mitochondrial genome database. (2016).
145. Gao, X. *et al.* Structural basis for the quinone reduction in the bc1 complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc1 with bound substrate and inhibitors at the Qi site. *Biochemistry (Mosc.)* **42**, 9067–9080 (2003).
146. Rose, P. W. *et al.* The RCSB protein data bank: integrative view of protein, gene and 3D structural information. *Nucleic Acids Res.* **45**, D271–D281 (2017).
147. Burley, S. K. *et al.* Protein Data Bank (PDB): The Single Global Macromolecular Structure Archive. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1607**, 627–641 (2017).
148. ATCC website. American Type Cell Collection, 143B documentation. (2014).
149. King, M. P. Use of ethidium bromide to manipulate ratio of mutated and wild-

- type mitochondrial DNA in cultured cells. *Methods Enzymol.* **264**, 339–344 (1996).
150. Chomyn, A. Platelet-mediated transformation of human mitochondrial DNA-less cells. *Methods Enzymol.* **264**, 334–339 (1996).
  151. Spinazzi, M. *et al.* Optimization of respiratory chain enzymatic assays in muscle for the diagnosis of mitochondrial disorders. *Mitochondrion* **11**, 893–904 (2011).
  152. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
  153. Heiske, M., Nazaret, C. & Mazat, J.-P. Modeling the respiratory chain complexes with biothermokinetic equations - the case of complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 1707–1716 (2014).
  154. Heiske, M., Letellier, T. & Klipp, E. Comprehensive mathematical model of oxidative phosphorylation valid for physiological and pathological conditions. *FEBS J.* **284**, 2802–2828 (2017).
  155. Michaelis, L. & Menten, M. M. L. The kinetics of invertin action. 1913. *FEBS Lett.* **587**, 2712–2720 (2013).
  156. Bohnensack, R. Control of energy transformation of mitochondria. Analysis by a quantitative model. *Biochim. Biophys. Acta* **634**, 203–218 (1981).
  157. Magnus, G. & Keizer, J. Minimal model of beta-cell mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  handling. *Am. J. Physiol.* **273**, C717–733 (1997).
  158. Cortassa, S., Aon, M. A., Marbán, E., Winslow, R. L. & O'Rourke, B. An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics. *Biophys. J.* **84**, 2734–2755 (2003).
  159. Korzeniewski, B. & Zoladz, J. A. A model of oxidative phosphorylation in mammalian skeletal muscle. *Biophys. Chem.* **92**, 17–34 (2001).
  160. Beard, D. A. A biophysical model of the mitochondrial respiratory system and oxidative phosphorylation. *PLoS Comput. Biol.* **1**, e36 (2005).
  161. Wojtczak, L., Bogucka, K., Duszyński, J., Zabłocka, B. & Zólkiewska, A. Regulation of mitochondrial resting state respiration: slip, leak, heterogeneity? *Biochim. Biophys. Acta* **1018**, 177–181 (1990).
  162. Rigoulet, M. *et al.* Flux-force relationships in intact cells: a helpful tool for understanding the mechanism of oxidative phosphorylation alterations? *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 117–124 (1998).
  163. Amo, T. & Brand, M. D. Were inefficient mitochondrial haplogroups selected during migrations of modern humans? A test using modular kinetic analysis of coupling in mitochondria from cybrid cell lines. *Biochem. J.* **404**, 345–351 (2007).

164. Rossignol, R., Malgat, M., Mazat, J. P. & Letellier, T. Threshold effect and tissue specificity. Implication for mitochondrial cytopathies. *J. Biol. Chem.* **274**, 33426–33432 (1999).
165. Rossignol, R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.* **370**, 751–762 (2003).
166. Rolfe, D. F., Hulbert, A. J. & Brand, M. D. Characteristics of mitochondrial proton leak and control of oxidative phosphorylation in the major oxygen-consuming tissues of the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1188**, 405–416 (1994).
167. Alvarez-Iglesias, V. *et al.* New population and phylogenetic features of the internal variation within mitochondrial DNA macro-haplogroup R0. *PloS One* **4**, e5112 (2009).
168. Yu, G., Tian, J., Yin, J., Li, Q. & Zhao, X. Incompatibility of nucleus and mitochondria causes xenomitochondrial cybrid unviable across human, mouse, and pig cells. *Anim. Biotechnol.* **25**, 139–149 (2014).
169. Ma, H. *et al.* Incompatibility between Nuclear and Mitochondrial Genomes Contributes to an Interspecies Reproductive Barrier. *Cell Metab.* **24**, 283–294 (2016).
170. Haraguchi, Y., Chung, A. B., Neill, S. & Wallace, D. C. OXBOX and REBOX, overlapping promoter elements of the mitochondrial F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase beta subunit gene. OXBOX/REBOX in the ATPsyn beta promoter. *J. Biol. Chem.* **269**, 9330–9334 (1994).
171. Amo, T. & Brand, M. D. Were inefficient mitochondrial haplogroups selected during migrations of modern humans? A test using modular kinetic analysis of coupling in mitochondria from cybrid cell lines. *Biochem. J.* **404**, 345–351 (2007).
172. Carelli, V. *et al.* Respiratory function in cybrid cell lines carrying European mtDNA haplogroups: implications for Leber's hereditary optic neuropathy. *Biochim. Biophys. Acta* **1588**, 7–14 (2002).
173. Mitchell, P. The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett.* **59**, 137–139 (1975).
174. Mitchell, P. Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c<sub>1</sub> complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle. *FEBS Lett.* **56**, 1–6 (1975).
175. Mazat, J.-P. & Ransac, S. [The cytochrome bc<sub>1</sub> complex in the mitochondrial respiratory chain functions according to the Q cycle hypothesis of Mitchell: the proof using a stochastic approach?]. *Médecine Sci. MS* **26**, 1079–1086 (2010).

## Characterization of models that can modify mitochondrial energy metabolism

### *Leigh syndrome and mitochondrial Haplogroups*

The mitochondrion is an intracellular organelle responsible for the cellular energy production, by synthesizing ATP through the oxidative phosphorylation (OXPHOS). One of the characteristics of this organelle is that it has its own DNA (mtDNA) encoding for subunits of OXPHOS complexes. Any alterations of mitochondrial energy metabolism cause mitochondrial pathologies whose severity is generally inversely proportional to the age of onset. Some scientific studies are looking at the mechanisms of occurrence and development of these diseases in order to better understand them and to be able to offer therapies. However, there is no tool that can transform mtDNA in a targeted way by mutation or DNA rearrangement. Moreover, there are still few animal models of mitochondrial pathology that would allow integrative studies on the one hand, and on the other hand, to try out possible therapeutic molecules.

In this thesis, we studied two types of models involving the modification of mitochondrial metabolism either by chemical treatment or by the use of mutations found in individuals. In a first part, we were interested in the realization of mouse model with a large number of characteristics of the Leigh syndrome, a progressive neurological disease characterized by neuropathological lesions associating a damage of the brain stem and the basal ganglia. For this study, we have used the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) neurotoxin, known for its toxicity to dopamine neurons and also as an inhibitor of mitochondrial respiratory chain. We analyzed the activity of the OXPHOS complexes I to IV on brain tissues (cerebellum, cortex, striatum and substantia nigra) and peripheral tissues (heart, liver, muscle and kidney) from treated and untreated mice. Inhibition of complexes III and/or IV in the liver, cortex, striatum and cerebellum was found. These results, combined with an increased neurodegeneration found in a previous study, are all characteristics of Leigh Syndrome. Mice treated with MPTP seem to be a good model for this mitochondrial pathology.

In the second project, we looked at the effect of mtDNA haplogroups (haplotypes grouping) on mitochondrial metabolism. Although, haplogroups are defined by neutral mutations of mtDNA (polymorphism), several studies have shown associations between haplogroups and some pathologies suggesting that haplogroups are able to have a protective effect or being a risk factor in the pathology development. Recently, our laboratory has confirmed that some haplogroups may not be neutral and have the ability to influence the mitochondrial energy metabolism functioning. Therefore, my research project consisted of setting up a model to study these cellular and molecular mechanisms. We looked for haplogroups of interest in the population in order to elaborate a cellular collection where each cell line has a particular haplogroup but with a common nuclear genetic background in all the cell lines. This collection was obtained by cybride constructions. We characterized these cybrides biochemically by analyzing the activity of each complex, determining kinetic parameters ( $K_M$  and  $V_{max}$ ) and titration specific respiratory chain inhibitors. Concomitantly, we defined cell parameters via growth curves. All these results were integrated into a computer model specifically developed in our laboratory to model mitochondrial processes. This project gives us some evidence of the mtDNA haplogroups' influence on mitochondrial metabolism and to propose a modulated vision of mitochondrial pathologies for their study and their diagnosis, highlighting the notion of personalized medicine. As each haplogroup modulates in the different way the mitochondrial metabolism, each individual could have a personal response to the same mutation or pathology. In future, the mtDNA genetics background should be taken into account to find new strategies or new targets for the therapies of mitochondrial diseases.

**Keywords:** Mitochondria, mtDNA, Leigh syndrom, MPTP, haplogroup, OXPHOS

## **Caractérisation de modèles pouvant modifier le métabolisme énergétique mitochondrial**

### ***Syndrome de Leigh et Haplogroupes mitochondriaux***

Un des rôles de la mitochondrie, qui possède son propre ADN (ADNmt), est la production de l'énergie nécessaire à la cellule, qu'elle synthétise sous forme d'ATP grâce aux oxydations phosphorylantes (OXPHOS). Ainsi, une altération du métabolisme énergétique mitochondrial peut provoquer l'apparition de pathologies mitochondriales dont, généralement, la sévérité est inversement proportionnelle à l'âge de début. De nombreuses études s'intéressent aux mécanismes d'apparition et de développement de ces maladies afin de mieux les comprendre et de pouvoir proposer des thérapies. Cependant, à ce jour, il est encore difficile de transformer l'ADNmt de façon ciblée (remaniement ou mutation). De plus, il existe encore peu de modèles animaux de pathologies mitochondriales qui permettraient de réaliser des études intégratives et d'essayer d'éventuelles molécules thérapeutiques.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons étudié deux types de modèles impliquant la modification du métabolisme mitochondrial. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la réalisation d'un modèle murin exprimant un grand nombre de caractéristiques du syndrome de Leigh, une maladie neurologique progressive. Pour cela nous avons utilisé une neurotoxine (MPTP) qui est connue pour sa toxicité envers les neurones dopaminergiques et aussi comme inhibiteur de la chaîne respiratoire. Nous avons analysé l'activité de chaque complexe OXPHOS de différents tissus cérébraux et de tissus périphériques (cœur, foie, muscle et rein), prélevés sur des souris traitées et non-traitées. Nous avons retrouvé une inhibition des complexes III et/ou IV de la chaîne respiratoire dans le foie, le cortex, le striatum et le cervelet. Ces résultats, ajoutés à une neuro-dégénérescence accrue retrouvée dans une étude précédente, sont tous caractéristiques du syndrome de Leigh. Ces souris traitées par le MPTP semblent donc être un bon modèle pour l'étude de cette pathologie mitochondriale.

Dans un second projet, nous nous sommes intéressés à l'effet des haplogroupes de l'ADNmt sur le métabolisme mitochondrial. En effet, bien qu'ils soient définis par des mutations neutres de l'ADNmt (polymorphismes), plusieurs études ont démontré des associations entre les haplogroupes et les pathologies, suggérant que les haplogroupes sont capables d'avoir un effet protecteur ou aggravant dans l'apparition d'une pathologie. Récemment, notre laboratoire a montré que certains haplogroupes avaient la capacité d'influencer le fonctionnement du métabolisme énergétique mitochondrial. Mon projet de recherche a donc consisté à mettre en place un modèle afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ce phénomène. Pour cela, nous avons recherché des haplogroupes d'intérêt dans la population française afin d'élaborer une collection de « cybrides » où chaque lignée de cellules possède un haplogroupe particulier mais un fonds génétique nucléaire commun à toutes les lignées. Nous avons caractérisé ces cybrides de manière biochimique (analyse de l'activité et des paramètres cinétiques de chaque complexe) et phénotypique (courbes de croissance). L'ensemble de ces résultats a été intégré dans un modèle informatique spécifiquement développé dans notre laboratoire pour modéliser la physiologie de la mitochondrie. Ce projet nous a permis de mettre en évidence l'influence des haplogroupes de l'ADNmt sur le métabolisme mitochondrial et de proposer une vision modulée des pathologies mitochondriales tant pour leur étude que pour leur diagnostic, en faisant ressortir la notion de médecine personnalisée. A l'avenir, il sera nécessaire de tenir compte du contexte génétique de l'ADNmt pour trouver de nouvelles stratégies ou de nouvelles cibles pour les thérapies des maladies mitochondriales.

**Mots-clés :** Mitochondrie, ADNmt, syndrome de Leigh, MPTP, haplogroupe, OXPHOS