



HAL
open science

Régulation du Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial et toxicité induite par les analogues de l'ubiquinone dans les hépatocytes cancéreux.

Flavien Devun

► **To cite this version:**

Flavien Devun. Régulation du Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial et toxicité induite par les analogues de l'ubiquinone dans les hépatocytes cancéreux.. Biologie cellulaire. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. NNT: . tel-00347922

HAL Id: tel-00347922

<https://theses.hal.science/tel-00347922>

Submitted on 17 Dec 2008

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Année 2008

N°

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement

par

Flavien DEVUN

Le 31 octobre 2008

**RÉGULATION DU PORE DE TRANSITION DE
PERMÉABILITÉ MITOCHONDRIAL ET TOXICITÉ
INDUITE PAR LES ANALOGUES DE L'UBIQUINONE
DANS LES HÉPATOCTES CANCÉREUX**

COMPOSITION DU JURY :

Président du Jury : Dr. Gérard BRANDOLIN

Rapporteurs : Pr. Louis CASTEILLA

Pr. Michel RIGOULET

Directeur de Thèse : Pr. Eric FONTAINE

Thèse préparée au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
INSERM U884

Université Joseph Fourier, Grenoble
Sous la direction du Pr. Eric FONTAINE

REMERCIEMENTS

Je remercie mon directeur de thèse, Eric Fontaine, pour m'avoir accueilli au sein de son équipe. La pertinence de ses idées scientifiques m'ont permis de contourner de nombreux obstacles expérimentaux et aussi de surmonter les moments de découragement, tout en me laissant une large autonomie dans mes travaux.

Je tiens à remercier les professeurs Louis Casteilla et Michel Rigoulet d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce manuscrit, ainsi que le docteur Gérard Brandolin pour avoir bien voulu examiner ce travail.

Merci à tous les membres du LBFA, pour leurs conseils scientifiques, leur aide technique et leur bonne humeur au quotidien, et plus particulièrement à Christiane qui m'a grandement fait bénéficier de son expérience en culture, à Dom pour ses discussions et conseils, à Fred pour m'avoir encadré lors de ma première année de thèse et enfin à Cécile pour ses nombreux conseils techniques.

Je remercie également la Ligue Nationale Contre le Cancer pour avoir porté un intérêt à mes recherches et pour avoir financé mes travaux pendant ces trois années.

Merci à Anne-Laure, Mathieu et aujourd'hui Romane, pour m'avoir fait partager leurs moments de bonheurs tout au long des années.

Merci à Nico pour toutes ces franches rigolades et aussi pour la thèse d'entraînement que nous avons faite ensemble.

Merci à Tim pour sa motivation toute particulière.

Merci à mes vieux potes du collège, To, Gaët et Delph, avec qui nous avons toujours gardé contact malgré les distances.

Merci à mes amis du vendredi, pour nos joyeuses soirées et pour m'avoir demandé toutes les semaines quel était le sujet de ma thèse sans pouvoir jamais le retenir.

Je remercie toute ma famille, qui m'a toujours soutenu et aidé au long de ma vie comme de mes études.

Enfin, je remercie Audrey pour son aide de tous les instants, et bien plus encore...

RÉGULATION DU PTP ET TOXICITÉ INDUITE PAR LES ANALOGUES DE L'UBIQUINONE DANS LES HÉPATOCYTES CANCÉREUX

La mitochondrie joue un rôle majeur dans la mort cellulaire par nécrose et apoptose. Un des phénomènes hautement régulés conduisant à cette mort cellulaire est la transition de perméabilité mitochondriale qui est médiée par l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) localisé dans la membrane interne. Dans les mitochondries de foie de rat, il a été constaté que les analogues de l'ubiquinone ont trois types d'action sur l'ouverture du PTP : l'induction, l'inhibition ou l'interaction sans effet régulateur. Bien que l'inhibition du PTP soit habituellement protectrice de la mort cellulaire, il a été rapporté que des quinones inhibitrices provoquent une toxicité sur certaines lignées cellulaires.

Dans notre étude, nous nous sommes attachés à comprendre d'où peuvent provenir ces divergences, en travaillant sur des lignées hépatocytaires immortalisées et cancéreuses. Nous avons observé que la régulation du PTP par les analogues de l'ubiquinone peut être bouleversée par l'immortalisation et/ou la cancérisation, alors que l'effet de la ciclosporine A demeure inchangé. Tant en culture qu'en co-culture, cette caractéristique unique permet une toxicité ciblée, même entre deux lignées cellulaires très proches. Dans certaines lignées, certaines ubiquinones inhibitrices entraînent malgré tout une mort cellulaire. Nous avons pu montrer que cette toxicité est due à l'augmentation de la production radicalaire. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives dans l'utilisation du PTP comme cible moléculaire de thérapie anticancéreuse sélective.

MOTS CLES : Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial, Régulation, Ubiquinone, Cytotoxicité, Hépatocytes, Cancer.

CANCEROUS HEPATOCYTES PTP REGULATION AND TOXICITY INDUCED BY UBIQUINONE ANALOGS

Mitochondria play a key role in apoptotic and necrotic cell death. One of the key mitochondrial events leading to cell death is the Mitochondrial Permeability Transition (MPT), a highly regulated phenomenon mediated by an inner membrane channel opening. In rat liver mitochondria, ubiquinone analogs have showed their ability to modulate pore opening by three functional ways: activation, inhibition and inactive interaction. Although MPT inhibitors usually protect from cell death, unexpected toxicity from inhibiting ubiquinone has been reported in different cell lines.

In this work, we aimed at understanding this opposite effects using immortalized and cancerous hepatocyte cell lines. We observed that MPT regulation by ubiquinone analogs might dramatically change after immortalization or transformation into cancer, whereas the effect of cyclosporin A remained unaffected. Studies on cell cultures and co-cultures shown that this unique characteristic can lead to a selective toxicity on similar cells, depending on their status (cancer vs. immortalization). Some inhibiting ubiquinones were cytotoxic in cells where they induced a dramatic oxidative stress, whereas they were non toxic for cells where they did not affect free radical production. These findings open new perspectives in the use of MPT as a molecular targeted in cell death therapies.

KEY WORDS : Mitochondrial Permeability Transition Pore, Regulation, Ubiquinone, Toxicity, Hepatocytes, Cancer.

SOMMAIRE

| | |
|---|-----------|
| LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES..... | 12 |
| ABREVIATIONS..... | 15 |
| PREAMBULE..... | 18 |

INTRODUCTION..... 19

I. Mitochondrie..... 20

| | |
|---|----|
| I.A. Origine de la mitochondrie | 20 |
| I.B. Organisation de la mitochondrie..... | 20 |
| I.C. Fonctions mitochondriales | 21 |
| I.C.1. Oxydation phosphorylante..... | 21 |
| I.C.1.1. La chaîne respiratoire mitochondriale | 22 |
| I.C.1.2. L'ATP synthase | 24 |
| I.C.1.3. L'ubiquinone..... | 24 |
| I.C.2. Echanges bidirectionnels avec cytoplasme | 28 |
| I.C.2.1. Transport à travers la membrane externe..... | 28 |
| I.C.2.2. Transport à travers la membrane interne..... | 28 |
| I.C.3. Mort cellulaire | 33 |

II. Le Pore de Transition de Perméabilité Mitochondrial 36

| | |
|---|----|
| II.A. Le phénomène de transition de perméabilité mitochondriale | 36 |
| II.B. Le Pore de Transition de Perméabilité..... | 38 |
| II.B.1. La Nature du Pore de Transition de Perméabilité | 39 |
| II.B.1.1. Les protéines de la membrane interne..... | 39 |
| II.B.1.2. Les partenaires régulateurs..... | 41 |
| II.B.2. La régulation du PTP..... | 47 |
| II.B.2.1. Les cations divalents..... | 47 |
| II.B.2.2. Le pH matriciel..... | 49 |
| II.B.2.3. Le potentiel membranaire..... | 50 |
| II.B.2.4. Le stress oxydant..... | 51 |
| II.B.2.5. Le Phosphate inorganique..... | 52 |
| II.B.2.6. Le flux d'électrons à travers le complexe I..... | 53 |
| II.B.2.7. Les ubiquinones | 53 |
| II.B.3. Fonctions physiologiques du PTP..... | 58 |
| II.B.3.1. Homéostasie mitochondriale et signalisation..... | 59 |
| II.B.3.2. Mort Cellulaire | 61 |

III. La transition de perméabilité et le cancer..... 65

| | |
|---|-----------|
| MATERIEL ET METHODES..... | 67 |
| I. Matériel..... | 68 |
| I.A. Culture cellulaire | 68 |
| I.A.1. Conditions de culture | 68 |
| I.A.2. Prélèvement des cellules | 69 |
| I.B. Prélèvement des mitochondries..... | 70 |
| I.C. Les ubiquinones | 71 |
| II. Méthodes..... | 71 |
| II.A. Mesure de la capacité de rétention calcique | 71 |
| II.A.1. Perméabilisation des cellules..... | 71 |
| II.A.2. Mesure de la capacité de rétention calcique..... | 72 |
| II.B. Etude de la mort cellulaire | 73 |
| II.B.1. Préparation des échantillons..... | 73 |
| II.B.1.1. Cultures simples..... | 74 |
| II.B.1.2. Co-cultures et marquage membranaire..... | 74 |
| II.B.2. Traitement..... | 75 |
| II.B.3. Détermination du taux de mortalité cellulaire..... | 75 |
| II.B.3.1. Exclusion du bleu de trypan | 75 |
| II.B.3.2. Marquage à l'annexine V-FITC..... | 76 |
| II.C. Mesure de la production radicalaire..... | 78 |
| II.D. Dosage spectrophotométrique des quinones | 78 |
| II.D.1. Mesure du coefficient de partition..... | 78 |
| II.D.2. Dosage dans le surnageant cellulaire..... | 79 |
| III. Analyse statistique..... | 79 |
| | |
| RESULTATS ET DISCUSSION | 80 |
| I. Etude de la régulation du PTP par les ubiquinones | 81 |
| I.A. Une régulation différente selon la lignée | 81 |
| I.A.1. Régulation du PTP par l'ubiquinone 0 | 81 |
| I.A.2. Régulation du PTP par trois autres ubiquinones..... | 84 |
| I.B. Mécanisme de régulation | 86 |
| I.B.1. Un site d'action spécifique aux ubiquinones | 86 |
| I.B.1.1. Compétitions avec des inhibiteurs de référence..... | 86 |
| I.B.1.2. Compétitions inter-quinones..... | 89 |
| I.B.2. Un site d'action hydrophile ?..... | 91 |
| I.C. Discussion | 95 |
| I.C.1. Une inversion de la régulation du PTP spécifique aux ubiquinones..... | 95 |
| I.C.2. Un site d'action hydrophile | 97 |
| I.C.3. Une variation de l'effet régulateur due à la cancérisation ou à l'immortalisation | 99 |

| | |
|---|------------|
| II. Toxicité induite par les ubiquinones | 102 |
| II.A. Une toxicité différente selon la lignée..... | 102 |
| II.A.1. Détermination de la durée de traitement nécessaire..... | 102 |
| II.A.2. Evaluation de la toxicité par microscopie optique | 103 |
| II.A.3. Evaluation de la toxicité par cytométrie en flux..... | 105 |
| II.B. Mécanisme de la toxicité | 109 |
| II.B.1. Une cytotoxicité médiée par le PTP | 109 |
| II.B.2. Production de ROS | 111 |
| II.B.3. Effet des anti-oxydants sur les ROS | 115 |
| II.B.4. Effet des anti-oxydants sur la CRC..... | 117 |
| II.B.5. Effet des anti-oxydants sur la toxicité..... | 118 |
| II.C. Discussion | 119 |
| II.C.1. Une cytotoxicité médiée par le PTP | 119 |
| II.C.2. Une production radicalaire différente selon l'environnement cellulaire..... | 119 |
| II.C.3. Une toxicité indépendante due aux radicaux libres | 121 |
| II.C.4. Un site d'action sensible à l'état rédox des quinones ? | 122 |
| III. Une toxicité sélective | 123 |
| III.A. Technique de marquage membranaire..... | 123 |
| III.B. Co-culture | 125 |
| III.B.1. Microscopie confocale..... | 125 |
| III.B.2. Cytomètre..... | 127 |
| III.C. Discussion..... | 129 |
| CONCLUSION..... | 135 |
| BIBLIOGRAPHIE | 139 |

LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| Figure 1: <i>Structure de la mitochondrie</i> | 21 |
| Figure 2 : <i>La chaîne respiratoire mitochondriale</i> | 22 |
| Figure 3 : <i>Modèle du cycle Q au niveau du complexe III</i> | 26 |
| Figure 4 : <i>Les différentes structures de l'ubiquinone</i> | 27 |
| Figure 5 : <i>Les transporteurs mitochondriaux du calcium</i> | 31 |
| Figure 6 : <i>Visualisation du gonflement mitochondrial par microscopie électronique</i> | 37 |
| Figure 7 : <i>Principaux mécanismes de régulation du pore de transition de perméabilité mitochondrial</i> | 48 |
| Figure 8 : <i>Structures des ubiquinones régulant le PTP via un site d'action spécifique</i> | 55 |

RESULTATS ET DISCUSSION

| | |
|--|----|
| Figure 9 : <i>Effet de 40 μM d'ubiquinone 0 sur la capacité de rétention calcique des lignées hépatocytaires</i> | 81 |
| Figure 10 : <i>Effets de différentes concentrations d'ubiquinone 0 sur la capacité de rétention calcique de trois lignées hépatocytaires</i> | 82 |
| Figure 11 : <i>Inhibition de la prise de calcium par une haute dose d'ubiquinone 0</i> | 83 |
| Figure 12 : <i>Effet de l'ubiquinone 0 sur la capacité de rétention calcique des hépatocytes humains immortalisés THLE-3</i> | 84 |
| Figure 13 : <i>Mesures de la capacité de rétention calcique en fonction des ubiquinones</i> | 85 |
| Figure 14 : <i>Effet de la roténone sur la capacité de rétention calcique en présence et en absence d'ubiquinone 0</i> | 87 |
| Figure 15 : <i>Effet de la ciclosporine A sur la capacité de rétention calcique en présence et en absence d'ubiquinones activatrices</i> | 88 |
| Figure 16 : <i>Compétitions inter-quinones sur les cellules Clone 9</i> | 89 |
| Figure 17 : <i>Compétitions inter-quinones sur les cellules MH1C1 et HepG2</i> | 90 |

| | |
|---|-----|
| Figure 18 : Partage des ubiquinones 0 et 10 entre l'eau et le cyclohexane..... | 91 |
| Figure 19 : Régulation du PTP par les ubiquinones 0 et 10 en fonction du taux de DMSO..... | 92 |
| Figure 20 : Régulation du PTP des cellules Clone 9 par l'ubiquinone 0 en fonction du taux de DMSO..... | 95 |
| Figure 21 : Effets des ubiquinones sur la capacité de rétention calcique d'hépatocytes fraîchement isolés de foie de rat..... | 99 |
| Figure 22 : Absorption de l'ubiquinone 0 au cours du temps par les cellules Clone 9 en culture..... | 102 |
| Figure 23 : Evaluation au bleu de trypan de la mortalité cellulaire induite par l'ubiquinone 0..... | 104 |
| Figure 24 : Evaluation par cytométrie en flux de la mortalité cellulaire induite par l'ubiquinone 0..... | 106 |
| Figure 25 : Evaluation par cytométrie en flux de la mortalité cellulaire induite par l'ubiquinone 5..... | 107 |
| Figure 26 : Comparaison entre l'effet de 40 μ M d'ubiquinone 0 et 100 μ M de décyl-ubiquinone sur les cellules Clone 9..... | 108 |
| Figure 27 : Effets des compétitions inter-quinones sur la mortalité cellulaire..... | 109 |
| Figure 28 : Effet de la CsA sur la toxicité induite par les quinones activatrices..... | 111 |
| Figure 29 : Effets des ubiquinones sur la production radicalaire..... | 112 |
| Figure 30 : Effets des compétitions entre la décyl-ubiquinone et l'ubiquinone 0 et 5 quinones sur la capacité de rétention calcique et la mortalité cellulaire..... | 114 |
| Figure 31 : Effets des anti-oxydants sur la production radicalaire induite par l'ubiquinone 0 sur les cellules Clone 9..... | 116 |
| Figure 32 : Effet du tocophérol sur la régulation du PTP des cellules Clone 9 par l'ubiquinone 0..... | 117 |
| Figure 33 : Effets des anti-oxydants sur la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur les cellules Clone 9..... | 118 |
| Figure 34 : Intensité du marquage PKH26 au cours du temps..... | 124 |
| Figure 35 : Toxicité et effet sur la capacité de rétention calcique du marquage PKH26..... | 125 |
| Figure 36 : Visualisation par microscopie confocale de la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures..... | 126 |
| Figure 37 : Visualisation par cytométrie en flux de la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures de cellules Clone 9 et MH1C1..... | 128 |

Figure 38 : Toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures de cellules Clone 9 et MH1C1.....129

Figure 39 : Modèle hypothétique de la régulation du PTP par un site d'action unique.....132

Figure 40 : Modèle hypothétique de la régulation du PTP par deux sites d'actions indépendants.....133

Figure 41 : Modèle hypothétique de la régulation du PTP lors de la mutation d'un des deux sites.....134

LISTE DES TABLEAUX

MATERIEL ET METHODES

Tableau I : Lignées cellulaires utilisées au cours de nos travaux.....68

RESULTATS ET DISCUSSION

Tableau II : Effets régulateurs de l'ubiquinone 0 sur le PTP de différentes cellules.....100

Tableau III : Récapitulatif des effets des ubiquinones sur le PTP, la production radicalaire et la toxicité.....115

Tableau IV : Dosage de composants cellulaires.....120

ABREVIATIONS

| | |
|------------------------------|---|
| $\Delta\Psi$ | Différence de potentiel de part et d'autre de la membrane mitochondriale |
| ΔpH | Différence de pH de part et d'autre de la membrane mitochondriale |
| Δp | Force protomotrice |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ADNase | Désoxyribonucléase |
| ADP | Adénosine-5'-diphosphate |
| AIF | Apoptose Inducing Factor |
| AMP | Adénosine-5'-mono phosphate |
| ANT | Transporteur de nucléotides adényliques |
| AsO | Arsénite |
| ATP | Adénosine-5'-triphosphate |
| CaCl_2 | Chlorure de calcium |
| CICR | Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release |
| CK | Créatine kinase |
| CO_2 | Dioxyde de carbone |
| CoQ | Quinone |
| CoQH. | Semi-quinone |
| CoQH ₂ | Quinol |
| CsA | Ciclosporine A |
| CyP-D | Ciclophiline D |
| DEM | Diéthylmaléate |
| DMSO | Diméthyl sulfoxyde |
| DPC | Diéthyl-pyrocarbonate |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Acide éthylène diamine tétra-acétique |
| EGTA | Acide éthylène glycol-bis (β -amino-éthyl éther) N,N, N', N'-tétraacétique |
| $\text{FAD}^+/\text{FADH}_2$ | Flavine adénine dinucléotide oxydée/réduite |
| FCCP | Carbonyl-cyanide p-(triFluorométhoxy) phényl-hydrazone |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| FSC | Forward Scatter |
| GS/GSH | Glutathion oxydé/réduit |

| | |
|---|--|
| H ₂ O ₂ | Peroxyde d'hydrogène |
| H ₂ PO ₄ ⁻ | Ion phosphate |
| HCl | Chlorure d'hydrogène |
| H ₂ DCFDA | Dichlorofluorescéine diacétate |
| Hepes | (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid]) |
| HIST/HIST-H | Histidine déprotonée / protonée |
| HK | Hexokinase |
| KCl | Chlorure de potassium |
| LDH | Lactate déshydrogénase |
| MBM | Monobromobimane |
| Me ²⁺ | Cation divalent |
| MOPS | Acide 3 (N-morpholino)-propane sulfonique |
| NaCl | Chlorure de sodium |
| NAD ⁺ /NADH+H ⁺ | Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/réduit |
| Na ₂ HPO ₄ | Phosphate de sodium |
| NCE | Na ⁺ Dependant Calcium Efflux |
| NEM | N-ethylmaleimide |
| NICE | Na ⁺ Independant Calcium Efflux |
| O ₂ | Dioxygène |
| OH ⁻ | Ion hydroxyde |
| NH ₃ | Ammoniac |
| PBS | Phosphate-Buffered saline |
| PhAsO | Phényl-arsine-oxyde |
| Pi | Phosphate inorganique |
| PN/PNH | Nucléotides pyridiniques oxydés/réduits |
| PTP | Pore de Transition de Perméabilité |
| RaM | Rapide uptake Mode |
| RPB | Récepteur Périphérique des Benzodiazépine |
| ROS | Reactive Oxygen Species |
| RR | Rouge de Ruthénium |
| SH | Fonction thiol |
| SSC | Side Scatter |
| TBH | t-butyl-hydroperoxide |
| Tim | Translocase of the Inner mitochondrial Membrane |

| | |
|------------------|---|
| Tom | Translocase of the Outer mitochondrial Membrane |
| Tris | Tris (hydroxyméthyl) amino méthane |
| TSAC | Transition State Analog Complex |
| Ub | Ubiquinone |
| Ub ₀ | Ubiquinone 0 |
| Ub ₅ | Ubiquinone 5 |
| Ub ₁₀ | Ubiquinone 10 |
| dUb | Décyl-ubiquinone |
| UCP | UnCoupling Protein |
| VDAC | Voltage Dependant Anion Channel |

PREAMBULE

Les mitochondries sont des organites intracellulaires de cellules eucaryotes. Ces organites ont deux rôles majeurs au sein des cellules. Tout d'abord, elles sont le siège de l'oxydation-phosphorylante qui permet la transduction d'énergie sous forme d'ATP. Ensuite, elles sont au cœur de nombreux mécanismes de mort cellulaire.

Cette mort cellulaire est primordiale pour l'organisme car elle permet le maintien de l'homéostasie tissulaire par l'élimination sélective des cellules superflues ou défectueuses. De plus, la dérégulation de ce processus est au cœur de nombreuses pathologies. En effet, son excès est à l'origine de maladies dégénératives, et à l'inverse, son absence permet le développement incontrôlé des cellules cancéreuses. La compréhension de ce processus présente donc un fort intérêt thérapeutique.

Une des voies mitochondriales provoquant cette mort cellulaire passe par l'ouverture du pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTP). Si ce phénomène est aujourd'hui admis par la communauté scientifique, il s'avère être hautement complexe et de nombreuses zones d'ombres persistent. Sa nature moléculaire est imprécise et les facteurs régulateurs impressionnent par leur quantité et leur diversité. Une famille de régulateurs du PTP récemment découverte est constituée par les analogues de l'ubiquinone. Ces composés peuvent soit induire soit inhiber l'ouverture de ce pore. Il a été observé que les inducteurs de la transition de perméabilité entraînent la mort des cellules alors que les inhibiteurs protègent de la mort cellulaire. Cependant, les résultats publiés sur ces analogues de l'ubiquinone dans différentes lignées cellulaires sont contradictoires et certains inhibiteurs induisent une toxicité.

Dans ce contexte, l'objectif de nos travaux a été d'étudier la régulation du PTP par les analogues de l'ubiquinone dans différentes lignées hépatiques, cancéreuses ou immortalisées, humaines ou de rat, afin d'évaluer leur régulation en fonction de la transformation ou de l'espèce de la cellule. Nous avons tenté de déterminer le mécanisme d'action de leur régulation chez ces lignées. Puis nous avons cherché à préciser pourquoi certains de ces analogues entraînent une toxicité inattendue. Enfin, nous avons évalué l'intérêt thérapeutique des ces molécules.

INTRODUCTION

I. Mitochondrie

I.A. Origine de la mitochondrie

La théorie endosymbiotique propose que la mitochondrie soit née lorsque deux bactéries, une archéobactérie anaérobie d'une part, et une protobactérie aérobie d'autre part, ont fusionné pour donner un eucaryote primitif duquel tous les eucaryotes actuels dérivent. Une telle hypothèse sur l'origine de la mitochondrie a été suggérée par la mise en évidence, en 1963, de l'ADN mitochondrial qui diffère de l'ADN nucléaire et par le fait que la mitochondrie possède une double membrane [1]. Toutefois, comme le code génétique de l'ADN mitochondrial est sensiblement différent du code génétique universel des procaryotes, certains pensent cette théorie erronée.

Le mot mitochondrie provient du grec mitos, « filament », et chondros, « graine », en raison de l'aspect polymorphique de cet organite selon le type cellulaire observé. Ainsi, elles sont filamenteuses dans les cellules élaboratrices d'hormones stéroïdiennes et granulaires dans les hépatocytes.

I.B. Organisation de la mitochondrie

Les mitochondries sont des organites intracellulaires situés dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Elles ont un diamètre d'environ 1 μm et leur nombre varie selon le type cellulaire. Elles représentent environ 20% du volume d'un hépatocyte de rat [2].

Les mitochondries ne sont pas des organites statiques : elles se scindent ou, au contraire, fusionnent couramment ce qui explique leur polymorphisme au sein d'une même cellule [3]. La mitochondrie est limitée par une enveloppe formée de deux membranes : la membrane externe et la membrane interne (Figure 1). Ces membranes sont très différentes dans leur composition et délimitent un espace intermembranaire ainsi qu'un espace matriciel. Il existe des points de contact entre ces deux membranes où l'espace intermembranaire devient inexistant. La membrane interne, qui possède une surface bien plus grande que la membrane externe, se replie pour former de nombreuses crêtes (cristae). La composition biochimique des différents compartiments mitochondriaux ainsi délimités reflète les fonctions qui y sont associées.

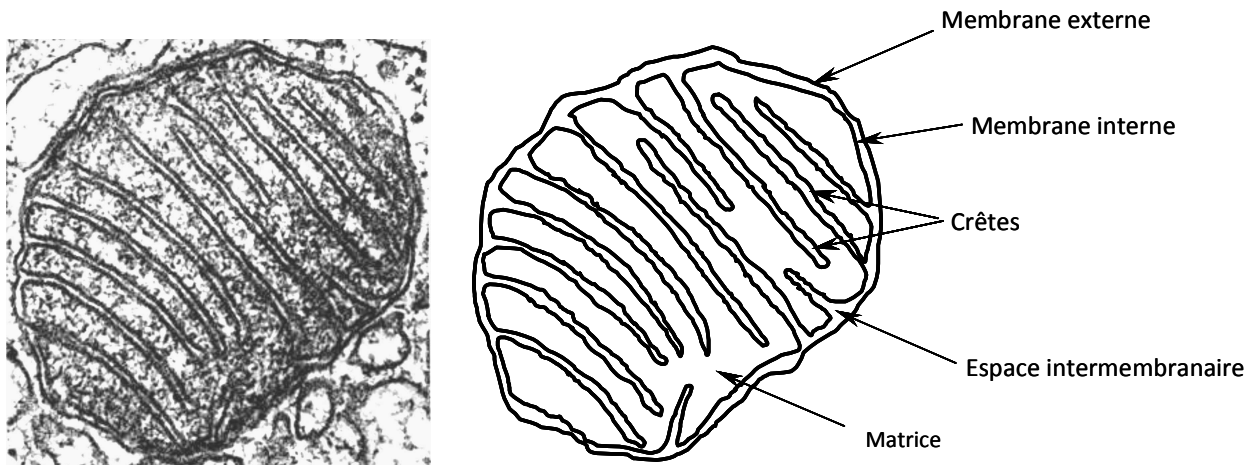


Figure 1 : *Structure de la mitochondrie.*

I.C. Fonctions mitochondriales

Les mitochondries participent à de nombreuses fonctions au sein des cellules. Nous pouvons citer, entre autres, la synthèse des hormones stéroïdes, l'uréogénèse, les échanges bidirectionnels de composants avec le cytosol ou encore le métabolisme énergétique et la mort cellulaire programmée.

I.C.1. Oxydation phosphorylante

La mitochondrie est le siège de l'oxydation phosphorylante. Cette réaction permet la formation d'ATP par l'ATP synthase située dans la membrane interne mitochondriale. La chaîne respiratoire, située elle aussi dans la membrane interne, utilise l'énergie fournie par l'oxydation d'équivalents réduits (NADH et FADH₂) pour expulser des protons (H⁺) de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons sert ensuite de source d'énergie à l'ATP synthase pour assurer la synthèse d'ATP par phosphorylation de l'ADP [4].

I.C.1.1. La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale est formée de quatre complexes protéiques structurellement indépendants. Ces composants peuvent être tour à tour accepteurs et donateurs d'électrons et forment ainsi une chaîne d'oxydo-réduction [4] (Figure 2).

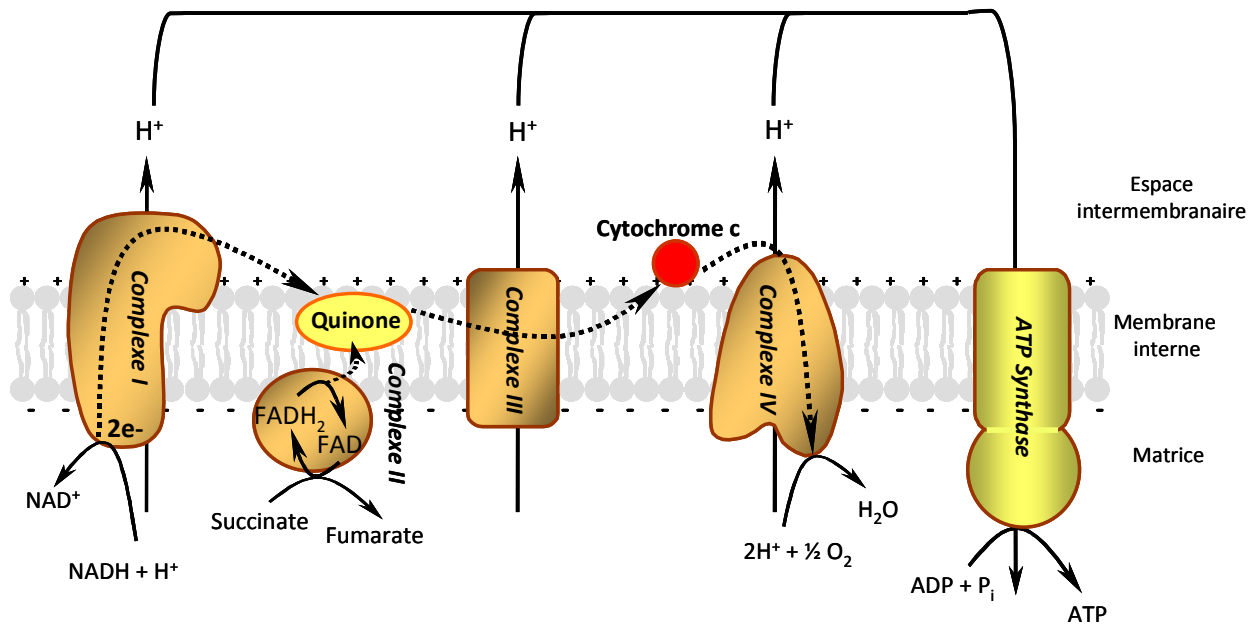


Figure 2 : La chaîne respiratoire mitochondriale.

Le flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire est schématisé par les flèches en pointillées.

- le complexe I (NADH-ubiquinone oxydoréductase) oxyde du NADH matriciel et transfère deux électrons sur l'ubiquinone permettant sa réduction en ubiquinol. Cette réaction d'oxydo-réduction est associée à une expulsion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

- le complexe II (succinate-ubiquinone oxydoréductase) oxyde du succinate en fumarate pour réduire du FAD en FADH₂. Ce FADH₂ est à son tour oxydé pour permettre le transfert de deux électrons sur l'ubiquinone.

- le complexe III (ubiquinol-cytochrome *c* réductase) réalise l'oxydation de l'ubiquinol en ubiquinone. Les électrons transportés par l'ubiquinol sont alors transférés sur le cytochrome *c*. Une translocation de protons vers l'espace intermembranaire a également lieu au cours de cette oxydo-réduction.

- le complexe IV (cytochrome oxydase) catalyse la dernière réaction d'oxydo-réduction en transférant les deux électrons portés par le cytochrome *c* sur l'oxygène. Cette étape est aussi couplée à un efflux de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire.

Ainsi, trois de ces complexes (I, III et IV) sont des sites de couplage qui utilisent l'énergie générée par le transfert des électrons pour la translocation active de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Ce mouvement de protons, de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale, crée la force protomotrice (Δp) à deux composantes :

- le gradient de pH (ΔpH) car le compartiment intermembranaire s'acidifie tandis que le milieu matriciel devient alcalin.

- la formation d'une différence de potentiel électrique transmembranaire ($\Delta\Psi$), l'intérieur devenant négatif et l'extérieur positif.

Cette force protomotrice, générée par le transfert orienté de protons par la chaîne respiratoire, peut alors être utilisée comme source d'énergie.

C'est ainsi que Peter Mitchell a établi la théorie chimio-osmotique [5] qui est un modèle basé sur quatre postulats permettant d'expliquer que cette force protomotrice est la source d'énergie nécessaire à la formation d'ATP :

- la membrane interne mitochondriale possède une faible conductivité pour les protons et la majorité des molécules chargées.

- les réactions d'oxydo-réduction de la chaîne respiratoire provoquent une expulsion vectorielle de protons à travers la membrane interne et permettent l'établissement d'un gradient électrochimique positif de protons à l'extérieur de la mitochondrie.

- les échanges sélectifs d'ions et de métabolites de part et d'autre de la membrane interne sont assurés par des protéines de transport spécifiques qui assurent l'équilibre des forces osmotiques.

- ce gradient électrochimique établi de part et d'autre de la membrane interne est le seul intermédiaire énergétique pour les différents systèmes transformateurs d'énergie. Il fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase qui est une enzyme réversible et également une pompe à protons.

I.C.1.2. L'ATP synthase

L'ATP synthase est une protéine possédant un domaine transmembranaire F_0 qui forme un canal transmembranaire à protons et un domaine hydrosoluble matriciel F_1 . Ce complexe couple l'énergie du gradient de protons par son domaine F_0 qui permet la diffusion facilitée de protons vers la matrice à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de P_i par son domaine F_1 . Ce complexe, à l'inverse de la chaîne respiratoire, permet de convertir une énergie électrochimique en une énergie chimique véhiculée par les molécules d'ATP. Cependant, ce phénomène est réversible car l'ATP synthase est également capable d'expulser des protons vers l'espace intermembranaire en hydrolysant de l'ATP. Son sens d'action dépend de la force protomotrice et du rapport ATP/ADP. Ainsi une chute importante de la force protomotrice ou une augmentation du rapport ATP/ADP entraînera une hydrolyse de l'ATP alors qu'une élévation de la force protomotrice ou une diminution du rapport ATP/ADP provoquera la synthèse d'ATP [4].

L'oxydation phosphorylante joue un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique de la cellule en assurant la coordination entre les besoins en ATP et la consommation de substrats.

I.C.1.3. L'ubiquinone

Parmi les transporteurs d'électrons de la chaîne respiratoire, le seul composant lipidique est l'ubiquinone. C'est une benzoquinone qui possède une longue chaîne isoprénolique. Cette chaîne carbonée lui confère une liposolubilité qui lui permet une mobilité à travers les membranes cellulaires et mitochondriales [6].

La taille de cette chaîne carbonée est la base des deux nomenclatures communément utilisées pour classer les nombreux composés de cette famille. La première regroupe ces molécules sous le terme de Coenzyme Q_n , où n représente le nombre d'unités isoprènes (chaîne de 5 carbones). La seconde désigne ces composés comme étant des ubiquinones n , avec n représentant le nombre de carbones totaux de la chaîne isoprénolique. Ainsi, la coenzyme Q_{10} correspond à l'ubiquinone 50, la coenzyme Q_0 correspond à l'ubiquinone 0, etc.

On retrouve des ubiquinones dans les membranes biologiques de tous les tissus (majoritairement la coenzyme Q_{10} chez l'homme et la coenzyme Q_9 chez le rat) et elles sont également fixées aux lipoprotéines dans le sang. Elles sont synthétisées *de novo* dans le

réticulum endoplasmique de toutes les cellules, à partir de tyrosine (ou phénylalanine) pour son cycle benzoïque et de mévalonate pour sa chaîne isoprénoïde [6]. Une étude portant sur l'élimination de la coenzyme Q10 chez l'animal, montre que celle-ci est excrétée dans la bile et les urines. On la retrouve alors majoritairement sous forme glucuronconjuguée [7].

Outre son rôle dans la conversion énergétique de la chaîne respiratoire, l'ubiquinone a d'autres activités dans l'organisme.

I.C.1.3.1. Conversion énergétique

Au niveau de la chaîne respiratoire, l'ubiquinone transfère des électrons du complexe I ou II vers le complexe III et transloque en même temps des protons vers l'espace intermembranaire. Ce phénomène se produit par des cycles successifs d'oxydo-réduction de la coenzyme Q appelés cycle Q [6].

L'ubiquinol formé au niveau des complexes I ou II voyage dans la membrane jusqu'au complexe III où elle est oxydée (Figure 3). Ici, l'ubiquinol subit un cycle d'oxydation-réduction-réoxydation avec une deuxième coenzyme Q. Le complexe III possède deux sites de fixation pour les coenzymes Q. Lorsque l'ubiquinol arrive au site Q_0 proche de l'espace intermembranaire, il donne un électron à la protéine fer-soufre et un électron à l'hème b_L . Deux protons sont alors relâchés dans l'espace intermembranaire et l'ubiquinone formée va se fixer sur le site Q_i proche de la matrice. L'hème b_L transfère alors son électron à l'hème b_H qui réduit l'ubiquinone du site Q_i en intermédiaire stable semi-ubiquinone. Un deuxième ubiquinol subit ensuite les mêmes étapes mais l'électron transféré à l'hème b_L est capté par la semi-ubiquinone précédemment formée qui est alors régénérée en ubiquinol grâce à deux protons matriciels. Quatre protons sont ainsi transférés vers l'espace intermembranaire, deux cytochromes c sont réduits, et la quinone oxydée retourne vers les complexes I ou II pour être à nouveau réduite [4]. Le cycle Q permet ainsi de doubler l'efficacité de la coenzyme Q dans la génération du gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP.

Le complexe I possède aussi deux sites de fixation connus pour les quinones [8, 9, 10, 11]. Le premier est hydrophobe et sensible à la roténone. Il catalyse un transfert d'électrons couplé à l'expulsion de protons vers l'espace intermembranaire. Le deuxième site est hydrophile et insensible à la roténone. Il catalyse une réaction d'oxydo-réduction de l'ubiquinone avec translocation [10] ou non de protons [8, 9] selon les études. Néanmoins, les auteurs s'accordent à dire que l'encombrement de ces deux sites est nécessaire à l'inhibition totale du flux d'électrons à travers le complexe I.

Ainsi, il apparaît que 95% des besoins corporels en énergie sont transformés à l'aide de la coenzyme Q10 [12, 13]. Il est dès lors évident que les organes nécessitant le plus d'énergie - tels que le cœur, les poumons et le foie - présentent également les taux de coenzyme Q10 les plus élevés [14] On la retrouve en concentration importante avec 1 quinone pour 100 molécules phospholipidiques environ [15].

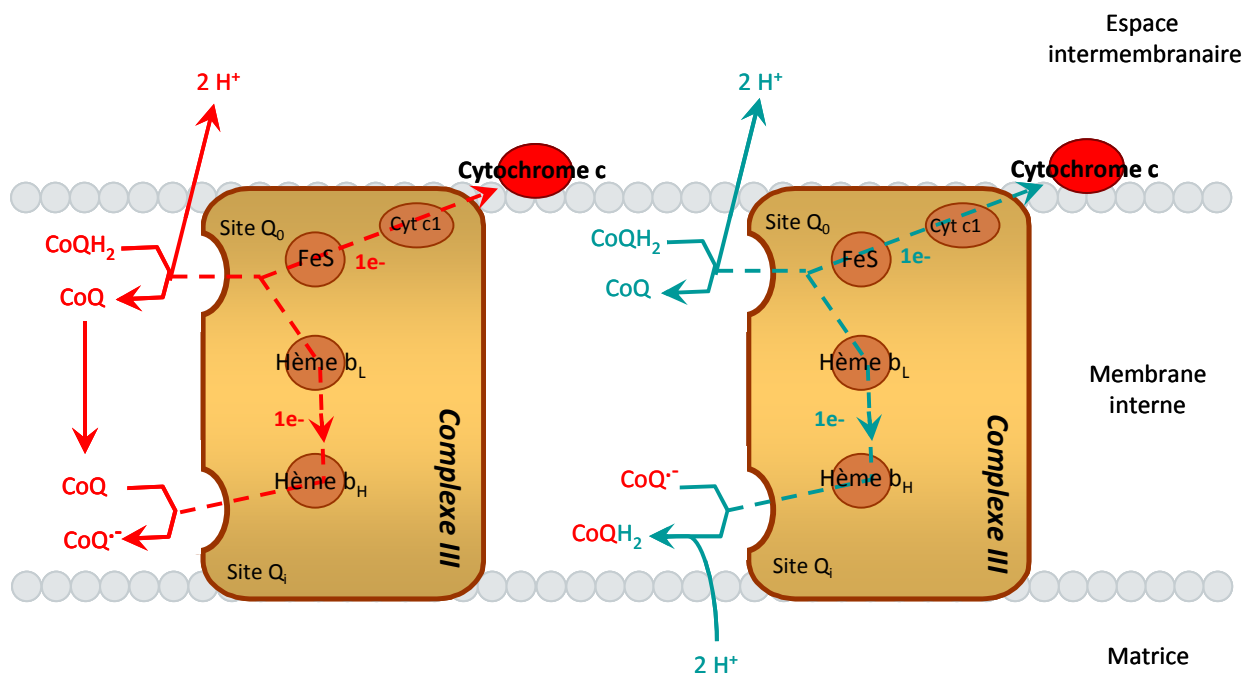


Figure 3 : Modèle du cycle Q au niveau du complexe III.

Les coenzymes Q provenant des complexes I ou II subissent des cycles d'oxydo-réduction successifs au niveau du complexe III. La première réaction d'oxydo-réduction est schématisée en rouge et la deuxième en bleu. Les flèches en pointillées schématisent le trajet des électrons à travers le complexe III. CoQH₂ : ubiquinol ; CoQ : ubiquinone ; CoQ^{•-} : semi-ubiquinone.

I.C.1.3.2. Fonction anti-oxydante

Les Coenzymes Q possèdent une forme oxydée appelée ubiquinone qui peut soit accepter un électron pour se transformer en radical semi-ubiquinone, soit accepter deux électrons pour donner la forme réduite appelée ubiquinol (Figure 4). Le taux d'ubiquinol varie de 30 à 95% et dépend de l'état métabolique de la cellule. En effet, dans certains modèles physiopathologiques modifiant le métabolisme oxydatif, tels que l'acclimatation au froid, un traitement thyroïdien ou encore chez les malades souffrant d'hépatite, des modulations de l'état rédox des ubiquinones sont observées [13].

L'ubiquinone, sous sa forme réduite, a une action anti-oxydante directe [16]. La quantité de quinones présentes dans les membranes est jusqu'à 30 fois supérieure à la quantité de tocophérol (vitamine E), un autre anti-oxydant [6]. Pour que l'effet anti-oxydant soit optimal, il faut que la quinone soit majoritairement sous sa forme réduite. Il existe de nombreuses enzymes qui peuvent garder l'ubiquinone sous sa forme réduite telles que la NADH deshydrogenase, la NADH cytochrome b5 reductase [17], la NADH/NADPH oxidoreductase (DT diaphorase) [18] et la NADPH coenzyme Q reductase [19]. L'ubiquinone est localisée dans les membranes à proximité de lipides insaturés et agit comme piègeur des radicaux libres. L'effet anti-oxydant des ubiquinones a été démontré directement chez une levure déficiente en Coenzyme Q subissant une forte peroxydation lipidique [20].

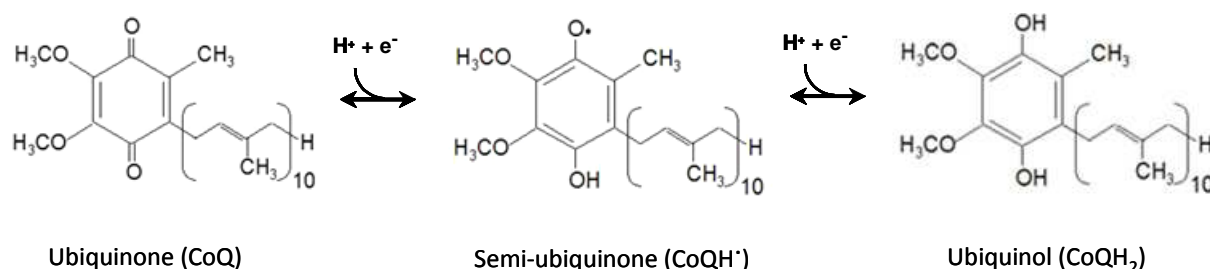


Figure 4 : Les différentes structures de l'ubiquinone.

L'action anti-oxydante peut également être indirecte par renouvellement du pool du tocophérol lorsque celui-ci devient radicalaire après réaction avec les lipides ou les radicaux libres [16]. Cette activité anti-oxydante de la Coenzyme Q n'est pas uniquement intracellulaire. En effet, sa diffusion dans les membranes lui permet également de régénérer l'ascorbate extracellulaire par transfert d'électrons à travers la membrane plasmique [21].

I.C.1.3.3. Fonction signalisation cellulaire et expression des gènes

La Coenzyme Q peut participer au contrôle oxydo-réducteur de nombreuses voies de signalisation dans la cellule. La forme semi-ubiquinone produite lors du transport des électrons est capable de réduire l'oxygène en ion superoxyde et donc de produire secondairement du peroxyde d'hydrogène [22]. Or l' H_2O_2 active des facteurs de transcription tels que NF κ B [23]. L'ubiquinone peut aussi participer à l'oxydation des

groupements thiol des récepteurs des facteurs de croissance tels que le récepteur de la ryanodine qui contrôle le relargage du calcium [24, 25].

Ainsi, l'ubiquinone est un composé essentiel à l'organisme et il a été observé que sa production diminue avec l'âge et certaines maladies [6]. La supplémentation en Coenzyme Q permet de retrouver des taux normaux dans toutes les cellules de l'organisme, sans dépasser ces taux, sauf dans le foie et la rate [6].

I.C.2. Echanges bidirectionnels avec cytoplasme

Les mitochondries entretiennent des relations fonctionnelles avec d'autres composants cellulaires tels que le cytoplasme, le réticulum endoplasmique, le cytosquelette ou encore le noyau. Ces échanges bidirectionnels sont notamment permis par la présence de transporteurs sélectifs dans les membranes mitochondriales.

I.C.2.1. Transport à travers la membrane externe

La membrane externe est perméable aux ions, nucléotides et métabolites grâce à la présence de porines qui sont des protéines transmembranaires formant de véritables pores [26]. Leur sélectivité et leur spécificité ne sont pas encore bien connues. Le canal anionique VDAC (voltage-dépendant anion channel) est considéré comme la voie principale de passage des métabolites à travers la membrane externe. Ce canal est constitué d'une protéine de 31 kDa adoptant une structure de tonneau β , ressemblant ainsi aux porines de la membrane externe des bactéries [27]. Ce pore a un diamètre interne de 2,5 à 3 nm qui permettrait donc le libre passage des acides gras, du pyruvate, des acides aminés et des nucléotides [27]. Cette membrane contient également des translocases impliquées dans l'import des protéines depuis le cytosol (Translocase of the Outer mitochondrial Membrane, Tom) [28].

I.C.2.2. Transport à travers la membrane interne

La membrane interne est quasi-imperméable du fait de sa forte proportion en cardiolipides (20% des lipides totaux) qui entraîne une stabilisation de la bicouche lipidique [29] et une diminution de la fluidité membranaire [30]. A part pour certaines petites molécules neutres telles que l'O₂, l'H₂O, le CO₂ ou le NH₃ qui peuvent diffuser passivement, le

passage à travers la membrane interne est hautement sélectif et réalisé par des transporteurs et échangeurs. Ceci explique en grande partie la richesse en protéines qui représentent 80 % de cette membrane

Ces échanges peuvent être de type uniport, antiport ou symport. Leur source d'énergie est généralement la force protomotrice (Δp) ou l'une de ses deux composantes : la composante chimique (ΔpH) ou la composante électrique ($\Delta \Psi$).

Ainsi, le transporteur du phosphate inorganique ou $H_2PO_4^-$ (P_i), de type symport, catalyse un cotransport électroneutre $H^+ / H_2PO_4^-$ pour que la somme des charges électriques transportées soit neutre. Il utilise donc comme source d'énergie le ΔpH . De même, l'entrée du pyruvate dépend d'un transporteur spécifique utilisant le ΔpH [4]. Les transporteurs d'anions di- ou tricarboxilate échangent le malate ou le succinate contre du P_i . Ces transporteurs spécifiques utilisent donc indirectement le ΔpH . Ces échanges permettent la connexion entre les métabolites matriciels et cytosoliques des voies métaboliques impliquant la mitochondrie.

Des translocases à protéines, les Tim (Translocase of Inner mitochondrial Membrane) sont également présentes et permettent l'entrée des peptides possédant une séquence d'adressage spécifique à la matrice. Ce type de transport nécessite l'hydrolyse d'ATP et un potentiel membranaire ($\Delta \Psi$) qui attire la séquence de d'adressage chargée positivement dans la direction de la matrice [4].

D'autres transporteurs sont dits électrogéniques, comme le transporteur des nucléotides adényliques ATP^4^- / ADP^3^- (antiport) ou du Ca^{2+} (uniport). Ils catalysent un échange de substrats accompagné d'un mouvement de charges de part et d'autre de la membrane. Le sens du transport est donc imposé par le potentiel membranaire ($\Delta \Psi$).

I.C.2.2.1. Le transport des nucléotides adényliques

L'ATP est synthétisé dans la matrice mitochondriale mais il est principalement utilisé dans le cytosol. Ainsi, un système de transport doit assurer la continuité métabolique entre la matrice mitochondriale et le cytosol : le transporteur des nucléotides adényliques ou ANT (Adenine Nucleotide Translocator). Cette ANT constitue la plus abondante protéine de la membrane interne mitochondriale [31]. Elle importe de l'ADP cytosolique et exporte l'ATP matriciel synthétisé par l'ATP synthase. L'ANT est hautement spécifique car parmi les nucléotides naturels seuls l'ATP et l'ADP sont transportés. Cet échange est

stoechiométrique, un ATP⁴⁻ étant échangé contre un ADP³⁻ et se fait sans compensation de charge. Ainsi, le pool de nucléotides matriciels ne change pas [32]. L'étude de ce transporteur par des inhibiteurs spécifiques a montré que l'échange ATP/ADP nécessite des changements de conformation de l'ANT. On trouve ainsi une conformation cytosolique (conformation "c") ou une conformation matricielle (conformation "m"). L'atractyloside et l'acide bongkrélique sont tous deux des inhibiteurs compétitifs alors que le carboxyatractylate est un inhibiteur non compétitif. L'atractylate et le carboxyatractylate se lient à la conformation "c" de l'ANT alors que l'acide bongkrélique se lie à la conformation "m". Il existe plusieurs isoformes de l'ANT dont les gènes ont été clonés [33]. Récemment, la structure 3D de l'ANT a été déterminée à Grenoble par cristallographie aux rayons X lors d'une collaboration entre les équipes de Gérard Brandolin et d'Eva Pebay-Peroula [34].

I.C.2.2.2. Les systèmes de transport mitochondriaux du calcium

L'ion Ca²⁺ est un messager secondaire dans de nombreux systèmes de signalisation intracellulaires. Ceci implique une régulation très stricte de sa concentration cellulaire. Le Ca²⁺ libre cytosolique est maintenu à une faible concentration d'environ 100 nM tandis que sa concentration est de l'ordre de 1,2 mM dans un milieu extracellulaire. Différents mécanismes permettent de maintenir la concentration cytosolique basse au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie, ces deux derniers étant les deux organites principaux permettant le stockage du Ca²⁺. Les mitochondries ont un rôle prépondérant dans la régulation de la concentration calcique et notamment dans sa diminution quand cette dernière dépasse quelques µM. Cette concentration élevée apparaît *in vivo* dans des microdomaines cellulaires, au voisinage des mitochondries et des réticulums endoplasmiques [35]. La matrice mitochondriale étant séparée du cytosol par la membrane interne qui possède une très faible perméabilité aux ions, de nombreuses études se sont axées sur les systèmes de transport du Ca²⁺ dans les mitochondries et sur ses cibles protéiques. Ainsi trois déshydrogénases mitochondriales sont activées par le Ca²⁺ : la pyruvate déshydrogénase, l'isocitrate déshydrogénase et l'α-cétoglutarate déshydrogénase [36, 37]. D'autres protéines sont la cible du Ca²⁺ telles que la NADH ubiquinone reductase (complexe I), la cytochrome oxydase (complexe IV) ou l'ATP synthase bien que leur régulation par le calcium soit mal définie [38, 39, 40].

Les systèmes de transport mitochondriaux du Ca²⁺ permettent l'influx ou l'efflux de cet ion dans la matrice mitochondriale et sont indépendants les uns des autres [41-44] (Figure 5).

Un uniport électrogénique permet l'entrée rapide du Ca^{2+} dans la mitochondrie contre son gradient de concentration en utilisant comme source d'énergie le potentiel membranaire ($\Delta\Psi$). Sa nature moléculaire n'est pas encore identifiée mais il est inhibé par les polycations comme le rouge de ruthénium (RR) et aussi de façon compétitive par des cations divalents (Me^{2+}) qu'il est également capable de transporter comme le strontium (Sr^{2+}), le manganèse (Mn^{2+}), le barium (Ba^{2+}) ou les lanthanides (La^{3+}) [41]. Ces ions, ainsi que le magnésium (Mg^{2+}) qui n'est pas transporté par l'uniport, peuvent moduler l'affinité de l'uniport au Ca^{2+} en agissant sur un ou plusieurs sites de fixation différents du site de transport [41].

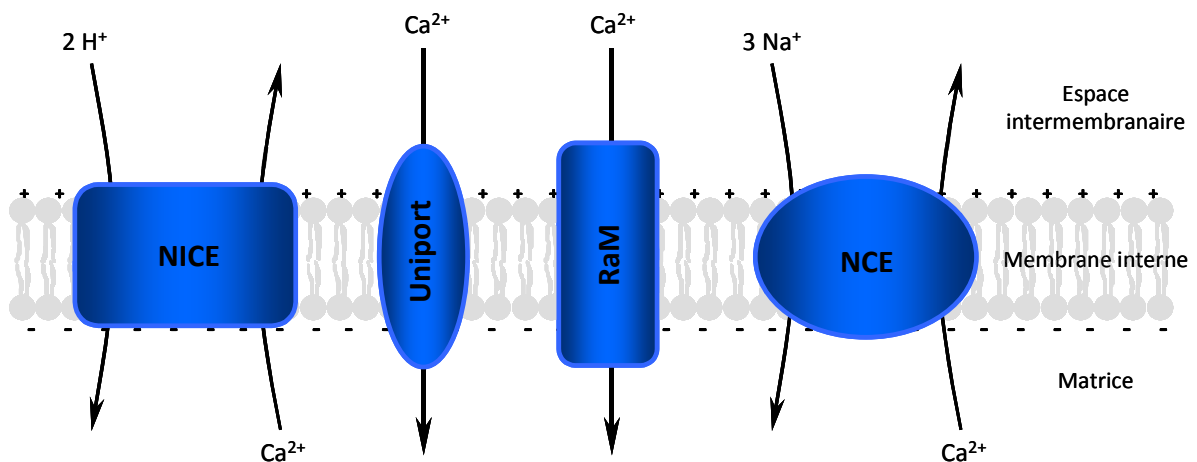


Figure 5 : Les transporteurs mitochondriaux du calcium.

Les systèmes de transport mitochondriaux du calcium permettent l'influx ou l'efflux de cet ion à travers la membrane interne mitochondriale. L'entrée est assurée par l'uniport et RaM (Rapid Uptake Mode) alors que sa sortie est sous le contrôle de NCE (Na⁺-Dependent Calcium Efflux) et NICE (Na⁺-Independent Calcium Efflux).

Il existe un deuxième système d'entrée rapide du Ca^{2+} appelé RaM (pour Rapid uptake Mode) [43, 45]. Il serait capable d'une prise rapide en réponse à des changements de la concentration en Ca^{2+} cytosolique mais serait inhibé très rapidement. Comme l'uniport, le transporteur RaM est électrogénique car il utilise le potentiel de membrane comme source d'énergie. Il est aussi sensible à une inhibition par le RR mais pour des concentrations plus importantes que dans le cas de l'uniport. La nature moléculaire de ce transporteur est également inconnue et l'entrée rapide de faibles quantités de calcium pourrait s'expliquer par l'existence de deux stades de conductance de l'uniport [45-47] bien que l'activité de RaM ne soit pas affectée par le Mg^{2+} .

D'autres systèmes de transport permettent l'efflux de Ca^{2+} de la mitochondrie d'une manière dépendante ou indépendante de la présence d'ions sodium (Na^+). Le mécanisme d'efflux dépendant du Na^+ (NCE pour Na^+ -dependent pathway for Ca^{2+} Efflux) est un antiport de type électrogénique, prédominant dans les mitochondries de cœur et de cerveau [48]. L'échange de Ca^{2+} et de Na^+ par ce transporteur ne serait pas électroneutre et se ferait avec 3 Na^+ pour 1 Ca^{2+} [48, 49]. Une protéine de 110 kDa présentant les propriétés du transporteur NCE a été purifiée [50]. Quant à l'efflux de Ca^{2+} indépendant du Na^+ (NICE pour Na^+ -Independent pathway for Ca^{2+} Efflux), il fait intervenir un antiport électroneutre qui permettrait l'échange de 1 Ca^{2+} contre 2 H^+ . Ce système est insensible au RR [41]. Toutefois, il n'est pas exclu que l'efflux calcique insensible au RR observé soit en partie dû à un autre mécanisme appelée transition de perméabilité mitochondriale que nous développerons plus loin [41]. La sortie de Ca^{2+} par ce transporteur est un processus très lent et saturé pour des concentrations calciques faibles (25 nmol/mg de protéine dans le foie) [41].

Cependant, l'influx de Ca^{2+} dans la mitochondrie étant un processus rapide et les systèmes d'efflux que sont NCE et NICE étant très lents, la concentration matricielle mitochondriale devrait être trop forte pour la mitochondrie à terme [50]. De fait, c'est un autre mécanisme d'efflux du calcium, induit par le Ca^{2+} , qui pourrait permettre sa sortie rapide de la mitochondrie : le pore de transition de perméabilité.

I.C.2.2.3. La fuite de protons

Les protons transférés de la matrice vers l'espace intermembranaire lors de l'oxydation phosphorylante génèrent la force protomotrice. Dans un modèle idéal, toute cette énergie serait ensuite utilisée pour effectuer un travail. Or, en réalité, la membrane interne mitochondriale n'est pas parfaitement imperméable et une certaine quantité de protons est capable de rentrer dans la matrice sans participer à la synthèse d'ATP. Ce retour passif entraîne la perte d'une partie de l'énergie de la force protomotrice sous forme de chaleur : ce phénomène est appelé le *leak*.

Cette perméabilité de la membrane interne peut également exister naturellement par la présence de protéines dites "découplantes" : les UCPs (UnCoupling Proteins). Ces protéines sont enchassées dans la membrane interne et forment un canal à protons lorsqu'elles sont activées [51]. Pour transporter les protons, ces UCPs ont besoin d'un cofacteur lipidique : la Coenzyme Q, comme le montre une étude par reconstitution d'UCPs dans des corps d'inclusion [15]. Les ubiquinones à longue chaîne isoprénoïque sont plus efficaces que les quinones sans chaîne carbonnée pour remplir cette fonction. Leur état

d'oxydo-réduction est également essentiel puisque les coenzymes oxydées permettent un transport de protons jusqu'à 15 fois supérieur aux formes réduites [15].

I.C.3. Mort cellulaire

Historiquement, deux types de morts cellulaires existent et s'opposent. La première est l'apoptose, un mécanisme physiologique fortement régulé qui permet une élimination sélective des cellules avec conservation de l'intégrité membranaire qui subit toutefois quelques modifications. La mitochondrie est impliquée dans certains mécanismes induisant cette mort programmée. L'apoptose a un grand rôle dans l'homéostasie tissulaire, le développement cellulaire, la défense contre les infections virales et les mutations [53].

La seconde est la nécrose qui a longtemps été considérée comme un phénomène accidentel et non régulé survenant suite à un traumatisme important des cellules. Elle entraîne une perte de l'intégrité de la membrane cytoplasmique, un gonflement du cytoplasme et de la matrice mitochondriale et provoque une réponse inflammatoire [53].

Cependant, ce modèle différenciant ces deux types de mort apparaît aujourd'hui comme trop simpliste et ne reflète pas la réalité. L'apoptose et la nécrose semblent être des mécanismes liés l'un à l'autre. En effet, certaines toxines peuvent provoquer l'une ou l'autre selon la dose et l'équilibre entre l'apoptose et la nécrose peut changer en variant le taux d'ATP ou en inhibant certaines enzymes [54]. De plus, certaines protéines mitochondriales sont également impliquées dans la nécrose [55]. Ainsi les protéines mitochondriales Bcl-2 peuvent inhiber la nécrose comme l'apoptose [55] et le relargage du cytochrome *c* mitochondrial, un événement majeur de l'apoptose, peut être aussi observé au cours de la nécrose [56]. Enfin, de récentes études montrent que la nécrose peut être également un phénomène actif et régulé de mort cellulaire programmée [56].

La grande différence entre ces deux types de mort cellulaire se situerait au niveau de leurs conséquences physiologiques sur l'organisme. Dans l'apoptose, les constituants du noyau et du cytoplasme sont isolés dans une membrane intacte qui sera phagocytée. Au contraire, dans la nécrose, les membranes sont détruites et le contenu des cellules est relargué dans l'espace extra-cellulaire, ce qui provoque une réponse inflammatoire [57]. Une chose est sûre : la mitochondrie participe activement à ces deux phénomènes.

L'implication de la mitochondrie dans l'apoptose a été suggéré par la découverte que certaines protéines de la famille Bcl-2, possédant des activités pro- ou anti-apoptotiques, étaient localisées dans la membrane externe mitochondriale [58-60]. Puis le fait que les mitochondries [61] et plus particulièrement le cytochrome *c* [62-64] soient essentiels à la mort cellulaire programmée a fini d'enterrer définitivement la mitochondrie au centre de ce processus. Le cytochrome *c*, présentant un poids moléculaire de 15 kDa [62], est un composant essentiel de la chaîne respiratoire localisé dans l'espace intermembranaire mitochondrial et faiblement attaché à la surface de la membrane interne [65] mais sa présence dans le cytosol est nécessaire à l'induction de l'apoptose. Une fois dans le cytosol, le cytochrome *c* s'associe à Apaf-1 (pour Apoptosis Activating Factor) [66] et active les caspases (Cysteine Aspartate-specific Proteases) qui possèdent une activité protéolytique [67-69]. Ces protéases ont toutes un résidu cystéine dans leur site actif et elles clivent leur cible après un résidu aspartate (une spécificité très rare chez les autres classes de protéases). La famille des caspases comprend plus d'une douzaine de protéines chez l'homme [70]. Certaines ne jouent pas un rôle dans l'apoptose mais sont impliquées dans la maturation de cytokines pro-inflammatoires dans la réponse immunitaire (caspase-1, -4, -5, -11, -12, -13 et -14). Les caspases impliquées dans l'apoptose peuvent encore être subdivisées en caspases initiatrices (caspase-2, -8, -9 et -10), responsables du déclenchement des cascades d'activation des caspases, et en caspases effectrices (caspase-3, -6 et -7) qui dégradent des substrats cellulaires spécifiques [70]. L'activation des caspases entraîne ainsi de nombreuses modifications au sein de la cellule dont la condensation et la dégradation de l'ADN, le remaniement du cytosquelette ou encore l'inhibition d'enzymes réparatrices [70].

D'autres protéines, normalement confinées dans l'espace intermembranaire et présentant une activité pro-apoptotique, sont relarguées dans le cytosol au cours de l'apoptose [71]. Parmi celles-ci, on retrouve, l'endonucléase G, Smac/DIABLO, l'apoptose inducing factor (AIF) et Htr2A/Omi [72-76]. Une fois relarguées, l'AIF et l'endonucléase G vont dans le noyau dégrader l'ADN par leur activité nucléasique, tandis que Smac/DIABLO et Htr2/Omi entraînent l'activation des caspases par fixation sur les IAPs (pour Inhibitor of Apoptosis Proteins) qui sont des inhibiteurs cytoplasmiques des caspases [77].

La mitochondrie est donc impliquée dans la mort cellulaire par un relargage dans le cytosol de certains de ces composants séquestrés normalement dans son espace intermembranaire. Or ces protéines ont des poids moléculaires bien supérieurs à la perméabilité de la membrane externe mitochondriale. Deux théories non exclusives permettent d'expliquer la libération de tels facteurs : la formation de larges canaux dans la membrane mitochondriale par les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 ou la perméabilisation de cette membrane externe secondaire à l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial (PTP).

La première et plus largement répandue de ces théories, permet le relargage des protéines apoptotiques dans le cytosol par la formation de canaux dans la membrane externe mitochondriale. Ces canaux sont créés par la polymérisation de protéines de la famille Bcl-2. Les membres cette famille se partagent en deux groupes : les anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-x_L, Bcl-w...) et les pro-apoptotiques (Bax, Bad, Bak, Bid, Bcl-x_S...) [78].

L'action de ces protéines se ferait par la formation, entre elles, d'homo ou d'hétéro-dimères qui, selon leur combinaison, induirait la mort ou la survie de la cellule [79]. Les protéines anti-apoptotiques du type de Bcl-2 sont localisées au niveau des membranes intracellulaires telles que la membrane externe mitochondriale, la face cytosolique de la membrane du réticulum endoplasmique et l'enveloppe nucléaire [80]. C'est cette insertion intramembranaire qui leur permet de jouer leur rôle anti-apoptotique. Les membres pro-apoptotiques ont une répartition différente. Bax est principalement localisée dans le cytosol des cellules sous forme monomérique [81, 82] alors que Bak est insérée dans la membrane externe mitochondriale [83].

Lorsqu'un stimulus apoptotique entraîne l'activation de Bax, celle-ci subit une translocation du cytosol jusque dans la membrane externe mitochondriale [84, 85]. Cette translocation est accompagnée de changements conformationnels de Bax [85, 86] qui conduisent à la formation de complexes oligomériques [85, 87] au sein de la membrane externe mitochondriale [88]. Ces complexes pourraient constituer de grands canaux qui présentent différents niveaux de conductance, sont sensibles au pH, insensibles au Ca²⁺ et possèdent une légère sélectivité pour les cations [89, 90]. Il a été montré que les oligomères de Bax sont capables d'induire, à eux seul, le relargage du cytochrome *c* [91]. De plus, l'ajout de Bax à des mitochondries isolées ainsi que sa surexpression dans les cellules entraînent la libération du cytochrome *c* [92]. Cependant, le mécanisme précis de relargage du

cytochrome *c* et des autres protéines pro-apoptotiques par Bax est encore débattu. Selon les auteurs, Bax pourrait destabiliser la bicouche lipidique, induire l'oxydation lipidique ou former un pore par homo ou hétérodimérisation [93].

L'autre hypothèse, longtemps dénigrée, est un phénomène entraînant la perte de l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale : la transition de perméabilité mitochondriale. Ce mécanisme est rendu possible par l'existence du pore de transition de perméabilité (PTP) et à pour conséquence la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale.

II. Le Pore de Transition de Perméabilité Mitochondrial

II.A. Le phénomène de transition de perméabilité mitochondriale

Les mitochondries isolées ont servi de modèle expérimental dans de nombreux travaux portant sur l'oxydation phosphorylante et sa régulation. C'est ainsi qu'il a été observé que, quelques temps après leur préparation, les mitochondries avaient tendance à augmenter de volume, notamment en présence de calcium. Ce gonflement spontané, d'abord attribué à un artefact de vieillissement des mitochondries *in vitro*, est maintenant connu sous le nom de transition de perméabilité dépendante du calcium [94], car induit spécifiquement par le calcium (Figure 6).

De 1976 à 1979, une série de travaux menée par Douglas Hunter et Robert Haworth sur ce phénomène de transition de perméabilité va permettre d'explorer les mécanismes et la régulation de ce processus [94-97]. Cette transition d'état est caractérisée par un accroissement du volume de la matrice, un découplage de l'oxydation phosphorylante ainsi qu'une augmentation non spécifique de la perméabilité de la membrane interne accompagnée d'une entrée de sucrose et d'une libération de calcium. Ces caractéristiques diffèrent de celles observées lors d'un gonflement mitochondrial causé par la différence d'osmolarité de part et d'autre de la membrane mitochondriale en milieu hypo-osmolaire.

Le gonflement mitochondrial induit par le phénomène de transition de perméabilité est la conséquence de l'augmentation de la perméabilité de la membrane interne aux composés osmotiques d'un poids inférieur à 1500 Da. Ceci a pour conséquence d'effondrer tous les gradients ioniques (au premier rang desquels, le gradient de proton indispensable à la synthèse d'ATP), et d'abolir la pression osmotique due à ces composés, de part et d'autre de la membrane interne. En revanche, la matrice mitochondriale est riche en protéines de poids moléculaire supérieur à 1500 Da qui ne diffusent pas et sont responsables d'un appel d'eau et donc d'un gonflement de la matrice mitochondriale. Celui-ci s'arrête lorsque la pression oncotique est égale à la pression mécanique qui résulte de la mise en tension de la membrane mitochondriale. Il en résulterait une rupture mécanique de la membrane externe qui a une plus faible surface que la membrane interne.

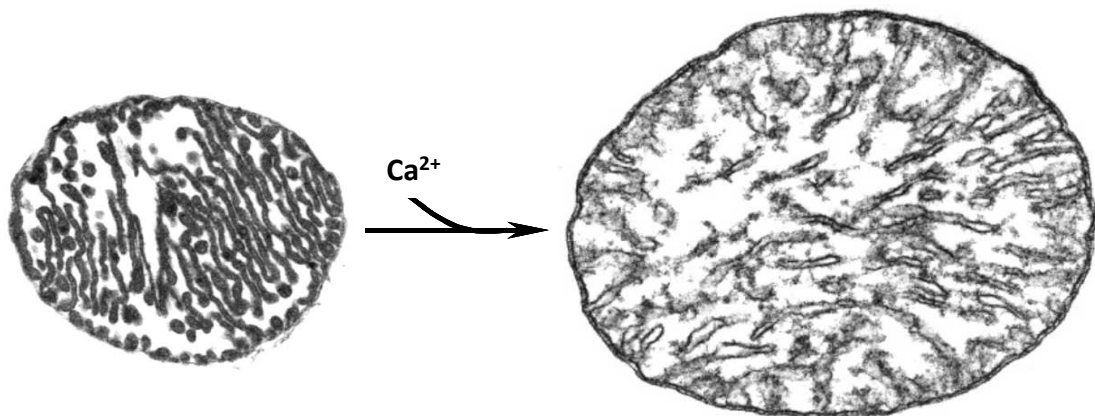


Figure 6 : Visualisation du gonflement mitochondrial par microscopie électronique.

La transition de perméabilité induite par l'addition de calcium entraîne un gonflement des mitochondries isolées.

Ces auteurs démontrent également que le Ca^{2+} seul est nécessaire et suffisant à l'apparition du phénomène. Les autres facteurs régulateurs qu'ils décrivent, potentialisent (atractyloside, oxydation du NADH), ou diminuent (H^+ , magnésium, strontium, ADP, acide bongkréique, réduction du NADH) l'effet du calcium. Ils décrivent ce phénomène comme réversible par l'ajout d'EGTA ou de magnésium, le premier chélatant le Ca^{2+} de son site d'action et le second agissant par inhibition compétitive sur le site d'action ou un site régulateur. Dans ce cas, la mitochondrie reste gonflée mais la membrane interne redevient imperméable et l'oxydation phosphorylante est restaurée. Ils observent que la transition de perméabilité est également induite par le phosphate inorganique, l'arsenate et l'acide oléique mais que ces inducteurs sont sans effet lorsque les transporteurs calciques sont

inhibés par le rouge de ruthénium ou le lanthanum. De même, les mitochondries préalablement déplétées en calcium deviennent insensibles aux inducteurs de la transition de perméabilité autres que le calcium indiquant ainsi que le calcium endogène est nécessaire à l'apparition du phénomène.

Enfin, ces travaux montrent que la libération de calcium associée à ce gonflement ne fait intervenir ni l'uniport, ni l'échangeur NCE et résulte bien d'une transition de perméabilité [95-97]. Ils proposent alors l'existence d'un site de fixation matriciel pour le calcium. Celui-ci permettrait le déclenchement du phénomène par l'intermédiaire d'un pore protéique situé dans la membrane interne. La notion de pore de transition de perméabilité (PTP) apparaît ainsi pour la première fois dans la littérature. La réversibilité du phénomène ainsi que sa régulation amènent Hunter et Haworth à proposer ce mécanisme comme étant physiologique. Toutefois, cette transition de perméabilité apparaît comme inconcevable pour la communauté scientifique de l'époque. En effet, la seule fonction reconnue de la mitochondrie, à ce moment là, est la production d'énergie. Or la perte de l'imperméabilité de la membrane interne est incompatible avec la théorie chimio-osmotique de Mitchell permettant cette production d'ATP mitochondrial et ne peut donc être un phénomène physiologique.

II.B. Le Pore de Transition de Perméabilité

C'est la découverte d'un régulateur pharmacologique du phénomène de transition de perméabilité qui rendra plus consistante la théorie de l'existence d'un pore proposée par Hunter et Haworth. En 1987, des travaux montrent que de faibles concentrations de Ciclosporine A (CsA), un peptide immunosuppresseur, augmentent la quantité de calcium pouvant être accumulée par la mitochondrie tout en bloquant sa libération [98]. D'autres études suivront et démontreront que la CsA est un puissant inhibiteur du gonflement et de la dépolarisation observés lors de la transition de perméabilité mitochondriale [99, 100], mais aussi qu'elle est capable de les renverser [101, 102]. L'action de la CsA n'étant pas due à un ralentissement de l'entrée du calcium dans la mitochondrie [100], et le phénomène étant binaire de type "tout ou rien", l'existence d'un pore protéique situé dans la membrane interne mitochondriale devient alors une réalité.

II.B.1. La Nature du Pore de Transition de Perméabilité

Si l'existence du Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial est aujourd'hui bien admise, sa nature reste encore largement débattue. Il s'agit vraisemblablement d'un complexe multiprotéique constitué d'un noyau central formant un canal dans la membrane interne et de diverses autres protéines régulatrices.

II.B.1.1. Les protéines de la membrane interne

Jusqu'à aujourd'hui, seules deux protéines de la membrane interne mitochondriale ont montré leur implication dans le phénomène et sont donc les candidates connues pouvant former le cœur du PTP.

II.B.1.1.1. L'Adenine Nucleotide Translocase

La relation l'ANT et le PTP a été proposée dès les premières études de la transition de perméabilité mitochondriale par Hunter et Haworth [95] qui se sont basés sur l'observation suivante : les ligands de ce transporteur ont un effet régulateur du pore. Ainsi le carboxyatractylate (CAT) ou l'atractylate, qui stabilisent l'ANT dans sa conformation "c", sont capables d'induire l'ouverture du pore, alors que l'ADP matriciel comme le bongkrékate, qui maintiennent l'ANT dans sa conformation "m", inhibe l'ouverture du PTP [95, 103, 104]. De plus, le fait que l'acide bongkréique potentialise l'effet inhibiteur de l'ADP a suggéré que la transition de perméabilité est liée à la conformation de la translocase [103, 105].

La cyclophiline D, une protéine matricielle de la famille des immunophilines, est un constituant du pore comme nous le verrons plus loin. Or l'équipe d'Halestrap confirmera son hypothèse initiale selon laquelle l'ANT servirait d'intermédiaire à l'interaction de la cyclophiline D sur le PTP [106] en démontrant de manière directe l'existence d'une interaction CyP-D/ANT sensible à la ciclosporine A [107].

Il a aussi été observé que l'ANT purifiée et incorporée dans des liposomes est capable de passer d'une forme canal antiport sélectif à une forme canal non-sélectif lorsqu'il est soumis à de grandes quantités de calcium [108]. L'ouverture de ce canal est réversible lorsque l'on retire le calcium et est sensible au pH ainsi qu'aux ligands de l'ANT.

Une surexpression de l'ANT1 entraîne l'apoptose probablement par le mécanisme transition de perméabilité mitochondriale puisque entraînant une perte du potentiel de la membrane interne [109]. La participation d'ANT1 au signal apoptotique est indépendante de la fonction de transport de la translocase [109]. En effet, la toxicité est observée en

présence de formes mutées d'ANT1 incapables de catalyser la translocation des nucléotides adényliques. Cependant, l'ANT2, qui présente 90% d'homologie de séquence avec ANT1, est inefficace.

Une autre étude menée par Kokoszka exclut la participation centrale de L'ANT dans la constitution du PTP [110]. Les mitochondries de foie de souris déplétées en ANT1/2 montre la persistance du phénomène de transition de perméabilité en l'absence de cette protéine bien que la quantité de calcium nécessaire à son induction soit triplée. De plus, l'ouverture du PTP reste encore sensible à la CsA, ce qui indique que l'ANT n'est pas l'unique cible de la CyP-D. Il est donc probable que l'ANT ne soit pas l'élément central du PTP par sa capacité à former un pore mais plutôt un élément régulateur. Néanmoins, une autre isoforme de l'ANT, l'ANT 4, a été découverte chez la souris [111]. Cette isoforme est exprimée exclusivement dans les cellules germinales et souches embryonnaires en conditions normales, mais elle pourrait se substituer aux gènes inactivés dans d'autres tissus. Toutefois, l'atractylate et l'ADP n'ont pas d'effet sur le PTP de ces cellules déficientes [110].

Une chose reste sûre, l'ANT joue un rôle dans le phénomène de transition de perméabilité, probablement par de multiples interactions avec d'autres protéines. Il a d'ailleurs été montré que, outre son interaction avec la cyclophiline D, elle se lie avec la protéine pro-apoptotique Bax [112, 113] pour induire l'apoptose ainsi qu'avec la porine VDAC [114, 115].

II.B.1.1.2. Le complexe I

Le seul autre complexe multi-protéique de la membrane interne mitochondriale connu pour être un constituant du PTP est le complexe I de la chaîne respiratoire. Son implication dans le phénomène de transition de perméabilité a été démontrée par le fait que le flux d'électrons transitant à travers ce complexe constitue un élément régulateur du pore indépendant de tout autre mécanisme connu, ce que nous développerons plus loin [116]. Composé d'au moins 43 sous-unités, le complexe I est le plus gros complexe de la chaîne respiratoire chez les mammifères [117]. La quantité de protéines constituant ce complexe est telle que sa régulation et nombre de ses fonctions sont encore obscurs. Cependant, il a été observé sur des particules submitochondriales que cette enzyme est capable de subir une interconversion entre une forme active et une forme inactive [118].

La transition entre les états actif et inactif de l'enzyme est accompagnée par des changements de conformation qui rendent la forme inactive très sensible au Ca^{2+} , aux pH

alcalins et à la N-éthylmaleimide [38]. Deux faits imposent donc le complexe I comme étant un constituant du pore : l'analogie de sensibilité de la forme inactive du complexe I à différents paramètres connus également pour réguler le PTP ainsi que la régulation de la transition de perméabilité par le flux d'électrons de ce complexe. Ceci suggère également l'existence d'un site de fixation du Ca^{2+} sur le complexe I. En effet, l'addition de Ca^{2+} ne diminue la vitesse de respiration maximale induite par un découplant qu'en présence de substrats du complexe I [117]. Enfin, il est remarquable de constater que les mitochondries de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, qui ne possèdent pas de complexe I, présentent une transition de perméabilité insensible à la CsA et au Ca^{2+} [119]. Il serait intéressant de savoir si la CyP-D est capable d'interagir avec le complexe I puisque l'ANT n'est pas sa seule cible [110].

Des deux candidats possibles du cœur du PTP, il a été démontré que l'ANT est dispensable. Ceci laisse envisager plusieurs hypothèses. Soit la transition de perméabilité est un phénomène primordial pour la cellule et les protéines déficientes sont capables d'être remplacées afin que le mécanisme persiste. Soit le cœur du pore est une protéine de la membrane interne dont la participation au PTP n'a pas encore été observée. Soit le complexe I est ce cœur.

II.B.1.2. Les partenaires régulateurs

De nombreuses études ont permis de constater que diverses protéines participent à la régulation de l'ouverture du Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial.

II.B.1.2.1. La cyclophiline D

La découverte que la Ciclosporine A (CsA) est capable d'inhiber l'ouverture du PTP a conduit à la recherche de sa cible mitochondriale. C'est en 1990 que celle-ci sera découverte de manière hypothétique. En effet, trois observations mènent Halestrap et Davidson à penser que l'action de la CsA sur la transition de perméabilité mitochondriale est due à son action sur une protéine matricielle ayant une activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase. Premièrement, nombre d'effets biologiques de la CsA sont dus à sa liaison à une famille de récepteurs intracellulaires, les cyclophilines (CyP) qui possèdent toutes une activité peptidyl-prolyl cis-trans-isomérase [120]. Or ils démontrent l'existence d'une telle enzyme

dans la matrice mitochondriale. Deuxièmement, ils observent que la CsA inhibe le gonflement mitochondrial avec la même affinité qu'elle inhibe l'action de l'isomérase matricielle. Enfin, ils calculent que le nombre de sites de liaison de la CsA impliqués dans son action sur la transition de perméabilité est du même ordre que la quantité de cyclophilines présentes dans la matrice mitochondriale.

Il existe une seule protéine matricielle capable de lier la CsA, la cyclophiline D qui possède un poids de 20 kDa et interagit avec la membrane interne mitochondriale. L'observation que la CsA perd son activité régulatrice du PTP des mitochondries de foie de souris déficientes en CyP-D confirme que cette protéine est bien la cible de l'immunosuppresseur [121, 122]. L'hypothèse la plus plausible concernant l'inhibition du pore par la CsA est que la liaison de la CyP-D avec le PTP favorise son ouverture et que la CsA provoque indirectement la fermeture du pore en empêchant la liaison de la CyP-D. En effet, un pH acide matriciel ainsi que la CsA sont capables de détacher la CyP-D de la membrane interne [123]. En ce qui concerne l'activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase de la cyclophiline, il semblerait que celle-ci soit indépendante de son action sur le PTP. Car bien que cette activité soit inhibée par la CsA, un traitement avec du diéthyl-pyrocarbonate (DPC) favorise l'ouverture du pore alors qu'il inhibe pleinement l'activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase de la CyP-D [124].

Toutefois, la liaison de la CyP-D n'est pas nécessaire à l'ouverture du pore pour de fortes concentrations de Ca^{2+} matriciels [125, 126]. De plus, la transition de perméabilité mitochondriale est toujours possible chez des souris déficientes en CyP-D [121]. Cette liaison de la CyP-D au pore permet juste de potentialiser l'effet du Ca^{2+} [127].

II.B.1.2.2. VDAC

La protéine la plus abondante de la membrane externe est une porine, la Voltage Dependant Anion Chanel (VDAC) que l'on retrouve sous trois isoformes chez les mammifères. C'est une protéine transmembranaire composée de 19 feuillets β formant les canaux protéiques traversant la bicouche lipidique. Ces canaux laissent passer toutes les molécules hydrophiles d'une masse moléculaire inférieure à 6 kDa (anions, cations, acides gras, pyruvate et nucléotides). Bien qu'*in vivo* la membrane externe ne soit pas soumise à un potentiel membranaire de par sa nature perméable, les canaux VDAC sont capables d'avoir une configuration ouverte ou fermée selon les potentiels membranaires appliqués *in vitro* sur bicouche lipidique [127]. De nombreuses études ont montré que cette protéine interagit au sein de complexes multiprotéiques au point de jonction des membranes mitochondriales

comprenant diverses protéines telles que l'hexokinase, la créatine kinase, l'ANT, le récepteur périphérique aux benzodiazépines ou encore les protéines de la famille Bcl-2 [113, 119, 128-130]. Un de ces complexes est constitué par VDAC, l'ANT et la cyclophiline D et pourrait être au cœur du PTP [131]. Une étude a été réalisée par l'incorporation de ce complexe dans des vésicules phospholipidiques contenant de la fluorescéine. Le Ca^{2+} et le P_i ont permis le relargage de la fluorescéine tandis que la CsA l'en a empêchée [131].

De plus, des études de patch-clamp ont révélé que la conductance du PTP est le double de celle du canal VDAC [132, 133]. Or une expérience de cross-linking montre que VDAC est présent sous forme de dimère dans la membrane externe mitochondriale de la levure [134]. La porine présente également une cinétique, une dépendance au voltage, une sensibilité au pH, et enfin, une sélectivité comparables au PTP [132, 133].

Un autre complexe multiprotéique isolé à partir de mitochondries de cerveau de rat est composé de VDAC, de l'ANT, de l'hexokinase et de la créatine kinase [130]. La reconstitution de ce complexe sur des liposomes montre qu'il peut induire une perméabilité comparable à celle du PTP. En effet, cette perméabilité est induite par du Ca^{2+} et est sensible à la CsA. Cette perméabilité est régulée pour des gammes de concentrations en Ca^{2+} , en CsA, en ADP et en ATP analogues à celles attendues pour le PTP [130, 136].

Un autre point mettant en évidence la participation VDAC dans la transition de perméabilité est son rôle dans l'apoptose. Des études menées sur protéoliposome ont montré que la porine interagit avec les protéines de la famille Bcl-2. Cette interaction conduit à l'ouverture ou la fermeture d'un large pore permettant le relargage du cytochrome *c* selon qu'elle ait lieu entre VDAC et Bax (pro-apoptotique) ou VDAC et Bcl-XL (anti-apoptotique) respectivement [137].

Il a aussi été démontré que le rouge de ruthénium, un inhibiteur du pore, interagit sur un site de liaison au calcium de VDAC pour inhiber son activité [26]. Enfin, Gincel a également montré que le L-glutamate est capable d'inhiber l'ouverture du pore de manière spécifique car son stéréo-isomère, le D-glutaminate, en est incapable [138]. Cette molécule empêche le relargage du cytochrome *c* et inhibe le gonflement mitochondrial induits par le calcium lorsque la membrane externe contenant VDAC est intacte. Or ce L-glutamate est aussi un modulateur du canal formé par VDAC [138].

Toutefois, la place de VDAC dans le PTP est sujette à controverse. Des expériences menées sur des mitochondries déplétées aux trois isoformes de VDAC ont montré que la transition de perméabilité ainsi que l'apoptose Bax dépendante persistent toujours [139]. Mais une autre expérience avec des anticorps dirigés contre VDAC et capables d'inhiber son

activité montre que ceux-ci sont également capables d'empêcher la transition de perméabilité induite par le calcium [140].

II.B.1.2.3. L'Hexokinase

L'hexokinase (HK) est une enzyme cytosolique qui catalyse la réaction de phosphorylation des hexoses sur leur sixième carbone. L'hexokinase est particulièrement importante pour le catabolisme du glucose puisqu'il s'agit de la première enzyme de la glycolyse. Cette enzyme est ubiquitaire, elle est présente dans presque tous les tissus excepté dans les cellules β du pancréas et du foie qui possèdent la glucokinase (une isoenzyme appelée aussi hexokinase IV et catalysant la même réaction que l'hexokinase mais uniquement pour le glucose). Elle possède quatre isoenzymes chez les mammifères [141]. Outre le fait que l'hexokinase forme un complexe avec VDAC, d'autres indices laissent à penser que cette enzyme fait partie du PTP.

En effet, il a été démontré que les hexokinases I et II jouent un rôle dans la mort cellulaire [142]. La surexpression de ces deux isoformes protège de la mort cellulaire induite par les pro-oxydants [143, 144]. Toutefois, le mécanisme de l'activité protectrice de l'hexokinase est encore obscur et deux hypothèses non exclusives ont été avancées pour l'expliquer : une protection par l'augmentation de la phosphorylation du glucose ou par la liaison de l'hexokinase aux mitochondries.

S'il est bien admis que l'hexokinase se lie aux mitochondries par l'intermédiaire de la porine [145-148], l'effet protecteur de cette liaison aux mitochondries n'est pas clair. Il semblerait qu'il soit dû à deux actions différentes : une action PTP dépendante et une action PTP indépendante. Effectivement, il a été observé sur des cultures cellulaires que l'HK I empêche la toxicité de la staurosporine [145] alors que cette molécule induit l'apoptose de manière insensible à la CsA [149-151]. Une autre étude a montré que la protection des hexokinases induite par sa liaison aux mitochondries est médiée par l'inhibition de la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie en empêchant la liaison entre Bax et VDAC [152]. Or certaines observations laissent à penser que la transition de perméabilité peut être indépendante de Bax et de Bid [149, 150]. D'un autre côté, une équipe a constaté que l'effet protecteur des hexokinases par leur liaison est indépendant de Bax et de Bak [153]. De plus, il a été démontré qu'il y a une relation directe de l'effet protecteur des hexokinases sur l'inhibition de la transition de perméabilité et le relargage du cytochrome *c* induits par le calcium [141, 142, 145]. Enfin, l'expérience menée par l'équipe de Sun, utilisant des hexokinases mutantes qui peuvent seulement se lier aux mitochondries et des

hexokinases tronquées qui peuvent seulement phosphoryler les hexoses, montre que ces deux actions sont nécessaires pour avoir une protection maximale face au stress induit par l'H₂O₂ [141]. Ils démontrent également que les hexokinases empêchent la translocation de Bax ainsi que la transition de perméabilité toutes deux induites par l'H₂O₂. L'hexokinase pourrait donc jouer un rôle au cœur des différents mécanismes induisant l'apoptose.

Enfin, il a été montré que la surexpression de la cyclophiline D, si celle-ci possède son activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase, augmente la liaison de l'hexokinase II aux mitochondries [154]. Au contraire, la CsA diminue cette liaison de l'hexokinase II. Toutefois, la CsA a la capacité de détacher la CyP-D mais aussi d'inhiber son activité peptidyl-prolyl cis-trans isomérase. Or cette activité enzymatique de la CyP-D n'a pas de rapport avec l'effet de la CyP-D sur le PTP [124]. Étant donné que l'effet de l'interaction CyP-D/hexokinase sur la régulation du PTP n'a pas été étudié dans cette étude, nous ne savons pas ce qu'il en est vis-à-vis de la transition de perméabilité. La cyclophiline D étant matricielle et l'hexokinase cytoplasmique, leur interaction est indirecte et passe probablement par l'un de leurs partenaires communs tels que VDAC. Or l'état de phosphorylation de VDAC affecte négativement la liaison de l'hexokinase II aux mitochondries [141, 155].

II.B.1.2.4. La Créatine Kinase

La créatine kinase (CK) est une enzyme située dans l'espace intermembranaire mitochondrial et dans le cytosol [155]. On la retrouve principalement dans le cœur, le muscle et le cerveau mais pas dans le foie. Elle a pour fonction de catalyser la conversion de la créatine en phosphocréatine [156]. La phosphocréatine est une molécule riche en énergie. Elle est utilisée dans les muscles pour régénérer l'ATP au départ de l'ADP dans les cellules ayant de fortes fluctuations énergétiques telles que les muscles ou le cerveau. Des complexes constitués de CK sous forme d'octamère, de VDAC, et d'ANT [130, 156] ont été isolés à partir de membranes de cerveau de rat. La reconstitution de ce complexe dans des vésicules phospholipidiques contenant du malate, a montré que le calcium entraîne un relargage du malate sensible à la CsA uniquement en présence de TSAC (Transition State Analog Complex), un agent qui provoque la passage de la CK d'un état octamérique à un état dimérique. La forme octamérique de la CK semble donc entraîner une fermeture du pore et sa forme dimérique favorise son ouverture [156, 157]. Toutefois, il est probable que les complexes reconstitués VDAC/ANT/Kinases contiennent d'autres protéines, telles que la CyP-D puisque le phénomène de relargage est sensible à la CsA. On retrouve les complexes ANT, VDAC, CK aux points de contact des membranes [157]. Une étude menée sur des souris

transgéniques exprimant une créatine kinase dans le foie montre que la présence de la protéine permet une inhibition de l'ouverture du pore par la créatine et son analogue, la cyclocréatine, chez ces souris mais pas chez les souches sauvages [156, 158]. Pour que cet effet inhibiteur des substrats de la CK ait lieu, il est nécessaire d'apporter du Mg^{2+} dans le milieu (un cofacteur de la réaction catalysée par la CK) et il faut que la CK se situe dans l'espace intermembranaire mitochondrial [158]. Les auteurs proposent alors que cette régulation est de nature indirecte : en transformant la créatine en phosphocréatine, la CK consomme de l'ATP pour produire de l'ADP qui doit être alors transporté dans la matrice par l'ANT qui prend la conformation "m" inhibitrice du PTP.

II.B.1.2.5. Le récepteur périphérique des benzodiazépines

Le Récepteur Périphérique des Benzodiazépines (RPB) est une protéine hydrophobique de 18 kDa située dans la membrane externe mitochondriale [159]. L'implication du RPB dans la constitution du PTP a été suggérée après qu'elle ait été isolée à partir de complexes regroupant VDAC et l'ANT [161]. Une étude de patch-clamp sur mitoplastes a également montré que les ligands du RPB sont capables de modifier l'activité canal du PTP [162]. Toutefois, les effets de ces ligands sur le pore sont contradictoires selon les études et il semblerait qu'ils dépendent de la dose utilisée ainsi que du type cellulaire étudié [162-164]. Enfin, de récents résultats suggèrent que les ligands du RPB peuvent avoir des répercussions sur l'apoptose et la prolifération cellulaire indépendamment de leur action sur le RPB [165-167]. Pour l'instant, il faut donc prendre avec précaution l'association du RPB avec le PTP.

II.B.1.2.6. Les protéines Bcl-2

Différentes techniques à base de co-immunoprécipitation, de chromatographie sur colonne d'affinité et de double-hybride ont montré que les protéines Bax et Bcl_{-XL} sont capables de se lier à VDAC et à l'ANT [168-170]. Les fonctions de ces interactions ont donc été étudiées. Ainsi, il a été montré que Bcl_{-XL} diminue, et qu'au contraire, Bax augmente la perméabilité des canaux VDAC inclus dans des protéoliposomes [169]. Une autre expérience menée sur des levures déficientes en VDAC a montré que chez ces organismes, Bax est incapable d'induire le relargage du cytochrome *c* mais que cette action est restaurée après transfection d'un vecteur exprimant VDAC1 [168]. Il a également été observé que Bax et l'ANT peuvent aussi former un canal perméabilisant la membrane mitochondriale et que

cette formation est inhibée par l'ATP, l'acide bongkréic, Bcl-2 et la CsA [170, 171]. Toutefois, Bax ne semble pas essentielle à la transition de perméabilité qui a toujours lieu dans des cellules déficientes sur un allèle [93] mais permettrait apparemment une ouverture optimale du PTP dans certaines conditions [172]. Comme la transition de perméabilité peut également être inhibée par Bcl-X_L et Bcl-2 [53, 173], qui sont connus pour inhiber l'apoptose par interaction avec Bax, cette inhibition pourrait intervenir par interaction directe avec d'autres composants du PTP tels que VDAC ou l'ANT. Cependant, l'action de Bcl-2 sur le PTP pourrait aussi être indirecte et médiée par une autre activité de la protéine. En effet, une étude a montré que Bcl-2 est capable d'empêcher l'effondrement du potentiel membranaire mitochondrial suivant l'ajout d'un protonophore [174]. L'activité de Bcl-2 sur le pore pourrait donc aussi provenir d'une activité d'efflux de protons de la matrice qui préviendrait la dépolarisation.

Les différentes origines cellulaires des éléments constituant le PTP, à savoir VDAC (membrane externe) [127], l'ANT (membrane interne) [103], la créatine kinase (espace intermembranaire) [156], l'hexokinase (cytosol) [130], la CyP-D (matrice) [175, 176], Bax et Bcl-2 (membrane externe) [114, 170, 179], semblent indiquer qu'il se situe probablement aux points de contact entre les membranes interne et externe mitochondriales.

II.B.2. La régulation du PTP

Depuis la reconnaissance du phénomène de transition de perméabilité et de l'existence du PTP, de nombreuses études ont eu pour but de déterminer les mécanismes de sa régulation. Il apparaît alors rapidement qu'une multitude de composés de structures et de fonctions aussi diverses que variées sont capables d'interagir et de réguler le pore. Cependant, des mécanismes de régulation majeurs ont pu être tirés de ces observations (Figure 7).

II.B.2.1. Les cations divalents

Dès leurs premiers travaux sur le pore de transition de perméabilité mitochondrial, Hunter et Haworth remarquent que l'accumulation de calcium dans la matrice est nécessaire et suffisante à son ouverture [94]. Ce fait sera très vite confirmé par les différents auteurs et imposera le calcium comme l'inducteur majeur de l'ouverture du pore. En effet, l'addition de rouge de ruthénium (RR) dans le milieu, un inhibiteur spécifique de l'uniport du Ca²⁺, ou

d'EGTA, un chélateur du Ca^{2+} , abolit complètement la transition de perméabilité et est même capable de stopper le processus dans le cas de l'EGTA [94]. Toutefois, la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore est susceptible de varier selon l'espèce et le type cellulaire étudié.

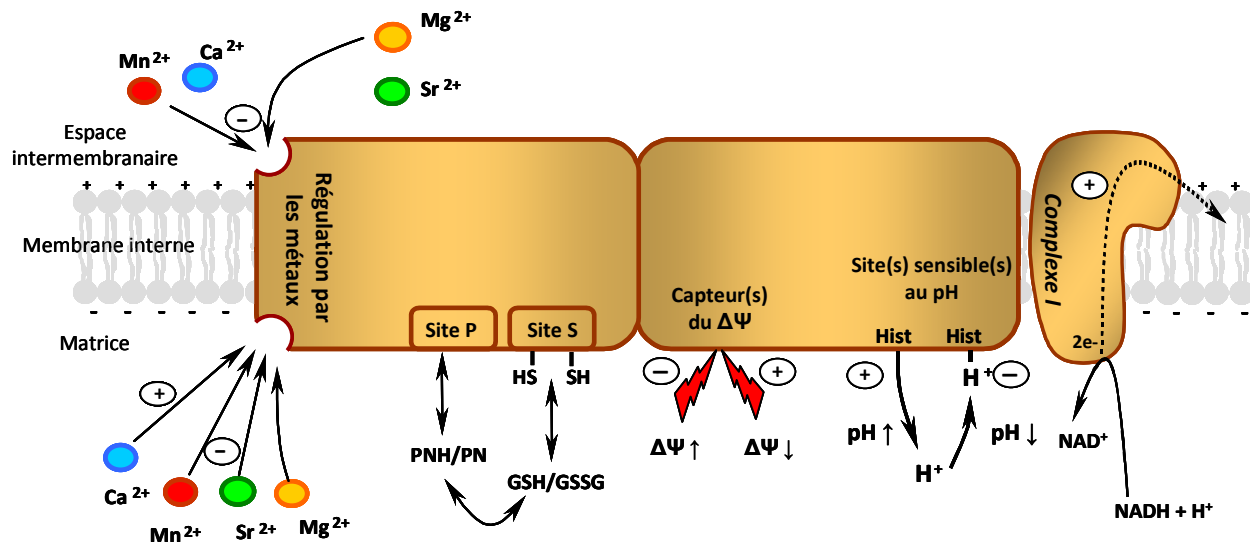


Figure 7 : Principaux mécanismes de régulation du pore de transition de perméabilité mitochondriale.

Le pore est régulé par deux sites sensibles aux métaux. Un site externe qui inhibe l'ouverture du pore et un site matriciel qui inhibe aussi l'ouverture du pore mais qui l'active avec le calcium. L'oxydation des sites S et P favorise l'ouverture du PTP à l'inverse de la réduction. Un potentiel membranaire élevé maintient le PTP en position fermée à l'inverse de la dépolarisation membranaire. Un pH matriciel acide inhibe l'ouverture du PTP. L'augmentation du flux d'électrons à travers le complexe I favorise l'ouverture du PTP.

Les symboles plus ou moins encadrés désignent respectivement un effet activateur ou inhibiteur de l'ouverture du PTP. SH : résidu thiol. PNH/PN : pool des nucléotides pyridiniques. GSH/GSSG : pool du glutathion. $\Delta\Psi$: potentiel de membrane. $\text{NAD}^+/\text{NADH} + \text{H}^+$: pool des acides nicotiniques.

L'équipe de Bernardi a démontré l'existence de deux sites d'action indépendants sensibles au calcium mais aussi à d'autres métaux divalents. Le premier est un site matriciel sur lequel le Ca^{2+} induit l'ouverture du pore tandis que le Mg^{2+} , le Mn^{2+} , le Ba^{2+} , et le Sr^{2+} ont une action inverse par compétition avec le Ca^{2+} [178]. L'utilisation de rouge de ruthénium, qui inhibe également le transport de ces cations, a permis de montrer l'existence du second site. C'est un site externe sur lequel l'action des cinq cations précédents entraînent une inhibition de l'ouverture du pore [179]. La distribution du calcium entre ces deux sites pourrait donc jouer un rôle dans la probabilité d'ouverture du pore [180].

Il a été proposé que VDAC soit un des sites de régulation du PTP modulé par le calcium depuis la découverte que cette protéine possède un site de liaison du Ca^{2+} sur lequel

interagit le RR pour inhiber son activité canal [26, 181]. Cependant, bien que le calcium déplace le RR du site, il n'en est rien du magnésium. Il s'agirait donc d'un autre site de régulation.

Le calcium matriciel est donc le régulateur phare du pore et son inducteur le plus puissant. Ainsi, les autres régulateurs ne font qu'accélérer ou ralentir le processus induit par le calcium.

II.B.2.2. Le pH matriciel

Dès 1979, Hunter et Haworth observent que l'augmentation de la concentration matricielle en protons nécessite une augmentation de la quantité de calcium pour induire l'ouverture du pore [96]. Plus tard, des études montreront que l'ouverture du PTP est optimale au pH physiologique et inhibée à un pH inférieur à 7.2 [121, 182]. Cette inhibition du pore par une acidité matricielle peut être levée par le diéthyl-pyrocarbonate (DPC) qui empêche la protonation de divers résidus [183]. Le fait que l'action du DPC peut être à son tour empêchée par de l'hydroxylamine semble indiquer que l'inhibition du pore par l'acidification passe par la protonation de résidus histidines situés du côté matriciel [183]. Il a été proposé que ces résidus histidines soient également à l'origine de la liaison de la cyclophiline D au pore, puisque l'acidification de la matrice entraîne un détachement de la cyclophiline D et que le DPC empêche ce détachement [123]. Ceci suggère que l'effet inhibiteur pH acide régule en partie le du pore à travers la cyclophiline D. Mais cette hypothèse a été infirmée car l'effet du pH sur le pore persiste chez les mitochondries déficientes en CyP-D [121].

D'une manière indirecte, de nombreux agents régulateurs du pore agissent sur le pH matriciel. Le calcium lui-même, entre dans la mitochondrie grâce à l'uniport qui utilise le potentiel membranaire comme source d'énergie. Pour compenser cette diminution du potentiel, la mitochondrie expulse des protons dans l'espace intermembranaire à l'aide de la chaîne respiratoire, créant ainsi une alcalinisation temporaire de la matrice [180, 184].

II.B.2.3. Le potentiel membranaire

Lors du phénomène de transition de perméabilité, le potentiel de la membrane interne mitochondrial s'effondre. Cependant, Hunter et Haworth ont observé que ce potentiel membranaire, dû au gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne, n'est pas nécessaire à l'induction de la transition de perméabilité puisque l'utilisation de FCCP, un protonophore, n'empêche pas l'ouverture du pore [95]. Cependant, ils notent que le maintien d'un potentiel membranaire élevé, par alimentation de la chaîne respiratoire, a un effet protecteur sur cette ouverture [95-97].

Pourtant, d'autres expériences montreront que si l'effondrement du potentiel membranaire est une conséquence de l'ouverture du pore, il peut aussi en être la cause [179, 184]. Pour observer que la dépolarisation de la membrane induit bien la transition de perméabilité, les auteurs ont dû inhiber l'acidification de la matrice et empêcher un efflux de calcium rapide. En effet, l'effondrement du gradient de protons est responsable d'une acidification de la matrice et d'une sortie du calcium matriciel via l'uniprot, deux événements en faveur d'un pore bloqué [180, 184].

Le PTP est donc un canal voltage-dépendant qui maintient sa forme fermée pour les hauts potentiels de membrane et qui augmente sa probabilité d'ouverture lors d'une dépolarisation membranaire [185]. Ce mécanisme de régulation nécessite des capteurs capables de réagir aux variations du potentiel membranaire. Le phénylglyoxal et le 2,3-butanedione, des agents capables de se lier avec des résidus arginines, empêchent l'ouverture du pore induite par la dépolarisation membranaire suite à une accumulation de calcium [186, 187]. L'activité de ces deux agents étant modifiée par le pH matriciel, les auteurs en déduisent que la régulation du pore par le potentiel de membrane est médiée par des résidus arginines situés du côté matriciel [187]. Cependant, dans une autre étude, un analogue hydroxylé du phénylglyoxal et se liant aussi aux résidus arginines du même site, entraîne au contraire une induction de la transition de perméabilité [188]. Il semblerait donc que l'effet ne soit pas seulement dû à une liaison aux résidus arginines mais qu'il dépende aussi de la charge du ligand ou de sa capacité à former des liaisons hydrogènes [189]. Ainsi, les dérivés du phénylglyoxal chargés négativement ou pouvant former des liaisons hydrogènes sont des activateurs alors que les autres sont des inhibiteurs [189].

Enfin, de nombreux effecteurs ne dépolarisent pas directement le potentiel membranaire, mais agissent en augmentant ou diminuant la sensibilité du pore aux variations du potentiel [190]. Il existe donc un mécanisme de régulation modifiant les propriétés voltage-sensor du PTP.

II.B.2.4. Le stress oxydant

Le stress oxydant provoque de nombreux dommages cellulaires. Il a été démontré que ce stress est également impliqué dans l'induction de la transition de perméabilité mitochondriale [189, 191] et que l'état d'oxydo-réduction des pools de glutathion et de nucléotides pyridiniques a un impact sur la transition de perméabilité [192].

Cet effet se retrouve pour divers pro-oxydants tels que l'arsénite (AsO), le phénylarsine-oxyde (PhAsO), la diamine, le t-butyl-hydroperoxyde (tBH), ou encore la ménadione. Ces agents pro-oxydants augmentent la probabilité d'ouverture du PTP [193] et sont tous capables d'oxyder les groupements thiols. De plus, l'effet de ces oxydants sur la sensibilité du pore à la dépolarisation membranaire est inhibé par le N-éthylmaléimide (NEM), le dithiothréitol (DTT) ou le monobromobimane (MBM) [193, 194] qui réduisent ou alkylent les fonctions thiols. Les auteurs en déduisent que le site de la régulation voltage-sensor est constitué de groupements thiols vicinaux (du fait de l'activité de PhAsO, un réactif spécifique des thiols vicinaux). A la suite de ces travaux, d'autres études prouveront l'existence d'au moins deux sites de régulation par oxydation : un site S et un site P [195, 196].

Le site S correspond au double groupement thiol. Il est activé par l'AsO et le PhAsO et peut être bloqué par le NEM, le DTT et le MBM [195, 196]. Le tBH active également ce récepteur mais de manière non additive avec les arsénites. Le tBH qui induit l'oxydation complète du glutathion perd son effet activateur du site S, contrairement aux arsénites, par l'ajout de 1-chloro-2,4-dinitrobenzène. Ce produit inhibe la glutathion-S-transférase qui maintient le glutathion sous sa forme réduite [196]. Ainsi, les arsénites agiraient directement sur le site S en liant deux groupements thiols vicinaux alors que le tBH agirait indirectement par oxydation du pool de glutathion. C'est ce glutathion oxydé qui activerait alors le site S en créant des liaisons covalentes entre les sulfures voisins [195, 196].

Il a été proposé que ce site S se situe sur l'ANT [197, 198]. En effet, le PTP des mitochondries déplétées en nucléotides adényliques par un traitement au pyrophosphate perd sa sensibilité au potentiel membranaire. De plus, les agents oxydant les groupements thiols sont capables de diminuer la capacité des nucléotides adényliques matriciels à inhiber le pore [199]. Enfin, la liaison des nucléotides adényliques à l'ANT est antagonisée par le PhAsO et le tBH. Cet antagonisme s'accompagne de modifications covalentes de l'ANT avec le PhAsO [197]. Le PhAsO sur colonne d'affinité est capable de lier à l'ANT et cette liaison est prévenue par un prétraitement de l'ANT par du CAT [198]. Néanmoins, le diamide, un

oxydant spécifique des groupements thiol, est capable d'induire l'ouverture du PTP chez les souris déplétées en ANT1/2, mettant à mal cette théorie [110].

Le site P est un autre site de régulation redox sensible mais qui dépend de l'état d'oxydo-réduction du pool de nucléotides pyridiniques (NAD(P)H/NAD(P)⁺). Effectivement, il a été observé que l'oxydation du NAD(P)H par l'oxaloacétate entraîne un large efflux de calcium mitochondrial et que cet effet peut être rapidement inhibé lorsque l'on réduit ce pool nucléotidique [200]. Il s'avère que l'oxydation de ces nucléotides entraîne une augmentation de la sensibilité du pore aux variations de potentiel membranaire [195, 196]. L'action de l'oxydation de ces nucléotides n'est pas inhibée par le DTT et le MBM, contrairement au site S, ce qui montre que ces deux sites sont bien distincts, bien que le site P reste sensible au NEM [196]. Il semblerait que la régulation du site P soit majoritairement due à l'état d'oxydo-réduction du NADH plutôt que du NADPH car l'utilisation de 2-hydroxybutyrate, qui restaure largement le NADH et moins le NADPH, inhibe l'effet de l'oxydation des nucléotides pyridiniques sur le pore [195]. Ceci est en accord avec l'observation de Hunter et d'Haworth, selon laquelle, le pore de mitochondries déplétées en nucléotides endogènes est bloqué par l'ajout de NADH mais pas de NADPH [96, 195].

Les sites S et P fonctionnent de manière indépendante puisque l'oxydation du pool nucléotidique augmente toujours la probabilité d'ouverture du pore bien que le glutathion soit maintenu sous forme réduite ou que le site S soit inhibé par le MBM [195, 196]. Et inversement, l'oxydation du site S par le PhAsO conserve son effet lorsque les nucléotides pyridiniques sont maintenus réduits [196]. De plus, l'oxydation des deux pools a un effet additif sur la régulation de la transition de perméabilité puisque le gonflement est alors plus important que lorsque seulement l'un ou l'autre pool est oxydé [195].

II.B.2.5. Le Phosphate inorganique

Dès les premiers travaux concernant le pore de transition de perméabilité, le phosphate inorganique apparaît comme étant un puissant inducteur de son ouverture [95-97, 201]. Cependant, le mécanisme de cette induction reste obscur. Il n'existe aucune indication dans le sens d'une interaction directe du P_i avec un constituant du pore. Il a été proposé que son activité soit due à la diminution d'inhibiteurs endogènes. En effet, le P_i entraîne une baisse de l'ADP mitochondrial [202] et du Mg²⁺ matriciel [180] qui sont deux facteurs inhibiteurs de l'ouverture du pore.

II.B.2.6. Le flux d'électrons à travers le complexe I

Un autre mécanisme de la régulation de la transition de perméabilité mitochondriale implique le complexe I de la chaîne respiratoire. Cette régulation a été mise à jour par l'observation que la sensibilité du pore au calcium est fortement dépendante des substrats utilisés pour énergiser les mitochondries des muscles squelettiques de rat [116]. Ainsi, la probabilité d'ouverture du pore est plus élevée lorsque l'on donne des électrons au complexe I que lorsque l'on fournit des substrats aux complexes II ou IV. Ce flux d'électrons à travers le complexe I régule l'ouverture du PTP de manière indépendante vis à vis du potentiel membranaire, de l'état d'oxydo-réduction des nucléotides pyridiniques, de la production de ROS ou du transport du calcium dans la matrice. Ainsi, lorsque l'on fournit du glutamate, du malate et du pyruvate aux mitochondries, en présence d'un faible taux de calcium, le FCCP induit une dépolarisation membranaire contrairement au cyanure, un inhibiteur du flux d'électrons de la chaîne respiratoire au niveau du complexe IV [116]. La roténone, un inhibiteur direct du complexe I, et la metformine, également inhibiteur du complexe I mais par un mécanisme indéterminé, protègent aussi les mitochondries de l'induction de la transition de perméabilité et de la mort cellulaire [116, 203, 204]. Néanmoins, ce mode de régulation du pore par le flux d'électrons est plus facilement observable dans certains tissus. Ainsi, la roténone seule n'a aucun effet sur le PTP des mitochondries de foie de rat alors que son effet est flagrant sur celui des mitochondries de muscle squelettique [116].

II.B.2.7. Les ubiquinones

L'étude de la régulation du PTP par le flux d'électrons à travers le complexe I a également été à l'origine de la découverte d'une nouvelle classe de régulateurs : les ubiquinones. Il a alors été suggéré que l'ubiquinone 0 inhibe l'ouverture du pore en se fixant sur un des deux sites d'action de l'ubiquinone endogène du complexe I, bloquant ainsi le flux d'électrons [116]. Par la suite, d'autres études tenteront d'élucider le mode d'action de ces ubiquinones.

II.B.2.7.1. Une famille de molécules mais 3 actions différentes

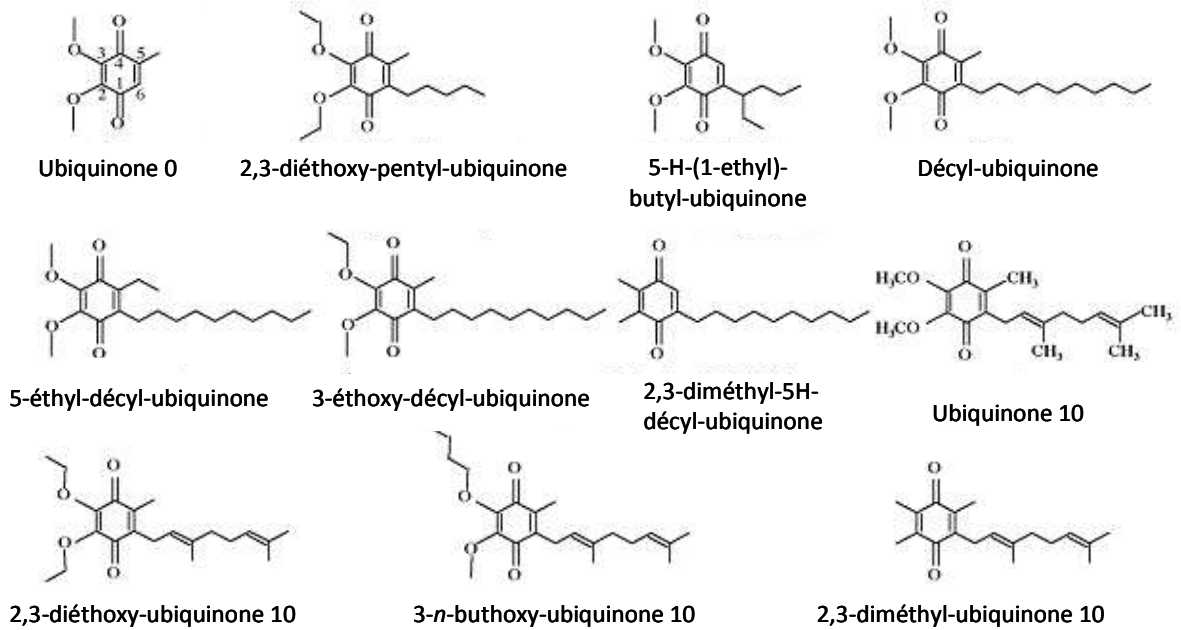
Une étude ciblée sur cette régulation du PTP de mitochondries de foie de rat par sept analogues de l'ubiquinone montrera que l'ubiquinone 0 (Ub_0) et la décyl-ubiquinone (dUb) sont capables d'augmenter très nettement la quantité de calcium nécessaire à l'induction de l'ouverture du pore [205]. Ce résultat sera confirmé par une expérience de patch clamp [206]. Si les cinq autres analogues sont par contre sans effet, l'ubiquinone 0 montre une activité plus importante que celle de la CsA, alors connue pour être l'inhibiteur de référence le plus puissant [205]. Les auteurs relèvent toutefois que l'action dose-dépendante de ces deux quinones varie selon les substrats de la chaîne respiratoire. En effet, l'inhibition de l' Ub_0 sera maximale lorsque l'on fournit des substrats au complexe I. A l'inverse, la dUb et la CsA auront une action optimale lorsque les substrats du complexe II seront utilisés.

Un screening plus poussé de l'activité des quinones sur le PTP des mitochondries de foie de rat montrera que celles-ci ont trois types de régulation. Ceci entraînera la classification des ubiquinones interagissant avec le PTP selon trois groupes [207]. Le groupe I, constitué entre autres de l' Ub_0 , la dUb et l' Ub_{10} , regroupe les ubiquinones qui ont une activité inhibitrice et qui augmentent donc la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore. A l'opposé, le groupe II comprend les quinones ont un effet inducteur du pore et diminuent le calcium nécessaire à l'ouverture du PTP. Enfin, un troisième groupe se détache des deux précédents par son inefficacité à modifier la probabilité d'ouverture du pore bien qu'il interagisse avec le site d'action des quinones des groupes I et II (Figure 8).

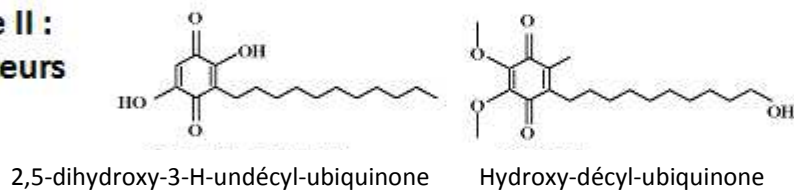
On observe toutefois que les quinones du groupe I ont une action de type biphasique, c'est à dire que leur effet inhibiteur augmente jusqu'à une dose optimale puis diminue aux doses plus élevées. L' Ub_{10} devient même activatrice à partir de 75 μ M.

Malgré le nombre d'analogues de l'ubiquinone testés sur mitochondries isolées de foie de rat, aucune relation entre la structure primaire et la régulation du PTP n'a pu être mise en évidence [205, 207]. De plus, une petite modification peut changer radicalement l'effet d'une quinone sur le pore. Par exemple, la dUb est inhibitrice alors que son analogue, l'hydroxy-décyl-ubiquinone, qui est la même molécule avec un groupe hydroxyl au bout de la chaîne isoprénolique, est activatrice.

Groupe I : Inhibiteurs



Groupe II : Activateurs



Groupe III : Neutres

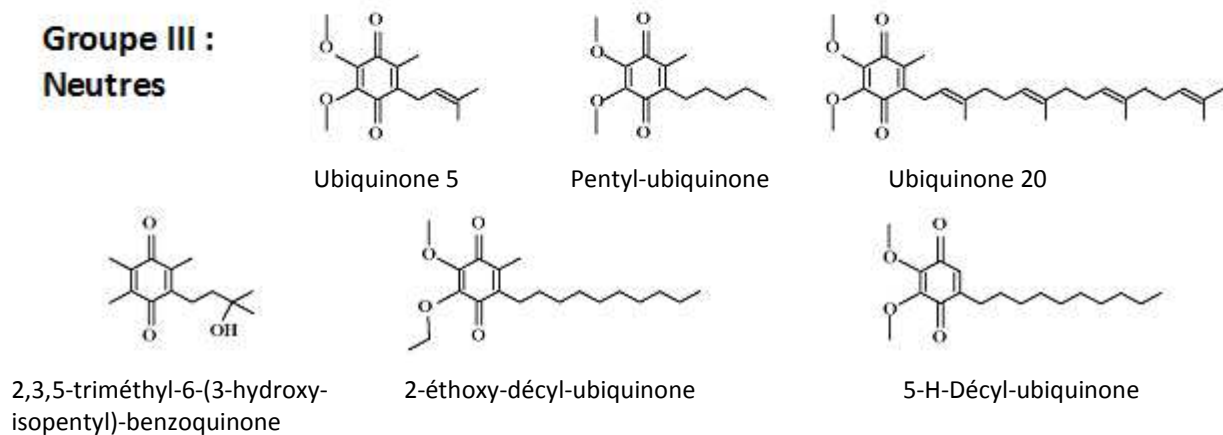


Figure 8 : Structures des ubiquinones régulant le PTP via un site d'action spécifique.

II.B.2.7.2. Une régulation spécifique

Les quinones peuvent être pro ou anti-oxydantes [16, 22] et peuvent modifier la respiration mitochondriale car elles en sont un constituant [208]. Les auteurs ont donc cherché à savoir si ce sont par ces activités que ces molécules jouent le rôle de régulateurs du pore et ainsi si ce sont des régulateurs directs ou non.

Il a été observé que toutes les quinones testées, sauf la dUb, interfèrent avec le flux d'électrons de la chaîne respiratoire des mitochondries découplées [205, 207] et diminuent donc la respiration. Ainsi, chez toutes les quinones inhibitrices diminuent la respiration sauf une qui l'augmente. Il est donc hautement improbable que l'activité des ubiquinones sur le PTP soit liée à une modification de la respiration.

En ce qui concerne la production de ROS, il a été montré que l'Ub₀, l'hydroxy-décyl-ubiquinone et l'Ub₅, des groupes I, II et III respectivement, sont toutes trois anti-oxydantes dans les conditions où elles ont une activité différente sur le PTP [207]. La régulation de la transition de perméabilité par les quinones n'est donc pas liée non plus à une variation du stress oxydant.

De plus, tout comme la CsA, l'Ub₀ et la dUb sont capables d'inhiber l'ouverture du PTP induite par le P_i, le FCCP, l'atractylate et le PhAsO [205] ce qui suggère que leur action s'effectue sur un site en aval des précédents. Cependant, leur action est indépendante de celle médiée par la CsA car l'inhibition du PTP par l'Ub₀ et la dUb peut être levée par l'Ub₅ alors que celle de la CsA non [205]. De plus, l'ubiquinone 0 conserve son effet inhibiteur chez les mitochondries déficientes en CyP-D [121]. Ceci démontre que l'action des ubiquinones n'a pas de lien avec la CyP-D.

II.B.2.7.3. Un site d'action inconnu

La compétition entre les quinones effectrices et neutres laisse entendre qu'elles agissent sur un même site d'action régulateur du PTP spécifique aux quinones [205]. Il est alors proposé deux modèles : un modèle de régulation par 2 sites d'action et un modèle de régulation par un site unique commun à toutes les quinones.

Le modèle à deux sites d'action propose l'existence d'un site inhibiteur et d'un site activateur de l'ouverture du pore. Cette hypothèse a l'avantage d'expliquer pourquoi certaines quinones du groupe I ont un effet biphasique. Ces quinones auraient une plus grande affinité pour le site inhibiteur mais à forte concentration, elles induiraient l'ouverture du pore en activant le second site d'action [207]. Les quinones du groupe III,

quant à elles, se fixeraient sur les deux sites sans les activer mais en déplaçant les autres quinones.

Le modèle au site unique se base l'hypothèse que c'est la structure du ligand qui permet au site d'action d'augmenter ou de diminuer la probabilité d'ouverture du PTP. La capacité de ces molécules à former des micelles dans l'eau selon leur concentration est en faveur de cette hypothèse. En effet, lorsque que la concentration de quinone dépasse la concentration micellaire critique, les molécules s'agglomèrent. La concentration micellaire critique dépend de nombreux facteurs tels que la force ionique, la présence de solvant organique ou encore du statut rédox des quinones [13]. Cette caractéristique pourrait expliquer l'activité biphasique des quinones du groupe I soit par une perte de l'activité de la quinone sous forme de micelle, soit par activation du site activateur par cette forme.

Le site d'action des ubiquinones reste à ce jour inconnu et peu d'études ont cherché à le caractériser. En 2003, des travaux menés à l'aide d'une molécule marquée au tritium, Ro 68-3400, dont l'effet inhibiteur du PTP peut être empêché par l'Ub₅, a permis d'identifier une protéine de 32 kDa comme la cible principale de son action [209]. Cette protéine est alors identifiée comme étant VDAC1. Cependant, trois années plus tard, l'étude de l'activité de Ro 68-3400 et de l'Ub₀ sur des cellules murines déficientes en VDAC1 montrera que ces deux molécules conservent leur action inhibitrice de la transition de perméabilité et interagissent toujours avec une protéine de 32 kDa qui n'est pas une isoforme de VDAC [210].

II.B.2.7.4. Les quinones et la mort cellulaire

La régulation du pore est intimement liée à la mort cellulaire comme nous le verrons plus loin. Toutefois, nous n'avons trouvé que peu d'études sur la mort cellulaire induite ou prévenue par les analogues de l'ubiquinone et médiée par le pore de transition de perméabilité mitochondrial.

Depuis longtemps, la toxicité des ubiquinones est connue pour être le fait de deux mécanismes qui sont l'arylation, c'est-à-dire la fixation d'un cycle aromatique, de résidus thiols ou aminés et la production de ROS par leur activité oxydante [211, 212]. Quant à leur effet protecteur de la mort cellulaire, il a toujours été considéré comme dû à leur capacité anti-oxydante [213, 214]. La découverte que ces molécules régulent la transition de perméabilité mitochondriale permet de jeter un regard nouveau sur leur rôle dans la mort cellulaire.

Il a été montré que la Coenzyme Q10 protège de la toxicité induite par l' H_2O_2 [215]. Le mécanisme de cette protection résulte de plusieurs observations. Tout d'abord, la CoQ10 empêche la dépolarisation de la membrane interne mitochondriale qui a lieu lors d'un traitement par de l' H_2O_2 . Ensuite, elle prévient le relargage du cytochrome *c* médié par Bax. Or Bax est surexprimée après un stress oxydant sauf si les cellules sont pré-traitées avec du CoQ10. Les auteurs en déduisent que cette quinone inhibe le PTP par interférence entre Bax et le pore.

Une autre étude confirme le rôle protecteur du CoQ10 qui empêche l'apoptose induite par les radicaux libres mais aussi par d'autres stress non générateurs de radicaux libres chez les kératocytes de lapins à l'opposé de la vitamine E [216]. Cette protection provient d'une part de l'action « piègeur de radicaux libres » de la CoQ10, et d'autre part de l'inhibition de la dépolarisation membranaire mitochondriale.

Cependant, une autre étude propose un mécanisme d'action différent [217]. Des expériences menées sur des cellules HL60, permettent d'observer que dans certaines conditions, le complexe III génère suffisamment de ROS pour induire la transition de perméabilité mitochondriale. Or la dUb est capable de piéger ces ROS, mais pas d'inhiber l'activité du complexe III, et empêche l'ouverture du PTP. A l'opposé, l'Ub₀ est incapable de piéger les ROS et ne peut empêcher l'ouverture du pore. Elle a même une activité cytotoxique. Les auteurs proposent donc que la régulation du pore par la dUb est due à son effet anti-oxydant. Toutefois, cette hypothèse, uniquement basée sur la production des radicaux libres, n'explique en rien l'inhibition de l'ouverture du pore par les ubiquinones du groupe I sur de nombreux autres inducteurs sans effet pro-oxydant.

II.B.3. Fonctions physiologiques du PTP

Une des grandes difficultés pour laquelle l'existence du PTP a longtemps été remise en cause est qu'il semblait inconcevable, pour une grande partie de la communauté scientifique, qu'un canal apparemment capable de seulement détruire l'homéostasie mitochondriale *in vitro* puisse représenter un phénomène physiologique. Or deux caractéristiques du PTP nous montrent que le fonctionnement de ce pore ne se limite pas à une configuration ouverte ou fermée.

Premièrement, des observations effectuées sur cellules intactes marquées par de la calcéine et du cobalt montrent des fluctuations permanentes entre des stades d'ouverture et de fermeture du pore qui peuvent être inhibées par la CsA [218]. L'ouverture du PTP n'est donc pas forcément irrémédiable et dans son fonctionnement *in cellulo*, le pore fonctionne par ouvertures transitoires.

Deuxièmement, différentes conformations d'ouverture du pore sont observables sur les organites intacts [219]. Il a été observé une configuration à faible conductance, perméable aux molécules de moins de 300 Da et aux ions tels que les protons, le Ca^{2+} ou le K^+ , qui n'entraîne pas de gonflement mitochondrial malgré une dépolarisation transitoire de la membrane interne. Cette configuration est principalement contrôlée par le pH matriciel dépendant de l'afflux calcique [193]. La seconde configuration, à haute conductance, est celle caractérisée par la série de travaux d'Hunter et Haworth [94-97].

Ainsi, ces différentes caractéristiques de l'ouverture du PTP permettent d'expliquer les différents rôles physiologiques du phénomène que sont l'homéostasie calcique et la mort cellulaire.

II.B.3.1. Homéostasie mitochondriale et signalisation

Le relargage intracellulaire de Ca^{2+} est le point de convergence de nombreux signaux cellulaires. Ces signaux contrôlent divers processus allant de la sécrétion d'hormones à la division cellulaire, en passant par la régulation du rythme cardiaque [220]. L'accumulation et le relargage du Ca^{2+} étant au cœur de la transition de perméabilité, Hunter et Haworth avaient déjà proposé que le PTP participe à l'homéostasie calcique [95, 104].

Une part du signal transmis par l'ion Ca^{2+} est codée par ses oscillations de concentrations intracellulaires [221, 222] dont le phénomène de CICR (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release) [223]. Il a été montré que, dans certaines conditions d'incubation, des ajouts faibles et fréquents de calcium provoquent une sortie transitoire du calcium matriciel immédiatement suivie d'un retour du calcium dans la mitochondrie [223]. Cette perméabilité ionique est non spécifique et concerne aussi le H^+ et le K^+ . Elle est aussi inhibée par l'ADP et la CsA ce qui implique le PTP dans le mécanisme de CIRC [219, 223]. La rentrée immédiate du calcium et la repolarisation membranaire indiquent que l'ouverture du PTP est transitoire dans ces conditions [219]. Au cours de cette augmentation de la perméabilité

transitoire, les auteurs observent que les mitochondries ne gonflent pas, mais au contraire, se contractent. En effet, la mitochondrie ne devient pas perméable au sucrose de plus de 350 Da lors de la CICR [219]. La CIRC mitochondriale est donc bien un phénomène faisant intervenir une ouverture transitoire du PTP dans une conformation de faible conductance.

Ainsi, le calcium est un messenger capable de s'auto-amplifier par l'induction de l'ouverture du pore. Cela de manière différente selon la nature du signal qu'il transmet à la mitochondrie, c'est-à-dire selon la fréquence et l'amplitude des augmentations du calcium cytosolique [223]. Le calcium relargué est stocké par les mitochondries voisines qui subissent à leur tour une transition de perméabilité à faible conductance. Ceci donne lieu à des oscillations du calcium intracellulaire, sous formes de vagues se propageant d'une mitochondrie à l'autre [219, 222, 224, 225], prenant place dans un système de signalisation cellulaire. Toutefois, dans ces conditions, il semble que l'ouverture transitoire du PTP soit le fait de modifications du pH matriciel plutôt que de l'action du Ca^{2+} sur le site activateur du pore. Effectivement, les auteurs ne trouvent pas de corrélation entre la concentration calcique matricielle et l'ouverture du PTP à l'inverse du pH [219]. Les auteurs proposent donc la séquence suivante : le calcium entre dans la matrice et pour compenser ce surplus en charges positives, la chaîne respiratoire expulse des protons dans l'espace intermembranaire. L'alcalinisation de la matrice induit l'ouverture du pore sous sa forme de faible conductance. Cette ouverture du pore cause un effondrement du potentiel membranaire avec une sortie de calcium qui ira activer les mitochondries voisines et le retour de protons dans la matrice. L'acidification de la matrice ferme alors le PTP et la chaîne respiratoire reconstitue le gradient de protons et le potentiel membranaire.

De plus, la co-localisation des mitochondries et des réticulums endoplasmiques, le principal organite de stockage du calcium dans la cellule, a été mise en évidence [226, 227]. Les mitochondries étroitement associées avec le réticulum endoplasmique permettraient la propagation du signal calcique suite à la libération primaire du calcium par le réticulum. Cette hypothèse est renforcée par le fait qu'une déplétion en calcium du réticulum empêche la dépolarisation transitoire des mitochondries [225, 228]. Enfin, l'ouverture du pore mitochondrial par de l'atractyloside entraîne une augmentation directe du calcium dans le réticulum endoplasmique [229].

Ces données suggèrent que le PTP permet aux mitochondries, par leur étroite collaboration avec les réticulums, de jouer un rôle dans l'homéostasie calcique et la signalisation cellulaire qui en découle. Cependant, au vu de l'importance d'une telle signalisation, la perturbation du fonctionnement du PTP devrait avoir des répercussions sur un organisme vivant. Or, aucun trouble particulier n'a été observé chez les souris déficientes en CyP-D [121].

II.B.3.2. Mort Cellulaire

L'implication de la transition de perméabilité mitochondriale dans la mort cellulaire a été proposée en 1988 par l'observation que son ouverture est induite par le calcium, le phosphate inorganique et le stress oxydant. Or ces trois facteurs sont reconnus comme étant les facteurs majeurs des dommages induits après une ischémie suivie d'une reperfusion [230]. Par la suite, d'autres travaux montreront que le PTP est impliqué dans de nombreuses conditions induisant la mort des cellules [231-233] et que ses inhibiteurs, notamment la ciclosporine A et l'acide bongkrélique, protègent les cellules *in vitro* et *in vivo* [234-237]. Inversement, les inducteurs du PTP, comme l'atractyloside, induisent la mort cellulaire.

Toutefois, ces résultats sont encore controversés car il a été rapporté que la CsA ne protège pas de l'apoptose dans certaines conditions [238]. De plus, la CsA peut agir sur d'autres cibles cellulaires à la dose généralement utilisée, son effet protecteur n'est donc pas obligatoirement à mettre sur le compte de son action inhibitrice du PTP. Cependant, l'utilisation d'analogues structurels sans effet sur le PTP ne protège pas de la mort cellulaire induite par des mécanismes sensibles à la CsA [239-242]. De même, l'inefficacité de la CsA dans certains cas n'indique pas forcément que la mort cellulaire observée est indépendante du PTP puisque certains effecteurs puissants peuvent passer outre l'inhibition de la CsA [244]. De plus, tous les tissus ne présentent pas la même sensibilité à cette molécule [244].

D'autres études ne trouvent pas de dépendance entre la transition de perméabilité et l'apoptose induite par Bax et Bid [245-248], ou encore que le relargage du cytochrome *c* induit par Bax n'est pas inhibé par l'acide bongkrélique ni la CsA [249]. Le gonflement mitochondrial n'est pas non plus observé à chaque apoptose [250] et parfois, la transition de perméabilité mitochondriale apparaît seulement après le relargage du cytochrome *c* et l'activation des caspases. Selon certains auteurs, l'ouverture du PTP serait donc plus une conséquence qu'une cause de l'apoptose [251-254]. Ainsi, la transition de perméabilité

servirait à amplifier le signal de mort cellulaire en permettant un relargage complet du cytochrome *c* par exemple.

Cependant, les détracteurs de la transition de perméabilité en tant qu'inducteur de la mort cellulaire se placent dans l'optique où celui-ci serait l'unique mécanisme. Or il est probable qu'il ne soit qu'un des mécanismes inducteurs parmi d'autres. Alors que la co-existence de la transition de perméabilité mitochondriale et de la mort cellulaire médiée par les protéines de la famille Bcl-2, voire la coordination entre les deux, permet d'expliquer pourquoi certains inhibiteurs sont inefficaces selon la signalisation de mort cellulaire.

Enfin, une étude récente menée sur des souris déficientes en CyP-D montre clairement que la transition de perméabilité est liée à la mort cellulaire puisque les mitochondries sont alors protégées de la mort cellulaire induite par le calcium et le stress oxydant [149]. Si la participation du PTP dans la mort cellulaire est donc aujourd'hui bien admise, les auteurs ne s'accordent pas tous pour dire si cette mort est de type apoptotique ou de type nécrotique. En effet, si sur le papier il est facile de faire la distinction entre l'apoptose et la nécrose, lors d'une observation expérimentale cela devient plus délicat de par la nature non linéaire des événements conduisant à un type ou l'autre de mort [238], surtout que ces deux voies peuvent coexister [255, 256].

II.B.3.2.1. Apoptose

Il a été observé que de nombreux signaux de mort cellulaire programmée entraînent un effondrement du potentiel membranaire mitochondrial précédant tout autre signe morphologique [257]. Il semblerait même que cet effondrement du potentiel soit un meilleur facteur prédictif de l'apoptose que l'activation des caspases. En effet, il a été montré que l'activation des caspases ne conduit pas à la mort cellulaire si le potentiel membranaire reste intact [258, 259]. De plus, certains régulateurs de l'apoptose de la famille Bcl-2 modulent le PTP. Bax peut aussi conduire à une dépolarisation membranaire sensible à la CsA [168, 261, 262]. Il est toutefois possible que le PTP ne soit pas le seul facteur impliqué dans la dépolarisation de la membrane interne [260].

Enfin, les inducteurs majeurs de la transition de perméabilité mitochondriale que sont les ROS et le calcium sont des stimuli générés par de nombreux signaux de mort cellulaire [257].

La perméabilisation de la membrane externe mitochondriale est l'évènement central conduisant à la mort cellulaire par relargage des protéines pro-apoptotiques dans le cytosol. L'ouverture du PTP conduit à ce relargage, notamment du cytochrome *c* [263-266], mais là encore, le mécanisme de cette perméabilisation de la membrane externe n'est pas clair et deux hypothèses expliquant ce phénomène s'opposent.

La première est que la membrane externe subit une rupture mécanique lors du gonflement mitochondrial induit par l'ouverture du pore. Lorsque la transition de perméabilité est induite à haute conductance, une soudaine augmentation de la membrane interne aux solutés d'un poids inférieur à 1500 Da apparaît, ce qui a des répercussions catastrophiques pour l'organite. Tout d'abord le potentiel membranaire s'effondre et empêche la mitochondrie de synthétiser de l'ATP. Ce blocage du flux d'électrons à travers la chaîne respiratoire conduit à la production de ROS via le transfert direct des électrons à l'oxygène. Enfin, la haute concentration en molécules osmotiquement actives de la matrice génère une pression osmotique élevée qui crée un afflux de molécules d'eau et l'expansion de la membrane interne. Celle-ci ayant une surface bien plus élevée que la membrane externe par ses nombreuses crêtes, elle entraîne la rupture mécanique de cette dernière. Les protéines pro-apoptotiques confinées normalement dans l'espace intermembranaire sont alors relarguées dans le cytosol et induisent l'apoptose. Cependant, certaines expériences montrent que le relargage du cytochrome *c* sensible à la CsA peut avoir lieu sans l'apparition du gonflement mitochondrial [267, 268].

L'autre alternative, expliquant le relargage des protéines pro-apoptotiques a été proposée récemment par Ichas et al. [267]. Elle combine la transition de perméabilité et l'action de Bax sur la membrane externe mitochondriale. En effet, ils observent, *in situ*, que les mitochondries ne gonflent pas lorsque le PTP s'ouvre, bien que cette ouverture entraîne la mort de la cellule avec libération du cytochrome *c*. La libération des protéines pro-apoptotiques ne peut donc pas provenir de la rupture de la membrane externe. En revanche, après l'ouverture du pore, les protéines cytosoliques Bax se redistribuent sur la membrane externe et y forment des agrégats. C'est alors que le cytochrome *c* sort dans le cytosol. L'ouverture du pore dans les cellules vivantes servirait en fait de coordinateur de la redistribution des protéines pro-apoptotiques. Ils proposent que la dépolarisation membranaire induite par la transition de perméabilité attire les protéines Bax sur la membrane externe et permet leur oligomérisation en canal qui laisse sortir le cytochrome *c* de la mitochondrie [267].

II.B.3.2.2. Nécrose

Lors de la nécrose, les mitochondries gonflent et sont découplées, ce qui est un point en faveur d'un pore induisant la nécrose [114, 269, 270]. Et de nombreux facteurs induisant la nécrose ont montré une implication de la transition de perméabilité avec perte du potentiel membranaire dans ce mécanisme [271].

Des cas de nécrose ont aussi été observés lors de l'ouverture du PTP notamment dans des études sur les dommages infligés par l'ischémie/reperfusion sur le cœur [230]. En effet, lors de l'ischémie, ce n'est pas le manque d'oxygène qui conduit à la mort des cellules mais c'est le stress oxydant généré par la réoxygénation des tissus. Il semblerait que l'ischémie induise des changements au sein de la cellule dont une diminution de l'ATP, une augmentation du phosphate inorganique et du calcium cytosolique. La disparité entre la forte concentration en substrats énergétiques de la chaîne respiratoire et la faible concentration en ATP mitochondrial conduit alors à la production de ROS lors de la reperfusion [114, 272]. Le cercle vicieux commence alors, car dans ces conditions, le PTP s'ouvre et conduit à l'augmentation de calcium et de ROS... La CsA peut réduire ce phénomène et protège des effets de l'ischémie/reperfusion [114].

On retrouve un autre exemple de l'implication du pore dans la nécrose d'astrocytes [228]. Dans ce modèle, le rayonnement photoluminescent induit la production de ROS qui active la libération de calcium par le réticulum endoplasmique. Ces deux facteurs provoquent l'ouverture du PTP avec libération de calcium et production de ROS, et finalement, la mort par nécrose des astrocytes.

Enfin, en faveur d'une transition de perméabilité induisant la nécrose mais non l'apoptose, deux expériences menées sur des cellules déplétées en CyP-D, montrent que l'absence de cette protéine ne protège pas de la mort cellulaire induite par Bax, Bid et le TNF_{α} alors qu'elle procure une résistance à des stimuli pro-nécrotiques [149, 150]. Néanmoins, il est possible que ces facteurs induisent l'apoptose de manière PTP indépendante.

La transition de perméabilité mitochondriale est un mécanisme qui semble être au carrefour de la mort cellulaire en général, qu'elle soit apoptotique ou nécrotique. Il semblerait que les conditions énergétiques de la cellule favorisent l'une ou l'autre de ces morts. Ainsi, lorsque le taux d'ATP est élevé, l'ouverture du pore induirait l'apoptose et à l'inverse, un taux faible entraînerait la nécrose [273]. Dans ce cas, il est toutefois surprenant, étant donné que la transition de perméabilité provoque l'effondrement du potentiel

membranaire et l'hydrolyse de l'ATP, que la nécrose ne soit pas favorisée. Ceci est en faveur d'un modèle où l'apoptose est provoquée par une ouverture transitoire du pore qui permet le maintien d'un niveau d'ATP suffisant pour l'apoptose. D'autres auteurs proposent que ce soit plutôt l'intensité du stress infligé et la durée de l'ouverture du pore qui détermine le mode de mort cellulaire. Cette proposition est en accord avec l'observation que ce sont les cellules entourant un infarctus du myocarde, qui subissent les dommages les moins sévères et les plus courts, qui deviennent apoptotiques, alors que les cellules plus touchées meurent par nécrose [274].

III. La transition de perméabilité et le cancer

De nombreuses étapes de la cancérogénèse devraient entraîner l'apoptose, en conditions physiologiques, telles que l'activation des oncogènes, la perte des contacts cellules-cellules au cours de la métastase ou encore l'environnement hypoxique [275]. Or les cellules cancéreuses possèdent une résistance à ces signaux de mort cellulaire. Ainsi, de multiples traitements anti-cancéreux tentent d'agir en rétablissant cette apoptose.

Le PTP est au cœur de nombreux signaux de mort cellulaire et sa sur-inhibition pourrait donc être un des mécanismes de la résistance des cellules tumorales comme le montrent de récentes études [276].

En effet, il a été observé que le PTP est impliqué lors de l'anoikis qui est un type d'apoptose suivant la perte de contact de la cellule avec la matrice extracellulaire [277]. Or ce détachement est nécessaire à la dissémination des métastases. Il est également connu que les cellules tumorales sont plus résistantes à la perméabilisation de la membrane externe permettant le relargage du cytochrome *c* [278]. On alors peut se demander si le PTP n'est pas responsable de cette résistance. Enfin, il a été montré que les cellules cancéreuses résistantes aux chimiothérapies relarguent moins de calcium après un stimulus apoptotique et sont plus résistantes aux stimuli médiés par cet ion [279]. Ce qui pourrait laisser à penser que le PTP joue encore un rôle dans ce cas.

Ces observations sont appuyées par le fait que plusieurs constituants du PTP sont modifiés, par leur expression ou par mutation, dans les cellules tumorales dont voici quelques exemples.

L'hexokinase, qui inhibe le PTP par liaison, est hautement surexprimée dans de nombreux cancers [144]. Cette surexpression explique également l'augmentation de la glycolyse observée chez les cellules cancéreuses et appelée "effet Warburg". Il en va de même pour la Créatine Kinase et le Récepteur Périphérique des Benzodiazépines qui sont surexprimés dans certains cancers [149, 280]. Il a aussi été observé que Bax est fréquemment mutée dans les cellules tumorales [281].

Tous ces points sont des indices qui laissent envisager que le PTP a un rôle dans la physiopathologie cancéreuse. Il pourrait donc bien être la cible de divers agents anticancéreux présents ou futurs.

L'objectif de ce travail a été, dans un premier temps, d'étudier la régulation du PTP par les analogues de l'ubiquinone dans des lignées hépatocytaires cancéreuses et immortalisées. Puis d'en évaluer les conséquences sur la toxicité induite par les ubiquinones.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel

I.A. Culture cellulaire

Afin de définir si les observations faites sont spécifiques d'un organisme ou d'un état de transformation général (cancéreux ou immortalisé), nos études ont été réalisées sur des lignées cellulaires de même origine tissulaire (Tableau I).

| Lignée | Espèce | Type cellulaire | Phénotype |
|---------|--------------------------|----------------------|-----------|
| Clone 9 | <i>Rattus norvegicus</i> | Epithélium hépatique | Normal |
| MH1C1 | <i>Rattus norvegicus</i> | Epithélium hépatique | Hépatome |
| THLE-3 | <i>Homo sapiens</i> | Epithélium hépatique | Normal |
| HepG2 | <i>Homo sapiens</i> | Epithélium hépatique | Carcinome |

Tableau I : Lignées cellulaires utilisées au cours de nos travaux.

I.A.1. Conditions de culture

Toutes les manipulations de culture cellulaire ont été réalisées en conditions stériles sous une hotte aspirante à flux laminaire vertical. Les milieux de culture ainsi que tous les produits à ajouter ont été préalablement chauffés à 37°C au bain-marie pour éviter tout stress cellulaire lorsque les cellules sont mises en contact avec les milieux. Les cellules en culture sont ensuite placées dans une étuve contenant une atmosphère ambiante humidifiée, enrichie à 5% de CO₂ et à une température stable de 37°C. Les cellules ont été maintenues en phase de croissance exponentielle par division selon leur vitesse de croissance.

Les lignées cellulaires ont été cultivées dans des milieux spécifiques conseillés par l'ATCC (American Type Culture Collection).

Les lignées HepG2 et Clone 9 ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 50 UI/ml de pénicilline, 50 µg/ml de streptomycine, 1% d'un mélange d'acides aminés non essentiels et 1 mM de pyruvate de sodium. Une matrice de collagène de type I a été ajoutée à la surface des boîtes servant à la culture de la lignée HepG2. Pour cela, les boîtes de culture ont été traitées avec 10

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de collagène I dissous dans de l'acide acétique à 0,1 N puis placées à 37°C pendant 30 minutes. A l'issue de l'incubation, les boîtes sont rincées trois fois avec du tampon PBS (10 mM de Na_2HPO_4 , 137 mM de NaCl, 3 mM de KCl, pH 7,4) puis ensemencées.

La lignée MH1C1 a été cultivée dans du milieu Hams's F12K supplémenté avec 15% de sérum de cheval, 2,5% de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine, 50 UI/ml de pénicilline, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de streptomycine, 1% d'un mélange d'acides aminés non essentiels et 1 mM de pyruvate de sodium.

La lignée THLE-3 a été cultivée dans du milieu BEGM supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal, 5 ng/ml d'EGF, 70 ng/ml de phosphoéthanolamine, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de BPE (Extrait Pituitaire de Bœuf), 500 ng/ml d'hydrocortisone, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de transferrine, 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'insuline, 0,1 ng/ml d'acide rétinoïque et 6,5 ng/ml de triiodothyronine.

I.A.2. Prélèvement des cellules

Pour l'entretien régulier des lignées et le maintien d'une croissance exponentielle, les cellules doivent être prélevées et partagées dans de nouvelles boîtes de culture.

Toutes les lignées sur lesquelles nos travaux ont porté sont des cellules adhérentes. Pour les prélever, le milieu des boîtes est éliminé et la culture est rincée avec du PBS. Ensuite, un mélange de trypsine-EDTA 1X est ajouté. La trypsine est une enzyme de type protéase provoquant la digestion partielle des protéines matricielles extracellulaires permettant l'adhésion des cellules à la surface de la boîte. L'EDTA, quant à lui, est un chélateur du Ca^{2+} nécessaire au maintien des jonctions desmosomiques entre les cellules. Ainsi l'emploi cumulé de la trypsine et de l'EDTA permet le détachement des cellules de leur support et leur individualisation. La suspension cellulaire est alors recueillie avec du PBS et centrifugée pendant 5 minutes à 100 g. Le culot cellulaire est alors repris dans du milieu complet puis remis en culture ou repris dans un tampon en vue de son utilisation.

I.B. Prélèvement des mitochondries

La procédure d'isolement des mitochondries de foie de rat repose sur une technique de fractionnement des composés cellulaires par centrifugation différentielle. Les rats sont assommés puis sacrifiés par rupture des cervicales (l'anesthésie modifiant les propriétés des mitochondries). Après une laparotomie médiane, le foie est immédiatement excisé et refroidi par immersion dans du tampon d'homogénéisation à 4°C et à pH 7,4 contenant 250 mM de saccharose, 10 mM de Tris-HCl et 0,1 mM d'EGTA. Le foie est alors découpé en petits morceaux qui sont rincés abondamment avec le même tampon froid pour éliminer un maximum d'hématies. Répartis en deux fractions égales, ces morceaux sont homogénéisés à l'aide d'un potter. L'homogénat subit alors une série de trois centrifugations à 4°C. La première centrifugation de 10 min à 700 g permet d'éliminer le culot contenant les gros débris cellulaires, les noyaux et les cellules intactes. Le surnageant, lui, est récupéré et centrifugé 10 min à 7000 g. Le culot mitochondrial obtenu est resuspendu dans du tampon d'homogénéisation afin de rincer les mitochondries. La suspension est de nouveau centrifugée 10 min à 7000 g. Finalement, le culot mitochondrial est resuspendu dans un minimum de tampon d'homogénéisation (environ 1 ml) et conservé à 4°C.

L'appréciation de la concentration de la suspension mitochondriale se fait en mg de protéines et est obtenue par le dosage quantitatif des protéines présentes dans la suspension selon la méthode du biuret reposant sur la complexification du sulfate de cuivre avec les protéines. Pour cela, 25 µl de la suspension mitochondriale sont solubilisés dans 200 µl de cholate de sodium à 4%. Après 10 minutes, cet échantillon, additionné de soude à 10% (qsp 3 ml) et de 300 µl de sulfate de cuivre à 1% est incubé pendant 15 minutes à température ambiante. La quantité de protéines contenues dans l'échantillon est déterminée par densité optique à 540 nm à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée avec des quantités connues d'albumine. La détermination de la concentration de la suspension de mitochondries est effectuée au début de chaque manipulation afin d'utiliser une quantité connue de mitochondries.

I.C. Les ubiquinones

Les ubiquinones que nous avons utilisées au cours de nos travaux proviennent de lots en poudre (Sigma). Etant donné leur forte liposolubilité, ces quinones ont été diluées dans un solvant, le DMSO, afin former des solutions aqueuses à 10 ou 100 mM selon les besoins.

Outre la capacité à solubiliser les quinones, ce solvant polaire permet d'augmenter la concentration micellaire critique des ubiquinones comme cela a été démontré précédemment par Ludivine Walter. En effet, de fait de leur forte liposolubilité, les ubiquinones ont tendance à former des micelles à forte concentration. La concentration micellaire critique est la concentration pour laquelle les premières micelles apparaissent.

II. Méthodes

II.A. Mesure de la capacité de rétention calcique

II.A.1. Perméabilisation des cellules

L'utilisation de cellules entières pour une étude de paramètres mitochondriaux comme la capacité de rétention calcique nécessite une étape de perméabilisation. En effet, l'entrée de calcium dans les cellules intactes est un processus hautement régulé qui ne permet le passage que de petites quantités de Ca^{2+} . De même, certains composés utilisés comme substrat (succinate) ou modulateur de l'activité respiratoire (ADP) sont incapables de franchir la membrane plasmique. Aussi, pour avoir accès aux mitochondries, les cellules sont perméabilisées à l'aide d'un détergent : la digitonine. Cette substance possède la propriété de se complexer avec le cholestérol et d'entraîner sa précipitation. Or la membrane plasmique est bien plus riche en cholestérol que la membrane mitochondriale. Ainsi, l'ajout de faibles concentrations de digitonine (50 $\mu\text{g/ml}$) à nos milieux d'incubation, nous permettent d'altérer la membrane plasmique tout en préservant la membrane mitochondriale. Lors d'études précédentes, la perméabilisation des cellules par cette méthode a été mise en évidence par la perte de l'exclusion du bleu trypan ou par la sortie d'une enzyme cytosolique, la lactate

déshydrogénase (LDH) dans le milieu extracellulaire. L'intégrité des mitochondries a aussi été vérifiée par l'absence de stimulation de la respiration en présence de cytochrome *c*. Ainsi pour une concentration de 50 µg/ml de digitonine, le bleu de trypan colore la totalité des cellules et l'addition de cytochrome *c* ne stimule pas la respiration.

II.A.2. Mesure de la capacité de rétention calcique

La capacité de rétention calcique représente la quantité de calcium nécessaire pour provoquer l'ouverture du PTP. Cette mesure permet d'obtenir, dans différentes conditions, la réponse du PTP à son inducteur le plus puissant : le calcium. En pratique, le calcium est ajouté à la suspension cellulaire ou mitochondriale à dose et temps fixes. Le nombre d'ajouts de calcium nécessaires pour déclencher la transition de perméabilité mitochondriale permet d'obtenir la capacité de rétention calcique. Cette méthode d'additions successives de calcium est particulièrement appropriée pour mesurer et quantifier l'action de composés susceptibles de favoriser ou au contraire d'inhiber l'ouverture du PTP. Ainsi, une molécule inhibitrice augmente la quantité de calcium nécessaire à l'ouverture du pore alors qu'une molécule inductrice diminue cette quantité. L'ouverture du pore a pour conséquences : une dépolarisation mitochondriale, un gonflement mitochondrial (dans nos conditions d'incubations en milieu sucrose), une oxydation complète du NADH+H⁺ et un équilibre entre le contenu de la matrice et du milieu extracellulaire de tous les composés de poids moléculaire inférieur à 1500 Da y compris le calcium accumulé dans la matrice. C'est cette sortie du calcium matriciel qui nous permet de déterminer la capacité de rétention calcique.

Sur cellules perméabilisées, seul le relargage du calcium et l'oxydation du NADH+H⁺ peuvent être observés avec suffisamment de sensibilité. La concentration calcique extra-mitochondriale est suivie grâce à une sonde fluorescente, le Calcium-Green ($\lambda_{\text{excitation}} = 506 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 527 \text{ nm}$), qui ne s'accumule pas dans les membranes et ne diffuse pas au travers d'elles, et dont la fluorescence est accrue par la présence de calcium. Le niveau d'oxydo-réduction du couple NADH+H⁺/NAD⁺ est accessible directement grâce à une propriété intrinsèque du NADH+H⁺. Le noyau pyridinique réduit est en effet capable de subir une transition électronique à des longueurs d'ondes utilisables ($\lambda_{\text{excitation}} = 345 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 455 \text{ nm}$) ce qui fait du NADH+H⁺ un chromophore naturel dont la fluorescence décroît lors de son oxydation. Nous avons utilisé la sonde

Calcium-Green pour toutes nos mesures de la capacité de rétention calcique dans ces travaux.

En pratique, les cellules sont prélevées, rincées et comptées, puis resuspendues à une concentration de 10^7 cellules/ml dans du tampon de rétention calcique à pH 7,4 contenant 250 mM de saccharose, 1 mM de P_i -Tris et 10 mM de Tris-MOPS et dont le calcium a été retiré par contact avec 5 g de Chelex, une résine chélatrice, pour 100 ml de tampon, sous agitation à 4°C pendant 24 heures. La suspension cellulaire est ensuite conservée dans la glace.

Les capacités de rétention calcique ont été mesurées à 25°C avec un spectrofluorimètre dans un volume final de 2 ml. Les cellules ont été perméabilisées immédiatement avant leur utilisation en les incubant pendant deux minutes à 25°C et sous agitation en présence de 50 µg/ml de digitonine dans du tampon de rétention calcique. La concentration finale en cellules est de 2,5 millions de cellules par ml pour les lignées Clone 9, MH1C1 et HepG2 et de 1,5 millions de cellules par ml pour la lignée THLE-3. La concentration extramitochondriale de Ca^{2+} libre est mesurée grâce à la présence de 1 µM de Calcium-Green. Les cellules ont été énergisées soit avec 5 mM de succinate-Tris en absence ou en présence de 1 µM. Par la suite, des additions successives de 7,5 µM de Ca^{2+} ont été réalisées toutes les 90 secondes jusqu'à obtenir une ouverture du PTP.

Pour les mitochondries isolées, la digitonine a été omise et les mitochondries ont été énergisées avec 5 mM de succinate. Des pulses de 25 µM de Ca^{2+} ont été ajoutés toutes les minutes.

II.B. Etude de la mort cellulaire

Nous avons étudié la mortalité cellulaire induite par les analogues des ubiquinones par diverses méthodes. Les conditions de préparation et de prélèvement des échantillons ont varié selon les techniques d'évaluation et les cultures que nous avons utilisées.

II.B.1. Préparation des échantillons

Toutes nos études de la mortalité cellulaire induite par les analogues de l'ubiquinone ont été réalisées sur des plaques 6 puits.

II.B.1.1. Cultures simples

Pour les cultures simples contenant une lignée unique, les cellules ont étéensemencées de façon à atteindre environ 3.10^5 cellules 48 heures plus tard lors du traitement.

II.B.1.2. Co-cultures et marquage membranaire

L'étude de la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures de cellules Clone 9 et MH1C1 a nécessité un marquage préalable des cellules Clone 9. Pour cela, nous avons utilisé un marqueur membranaire fluorescent : le PKH26 (PKH26 Fluorescent Linker Kit, Sigma). Cette sonde se fixe irréversiblement dans la membrane plasmique des cellules et se transmet de cellule mère à cellule fille. Sa longueur d'onde d'excitation maximale est de 551 nm et sa longueur d'onde d'émission maximale est de 567 nm.

Les cellules Clone 9 ont été prélevées comme décrit dans le chapitre concernant la culture puis comptées sur cellules de Malassez et centrifugées à 100 g pendant 10 minutes. Deux millions de cellules sont alors prélevées puis rincées avec du PBS et centrifugées à nouveau 10 minutes à 100 g. Le culot cellulaire est alors remis en suspension dans 1 ml de diluent C (PKH26 Fluorescent Linker Kit, Sigma). La suspension cellulaire est ensuite diluée dans un 1 ml de diluent C contenant 2.10^{-6} à 2.10^{-5} M de sonde PKH26. Le volume total est mélangé 3 minutes à température ambiante puis additionné de 2 ml de sérum de veau fœtal pour stopper la réaction de marquage. Après un mélange d'une minute à température ambiante, 4 ml du milieu de culture complet à base de DMEM sont ajoutés. La solution est alors centrifugée 10 minutes à 100 g. Le culot cellulaire est ensuite récupéré et rincé à trois reprises par centrifugation dans 10 ml de PBS. Le culot cellulaire est alors remis en suspension dans 10 ml de milieu de culture complet puis les cellules sont comptées etensemencées selon les besoins.

Pour les observations au microscope confocal, comme les cellules MH1C1 croissent plus lentement que les cellules Clone 9, 4.10^4 cellules Clone 9 et 6.10^4 cellules MH1C1 ont étéensemencées par puit dans lesquelles des lamelles de verre stérilisées avaient été préalablement déposées.

Pour l'évaluation de la mortalité par cytométrie, ce sont 7.10^4 et 1.10^5 cellules Clone 9 et MH1C1, respectivement, qui ont étéensemencées dans chaque puit. Les quantités de cellules déposées sont supérieures dans cette méthode car il n'est pas nécessaire que les cellules aient une faible confluence comme pour une observation microscopique.

Les co-cultures ont ensuite été mises à 37°C dans une atmosphère humidifiée et à 5% de CO₂ pendant 24 heures à l'abri de la lumière. Le milieu de culture utilisé a été le F12K complétement décrit dans le chapitre concernant la culture.

II.B.2. Traitement

Le milieu de culture est retiré puis les cellules sont rincées avec du PBS. Les cellules sont ensuite traitées avec 500 µl de milieu sans sérum correspondant à leur milieu de culture basal (DMEM pour les cellules HepG2 et Clone 9, et F12K pour les cellules MH1C1) en l'absence ou en présence de différentes concentrations d'ubiquinones, pendant 30 minutes à 37°C dans une atmosphère humidifiée contenant 5% de CO₂. Pour les compétitions inter-quinones, les cellules sont traitées 30 minutes avec la quinone neutre ou inhibitrice puis 30 minutes avec la quinone activatrice comme décrit précédemment. En ce qui concerne l'activité des anti-oxydants sur la toxicité induite par les analogues de l'ubiquinone, les cellules ont été traitées simultanément avec différentes concentrations d'ubiquinones et d'anti-oxydants pendant 30 minutes. Les diluants alors utilisés pour les solutions mères d'anti-oxydants sont l'eau pour le tiron et le DMSO pour l'α-tocophérol. Après le traitement, les cellules sont remises en culture 24 heures dans 1 ml de leurs milieux de culture respectifs.

II.B.3. Détermination du taux de mortalité cellulaire

Lors de nos travaux, la viabilité cellulaire a été évaluée par différentes techniques. La plupart d'entre elles reposent sur des propriétés de la membrane plasmique lors du processus de mort cellulaire que ce soit la perte de son intégrité ou une modification dans sa composition. Deux marqueurs de mort cellulaire ont été utilisés : le bleu de trypan et l'annexine V-FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate).

II.B.3.1. Exclusion du bleu de trypan

Le bleu de trypan est un colorant vital qui s'accumule dans les cellules lorsque ces dernières perdent l'intégrité de leur membrane plasmique. Une visualisation au microscope optique permet de compter aisément les cellules mortes qui apparaissent bleues à la différence des cellules vivantes qui restent réfringentes à la lumière.

Pour cela, 24 heures après leur traitement, les cellules ayant subi ou non un traitement sont grattées puis récupérées avec leur surnageant. Un échantillon du volume est prélevé puis mélangé à 10% (v/v) de bleu de trypan. Le comptage sur cellules de Malassez du nombre de cellules n'excluant pas le bleu de trypan par rapport au nombre de cellules totales nous permet ainsi d'évaluer le taux de mortalité.

II.B.3.2. Marquage à l'annexine V-FITC

Le principe d'action de l'annexine V-FITC ($\lambda_{\text{excitation}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 520 \text{ nm}$) se base sur une variation de la localisation de la phosphatidylsérine dans la membrane plasmique des cellules. Normalement exposés vers l'intérieur dans une cellule vivante, les résidus phosphatidylsérines se retrouvent exposés sur les deux feuillets de la membrane cellulaire lorsque les cellules deviennent apoptotiques. L'annexine V est capable de se fixer sur les résidus phosphatidylsérines. Ainsi, les cellules s'engageant vers la mort, qu'elles soient apoptotiques avec les résidus phosphatidylsérines à l'extérieur, ou nécrotiques avec perméabilisation de leur membrane, se retrouvent marquées et apparaissent en vert au microscope à fluorescence.

II.B.3.2.1. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet d'analyser des cellules mises en suspension dans un liquide et marquées à l'aide d'un fluorochrome. Les cellules passent une à une devant un rayon laser qui excite la molécule fluorescente. La lumière recueillie permet alors de classer les cellules selon différentes caractéristiques. La lumière diffusée renseigne sur la densité granulométrique des cellules (canal SSC pour Side Scatter) car plus les cellules sont denses (morphologie du noyau, réfringence du cytoplasme) plus la lumière sera diffusée. La lumière transmise permet de classer les cellules selon leur taille (canal FSC pour Forward Scatter). En effet, plus le rapport entre la lumière émise et la lumière transmise est grand, plus l'élément qui est passé devant le détecteur est grand. Et enfin, la fluorescence émise donne diverses informations selon les fluorochromes utilisés (canaux FL1, 2 et 3).

Pour l'étude de la mortalité par cytométrie en flux, 24 heures après le traitement, le surnageant de culture est retiré et mis de côté. Puis, les cellules sont décollées par addition de 500 μ l de solution de trypsine-EDTA 1X et mélangées à leur surnageant. Le tout est alors centrifugé à 290 g à 4°C pendant 6 minutes. Le culot est ensuite rincé par 1 ml de PBS froid et les cellules sont comptées sur cellules de Malassez. Les cellules sont ensuite diluées à raison de 1000 cellules par μ L dans un tampon de marquage à 4°C et pH 7,4 contenant 10 mM d'Hepes, 140 mM de NaCl et 2,5 mM de CaCl₂. 10⁵ cellules sont prélevées et 5% d'annexine V-FITC (v/v) sont ajoutés dans le tampon. Après 15 minutes d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, les échantillons sont analysés par cytométrie en flux.

Le cytomètre nécessite un paramétrage lors de chaque étude. Pour cela, nous avons utilisé des échantillons cellulaires contrôles, non traités et marqués à l'annexine V-FITC. Premièrement, nous avons sélectionné la population de cellules à étudier en fonction des canaux FSC et SSC afin d'obtenir une population homogène et d'éliminer les débris cellulaires de nos études. Cette population cellulaire a ensuite été étudiée en fonction de la fluorescence émise, ce qui nous a permis de déterminer les seuils de fluorescence en dessous desquels les cellules sont considérées comme non significativement fluorescentes malgré une légère fluorescence (auto-fluorescence des cellules, marquage non spécifique des fluorochromes).

Nous avons ensuite mesuré 5 à 20 000 évènements par échantillons sur les canaux SSC et FSC. Puis nous avons étudié les paramètres des canaux FL1, pour l'annexine V-FITC, et FL2, pour le PKH26, sur la population cellulaire sélectionnée avec les seuils de fluorescences préalablement établis.

II.B.3.2.2. Microscopie confocale

Les cellules sur lamelle dans les puits sont rincées avec du PBS froid. Les lamelles sont ensuite retirées des puits et recouverte du tampon de marquage contenant 5% (v/v) d'annexine V-FITC. Après 15 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, les lamelles sont observées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP2) à un grossissement X63. Les images ont été prises en microscopie à fluorescence sur deux canaux différents et en contraste de phase. L'excitation à 543 nm et l'émission à 567 nm nous ont permis de visualiser les cellules marquées avec les PKH26. Avec un laser d'excitation à 488 nm et un filtre d'émission à 520 nm, nous avons pu observer les cellules marquées par l'annexine

V-FITC. La superposition des trois types d'images nous a permis de voir la proportion de cellules MH1C1 et de cellules Clone 9 mortes.

II.C. Mesure de la production radicalaire

La mesure de la production radicalaire a été effectuée à l'aide d'une sonde fluorescente, la dichlorofluorescéine diacétate (H₂DCFDA) ($\lambda_{\text{excitation}}$: 506 nm, $\lambda_{\text{émission}}$: 521 nm). Ce composé non polaire est absorbé par la cellule et converti en dérivé non fluorescent par les estérases. Ce dérivé ne peut pas traverser les membranes et peut être oxydé en composé fluorescent par réaction avec les radicaux libres oxygénés. L'intensité de fluorescence du dérivé oxydé de la dichlorofluorescéine (DCF) est proportionnelle à la quantité d'espèces réactives de l'oxygène présentes dans le milieu. Cinq millions de cellules ont été mises en suspension dans un tampon à pH 7,4 contenant 250 mM de saccharose, 1 mM de P_i-Tris et 10 mM de Tris-MOPS et 5 μ M d'H₂DCFDA. La mesure de la fluorescence a été effectuée au spectrofluorimètre à 37°C sous agitation. Après 5 minutes d'incubation, les ubiquinones ou les anti-oxydants ont été ajoutés au milieu. Lorsque nous avons observé l'effet des anti-oxydants sur la production radicalaire induite par les ubiquinones, les anti-oxydants ont été ajoutés 5 minutes après l'addition des quinones dans le milieu. Nous avons ensuite calculé les pentes des droites obtenues et comparé celles-ci aux pentes des conditions contrôles sans quinone ni anti-oxydant.

II.D. Dosage spectrophotométrique des quinones

II.D.1. Mesure du coefficient de partition

La mesure du partage des ubiquinones entre une phase aqueuse et une phase lipophile a été réalisée par spectrophotométrie d'absorbance. Le partage a été réalisé entre deux phases non miscibles que sont l'eau et le cyclohexane. 50 μ M d'ubiquinone 0 ou 10 ont été déposés dans un tube eppendorf de 2 ml. Il a ensuite été ajouté ou non 100, 150 ou 300 μ l de DMSO puis un volume d'eau qsp 1 ml. Le DMSO est non miscible avec le cyclohexane. Après addition d'1 ml de cyclohexane, le mélange a subi une agitation puissante pendant 5 minutes. Les phases ont ensuite décanté pendant 24 heures à

température ambiante à l'abri de la lumière. Les deux phases ont ensuite été séparées puis les quinones ont été dosées dans chacune d'elles par spectrophotométrie d'absorbance. La longueur d'onde d'absorption maximale a été déterminée par la réalisation d'un balayage spectral. Dans l'eau, les pics d'absorption se situent à 268 et 282 nm pour l'ubiquinone 0 et l'ubiquinone 10 respectivement. Dans le cyclohexane, nous avons observé une légère variation avec des pics d'absorption à 262 et 272 nm pour l'ubiquinone 0 et l'ubiquinone 10. Ainsi, après comparaison avec nos gammes d'étalonnage, nous avons déterminé les concentrations de quinones présentes dans chaque phase.

Notons qu'aux alentours de la concentration micellaire critique, la relation entre absorption et concentration en quinones n'est pas linéaire. La linéarité des gammes d'étalonnage nous a permis de vérifier que les ubiquinones n'ont pas atteint leurs concentrations micellaires critiques.

II.D.2. Dosage dans le surnageant cellulaire

Les cellules Clone 9 ont étéensemencées dans des plaques 6 puits à raison de $7 \cdot 10^4$ cellules par puit. Elles ont ensuite été mises en culture pendant 48 heures comme décrit dans le chapitre traitant de la culture cellulaire. Les cellules ont alors été rincées 3 fois avec du PBS. Nous avons ensuite ajouté 1 ml de PBS contenant $50 \mu\text{M}$ d'ubiquinone 0. Ce surnageant a été prélevé immédiatement ou 10, 30 et 60 minutes plus tard. Le dosage de l'ubiquinone 0 a ensuite été réalisé par spectrophotométrie d'absorbance à 268 nm.

III. Analyse statistique

Tous les résultats sont exprimés sous la forme d'une moyenne +/- l'écart-type. Les comparaisons statistiques ont été effectuées avec un test *t* de Student. Sauf indication contraire, les niveaux de significativité ont été représentés pour les comparaisons avec les contrôles (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

RESULTATS ET DISCUSSION

I. Etude de la régulation du PTP par les ubiquinones

I.A. Une régulation différente selon la lignée

I.A.1. Régulation du PTP par l'ubiquinone 0

L'ubiquinone 0 (Ub_0) est une quinone classée dans le groupe I qui inhibe l'ouverture du pore des mitochondries isolées de foie de rat [207]. Afin de vérifier son effet inhibiteur du pore, nous avons étudié l'impact de cette molécule sur la régulation du PTP de trois lignées cellulaires. Ces lignées sont toutes hépatocytaires mais leur organisme d'origine ou leur transformation, cancéreuse ou immortalisée, sont différents. Ainsi la lignée HepG2 est une lignée d'hépatocytes humains cancéreux tandis que les MH1C1 et Clone 9 sont des lignées d'hépatocytes de rat cancéreux et immortalisés respectivement.

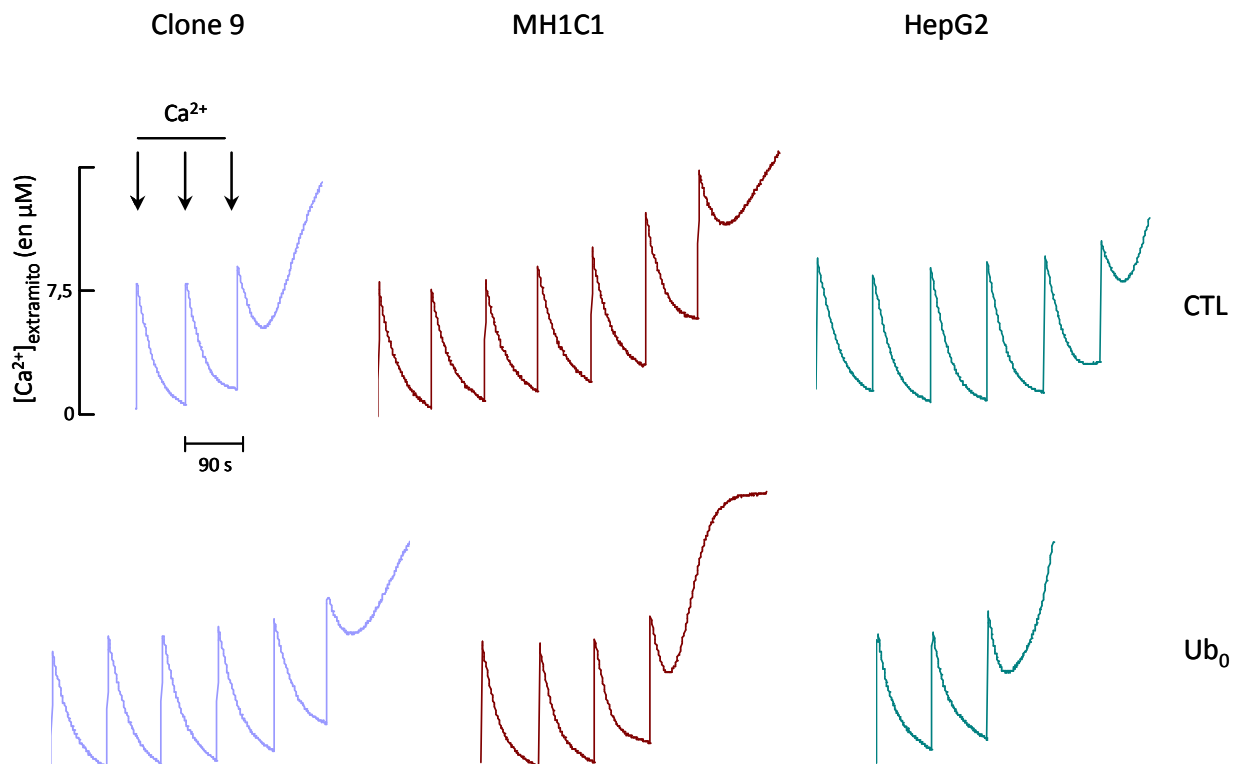


Figure 9 : Effet de 40 μM d'ubiquinone 0 sur la capacité de rétention calcique des lignées hépatocytaires.

La capacité de rétention calcique a été mesurée sur les différentes lignées en présence de 40 μM d' Ub_0 (Ub_0) ou non (CTL). 5 millions de cellules ont été incubés dans 2 ml de tampon sucrose contenant 5 mM de succinate-Tris, 50 μg de digitonine et 1 μM de calcium green. Après 2 min de stabilisation, le calcium a été ajouté à raison de 7,5 μM toutes les 90 s. La capacité de rétention calcique est atteinte lorsque le calcium mitochondrial est relargué dans le milieu.

L'étude de la régulation du PTP a été réalisée par mesure de la capacité de rétention calcique (CRC). Cette technique nous a permis de déterminer la quantité de calcium nécessaire et suffisante à l'induction de l'ouverture du pore par additions successives et régulières de petites quantités de calcium. Les mouvements du calcium dans le milieu extramitochondrial sont visualisés à l'aide d'une sonde ne pouvant pas pénétrer dans les mitochondries et émettant de la fluorescence en présence de calcium. Le relargage du calcium par les mitochondries marque l'ouverture du PTP.

Pour chaque lignée, nous avons comparé la CRC avec ou sans 40 μM d'Ub₀ (Figure 9). Cette expérience nous a permis de constater les points suivant :

Premièrement, la sensibilité basale d'ouverture du pore par le calcium varie d'une lignée à l'autre. Ainsi, pour les conditions contrôles, le PTP s'ouvre avec 18, 9 ou 21 nmol de Ca²⁺ par million de cellules HepG2, Clone 9 ou MH1C1 respectivement.

Deuxièmement, cette dose d'Ub₀ provoque une augmentation de la CRC de la lignée Clone 9 immortalisée mais diminue celles des lignées cancéreuses HepG2 et MH1C1. Ainsi, l'ubiquinone 0 qui est l'un des plus puissants inhibiteurs du pore des mitochondries isolées de foie de rat [207] semble devenir un activateur sur deux autres lignées hépatocytaires cancéreuses dont une provenant du rat.

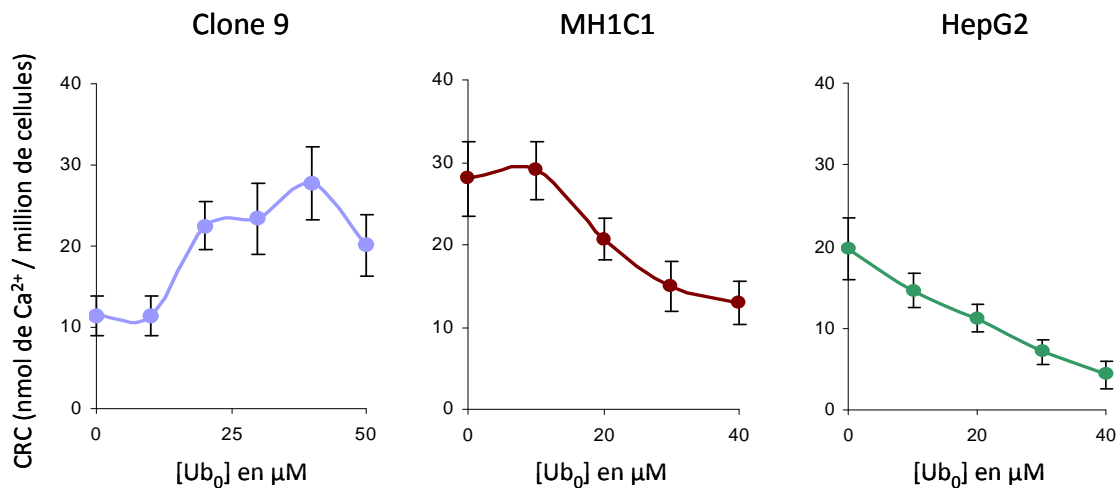


Figure 10 : Effets de différentes concentrations d'ubiquinone 0 sur la capacité de rétention calcique de trois lignées hépatocytaires.

La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des hépatocytes immortalisés (Clone 9), cancéreux de rats (MH1C1) et cancéreux humains (HepG2) en présence des concentrations indiquées d'ubiquinone 0, dans les conditions décrites à la figure 9. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes +/- écarts-types d'au moins quatre expériences indépendantes.

Cependant, certaines quinones du groupe I peuvent avoir un effet biphasique sur le PTP avec une inhibition du pore à faibles doses puis une activation à hautes doses [207]. Bien que cet effet biphasique n'ait jamais été observé pour l'Ub₀, nous avons étudié l'effet de différentes concentrations d'Ub₀ sur toutes nos lignées (Figure 10). Ces résultats nous confirment que l'Ub₀ diminue bien la CRC des lignées cancéreuses HepG2 et MH1C1, et qu'à l'inverse, elle augmente celles des cellules Clone 9 de manière dose dépendante. De plus, l'activité régulatrice de cette quinone reste puissante dans un sens ou dans l'autre. Elle double la CRC des cellules Clone 9 et elle divise par trois celle des hépatocytes cancéreux. Les concentrations utilisées dans cette expérience représentent la fenêtre d'activité de l'Ub₀ pour la lignée Clone 9. Cette quinone, lorsqu'elle est inhibitrice, entraîne à forte concentration une inhibition de l'influx de calcium mitochondrial qui empêche toute mesure de la CRC (Figure 11).

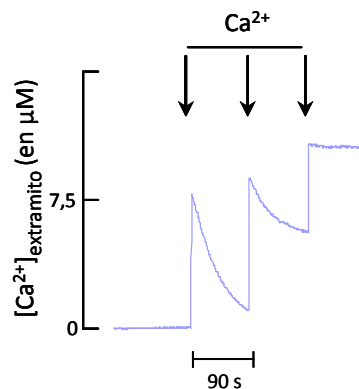


Figure 11 : Inhibition de la prise de calcium par une haute dose d'ubiquinone 0.

La CRC est mesurée comme décrit à la figure 9, sur des cellules Clone 9, en présence de 75 µM d'ubiquinone 0. Les mitochondries absorbent une faible quantité de calcium avant l'inhibition totale de tout influx calcique mitochondrial. Ce phénomène est visualisé par la disparition des pics d'absorption.

Comme l'Ub₀ inhibe l'ouverture du pore des hépatocytes de rat isolés sains [207] et immortalisés, nous nous sommes demandés si c'est la cancérisation des hépatocytes, mais pas leur immortalisation, qui est capable d'induire cette inversion de l'effet de l'ubiquinone 0 sur le pore. Nous avons donc étudié l'évolution de la CRC en fonction de la concentration de l'Ub₀ sur une autre lignée d'hépatocytes humains, immortalisés mais non cancéreux : les cellules THLE-3 (Figure 12). Nous observons ici que l'ubiquinone 0 s'avère être un puissant activateur du PTP sur cette lignée comme pour les lignées cancéreuses précédemment testées. Cette induction de l'ouverture du pore est même

plus puissante que chez ces lignées cancéreuses puisque pour seulement 20 μM d' Ub_0 , la CRC est divisée par 4. La cancérisation des cellules ne semble donc pas être l'unique facteur déclenchant l'inversion d'effet observée.

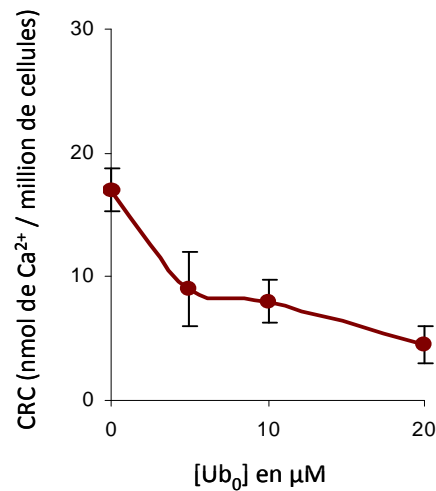


Figure 12 : Effet de l'ubiquinone 0 sur la capacité de rétention calcique des hépatocytes humains immortalisés THLE-3.

La capacité de rétention calcique a été mesurée sur 3 millions d'hépatocytes THLE-3 en présence des concentrations indiquées d'ubiquinone 0, selon le protocole décrit à la figure 9. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes +/- écarts-types de trois expériences indépendantes.

La croissance des hépatocytes THLE-3 étant très lente et nécessitant des conditions très particulières, cette lignée ne sera pas développée dans les résultats ultérieurs.

I.A.2. Régulation du PTP par trois autres ubiquinones

Afin de déterminer si le changement de régulation observé pour l' Ub_0 est spécifique de cette quinone ou s'il concerne les autres composés de cette famille, nous avons étudié la régulation du PTP par trois autres analogues sur les lignées hépatocytaires en notre possession. Nous avons utilisé deux quinones inhibitrices du groupe I, l'ubiquinone 10 et la décyl-ubiquinone, et une quinone neutre du groupe III, l'ubiquinone 5 (Figure 13).

Nous observons ici que l'ubiquinone 5 (Ub_5) conserve son caractère neutre sur la lignée cancéreuse MH1C1 mais qu'elle acquiert un effet activateur chez les cellules Clone 9 et les cellules HepG2. A l'inverse, l'ubiquinone 10 (Ub_{10}) perd son action inhibitrice et devient neutre chez les lignées Clone 9 et MH1C1. En revanche, sa régulation du pore des

cellules HepG2 s'inverse pour devenir activatrice aux doses supérieures à 50 μM . Enfin, la décyl-ubiquinone (dUb) conserve son profil d'inhibiteur biphasique chez les cellules Clone 9 et MH1C1 mais devient neutre chez les cellules HepG2 cancéreuses.

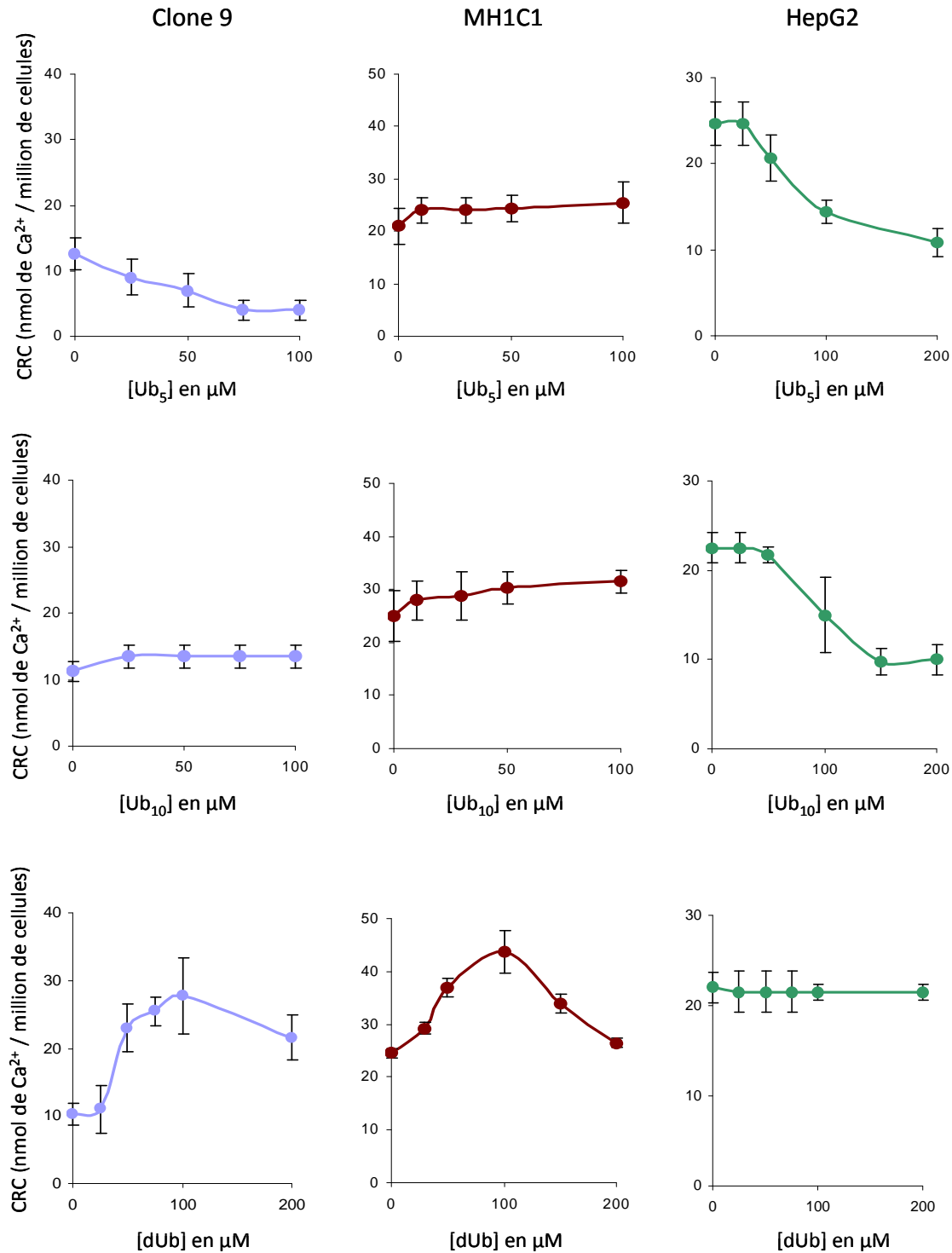


Figure 13 : Mesures de la capacité de rétention calcique en fonction des ubiquinones.

La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des hépatocytes Clone 9, MH1C1 et HepG2 en fonction des différentes concentrations d'ubiquinone 5 (Ub₅), d'ubiquinone 10 (Ub₁₀) ou de décylubiquinone (dUb), selon le protocole décrit à la figure 9. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes +/- écarts-types d'au moins quatre expériences indépendantes.

Ce phénomène d'inversion de la régulation observé pour l'ubiquinone 0 se retrouve donc aussi pour d'autres composés de cette famille. Cependant, il ne s'agit pas toujours d'une inversion mais parfois de l'apparition ou de la disparition d'un effet régulateur selon les lignées.

I.B. Mécanisme de régulation

Nous avons ensuite cherché à préciser le mécanisme d'action des ubiquinones sur le PTP afin de mieux comprendre ce phénomène.

I.B.1. Un site d'action spécifique aux ubiquinones

D'après la littérature, l'action des ubiquinones sur le PTP des mitochondries de foie de rat est médiée par un site d'action qui leur est propre [207]. Comme nous observons des variations entre la régulation du pore de nos lignées et la régulation déjà rapportée sur hépatocytes isolés, nous avons cherché à savoir si d'autres régulateurs connus subissent également des changements dans leur régulation et si les quinones interagissent toujours sur un ou plusieurs sites communs chez nos lignées [207].

I.B.1.1. Compétitions avec des inhibiteurs de référence

Nous avons utilisé deux puissants inhibiteurs du PTP reconnus et agissant sur leurs propres sites d'action : la roténone et la ciclosporine A [121, 122, 204]. Nous avons étudié si ces molécules conservent leur activité et si leurs mécanismes de régulation sont toujours indépendants de celui des quinones.

La CRC en présence de roténone a été mesurée sur les lignées Clone 9 et MH1C1 (Figure 14). Nous voyons sur le panel A que cette molécule conserve un puissant effet inhibiteur sur le pore avec une CRC triplée pour ces deux lignées.

La roténone est une molécule régulant le PTP directement au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire [204]. Or le complexe I possède deux sites de fixation pour les quinones dont un sensible à la roténone [8, 9]. Nous avons voulu savoir si la roténone est capable d'empêcher l'action de l'Ub₀ sur les cellules Clone 9, ce qui signifierait qu'elle déplace l'ubiquinone 0 de son site d'action, ou si leurs effets inhibiteurs sont additifs (Figure 14, Panel B). Ici, nous avons obtenu une inhibition de la prise de calcium par les

mitochondries ne nous permettant pas de répondre à ces questions. Cependant, nous pouvons voir que cette inhibition de l'influx calcique apparait plus rapidement avec la concentration la plus élevée d'Ub₀.

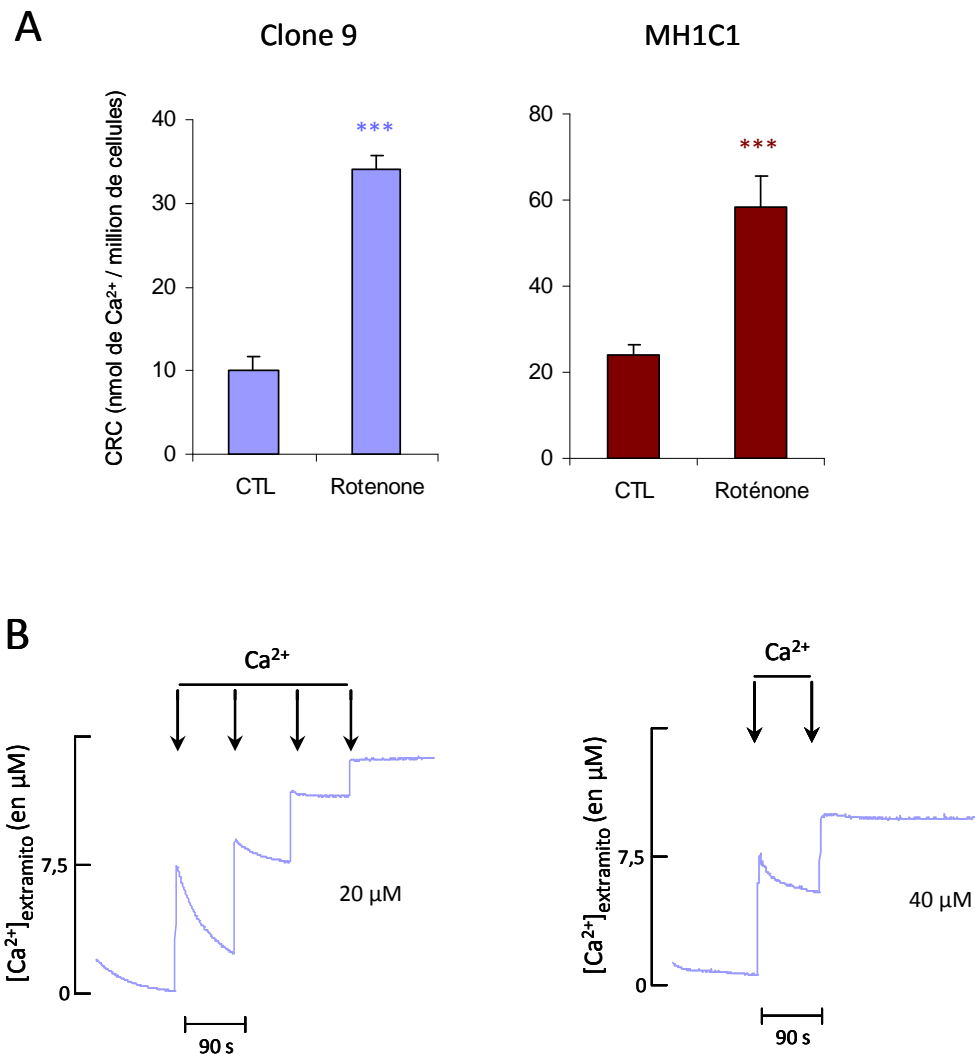


Figure 14 : Effet de la roténone sur la capacité de rétention calcique en présence et en absence d'ubiquinone 0.

Panel A : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des hépatocytes Clone 9 et MH1C1 après ajout de 1 µM de roténone avec le même protocole décrit dans la figure 9. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes + écarts-types de trois expériences indépendantes (*** : p<0,001). **Panel B :** Après addition d'1 µM de roténone et stabilisation 2 min, il a été ajouté 20 ou 40 µM d'ubiquinone 0. La capacité de rétention calcique a ensuite été mesurée. Les résultats sont les courbes représentatives de trois expériences indépendantes.

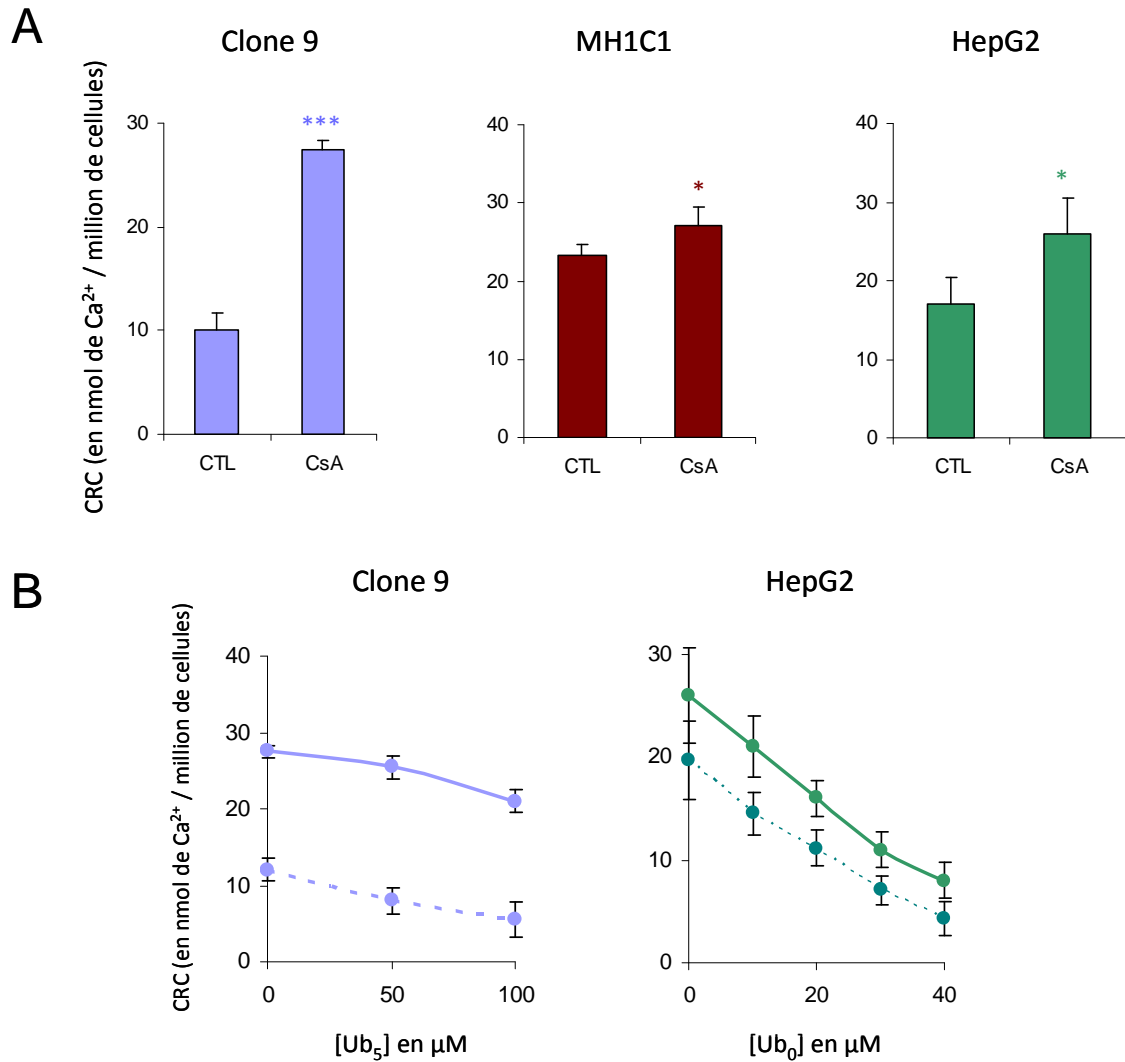


Figure 15 : Effet de la ciclosporine A sur la capacité de rétention calcique en présence et en absence d'ubiquinones activatrices.

Panel A : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des hépatocytes Clone 9, MH1C1 et HepG2 après ajout de 1 μM de ciclosporine A (CsA) selon le protocole décrit dans la figure 9. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes + écarts-types de quatre expériences indépendantes (*, p<0,05 ; ***, p<0,001).

Panel B : Après addition d'1 μM de CsA et stabilisation 2 min, la capacité de rétention calcique a été mesurée en fonction des concentration d'ubiquinone 5 ou d'ubiquinone 0 chez les cellules Clone 9 et HepG2 respectivement. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes +/- écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes.

Nous avons réalisé le même type d'expérience avec la ciclosporine A (CsA) (Figure 15, Panel A). Nous voyons que celle-ci conserve également son effet inhibiteur sur les lignées Clone 9, MH1C1 et HepG2, même si celui-ci est très faible pour ces deux dernières. Nous avons ensuite étudié la capacité de la CsA à empêcher l'induction de l'ouverture du pore par les quinones activatrices. Lorsque nous avons fait une compétition entre la CsA et l'Ub₅ sur les cellules Clone 9 (Figure 15, Panel B), nous avons observé que la CsA diminue l'effet activateur de la quinone de manière régulière quelle que soit la dose d'Ub₅ utilisée.

Nous avons constaté le même genre de compétition entre la CsA et l'Ub₀ sur les cellules HepG2, avec une addition des effets (Figure 15, Panel B). Ceci nous suggère que la CsA provoque une inhibition non compétitive envers les ubiquinones en agissant sur un site d'action différent.

I.B.1.2. Compétitions inter-quinones

Ludivine Walter a démontré que les quinones du groupe III n'ont pas d'effet sur la régulation du PTP mais qu'elles sont capables d'interférer compétitivement avec les quinones des groupes I et II et donc qu'elles interagissent avec un site d'action commun [207]. D'autres ubiquinones n'ont pas d'effet régulateur mais ne sont pas non plus capables d'inhiber par compétition l'action des autres quinones. Nous avons cherché à déterminer si les quinones qui deviennent neutres dans notre étude, le deviennent par une perte totale de leur interaction avec leur site d'action ou si elles deviennent des quinones du groupe III. Pour cela, nous avons ainsi étudié diverses compétitions entre nos quinones.

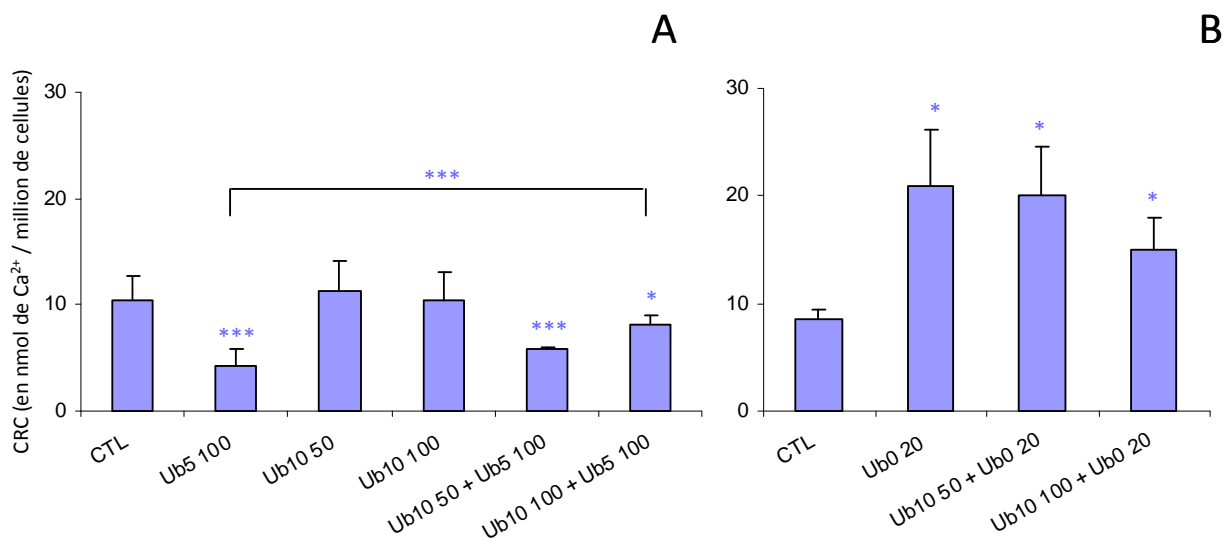


Figure 16 : Compétitions inter-quinones sur les cellules Clone 9.

Panel A : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des cellules Clone 9, selon la méthode décrite à la figure 9, en l'absence de régulateur (CTL), avec 100 µM d'ubiquinone 5 (Ub5 100), avec 50 µM d'ubiquinone 10 (Ub10 50) et avec 100 µM d'ubiquinone 10 (Ub10 100). Pour les compétitions, les cellules ont été incubées 2 min avec 50 ou 100 µM d'ubiquinone 10 avant l'ajout de 100 µM d'ubiquinone 5 (Ub10 50 + Ub5 100) et (Ub10 100 + Ub5 100) respectivement. **Panel B :** La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des cellules Clone 9, par la même méthode, en l'absence de régulateur (CTL), avec 20 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 20), 50 µM d'ubiquinone 10 (Ub10 50) ou 100 µM d'ubiquinone 10 (Ub10 100). Pour les compétitions, les cellules ont été incubées 2 min avec 50 ou 100 µM d'ubiquinone 10 avant l'ajout de 20 µM d'ubiquinone 0 (Ub10 50 + Ub0 20) et (Ub10 100 + Ub0 20) respectivement. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes + écarts-types d'au moins trois expériences indépendantes (*, p<0,05 ; ***, p<0,001).

Premièrement, nous avons étudié le mécanisme de la disparition de l'effet de l'ubiquinone 10, sur le PTP des cellules Clone 9. Pour ce faire, nous avons réalisé une étude de compétition via la mesure de la CRC. D'un côté entre l'Ub₁₀ et une quinone activatrice, l'Ub₅, d'un autre côté entre l'Ub₁₀ et une quinone inhibitrice, l'Ub₀ (Figure 16). Sur les cellules Clone 9, bien que l'Ub₁₀ n'ait pas d'activité régulatrice du pore, nous voyons qu'elle empêche l'effet activateur de l'Ub₅ de manière dose dépendante (Figure 16, Panel A). Ainsi, 50 µM d'Ub₁₀ diminuent légèrement l'activation du pore par 100 µM d'Ub₅ tandis que 100 µM d'Ub₁₀ restaurent une CRC pratiquement égale au contrôle.

Toujours sur les cellules Clone 9, l'Ub₁₀ diminue aussi légèrement l'effet inhibiteur de l'Ub₀ à la dose de 100 µM mais pas à la dose de 50 µM (Figure 16, Panel B). Les mêmes compétitions ont été réalisées avec une concentration de 40 µM d'Ub₀, mais les résultats montrent alors une inhibition de la prise de calcium par les mitochondries et sont donc inexploitable (résultats non montrés). Notons cependant que l'inhibition de la prise de calcium apparaît plus rapidement avec la dose la plus élevée d'Ub₁₀.

Nous avons également réalisé des compétitions sur les cellules cancéreuses MH1C1 et HepG2 (Figure 17). Sur les cellules MH1C1, nous avons mis en compétition 100 µM d'Ub₅, sans effet sur le pore de ces cellules, et 20 µM de la quinone activatrice Ub₀. Ici encore, la quinone neutre empêche l'activation du pore par l'Ub₀.

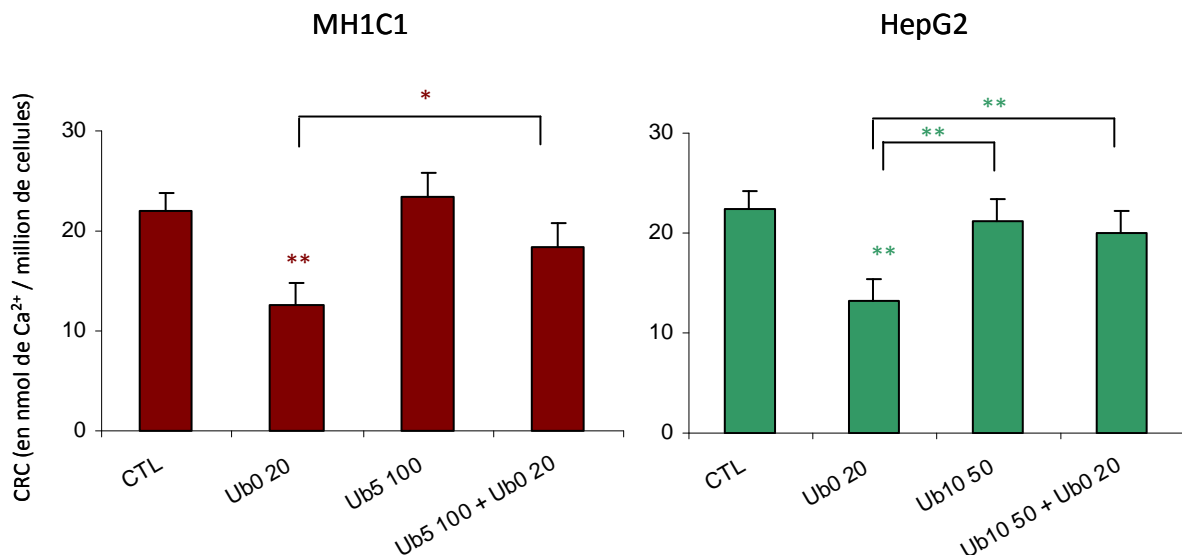


Figure 17 : Compétitions inter-quinones sur les cellules MH1C1 et HepG2.

MH1C1 : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des cellules MH1C1, par la méthode décrite à la figure 9, en l'absence de régulateur (CTL), avec 20 µM d'ubiquinone 0 (Ub₀ 20) ou 100 µM d'ubiquinone 5 (Ub₅ 100). Pour la compétition, les cellules ont été incubées 2 min avec 100 µM d'ubiquinone 5 avant l'ajout de 20 µM d'ubiquinone 0 (Ub₅ 100 + Ub₀ 20). **HepG2** : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des cellules HepG2 en l'absence de régulateur (CTL), avec 20 µM d'ubiquinone 0 (Ub₀ 20) ou 50 µM d'ubiquinone 10 (Ub₁₀ 50). Pour les compétitions, les cellules ont été incubées 2 min avec 50 µM d'ubiquinone 10 avant l'ajout de 20 µM d'ubiquinone 0 (Ub₁₀ 50 + Ub₀ 20). Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes + écarts-types de trois expériences indépendantes pour les MH1C1 et HepG2 respectivement (*, p<0,05 ; **, p<0,01).

Pour les cellules HepG2, nous avons réalisé le même type d'expérience en utilisant l'Ub₁₀ à sa dose neutre la plus élevée, c'est-à-dire 50 µM. Nous voyons ici que cette dose d'Ub₁₀ est capable d'empêcher totalement l'effet activateur de 20 µM d'Ub₀.

I.B.2. Un site d'action hydrophile ?

Les quinones sont des molécules qui se partagent entre la phase aqueuse et la phase lipidique. Nous avons cherché à savoir dans quelle mesure cette propriété joue un rôle dans leur régulation du PTP.

Théoriquement, des quinones que nous avons utilisées dans nos travaux, l'ubiquinone 0, qui n'a pas de chaîne isoprénoïde, est la plus hydrosoluble et l'ubiquinone 10, qui a la chaîne carbonée la plus longue, est la moins hydrosoluble. Le diméthylsulfoxyde (DMSO) est un solvant polaire permettant de solubiliser les quinones. Ce solvant est insoluble dans le cyclohexane que nous avons utilisé comme phase lipophile.

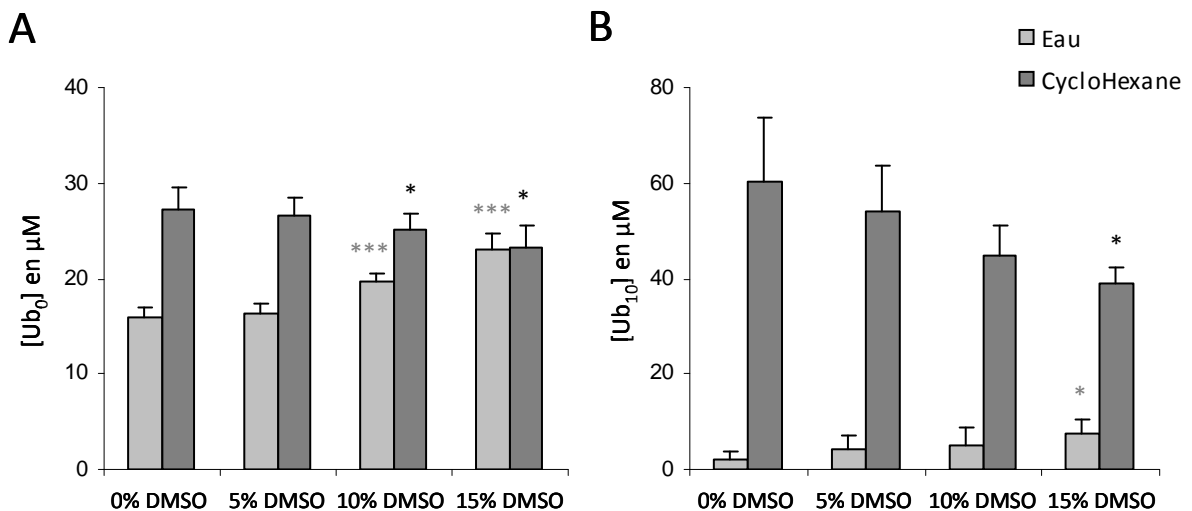


Figure 18 : Partage des ubiquinones 0 et 10 entre l'eau et le cyclohexane.

50 µM de quinone sont ajoutés dans 1 ml de cyclohexane et 1 ml de solution aqueuse contenant de l'eau et un taux de DMSO de 0, 5, 10 ou 15% du volume total. Après 5 min d'agitation, le mélange repose 24 heures à température ambiante. Les solutions hydrophile et lipophile sont ensuite séparées et les quinones dosées par absorbance au spectrophotomètre. **Panel A** : Concentrations d'Ub₀ dans la phase aqueuse (268 nm) et la phase lipophile (262 nm). **Panel B** : Concentrations d'Ub₁₀ dans la phase aqueuse (282 nm) et la phase lipophile (272 nm). Les résultats sont représentés sous formes de moyennes +/- écarts-types de 5 et 4 expériences indépendantes respectivement (* : p<0,05 ; *** : p<0,001).

Nous avons étudié l'effet de différents taux de DMSO sur le partage des ubiquinones 0 et 10 entre l'eau et le cyclohexane. Pour cela, nous avons mis 50 μM d'Ub₀ ou d'Ub₁₀ en présence d'un mélange d'eau et de DMSO et d'une même quantité de cyclohexane. Après agitation, le mélange a été incubé 24 heures puis le dosage des quinones a été réalisé par spectrophotométrie d'absorption dans chacune des deux phases (Figure 18).

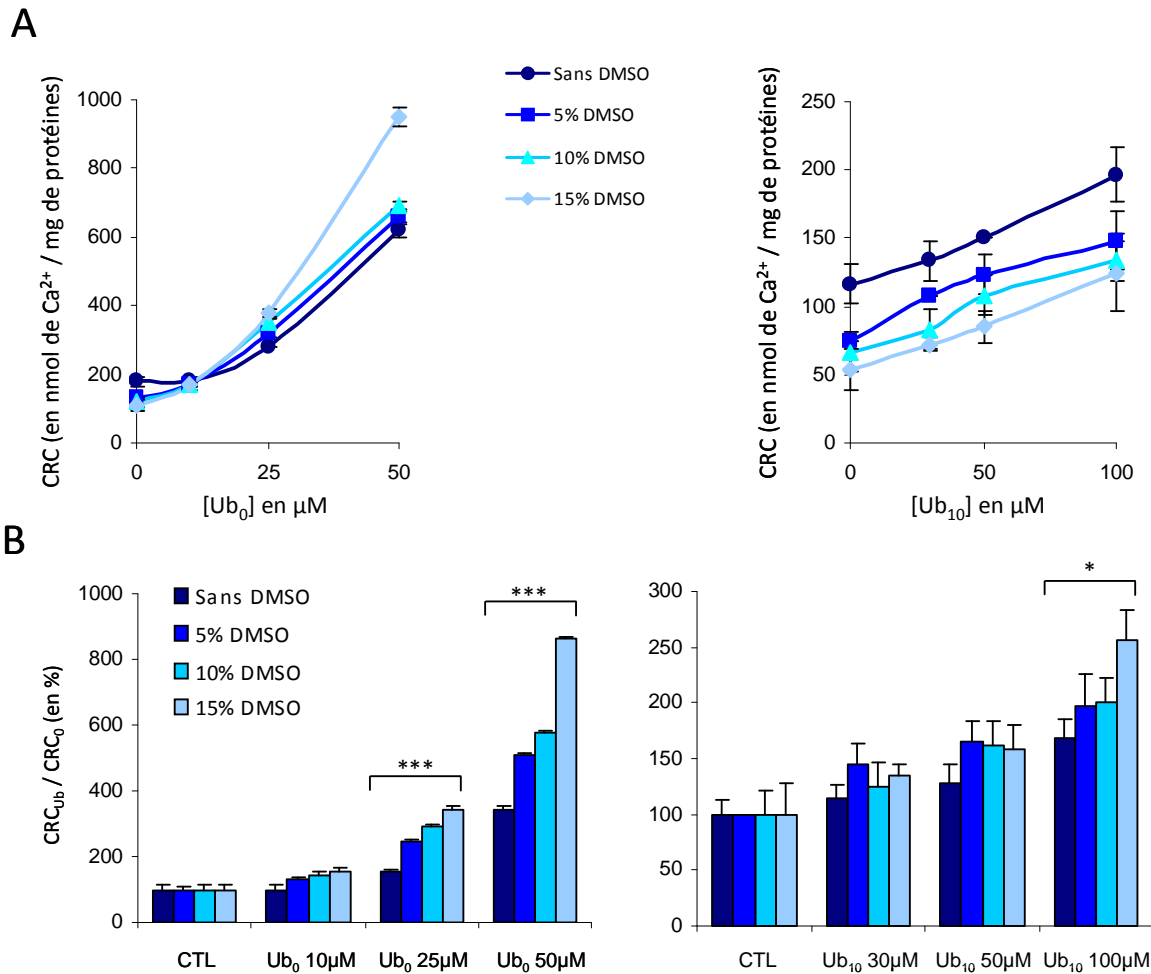


Figure 19 : Régulation du PTP par les ubiquinones 0 et 10 en fonction du taux de DMSO.

Panel A : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur 2 mg de mitochondries isolées de foie de rat en présence de 10, 25 et 50 μM d'Ub₀ ou 30, 50 et 100 μM d'Ub₁₀ dans 2 ml de tampon contenant 250 mM de saccharose, 50 μM d'EDTA, 1 mM de Pi-Tris, 10 mM de Tris-MOPS, 5 mM de succinate-Tris, 50 μM d'EDTA, 1 μM de calcium green et 0, 5, 10 ou 15% de DMSO. Après 2 min de stabilisation, le calcium a été ajouté à raison de 25 μM toutes les 60 s. **Panel B :** Les résultats sont représentés sous la forme du taux d'augmentation de la capacité de rétention calcique par rapport au contrôle ($\text{CRC}_{\text{Ub}} / \text{CRC}_0$) pour chaque concentration de DMSO. Les résultats sont représentés sous formes de moyennes \pm écarts-types de 5 et 3 expériences indépendantes pour l'Ub₀ et l'Ub₁₀ respectivement (* : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$).

Bien que les deux quinones soient majoritairement lipophiles, nous voyons ici que l'absence de chaîne isoprénoïde favorise l'hydrosolubilité de l'Ub₀ puisque celle-ci est retrouvée dans l'eau en concentration 8 fois supérieure à son analogue à chaîne moyenne, l'Ub₁₀. Ensuite, nous observons que le DMSO est un solvant capable d'augmenter la présence des deux quinones dans la phase aqueuse. Cet effet est d'autant plus marqué que la quinone est hydrophobe et que le taux de DMSO dans le milieu est élevé. Ainsi, avec 15% de DMSO dans le milieu, nous retrouvons des concentrations de quinones dans la phase aqueuse augmentées de 44 et 275% pour l'Ub₀ et l'Ub₁₀ respectivement.

Afin de déterminer si l'augmentation des quinones dans le milieu hydrophile a un impact sur leur activité, nous avons étudié l'effet des différents taux de DMSO sur la régulation du pore par les quinones. Pour cela, nous avons mesuré la capacité de rétention calcique des mitochondries isolées de foie de rat, en fonction du volume de DMSO présent dans le milieu et de la concentration en ubiquinone 0 et ubiquinone 10 (Figure 19, Panel A).

Les résultats nous montrent que le DMSO lui-même possède un effet activateur du pore puisque la capacité de rétention calcique de base, entre les mitochondries contrôles et celles dans un tampon à 15% de DMSO, diminue d'environ 60 nmol de Ca²⁺/mg de protéines. Cet effet propre du DMSO rend la comparaison de l'activité des quinones selon les taux de DMSO difficile à lire. Nous avons donc normalisé ces résultats en prenant le contrôle sans quinone comme référence de chaque tampon et exprimé les résultats en capacité de rétention calcique relative pour plus de lisibilité (Figure 19, Panel B). Dans le cas de l'ubiquinone 0, nous voyons clairement que l'activité de la quinone sur le pore est augmentée avec le taux de DMSO. A la dose de 40 µM, la CRC augmente de 250% dans le tampon sans DMSO alors que cette augmentation passe à 750% lorsqu'il y a 15% de DMSO dans le tampon. Bien que de manière moins flagrante, le DMSO accroît aussi l'activité inhibitrice de l'Ub₁₀. Ainsi, 100 µM d'Ub₁₀ augmentent la CRC de 70% sans DMSO et de 160% lorsque le taux de DMSO est de 15%.

Le DMSO est connu pour favoriser la pénétration de diverses molécules à travers les membranes [282, 283]. Nous avons donc voulu savoir si l'accroissement du taux de DMSO dans le milieu favorise la pénétration des quinones dans les mitochondries. Ceci afin de déterminer si l'augmentation de l'effet des quinones est imputable à ce mécanisme, ou si au contraire, la hausse de l'hydrosolubilité des quinones diminue leur diffusion à travers les membranes cellulaires.

Pour cela, nous avons mis en présence des mitochondries en suspension avec 5, 10 et 15% de DMSO et 50 μM d'ubiquinone 0. Après incubation, nous avons centrifugé l'échantillon et récupéré le surnageant pour effectuer un dosage spectrophotométrique à 268 nm de la quinone présente dans celui-ci. Cependant, les résultats n'ont pu être exploités car il semblerait que la présence de débris dans le surnageant masque l'absorbance de l'ubiquinone (les pics d'absorption des bases cytidine, thymidine, adénine, de l'ADN et de l'ARN sont proches de 268 nm). Pour éliminer ces débris, nous avons traité nos échantillons par ultracentrifugation et filtration mais le résultat fut le même.

Pour palier à ce problème, nous avons étudié, selon le principe ci-dessus, l'effet du DMSO sur l'action de l'ubiquinone sur des cellules Clone 9 perméabilisées, en espérant que la centrifugation éliminerait alors plus efficacement les débris sur des cellules entières perméabilisées.

La Figure 20, nous montre que sur ces cellules, le DMSO a également un effet amplificateur de l'action inhibitrice de l'ubiquinone 0 des cellules Clone 9. Sans DMSO, 40 μM d'Ub₀ augmentent de 80% la CRC. Avec 10% de DMSO, la CRC augmente de 115% pour 40 μM d'ubiquinone 0. Pour un taux de 15% de DMSO, la CRC est augmentée de 150%. Néanmoins, si nous observons ici aussi que le DMSO accroît l'effet de l'Ub₀, nous avons eu le même souci qu'avec les mitochondries concernant la mesure de l'ubiquinone 0 dans le surnageant des cellules Clone 9 perméabilisées.

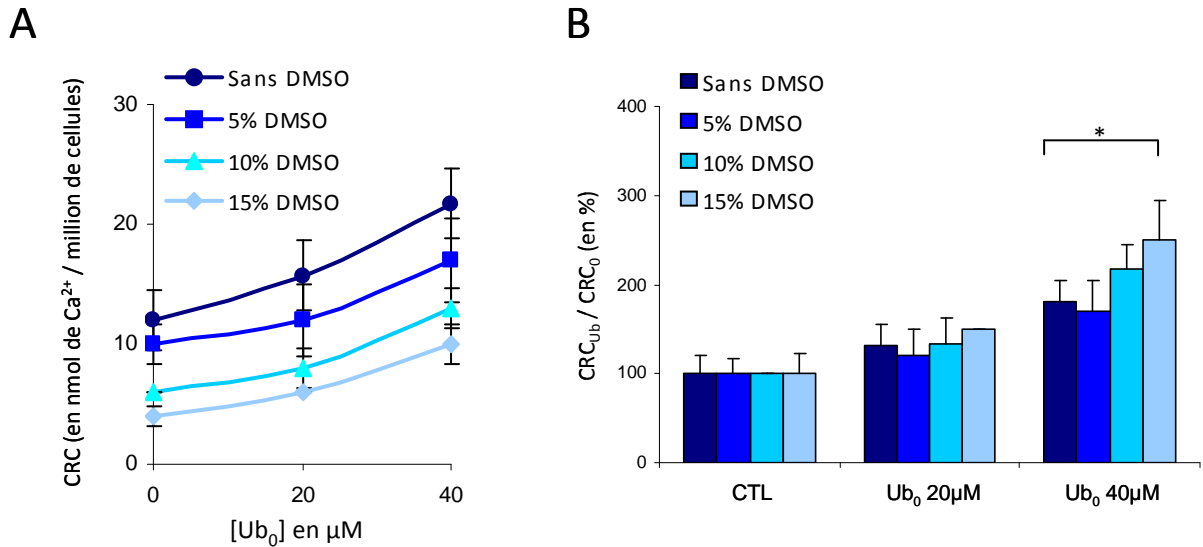


Figure 20 : Régulation du PTP des cellules Clone 9 par l'ubiquinone 0 en fonction du taux de DMSO.

Panel A : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur 5 millions de cellules Clone 9 en présence de 20 et 40 µM d'Ub₀ et de taux de 0, 5, 10 ou 15% de DMSO selon le protocole décrit à la figure 9. **Panel B :** Les résultats sont représentés sous la forme du taux d'augmentation de la capacité de rétention calcique par rapport au contrôle (CRC_{Ub} / CRC₀) pour chaque concentration de DMSO. Les résultats sont représentés sous formes de moyennes +/- écarts-types de 5 et 3 expériences indépendantes (* : p<0,05).

I.C. Discussion

I.C.1. Une inversion de la régulation du PTP spécifique aux ubiquinones

Avec les ubiquinones, nous observons une inversion de l'effet d'une classe de régulateurs qui semble être dépendante du type cellulaire étudié. Cette variation se produit même sur des lignées voisines telles que Clone 9 et MH1C1 qui sont toutes deux originaires d'épithélium de foie de *Rattus norvegicus*. Ces changements semblent spécifiques aux quinones car ni la roténone, ni la CsA ne subissent d'inversion de leurs effets inhibiteurs de l'ouverture du PTP.

Bien que les ubiquinones aient des effets différents selon les lignées, leur mécanisme d'action par interaction sur un site spécifique est conservé. En effet, les quinones des différents groupes régulateurs du pore peuvent toujours entrer en compétition les unes avec les autres. Ceci nous indique que les variations de régulation ne sont pas dues à l'apparition d'une action sur un autre site indépendant, ni à la disparition de toute interaction.

La compétition sélective des quinones neutres envers les quinones activatrices et inhibitrices a déjà été observée dans la littérature [207]. Il avait alors été proposé deux hypothèses quant au site d'action des quinones. La première propose l'existence de deux sites d'action, l'un activateur et l'autre inhibiteur, sur lesquels interagissent les ubiquinones en fonction de leur affinité. Dans cette hypothèse, les quinones neutres se fixent sur les deux sites et peuvent ainsi empêcher l'action des quinones inhibitrices comme activatrices. L'effet biphasique de certaines quinones inhibitrices s'explique alors par leur action sur le site activateur après saturation du site inhibiteur. La seconde hypothèse est l'existence d'un site commun, l'effet des quinones sur le PTP étant alors dû à leur structure. Ici, l'effet biphasique peut être expliqué par la capacité des quinones à former des micelles lorsqu'elles sont en trop forte concentration, ce qui changerait leur structure mais aussi leur effet sur le pore.

Dans nos travaux, nous avons tenté de déterminer si le site d'action des quinones pourrait être l'un des sites de fixation des quinones sur le complexe I. En effet, ce complexe de la chaîne respiratoire possède un site de fixation pour les quinones qui est sensible à la roténone. Les résultats que nous avons obtenus ne nous permettent pas de répondre à cette question car la présence de roténone et d'Ub₀ entraîne une inhibition de la prise de calcium par les mitochondries. Ce phénomène s'observe notamment en présence de fortes concentrations de quinones inhibitrices mais reste inexpliqué. Cependant, nous avons également obtenu cette inhibition de l'influx calcique mitochondrial lorsque nous avons mis 40 µM d'ubiquinone 0 en présence de 50 et 100 µM d'ubiquinone 10 sur les cellules Clone 9 (résultats non montrés). Comme ce phénomène apparaît aussi lorsque nous mettons une forte concentration d'Ub₀, (Figure 11) il se pourrait que l'inhibition de l'influx soit imputable à la fixation de l'ubiquinone 0 sur un site non spécifique. Avec l'Ub₁₀, la quantité d'Ub₀ nécessaire à l'inhibition de l'influx serait alors diminuée car l'Ub₁₀ bloquerait le site d'action principal de l'Ub₀. Dans cette hypothèse, la roténone serait aussi capable d'empêcher l'ubiquinone 0 de rejoindre son site d'action principal. Ceci pourrait alors indiquer qu'au moins un des sites d'actions des ubiquinones est le site de fixation au complexe I sensible à la roténone. Toutefois, cela reste purement hypothétique et demandera d'être expérimenté plus en avant. Pour ce faire, nous pourrions regarder si nous observons la même inhibition de l'influx avec la dUb ou l'Ub₁₀ sur les cellules Clone 9, ou encore mettre en compétition la roténone et l'ubiquinone 0 activatrice sur les cellules MH1C1 et HepG2.

Cependant, nous avons vu que l'augmentation de la concentration en ubiquinone 0 dans la phase aqueuse accroît son activité. Ceci semble infirmer l'hypothèse ci-dessus car le site de fixation des quinones au complexe I sensible à la roténone est hydrophobe [8, 9]. A partir de ces données, nous pouvons émettre plusieurs hypothèses :

-La roténone empêcherait l'action de l'Ub₀ par une action indépendante de sa fixation au complexe I.

-La roténone aurait un effet additif à l'Ub₀ et c'est une trop forte inhibition du pore qui serait à l'origine de l'inhibition de l'influx calcique. Toutefois, cette hypothèse reste peu probable du fait que 50 ou 100 µM d'Ub₁₀, qui ne sont pas inhibiteurs sur le pore des cellules Clone 9, entraînent aussi une inhibition de l'influx calcique avec 40 µM d'Ub₀ (non montré).

-Le site de fixation hydrophobe et sensible à la roténone serait un site de fixation secondaire pour l'Ub₀. Lorsque celle-ci aurait saturé le site inhibiteur principal, la roténone ou l'Ub₁₀, en bloquant le second site de fixation sur le complexe I, déplacerait alors la quinone vers un troisième site induisant l'inhibition de l'influx.

I.C.2. Un site d'action hydrophile

L'hydrosolubilité semble être un facteur important de l'activité régulatrice des ubiquinones. Nous avons vu que le taux de DMSO dans le milieu augmente la concentration des quinones dans la phase aqueuse. Avec 15% de DMSO dans le milieu, cette augmentation est d'un facteur 3,7 et 1,4 pour l'Ub₁₀ et l'Ub₀ respectivement. Cependant, la concentration finale en Ub₁₀ dans l'eau reste faible. Ceci explique peut-être pourquoi l'activité inhibitrice de 100 µM d'Ub₁₀ augmente seulement de 50% avec ce taux de DMSO alors que l'activité de l'Ub₀ augmente de 150%. Néanmoins, dans les deux cas, plus le taux de quinone dans la phase aqueuse est élevé et plus l'activité de la quinone augmente.

Ceci suggère que le site d'action des ubiquinones 0 et 10 serait hydrophile. Ce qui induit que l'affinité réelle des quinones pour leur site d'action est largement sous-estimée du fait de leur forte liposolubilité. Il existe néanmoins une autre possibilité que nous n'avons pu étudier. Le DMSO pourrait augmenter l'absorption des quinones par les cellules. Cependant, la forte liposolubilité des quinones est une caractéristique qui doit leur permettre de franchir relativement facilement les membranes cellulaires. En effet, une étude antérieure a déjà montré que l'ubiquinone 0 est absorbée à plus de 95% en

moins de 2 minutes dans les conditions de mesure de la capacité de rétention calcique (résultats obtenus par Ludivine Walter, non montrés). Il est donc peu probable que l'augmentation de l'effet des quinones dans le DMSO soit la conséquence d'une meilleure pénétration cellulaire. Au contraire, il se pourrait que la hausse de la solubilité dans la phase aqueuse diminue la diffusion des quinones à travers les membranes cellulaires. Le site d'action serait alors situé à l'extérieur de la mitochondrie. Néanmoins, nous n'avons pu répondre à cette question par notre étude et aucune donnée concernant ce point n'a été trouvée dans la littérature.

Un site d'action hydrophile expliquerait aussi pourquoi la quinone la plus soluble a une meilleure activité que les autres. Ainsi, 50 μM d'ubiquinone 0 ont une action inhibitrice du PTP mitochondrial 3 fois plus puissante que 100 μM ubiquinone 10 sur les mitochondries isolées (Figure 13). De même, cela expliquerait également pourquoi dans les cellules Clone 9, 100 μM d'Ub₁₀ ne peuvent empêcher efficacement l'effet inhibiteur des 20 μM d'Ub₀. A l'inverse, dans les cas où l'Ub₀ active l'ouverture du PTP, les quinones neutres, plus lipophiles, sont capables d'empêcher totalement l'activité de l'Ub₀. En effet, dans les cellules MH1C1, les 100 μM d'Ub₅ inhibent l'action des 20 μM d'Ub₀. Dans les cellules HepG2, 50 μM d'Ub₁₀ seulement suffisent à empêcher l'action de 20 μM d'Ub₀. Nous pourrions alors envisager l'existence d'un site inhibiteur hydrophile et d'un site activateur lipophile. Mais, dans ce cas, il est surprenant que l'Ub₀ soit la seule quinone activatrice à faible dose des cellules MH1C1 et HepG2 alors que l'Ub₅ et l'Ub₁₀ sont nettement plus lipophiles. Il faut cependant noter qu'à plus fortes doses, l'Ub₅ et l'Ub₁₀ deviennent activatrices du PTP des cellules HepG2. Afin de déterminer si le site d'action qui permet l'induction de l'ouverture du pore par l'Ub₀ est hydrophile, il pourrait être intéressant de faire des compétitions entre l'Ub₀ et diverses doses d'Ub₅ et d'Ub₁₀ sur les cellules MH1C1. En effet, ces deux quinones sont neutres sur le pore de ces cellules et ont des hydrosolubilités différentes. Ainsi, si l'Ub₅, la plus hydrophile des deux, est plus efficace que l'Ub₁₀ pour empêcher l'action de l'Ub₀, cela indiquerait que le site d'action de l'Ub₀ activatrice est hydrophile.

Bien que du même ordre, les résultats que nous avons obtenus sur le partage des quinones entre l'eau et le cyclohexane sont sensiblement différents des coefficients de partition mesurés par Peter Rich [284]. En effet, dans nos conditions nous observons une présence accrue des ubiquinones dans la phase aqueuse. Cela provient probablement du fait que toutes nos quinones sont préalablement diluées dans du DMSO. Même si les volumes utilisés sont de l'ordre de 1 à 10 microlitres, ils permettent néanmoins une solubilisation des quinones dans tous nos tampons aqueux.

I.C.3. Une variation de l'effet régulateur due à la cancérisation ou à l'immortalisation

Lorsque nous comparons nos résultats à ceux précédemment obtenus sur hépatocytes fraîchement isolés de foie de rat par Ludivine Walter (non publiés, Figure 21), nous voyons que les variations de régulation sont nombreuses et touchent tous les groupes de la classification des quinones. Cette complexité des variations de régulation ne nous permet pas de définir un schéma prévisionnel de leur action selon les structures ou les groupes régulateurs originels des quinones.

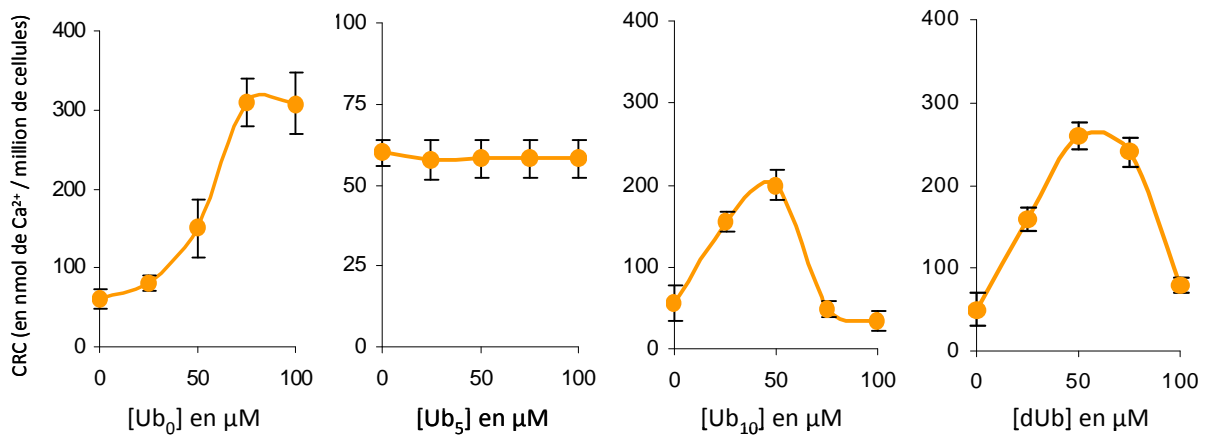


Figure 21 : Effets des ubiquinones sur la capacité de rétention calcique d'hépatocytes fraîchement isolés de foie de rat. Résultats obtenus par Ludivine Walter (non publiés).

Actuellement, le seul moyen de connaître l'activité d'une ubiquinone sur la régulation du PTP d'une cellule en particulier reste l'expérimentation. Ceci nous permet d'expliquer pourquoi, dans la littérature, certaines quinones n'ont pas eu l'effet escompté. Ainsi, dans une étude menée sur des cellules HeLa, l'Ub₀ est incapable d'empêcher l'ouverture du pore induite par les ROS alors que la décyl-ubiquinone en a le pouvoir [217]. Comme seule la dUb est capable de diminuer significativement la production de radicaux libres oxygénés induite par le diéthylmaléate (DEM), qui induit l'ouverture du PTP, les auteurs en déduisent que c'est l'activité anti-oxydante de la dUb qui est responsable de l'effet protecteur de l'induction de la transition de perméabilité. Cependant, dans cette étude, l'activité propre des quinones sur le PTP n'est pas testée, il se pourrait donc que l'Ub₀ active le pore des cellules HeLa tandis que la dUb l'inhibe.

La découverte de cette variation de l'effet des ubiquinones envers le pore nous montre que la prudence est de mise lorsque l'on étudie la transition de perméabilité mitochondriale à l'aide d'analogues de l'ubiquinone.

| Types cellulaires | Lignées | Références | Régulations du PTP |
|------------------------|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|
| Cellules saines | Hépatocytes de rat | Walter et al. [207] | Inhibition |
| | Myocytes de rat | Fontaine et al. [205] | Inhibition |
| | Neurones de rat | Kristian et al. [292] | Inhibition |
| | PBCMs humains | Belliere, non publié | Inhibition |
| | Hépatocytes murins | Basso et al. [121] | Inhibition |
| | Fibroblastes humains | | Activation |
| Cellules immortalisées | Hépatocytes de rat Clone 9 | | Inhibition |
| | Hépatocytes humains THLE-3 | | Activation |
| | Cellules mammaires humaines MCF102A | Belliere, non publié | Activation |
| | Cellules endothéliales murines MS1 | Belliere non publié | Activation |
| Cellules cancéreuses | Hépatome humains HepG2 | | Activation |
| | Hépatome de rat MH1C1 | | Activation |
| | Carcinome buccal humain KB | Belliere, non publié | Activation |
| | Carcinome mammaire humain MCF7 | Belliere, non publié | Activation |
| | Hémangi endothéliome murin EOMA | Belliere, non publié | Activation |
| | Lymphome humain U937 | Belliere, non publié | Activation |

Tableau II : Effets régulateurs de l'ubiquinone 0 sur le PTP de différentes cellules.

Nous avons vu que la régulation ne dépend pas non plus de l'état strictement cancéreux, comme nous pouvions le penser de prime abord, car l'ouverture du PTP des cellules THLE-3 immortalisées, mais non cancéreuses, est activée par l'ubiquinone 0.

Nous avons recensé toutes les études publiées, ou réalisées au Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, concernant l'activité de l'Ub₀ sur le PTP de différentes lignées cellulaires (Tableau II). Nous retrouvons ici une tendance :

L'ubiquinone 0 inhibe l'ouverture du pore de 5 lignées non cancéreuses et non immortalisées (hépatocytes, myocytes et neurones de rats, monocytes de sang périphérique humains (PBCM) et hépatocytes murins), et induit l'ouverture du pore d'une seule lignée (fibroblastes humains).

L'Ub₀ active l'ouverture du pore des 6 lignées cancéreuses testées (MH1C1, HepG2, U937, KB, EOMA et MCF7). Toutefois, étant donné l'effet versatile des ubiquinones d'une lignée à l'autre, nous nous garderons d'en faire une généralité.

Pour les lignées immortalisées, par contre, on ne peut détacher aucune règle mais il semblerait que l'ubiquinone 0 régule leur PTP comme celui des cellules cancéreuses d'une manière générale.

II. Toxicité induite par les ubiquinones

Une des conséquences de l'ouverture du PTP est la mort cellulaire. De nombreux activateurs et inhibiteurs du pore ont ainsi montré leur capacité à induire ou prévenir la mort des cellules [230-237]. Nous avons vu que les analogues de l'ubiquinone peuvent avoir des effets radicalement différents sur le PTP selon le type cellulaire étudié. Nous avons donc étudié l'impact de cette variation de régulation sur l'induction ou non d'une toxicité cellulaire.

II.A. Une toxicité différente selon la lignée

II.A.1. Détermination de la durée de traitement nécessaire

Tout d'abord, afin de déterminer la durée de traitement nécessaire à l'absorption de l'ubiquinone 0 par les cultures cellulaires, nous avons réalisé un dosage de cette quinone dans le surnageant de cellules traitées. Les cellules ont étéensemencées puis traitées 48 heures plus tard par 50 μM d'Ub₀ dilués dans du PBS. Le surnageant a ensuite été prélevé à 10, 30 et 60 minutes pour un dosage spectrophotométrique de la quinone (Figure 22).

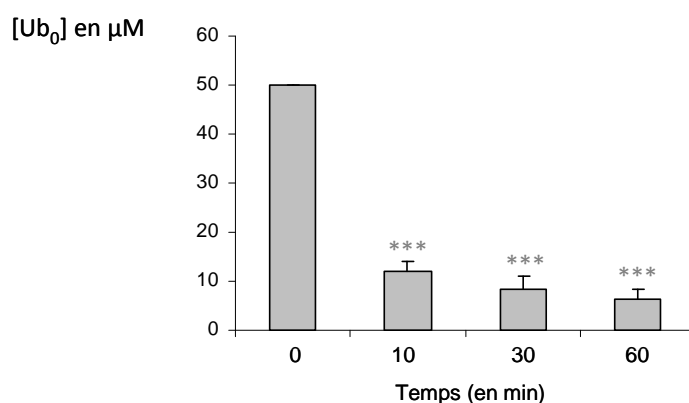


Figure 22 : Absorption de l'ubiquinone 0 au cours du temps par les cellules Clone 9 en culture.

Les cellules Clone 9 sont traitées par 50 μM d'Ub₀ dans 1 ml de PBS. Le surnageant est ensuite récupéré à 10, 30 et 60 min et la quinone dosée par spectrophotométrie. Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types de 3 expériences indépendantes. (***, $p < 0,001$)

Nous voyons ici que 75% de la quinone sont absorbés lors des 10 premières minutes. Après 30 minutes, nous obtenons 85% d'absorption, ce qui est proche de l'absorption de 90% après une heure d'incubation. Dans nos expériences, le traitement s'effectue dans du milieu sans sérum. Pour éviter de stresser les cellules, nous avons choisi de traiter nos cellules pendant 30 minutes lors des études ultérieures.

II.A.2. Evaluation de la toxicité par microscopie optique

L'évaluation de la toxicité a été réalisée au microscope optique par la technique d'exclusion du bleu de trypan. Le bleu de trypan est un colorant qui pénètre dans toutes les cellules qu'il rencontre. Les cellules vivantes sont alors capables de l'expulser et restent blanches au microscope, tandis que les cellules mortes deviennent bleues. C'est une technique peu précise, mais qui a l'avantage d'avoir une mise au point rapide et d'être peu onéreuse.

Les cellules ont étéensemencées 48 heures avant un traitement de 30 min par différentes concentrations d'Ub₀. Elles ont ensuite été récupérées 6 et 24 heures plus tard par grattage et la toxicité a été évaluée immédiatement au microscope optique (Figure 23). Les quinones étant solubilisées dans du DMSO, nous avons réalisé un contrôle par traitement avec une quantité de DMSO égale à la quantité de DMSO utilisée pour la concentration maximale en quinones soit 8 µl.

Tout d'abord, cette figure nous montre que le DMSO n'entraîne aucune toxicité significative par rapport au contrôle non traité quelle que soit la lignée cellulaire étudiée. Ensuite, il semble y avoir un parallèle entre la régulation du PTP et la toxicité induite par l'ubiquinone 0. En effet, l'ubiquinone 0 qui inhibe le pore des cellules Clone 9 n'induit pas de toxicité significative dès les plus faibles doses chez cette lignée. A l'inverse, cette quinone qui induit l'ouverture du pore des deux lignées cancéreuses entraîne une toxicité aux plus faibles doses chez les cellules MH1C1 et HepG2. Cette toxicité est prononcée 6 heures après le traitement et varie peu 18 heures plus tard. L'induction de la mort cellulaire est dépendante de la concentration d'Ub₀ utilisée chez les cellules cancéreuses MH1C1 et HepG2 et apparaît pour la dose maximale chez les Clone 9 immortalisées. Ainsi, à la dose de 10 µM, nous n'observons aucune toxicité significative sur la lignée immortalisée alors que les cellules cancéreuses ont une mortalité 2 à 3 fois supérieure au contrôle. A 20 µM, il n'y a toujours pas de toxicité significative pour les Clone 9 alors que

les cellules cancéreuses subissent 60 à 90% de pertes. A la concentration de 40 μM , la toxicité est maximale pour les cellules cancéreuses avec 90% de mortalité pour les deux lignées. En revanche, l'Ub₀ tue alors 50 à 70% des cellules Clone 9. Cette toxicité est surprenante car les inhibiteurs du PTP sont habituellement protecteurs de la mort cellulaire. Nous nous sommes alors posés la question de savoir si cet effet pouvait être causé par notre protocole.

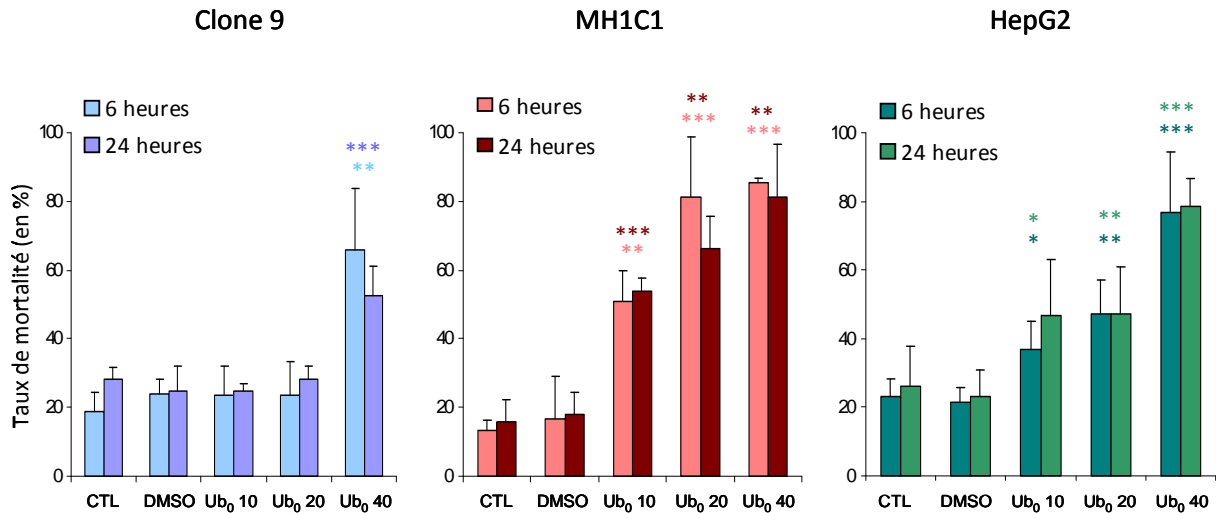


Figure 23 : Evaluation au bleu trypan de la mortalité cellulaire induite par l'ubiquinone 0.

Les cellules des lignées Clone 9, MH1C1 et HepG2 ont été incubées 30 min, dans du milieu sans sérum, en présence de 10, 20 ou 40 μM d'Ub₀ (Ub₀ 10, Ub₀ 20 et Ub₀ 40). Les contrôles ont été réalisés avec des cellules incubées avec du DMSO (DMSO) ou non (CTL). Les cellules ont été récupérées par grattage 6 et 24 heures après le traitement. Le taux de mortalité a été évalué au microscope optique par exclusion du bleu de trypan. Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types d'au moins cinq expériences indépendantes (*, p < 0,05 ; **, p < 0,01 ; ***, p < 0,001).

Comme dit précédemment, la technique d'exclusion du bleu de trypan a ses défauts, notamment l'évaluation de la mortalité par l'expérimentateur, la faible quantité de cellules incluses dans l'étude et une toxicité propre du colorant. De plus, les contrôles réalisés montrent une toxicité particulièrement élevée, de l'ordre de 20%, qui peut être la conséquence de la méthodologie et notamment du prélèvement par grattage. Nous avons donc décidé de valider ces résultats par une autre technique : la cytométrie en flux.

II.A.3. Evaluation de la toxicité par cytométrie en flux

Les cellules ont été traitées de la même manière mais ont été prélevées 24 heures plus tard par trypsination. La toxicité a ensuite été évaluée par un cytofluorimètre. Pour cela, nous avons utilisé l'annexine V couplée à un fluorochrome comme marqueur de la mort cellulaire. L'annexine V est une molécule qui se fixe sur les résidus phosphatidylsérine de la membrane plasmique sans toutefois avoir la capacité de traverser celle-ci. Or ces résidus sont situés du côté intracellulaire lorsque la cellule est vivante. Lors du mécanisme d'apoptose, ces résidus basculent aussi du côté extra-cellulaire. L'annexine V permet ainsi de révéler les cellules apoptotiques, ainsi que les cellules nécrotiques qui perdent leur intégrité membranaire. Le cytomètre comptabilise alors les cellules une par une et les classe en fonction de leur fluorescence (Figure 24).

Les panels A et B nous montrent ce que nous observons lors d'une mesure par cytométrie en flux. Le cytomètre classe les cellules en fonction de la fluorescence émise par l'annexine V-FITC. Les cellules dont la fluorescence dépasse le seuil M1 sont marquées significativement par l'annexine. Nous voyons que le traitement par l'ubiquinone 0 déplace la population hors du seuil M1 de manière dose dépendante.

Le panel C est la représentation statistique de ces expériences. Nous observons ici que les contrôles ont une mortalité raisonnable. La toxicité élevée des contrôles de l'expérience menée par exclusion de bleu de trypan est donc, soit intrinsèque au bleu de trypan, soit due au prélèvement par grattage. Ici, la cytométrie en flux nous a permis de révéler que la toxicité de l'Ub₀ pour les cellules Clone 9 débute déjà à la dose de 20 µM avec 20% de mortalité. Avec 40 µM d'Ub₀, les cellules Clone 9 ont une mortalité de 40% qui est plus faible que celle observée au bleu de trypan.

Néanmoins, la toxicité de l'Ub₀ pour les cellules MH1C1 est nettement plus élevée, et du même ordre que les résultats obtenus au bleu de trypan, avec 45 et 75% de mortalité aux doses de 20 et 40 µM respectivement. Par la cytométrie en flux, nous validons le fait que l'Ub₀ est plus toxique pour les cellules chez lesquelles elle induit l'ouverture du pore. Cette technique nous a permis de révéler la toxicité de l'Ub₀ à 20 µM chez les Clone 9 mais nous montre que la mortalité à 40 µM a été surestimée dans l'étude précédente. Comme nous retrouvons les mêmes résultats avec les deux méthodes pour les MH1C1, il semblerait que les écarts de 15 à 20 points observés entre ces méthodes soient la conséquence d'un effet délétère propre à notre méthodologie d'évaluation au bleu de trypan qui augmente la mortalité lorsque les cellules subissent une faible toxicité.

Cet écart disparaît lorsque la quinone provoque une forte mortalité avant le prélèvement et la coloration. Néanmoins, la vérification que l'Ub₀, inhibitrice du pore des cellules Clone 9, induit une forte toxicité chez ces cellules est pour le moins troublante.

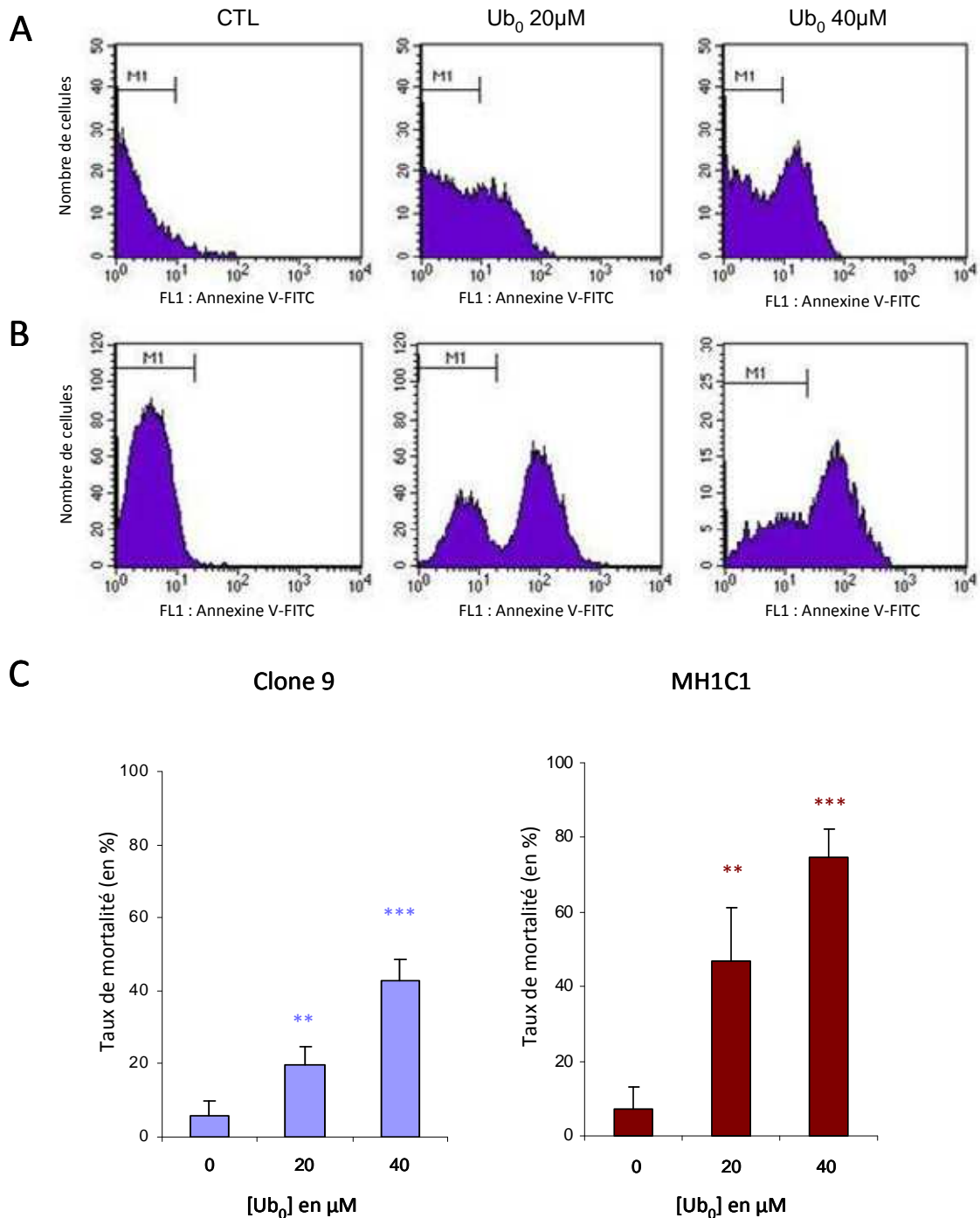


Figure 24 : Evaluation par cytométrie en flux de la mortalité cellulaire induite par l'ubiquinone 0.

Les cellules des lignées Clone 9 et MH1C1 ont été incubées 30 min, dans du milieu sans sérum, en présence de 20 et 40 µM d'Ub₀. Les contrôles ont été réalisés avec des cellules incubées dans du milieu sans sérum. Les cellules ont été récupérées par trypsination 24 heures après le traitement. La mortalité a été évaluée au cytomètre par marquage à l'annexine V couplée à du FITC. **Panel A et B** : Histogrammes représentatifs de la répartition des cellules Clone 9 (panel A) et MH1C1 (panel B) en fonction de la concentration en ubiquinone 0. Le cytomètre compte les cellules et les classe selon la fluorescence émise par le FITC (FL1). La zone M1 correspond aux cellules non marquées significativement. **Panel C** : Représentation statistique du taux de cellules dont la fluorescence est supérieur au seuil M1. Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types d'au moins 5 expériences indépendantes (**, p<0,01 ; ***, p<0,001).

Comme l'ubiquinone 0, l'ubiquinone 5 régule de manière différente le PTP chez les lignées Clone 9 et MH1C1 (Figure 13). Afin de déterminer si la toxicité observée avec l'Ub₀ chez les cellules Clone 9 est intrinsèque aux quinones ou si elle ne concerne que l'ubiquinone 0, nous avons étudié la toxicité induite par l'Ub₅ sur les lignées Clone 9 et MH1C1 par cytofluorimétrie (Figure 25).

Nous observons alors des résultats opposés à ceux obtenus avec l'Ub₀. L'ubiquinone 5 est toxique pour les cellules Clone 9 dont elle active le pore, avec une mortalité allant de 40 à 60%, mais elle épargne complètement les cellules MH1C1 dont elle ne régule pas le pore. Nous avons également obtenu les mêmes résultats par l'évaluation de la toxicité au bleu de trypan (résultats non montrés). Ces expériences semblent nous indiquer que lorsqu'une quinone active le PTP, elle induit une cytotoxicité. En revanche, l'ubiquinone 5 neutre pour les MH1C1 n'est pas toxique pour ces cellules. Nous nous sommes alors posés la question de savoir si l'inhibition du pore pouvait être également nocive.

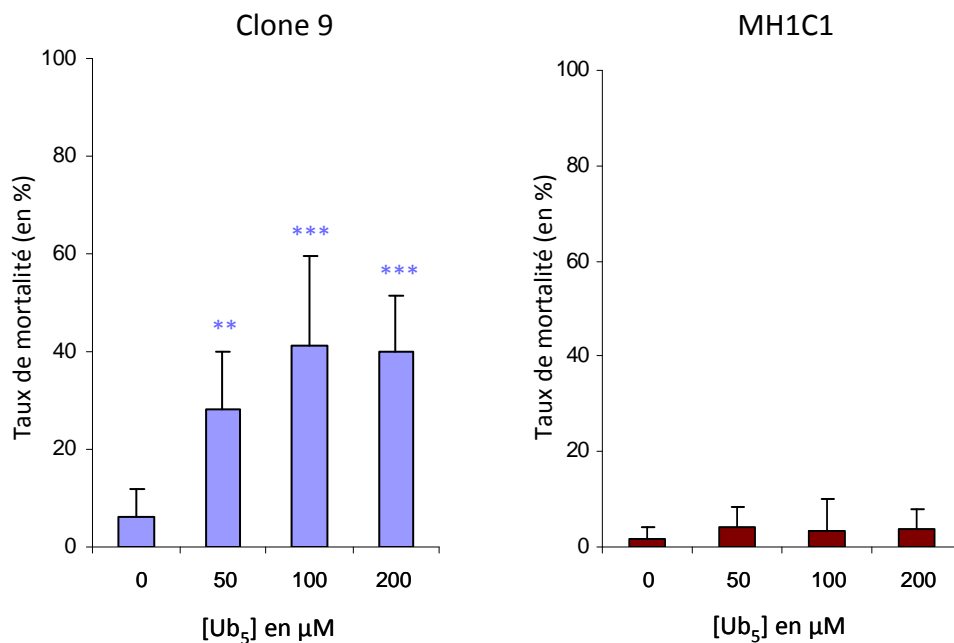


Figure 25 : Evaluation par cytométrie en flux de la mortalité cellulaire induite par l'ubiquinone 5.

Les cellules des lignées Clone 9 et MH1C1 ont été incubées 30 min, dans du milieu sans sérum, en présence de 50, 100 et 200 µM d'Ub₅. Les contrôles ont été réalisés avec des cellules incubées avec du milieu sans sérum. Les cellules ont été récupérées par trypsination 24 heures après le traitement. Le taux de mortalité a été évalué au cytomètre par marquage à l'annexine V couplée à du FITC. Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types de 5 expériences indépendantes (**, p<0,01 ; ***, p<0,001).

En effet, le cas de l'ubiquinone 0 nous démontre qu'une quinone inhibitrice peut être toxique. Or l'Ub₀ est un inhibiteur très puissant du pore. Est-ce qu'un blocage puissant de ce canal, de même que son ouverture, peut être toxique pour la cellule ? Nous avons vu que 100 μM de décyl-ubiquinone inhibent de manière plus forte le PTP des cellules Clone 9 que 40 μM d'Ub₀ (Figures 10 et 13). Nous avons donc étudié l'effet toxique de 100 μM de dUb sur les cellules Clone 9 par cytométrie en flux (Figure 26). Comme nous le voyons sur cette figure, 100 μM de dUb n'induisent aucune toxicité des cellules Clone 9. La cytotoxicité observée avec l'Ub₀ chez ces cellules n'est donc pas due à son action inhibitrice du PTP.

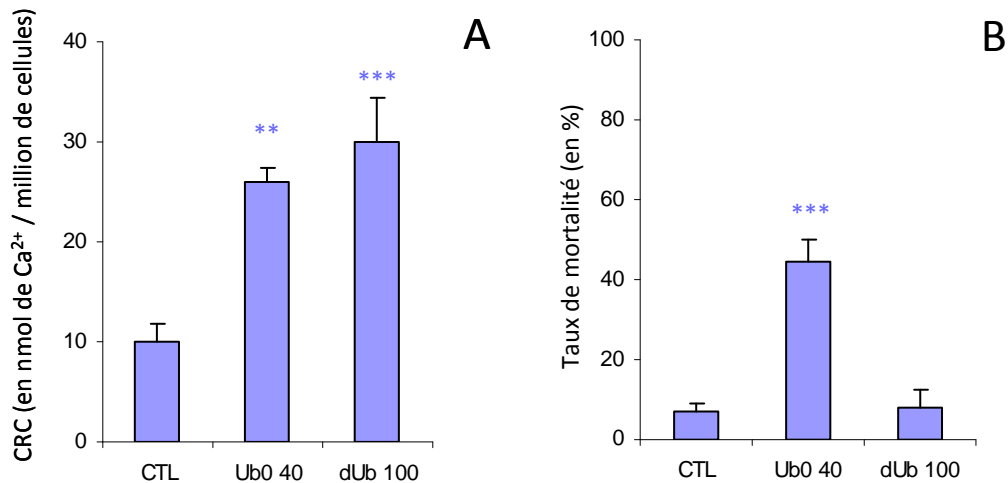


Figure 26 : Comparaison entre l'effet de 40 μM d'ubiquinone 0 et l'Effet de 100 μM de décyl-ubiquinone sur les cellules Clone 9.

Panel A : Mesure de la capacité de rétention calcique en présence de 40 μM d'ubiquinone 0 (**Ub₀ 40**) ou 100 μM de décyl-ubiquinone (**dUb 100**) selon la méthode décrite à la figure 9. **Panel B :** La toxicité induite par 40 μM d'ubiquinone 0 (**Ub₀ 40**) ou 100 μM de décyl-ubiquinone (**dUb 100**) a été visualisée par cytométrie en flux comme décrit à la figure 24. Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types de 3 expériences indépendantes (**, p<0,01 ; ***, p<0,001).

II.B. Mécanisme de la toxicité

La toxicité des ubiquinones a déjà été révélée dans la littérature [211, 212] mais pas par le mécanisme de transition de perméabilité mitochondriale. Nous avons cherché à déterminer quel rôle joue la régulation du PTP dans ce phénomène ou quel autre mécanisme des quinones peut aussi être mis en cause.

II.B.1. Une cytotoxicité médiée par le PTP

Afin de vérifier que la toxicité induite par les ubiquinones activatrices est médiée par leur régulation du PTP, nous avons réalisé des compétitions inter-quinones. Pour cela, nous avons mis en compétition l'Ub₅ avec l'Ub₁₀ chez les cellules Clone 9, et l'Ub₀ avec l'Ub₅ chez les cellules MH1C1. En effet, comme nous l'avons vu dans les figures 16 et 17, l'Ub₁₀ est capable de limiter l'effet activateur du PTP de l'ubiquinone 5 chez les cellules Clone 9. Quant à l'Ub₅, elle empêche l'effet activateur de l'Ub₀ chez les cellules MH1C1.

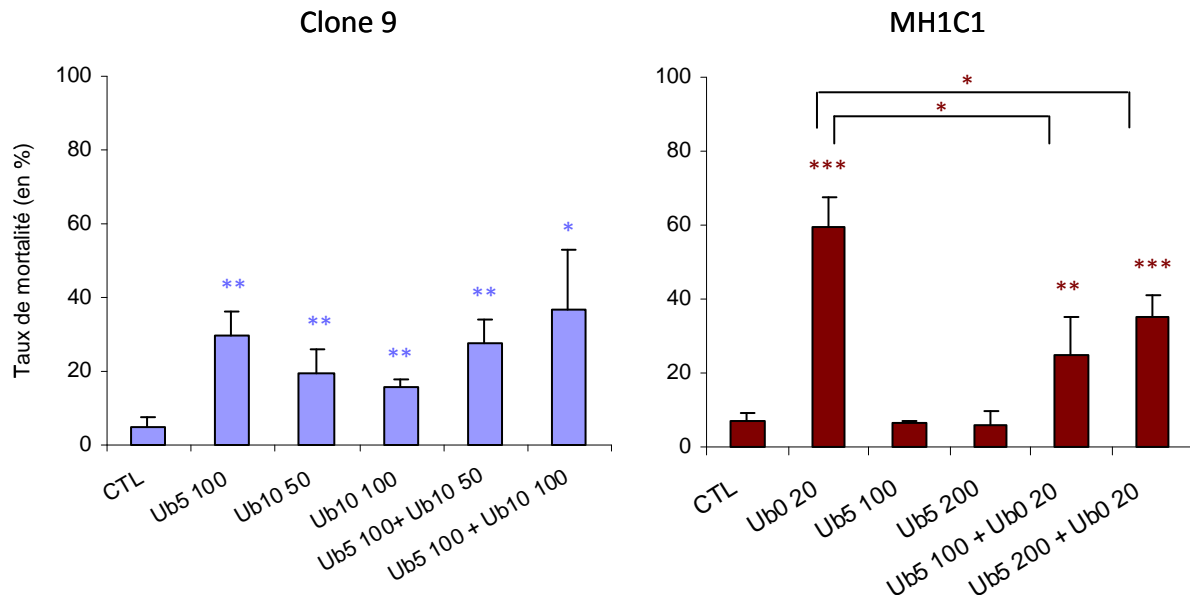


Figure 27 : Effets des compétitions inter-quinones sur la mortalité cellulaire.

Clone 9 : Les cellules ont été incubées 30 min avec du milieu sans sérum (CTL), 100 μ M d'ubiquinone 5 (Ub5 100), 50 ou 100 μ M d'ubiquinone 10 (Ub10 50 et Ub10 100) et le taux de mortalité a été évalué par la méthode décrite à la figure 24. Pour les compétitions, les cellules ont été incubées 30 min avec 50 ou 100 μ M d'ubiquinone 10 avant l'ajout de 100 μ M d'ubiquinone 5 pendant 30 min (Ub5 100 + Ub10 50 et Ub5 100 + Ub10 100). **MH1C1** : Les cellules ont été incubées 30 min avec du milieu sans sérum (CTL), 20 μ M d'ubiquinone 0 (Ub0 20), 100 ou 200 μ M d'ubiquinone 5 (Ub5 100 et Ub5 200) et le taux de mortalité a été évalué par la méthode décrite à la figure 24. Pour les compétitions, les cellules ont été incubées 30 min avec 100 ou 200 μ M d'ubiquinone 5 avant l'ajout de 20 μ M d'ubiquinone 0 pendant 30 min (Ub5 100 + Ub0 20 et Ub5 200 + Ub0 20). Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types de 3 expériences indépendantes (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

Nous avons réalisé des compétitions sur des cultures de Clone 9, en les traitant 30 minutes par 50 ou 100 μM d'Ub₁₀ puis 30 min par 100 μM d'Ub₅. Et de la même manière, nous avons fait des compétitions entre 100 ou 200 μM d'Ub₅ et 20 μM d'Ub₀ chez les cellules MH1C1 (Figure 27).

Nous voyons ici que l'Ub₅ parvient à diminuer la toxicité de l'Ub₀ sur les MH1C1 de la même manière qu'elle empêche son action activatrice du pore. En revanche, sur la lignée Clone 9, l'Ub₁₀ induit d'elle-même une légère toxicité malgré son inhibition du pore. L'Ub₁₀ ne parvient donc pas à diminuer la toxicité de l'Ub₅.

Cette expérience nous révèle que l'effet toxique de l'Ub₀ envers les cellules MH1C1 semble bien médié par son action sur le PTP mais que l'Ub₁₀, une quinone neutre envers le pore des cellules Clone 9, est aussi toxique pour ces cellules. Les ubiquinones 0 et 10 ont une toxicité propre chez les Clone 9, indépendante de leur activité sur le PTP.

Pour nous assurer que la mortalité induite par les ubiquinones activatrices est bien médiée par leur effet activateur du pore, nous avons réalisé les compétitions, comme décrites précédemment, mais en remplaçant les ubiquinones neutres par un inhibiteur du pore de référence : la CsA (Figure 28).

Nous avons déjà vu que la CsA est capable de diminuer l'ouverture du pore induite par les quinones activatrices (Figure 15). Ici, la CsA n'a aucune toxicité sur ces deux lignées et diminue la toxicité des deux quinones activatrices. Ceci nous confirme que la toxicité de l'Ub₀ envers les cellules cancéreuses MH1C1 est bien due à son induction de l'ouverture du PTP. De même, la CsA nous révèle que la toxicité de l'Ub₅ pour les Clone 9 résulte de l'ouverture du PTP puisque son action inhibitrice annule totalement la toxicité de la quinone.

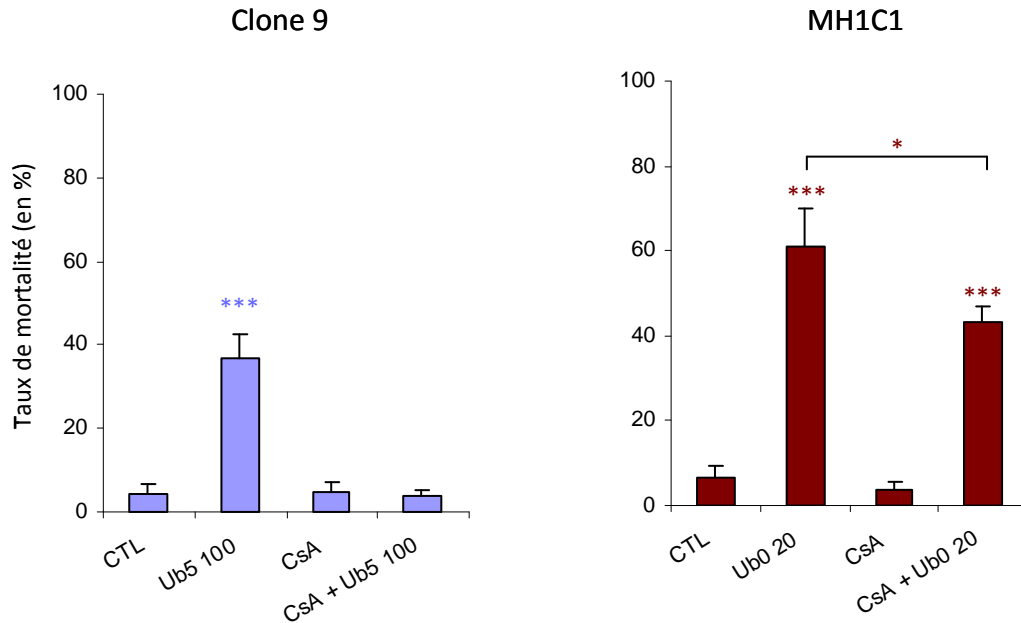


Figure 28 : Effet de la CsA sur la toxicité induite par les quinones activatrices.

Clone 9 : Les cellules ont été traitées avec du milieu sans sérum (CTL), 100 μ M d'ubiquinone 5 (**Ub5 100**) ou 1 μ M de ciclosporine A (**CsA**) selon le protocole décrit à la figure 24. Pour la compétition entre la CsA et l'ubiquinone 5 (CsA + Ub5 100), les cellules ont été traitées 30 minutes avec 1 μ M de CsA puis 30 minutes avec 100 μ M d'Ub₅. **MH1C1** : Les cellules ont été traitées avec du milieu sans sérum (CTL), 20 μ M d'ubiquinone 0 (**Ub0 20**) ou 1 μ M de ciclosporine A (**CsA**) selon le protocole décrit à la figure 24. Pour la compétition entre la CsA et l'ubiquinone 0 (CsA + Ub0), les cellules ont été traitées 30 minutes avec 1 μ M de CsA puis 30 minutes avec 20 μ M d'Ub₀. La toxicité a été évaluée 24 heures plus tard comme décrit à la figure 24. Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types de 3 expériences indépendantes (*, p < 0,05 ; ***, p < 0,001).

Si les quinones activatrices entraînent une mortalité cellulaire suite à l'ouverture du PTP, les ubiquinones inhibitrices et neutres sont également nocives pour les cellules Clone 9. Comme cette toxicité est indépendante de la régulation du PTP, nous avons cherché à déterminer d'où provient cet effet délétère.

II.B.2. Production de ROS

Bien que les ubiquinones soient souvent considérées comme des anti-oxydants [6, 16], la littérature montre qu'elles sont aussi capables de produire secondairement des radicaux libres [22]. Nous avons observé dans nos travaux que certaines quinones non activatrices du pore entraînent une toxicité chez les cellules Clone 9 mais pas chez les cellules MH1C1. Nous avons alors décidé d'estimer la variation éventuelle de la production de radicaux qu'entraînent nos quinones.

Nous avons réalisé cette étude par spectrofluorimétrie à l'aide de la sonde fluorescente H₂DCFDA. Nous avons utilisé cette sonde, qui permet d'estimer la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS) sur les cellules entières, afin d'être

au plus proche des conditions de culture. Ainsi, la production de ROS induite par toutes les quinones de notre étude a été évaluée sur les lignées Clone 9 et MH1C1 (Figure 29).

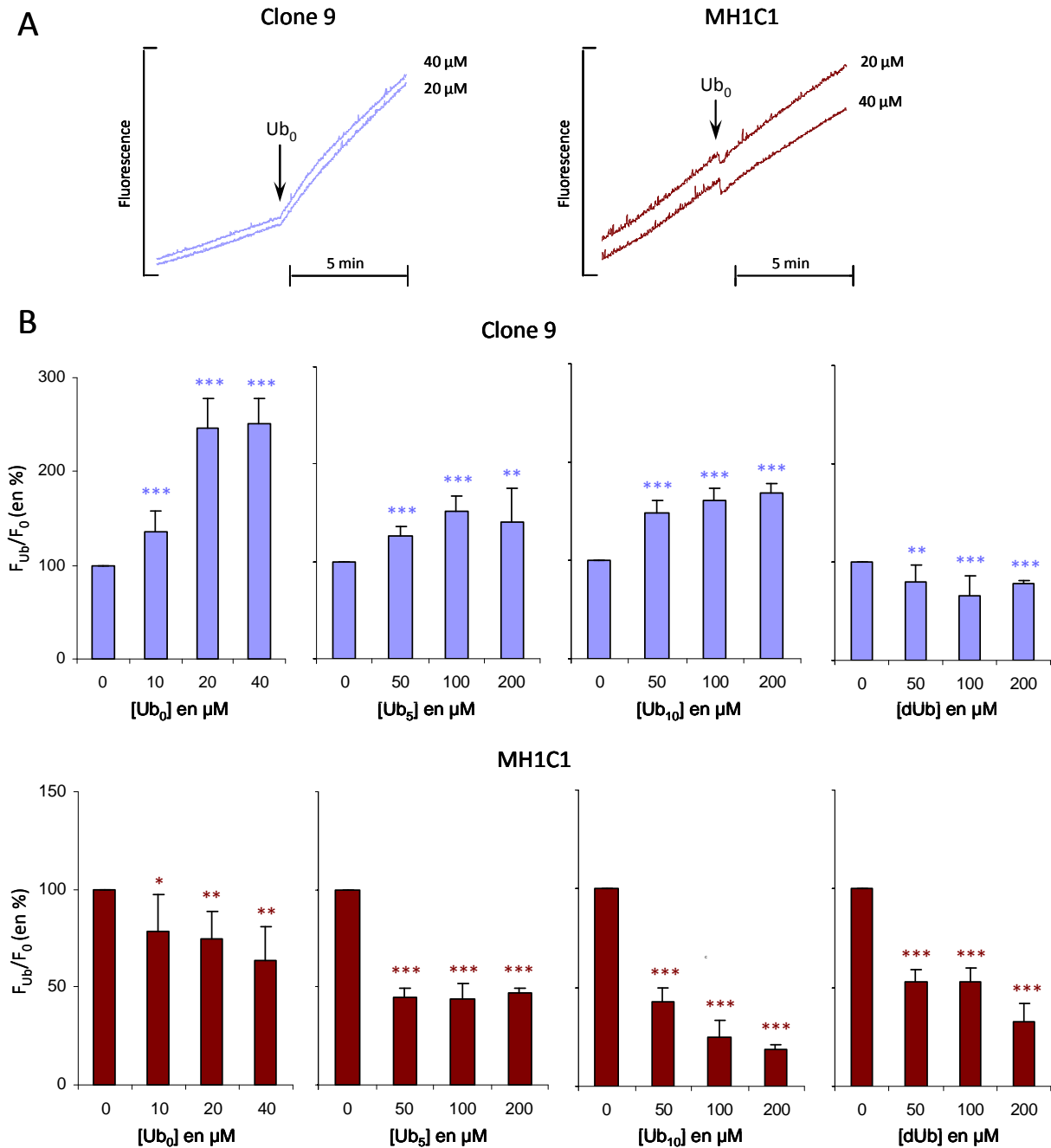


Figure 29 : Effets des ubiquinones sur la production radicalaire.

Panel A : 5 millions de cellules Clone 9 ou MH1C1 ont été incubés dans 2 ml de tampon sucrose en présence de 5 µM de H₂DCFDA. La fluorescence de la sonde est mesurée pendant 5 min par spectrofluorimétrie en absence puis en présence de différentes concentrations des ubiquinones 0. **Panel B :** Les résultats sont représentés en taux de la fluorescence émise par minute en présence de différentes concentrations des ubiquinones 0, 5, 10 et décyl-ubiquinone par rapport à la fluorescence émise par minute sans ubiquinone (F_{Ub}/F_0). Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types de 3 expériences indépendantes (*, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001).

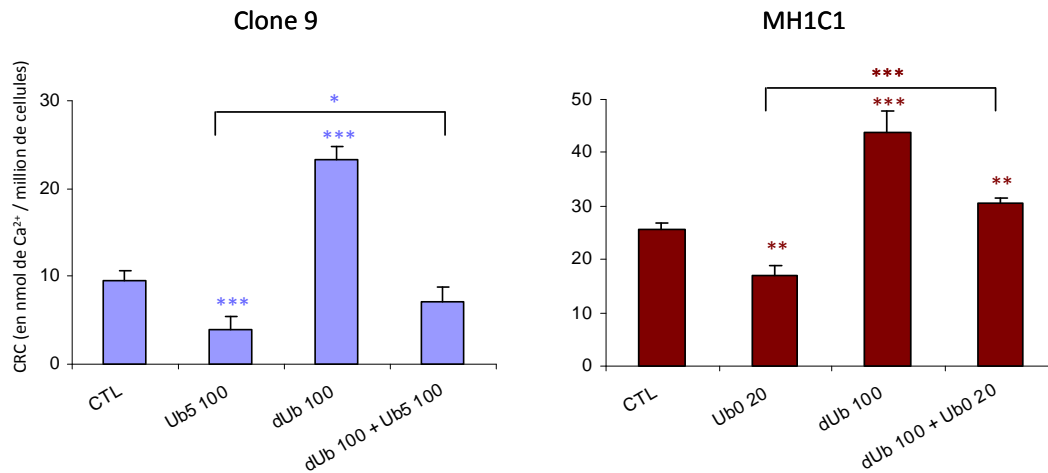
Le Panel A nous montre ce que nous avons visualisé au spectrophotomètre. Ici, nous observons que la production radicalaire basale est supérieure chez les cellules MH1C1. Sur le Panel B, nous avons normalisé les résultats en faisant le rapport entre la production radicalaire en présence des quinones et la production radicalaire basale des cellules. Nous constatons ici que les ubiquinones ont des effets différents sur la production radicalaire. Ces différences dépendent des quinones mais aussi des lignées cellulaires. Ainsi, trois des ubiquinones testées augmentent la production radicalaire chez les cellules Clone 9. L'Ub₀ est celle qui a le plus fort pouvoir oxydant avec une augmentation de ROS allant jusqu'à 2,6 fois le taux basal pour 40 µM. Les ubiquinones 5 et 10 augmentent aussi la production radicalaire, dans une moindre mesure toutefois avec des taux maximaux de 170% aux doses les plus élevées. Seule la dUb a un effet anti-radicalaire sur les hépatocytes immortalisés. En ce qui concerne la lignée cancéreuse MH1C1, toutes les quinones sans exception sont anti-oxydantes. L'Ub₁₀ est ici celle qui a le plus grand pouvoir anti-oxydant avec une baisse de la production radicalaire de plus de 80% à 200 µM.

Cet effet pro-oxydant des ubiquinones 0 et 10 sur les cellules Clone 9 pourrait expliquer pourquoi elles induisent une toxicité sur ces cellules alors qu'elles inhibent ou sont neutres envers leur PTP, et pourquoi l'Ub₁₀ est incapable d'empêcher la toxicité de l'Ub₅. Cela expliquerait également pourquoi nous ne retrouvons pas cette toxicité avec l'Ub₅ qui est anti-oxydante et neutre pour le pore des les cellules MH1C1.

Pour vérifier cela, nous avons réalisé une nouvelle compétition en utilisant la dUb, qui est anti-oxydante chez les deux lignées, pour inhiber l'effet toxique de l'Ub₅ envers les cellules Clone 9, et de l'Ub₀ envers les cellules MH1C1 (Figure 30).

Nous voyons ici que la dUb qui inhibe l'activation du PTP par l'Ub₅ et l'Ub₀, empêche aussi la toxicité de ces quinones envers les cellules Clone 9 et MH1C1 respectivement. En effet, nous voyons que cette quinone sans activité pro-radicalaire, et qui inhibe le pore des Clone 9 de manière plus puissante de l'Ub₀, n'entraîne pas de toxicité significative et inhibe complètement celle de l'Ub₅. Ceci nous suggère fortement que la toxicité observée par les quinones non activatrices du pore, sur les cellules Clone 9, est due à la production de radicaux libres.

A. CAPACITE DE RETENTION CALCIQUE



B. TOXICITE

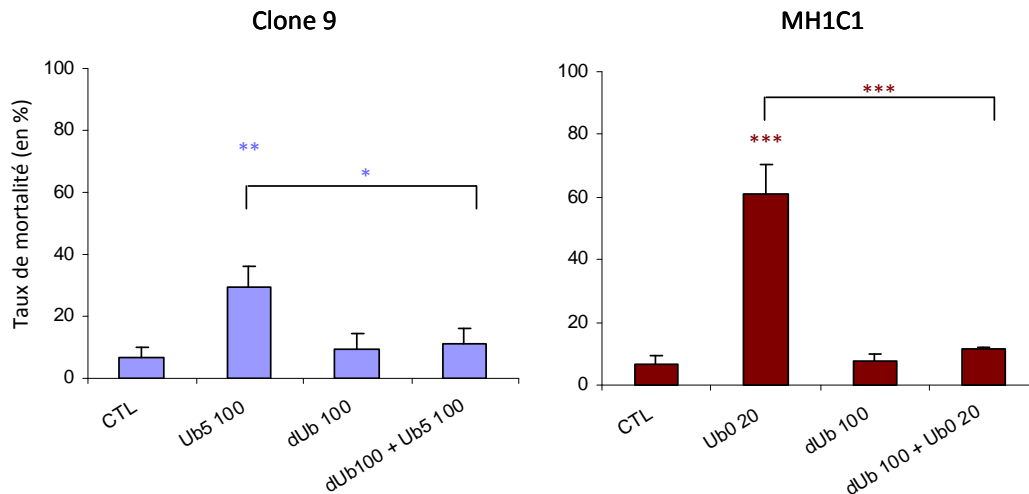


Figure 30 : Effets des compétitions entre la décyl-ubiquinone et l'ubiquinone 0 et 5 sur la capacité de rétention calcique et la mortalité cellulaire.

Panel A : Clone 9 : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des cellules Clone 9 en absence de régulateurs (CTL), avec 100 μ M d'ubiquinone 5 (Ub5 100), avec 100 μ M de décyl-ubiquinone (dUb 100). Pour les compétitions, les cellules ont été incubées 2 min avec 100 μ M de décyl-ubiquinone avant l'ajout de 100 μ M d'ubiquinone 5 (dUb 100 + Ub5 100). MH1C1 : La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des cellules MH1C1 en absence de régulateurs (CTL), avec 20 μ M d'ubiquinone 0 (Ub0 20), avec 100 μ M de décyl-ubiquinone (dUb 100). Pour les compétitions, les cellules ont été incubées 2 min avec 100 μ M de décyl-ubiquinone avant l'ajout de 20 μ M d'ubiquinone 0 (dUb 100 + Ub0 20).

Panel B : Clone 9 : Les cellules ont été incubées 30 min avec du milieu sans sérum (CTL), 100 et 200 μ M d'ubiquinone 5 (Ub5 100 et Ub5 200), 100 μ M de décyl-ubiquinone (dUb 100) et le taux de mortalité a été évalué par la méthode décrite à la figure 16. Pour les compétition, les cellules ont été incubées 30 min avec 100 μ M de décyl-ubiquinone avant l'ajout de 100 μ M d'ubiquinone 5 pendant 30 min (dUb 100 + Ub5 100). MH1C1 : Les cellules ont été incubées 30 min avec du milieu sans sérum (CTL), 20 μ M d'ubiquinone 0 (Ub0 20), 100 μ M de décyl-ubiquinone (dUb 100) et le taux de mortalité a été évalué par la méthode décrite à la figure 16. Pour les compétition, les cellules ont été incubées 30 min avec 100 μ M de dUb avant l'ajout de 20 μ M d'Ub₀ pendant 30 min (dUb 100 + Ub0 20). Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types de 3 expériences indépendantes (*, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001).

En effet, si nous regardons le tableau récapitulatif des effets des ubiquinones au niveau de la régulation du PTP, de la production radicalaire et de la mort cellulaire (Tableau III), nous pouvons voir que ces molécules ne sont toxiques que si elles induisent l'ouverture du pore ou si elles augmentent la production radicalaire.

| | Ubiquinone 0 | | | Ubiquinone 5 | | | Ubiquinone 10 | | | Décyl-ubiquinone | | |
|---------|--------------|-----|----------|--------------|-----|----------|---------------|-----|----------|------------------|-----|----------|
| | PTP | ROS | Toxicité | PTP | ROS | Toxicité | PTP | ROS | Toxicité | PTP | ROS | Toxicité |
| Clone 9 | - | + | + | + | + | + | = | + | + | - | - | - |
| MH1C1 | + | - | + | = | - | - | = | - | - | - | - | - |

Tableau III : Récapitulatif des effets des ubiquinones sur le PTP, la production radicalaire et la toxicité.
PTP : - : inhibition de l'ouverture du pore; + : induction de l'ouverture du pore; = : sans effet.
ROS : - : diminution de la production de radicaux; + : augmentation de la production de radicaux.
Toxicité : - : pas d'effet toxique; + : effet toxique.

II.B.3. Effet des anti-oxydants sur les ROS

Nous avons ensuite tenté d'apporter une preuve directe que la toxicité induite par l'Ub₀, sur les cellules Clone 9, est due à l'augmentation de la production de radicaux libres. Pour y parvenir, nous avons utilisé deux composés aux propriétés anti-radicalaires, le tiron et l'α-tocophérol, qui agissent en piégeant les radicaux libres.

Nous avons tout d'abord vérifié que ces deux anti-oxydants ont effectivement un pouvoir anti-radicalaire sur l'Ub₀ (Figure 31). Le tocophérol est l'anti-oxydant le plus puissant. Il parvient à diminuer le stress oxydant d'environ 40% à la dose de 200 μM. Quant au tiron, utilisé à 1 mM, il diminue la production radicalaire de 30%. Les deux anti-oxydants employés réduisent donc significativement la production radicalaire des quinones sans toutefois l'inhiber totalement.

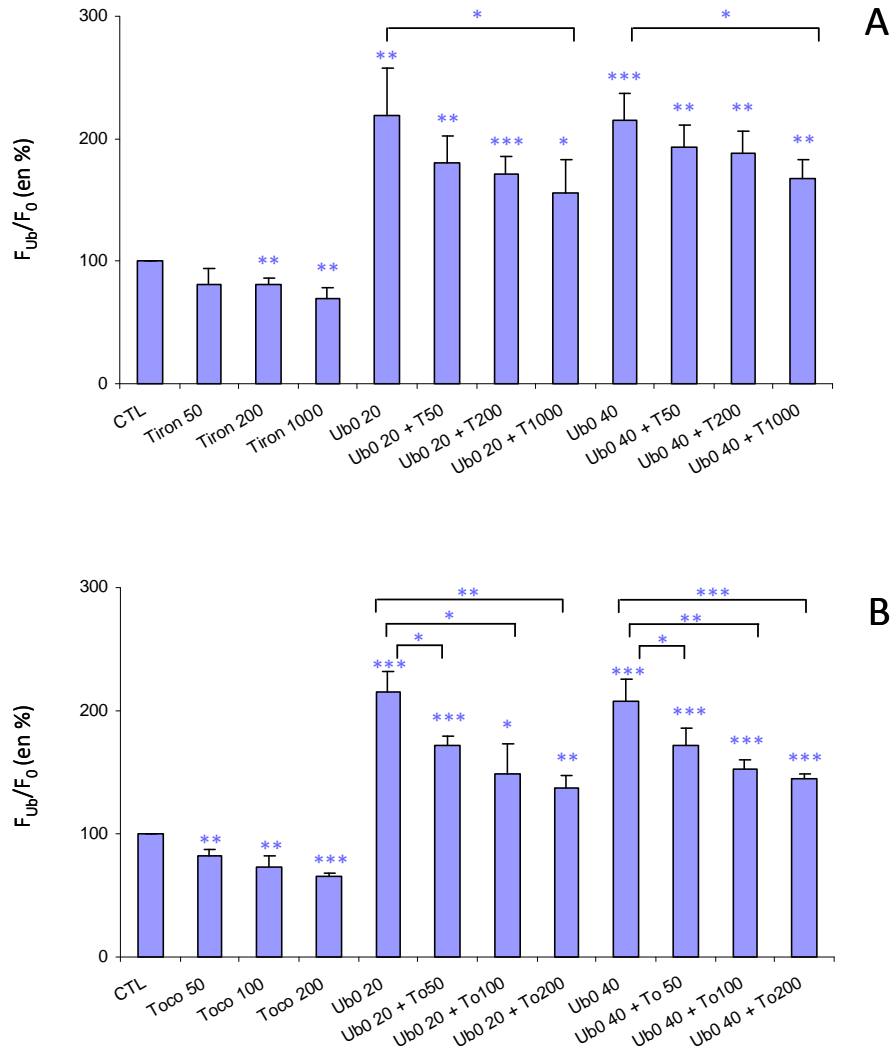


Figure 31 : Effets des anti-oxydants sur la production radicalaire induite par l'ubiquinone 0 sur les cellules Clone 9.

La production radicalaire a été mesurée comme décrit à la figure 29. Pour étudier l'action des anti-oxydants sur la production radicalaire induite par l'ubiquinone 0, nous avons mesuré la fluorescence émise par l'H₂DCFDA pendant 5 min en présence de la quinone, puis nous avons ajouté les différentes concentrations d'anti-oxydants et mesuré à nouveau la fluorescence pendant 5 min. **Panel A** : Les mesures ont été réalisées sans ubiquinone ni tiron (CTL), avec 50, 200 ou 1000 µM de tiron (Tiron 50, Tiron 200 et Tiron 1000 respectivement), avec 20 ou 40 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 20 et Ub0 40), avec 20 µM d'ubiquinone 0 puis 50, 200 ou 1000 µM de tiron (Ub0 20 + T50, Ub0 20 + T200 et Ub0 20 + T1000 respectivement), avec 40 µM d'ubiquinone 0 puis 50, 200 ou 1000 µM de tiron (Ub0 40 + T50, Ub0 40 + T200 et Ub0 40 + T1000 respectivement). **Panel B** : Les mesures ont été réalisées sans ubiquinone ni tocophérol (CTL), avec 50, 100 ou 200 µM de tocophérol (Toco 50, Toco 100 et Toco 200 respectivement), avec 20 ou 40 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 20 et Ub0 40), avec 20 µM d'ubiquinone 0 puis 50, 100 ou 200 µM de tocophérol (Ub0 20 + To50, Ub0 20 + To100 et Ub0 20 + To200 respectivement), avec 40 µM d'ubiquinone 0 puis 50, 200 ou 1000 µM de tocophérol (Ub0 40 + To50, Ub0 40 + To100 et Ub0 40 + To200 respectivement). Les résultats sont représentés en taux de production radicalaire par rapport à la fluorescence émise sans ubiquinone. La production radicalaire est mesurée sur des cellules MH1C1. Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types d'au moins 3 expériences indépendantes (*, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001).

II.B.4. Effet des anti-oxydants sur la CRC

Le stress oxydant est un facteur favorisant l'ouverture du PTP [190-198]. Or chez les cellules Clone 9, nous voyons que l'Ub₀ provoque un fort stress oxydant mais qu'elle inhibe néanmoins leur pore. Il est donc possible que la puissance de cet inhibiteur soit sous-estimée dans nos mesures de capacité de rétention calcique. Pour vérifier cela, nous avons réalisé des mesures de la CRC en fonction de la concentration d'Ub₀ en présence de tocophérol (Figure 32).

Nous voyons ici que le tocophérol seul n'a pas d'effet sur la CRC des cellules Clone 9. En revanche et contre toute attente, le tocophérol diminue l'inhibition du pore par l'Ub₀ bien que cela ne soit significatif qu'à la dose de 200 µM avec 40 µM d'Ub₀ où la CRC ne diffère plus du contrôle. Cependant, aux doses de tocophérol utilisées, l'ubiquinone 0 conserve toujours un pouvoir inhibiteur du pore bien que celui-ci soit amoindri. Les effets de 50 et 100 µM de tocophérol ont également été testés et diminuent légèrement la CRC des 20 et 40 µM d'Ub₀ (résultats non montrés).

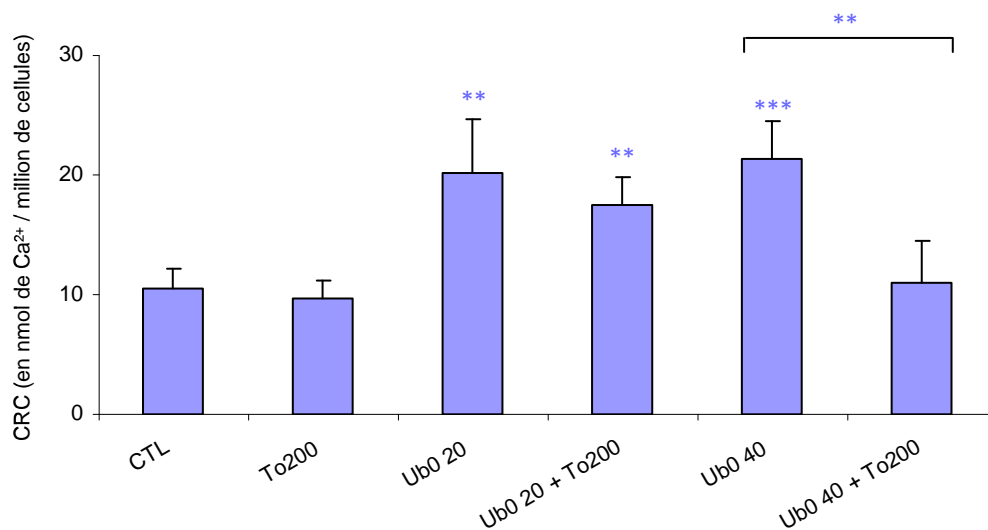


Figure 32 : Effet du tocophérol sur la régulation du PTP des cellules Clone 9 par l'ubiquinone 0.

La capacité de rétention calcique a été mesurée sur des cellules Clone 9, selon le protocole décrit à la figure 9, en l'absence de régulateurs (CTL), avec 200 µM de tocophérol (To200), avec 20 ou 40 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 20 et Ub0 40 respectivement). Pour l'étude de l'effet du tocophérol sur la régulation du PTP par l'ubiquinone 0, 200 µM de tocophérol ont été ajoutés en même temps que 20 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 20 + To200) ou 40 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 40 + To200) et la capacité de rétention calcique a été mesurée après 2 min de stabilisation. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes + écarts-types de trois expériences indépendantes (**, p<0,01 ; ***, p<0,001).

II.B.5. Effet des anti-oxydants sur la toxicité

Pour vérifier notre hypothèse selon laquelle la production de radicaux libres est à l'origine de la toxicité de l'Ub₀ envers les cellules Clone 9, nous avons réalisé une étude de la toxicité induite par cette quinone en présence de tiron ou de tocophérol. L'expérience a été réalisée comme les études de toxicité par cytofluorimétrie précédentes. Les cellules ont été traitées 30 minutes par 20 ou 40 µM d'Ub₀ en présence 200 µM de tocophérol ou d'1 mM de tiron (Figure 33).

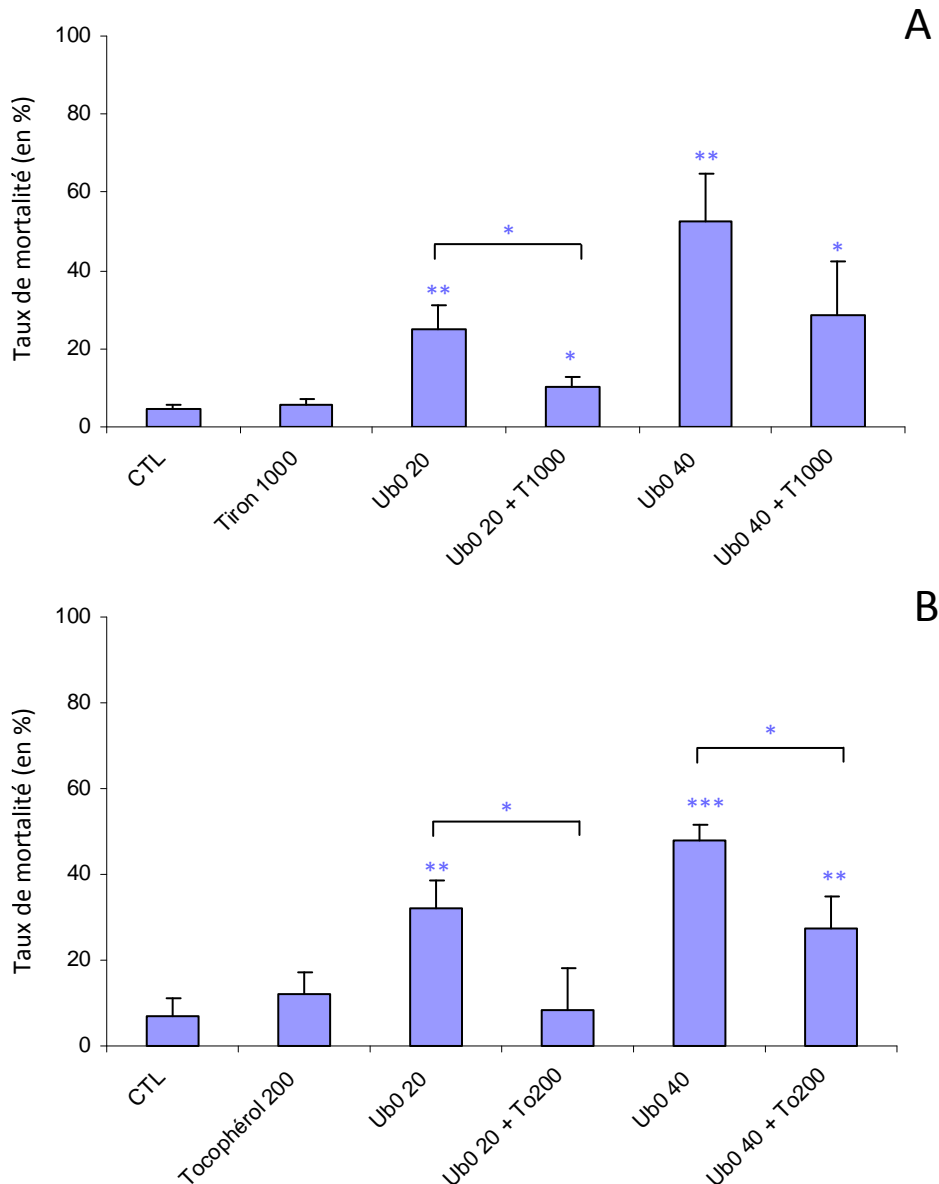


Figure 33 : Effets des anti-oxydants sur la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur les cellules Clone 9.

La mortalité cellulaire a été mesurée comme décrit à la figure 24. Pour étudier l'action des anti-oxydants sur la toxicité induite par l'ubiquinone 0, nous avons traité les cellules 30 min avec du milieu sans sérum contenant l'ubiquinone et l'anti-oxydant. **Panel A** : Les cellules ont été traitées sans ubiquinone ni tiron (CTL), avec 1000 µM de tiron (Tiron 1000), avec 20 ou 40 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 20 et Ub0 40), avec 20 µM d'ubiquinone 0 et 1000 µM de tiron (Ub0 20 + T1000 respectivement), avec 40 µM d'ubiquinone 0 et 1000 µM de tiron (Ub0 40 + T1000 respectivement). **Panel B** : Les cellules ont été traitées sans ubiquinone ni tocophérol (CTL), avec 200 µM de tocophérol (Tocophérol 200), avec 20 ou 40 µM d'ubiquinone 0 (Ub0 20 et Ub0 40), avec 20 µM d'ubiquinone 0 et 200 µM de tocophérol (Ub0 20 + To200), avec 40 µM d'ubiquinone 0 et 200 µM de tocophérol (Ub0 40 + To200 respectivement). Les résultats sont présentés sous formes de moyennes + écarts-types d'au moins 3 expériences indépendantes. (*, p<0,05 ; **, p<0,01 ; ***, p<0,001)

Le panel A nous montre l'effet du tocophérol. Nous voyons ici que les 200 μM de tocophérol utilisés permettent de réduire significativement la toxicité induite par 20 et 40 μM d'ubiquinone 0. Cette dose de tocophérol permet même réduire totalement la toxicité des 20 μM d'Ub₀. Le panel B nous montre que le tiron diminue de la même manière la toxicité de la quinone.

II.C. Discussion

II.C.1. Une cytotoxicité médiée par le PTP

Nous avons vu que, comme il a déjà été observé pour d'autres activateurs du PTP [233, 239, 241, 255, 256], les ubiquinones activatrices sont capables d'induire la mort cellulaire par l'intermédiaire de l'ouverture du pore. Cette toxicité observée pour l'Ub₅ chez les cellules Clone 9, et l'Ub₀ pour les cellules MH1C1, est strictement dépendante de leur activité inductrice de l'ouverture du PTP. En effet, l'Ub₀ n'induit pas de production radicalaire chez les cellules MH1C1, et l'Ub₅, bien que générant des radicaux libres chez les cellules Clone 9, devient non toxique lorsqu'elle est additionnée de CsA ou de dUb.

Cependant, si les quinones activatrices sont toujours toxiques pour les cellules, les quinones inhibitrices ou neutres peuvent aussi avoir une toxicité. Ainsi, les ubiquinones 0 et 10 provoquent une forte toxicité sur les cellules Clone 9. Nous avons révélé que cette toxicité est indépendante de l'activité des ubiquinones sur le pore et qu'elle est directement liée à la production radicalaire qu'elles induisent.

II.C.2. Une production radicalaire différente selon l'environnement cellulaire

Nous avons observé que les ubiquinones sont pro ou anti-oxydantes. Toutefois, cette activité n'est pas imputable aux propriétés intrinsèques de chaque quinone puisque la même quinone peut être anti-oxydante sur une lignée et pro-oxydante sur une autre. Mais, si l'activité oxydante des quinones est différente d'une lignée à l'autre, nous démontrons que celle-ci est indépendante de l'action régulatrice du PTP. Dans le cas des cellules Clone 9, les ubiquinones 0, 5 et 10 sont toutes trois pro-oxydantes et sont inhibitrice, activatrice et neutre pour le PTP respectivement. A l'inverse, chez les cellules

MH1C1, les ubiquinones 0, 5 et la décyl-ubiquinone sont toutes anti-oxydantes bien qu'elles soient activatrice, neutre et inhibitrice du pore respectivement.

Notre étude ayant porté sur deux lignées hépatocytaires de rat, les différentes productions de radicaux ne sont pas tissulaires mais dépendraient plutôt de l'état cancéreux ou immortalisé des cellules. Il a déjà été observé que les cellules subissant une transformation néoplasique ont un niveau de production basal de ROS plus élevé que leurs homologues immortalisés [285]. Effectivement, nous observons dans les conditions contrôles de nos expériences que les cellules cancéreuses MH1C1 produisent en moyenne 2,4 fois plus de radicaux que les cellules immortalisées Clone 9 (Figure 29, Panel A).

Il est alors possible que l'activité oxydante des ubiquinones soit liée au potentiel oxydo-réducteur de leur environnement. De plus, le dosage de l'état rédox des quinones et de l' α -tocophérol endogènes des cellules MH1C1 et Clone 9, par une technique de chromatographie liquide haute performance couplée à une détection électrochimique [286], réalisé au laboratoire de Louis Casteilla, nous montre qu'il y a des différences selon les lignées (Tableau IV). Ce dosage nous a révélé que seules les cellules MH1C1 possèdent de l' α -tocophérol réduit et que seules les cellules Clone 9 possèdent de l'ubiquinone 45 oxydée. Cette composition favorise probablement le pouvoir oxydant des quinones dans les cellules Clone 9 et, à l'inverse, leur pouvoir réducteur dans les cellules MH1C1 par un mécanisme d'oxydo-réduction entre les ubiquinones et le tocophérol intracellulaire. Ainsi, de même que pour leur régulation du PTP, il semble nécessaire de tester leur activité oxydante sur chaque lignée avant de les considérer comme pro ou anti-oxydante.

| | α -tocophérol réduit | Ub ₃₀ réduite | Ub ₃₀ oxydée | Ub ₄₅ réduite | Ub ₄₅ oxydée |
|---------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|-------------------------|
| MH1C1 | 1427 | 1083 | 0 | 623 | 0 |
| Clone 9 | 0 | 612 | 0 | 667 | 331 |

Tableau IV : Dosage de composants cellulaires (nmol/g de protéines).
Résultats d'une expérience.

II.C.3. Une toxicité indépendante due aux radicaux libres

Les ROS sont de puissants inducteurs de l'ouverture du PTP [189, 191-196]. Une étude a montré que la toxicité induite par les ROS au niveau des mitochondries peut être totalement prévenue par la CsA, suggérant ainsi que la toxicité des radicaux libres est médiée par le PTP [189]. Cependant, nos résultats montrent que les radicaux libres peuvent conduire à une mort cellulaire PTP indépendante. En effet, chez les cellules Clone 9, l'Ub₀ produit des radicaux libres. Bien que son pouvoir inhibiteur du pore soit supérieur à son pouvoir inducteur secondaire au ROS, cette quinone entraîne une toxicité relativement élevée. A 20 µM, la toxicité est uniquement imputable aux radicaux libres car l'addition d'α-tocophérol, bien que n'inhibant pas totalement la production radicalaire, empêche complètement l'induction de la mortalité cellulaire. Ceci nous suggère également que la toxicité radicalaire soit dépendante d'un seuil de production.

L'Ub₅ produit aussi des radicaux dans les cellules Clone 9, mais cette génération de radicaux est insuffisante à l'induction d'une toxicité car la CsA inhibe totalement cette toxicité comme le montre la figure 26. De plus, l'α-tocophérol diminue la génération de ROS de l'Ub₀ chez les cellules Clone 9 de manière dose dépendante. Or cet effet dose dépendant ne se retrouve pas dans l'inhibition de la toxicité (résultats non montrés).

Ainsi, s'il est connu que l'ouverture du pore induit la génération de radicaux libres [287], nous voyons que les radicaux libres seuls peuvent induire la mort des cellules, et cela même quand l'ouverture du pore est inhibée. L'ouverture en configuration à haute conductance du PTP pourrait donc être, en réalité, un signal de mort cellulaire dont les messagers seraient les radicaux libres.

Nous avons mesuré la même production radicalaire avec 20 et 40 µM d'Ub₀ alors que les 40 µM induisent une toxicité supérieure. De plus, le tiron et le tocophérol, qui diminuent de la même façon la production radicalaire de 20 et 40 µM d'Ub₀, inhibent complètement la toxicité des 20 µM d'Ub₀ mais pas des 40 µM. Ceci nous indique que la production radicalaire n'est impliquée que dans une partie de la toxicité induite par cette forte dose d'Ub₀ sur les cellules Clone 9. Il a été rapporté dans la littérature que l'arylation par les quinones a un effet toxique [212, 288] et notamment chez les hépatocytes de rat [293]. Cela pourrait expliquer la mortalité résiduelle des 40 µM d'Ub₀ en présence d'anti-oxydant. Il est cependant possible, qu'étant donné le caractère hautement lipophile des ubiquinones, nous ne mesurons pas totalement l'activité pro ou

anti-radicalaire des quinones ou de l' α -tocophérol avec la sonde H₂DCFDA. Ce qui pourrait également expliquer que 20 et 40 μ M d'Ub₀ produisent la même quantité de radicaux libres dans nos mesures.

II.C.4. Un site d'action sensible à l'état rédox des quinones ?

La mesure de la capacité de rétention calcique en présence d'ubiquinone et de tocophérol nous a montré un résultat inattendu. Si nous pouvions nous attendre à voir l'effet de la quinone augmenter du fait de la diminution de la production radicalaire, il s'avère que nous avons obtenu des résultats opposés (Figure 32). Comme cet effet du tocophérol n'apparaît pas lors des mesures de CRC sans ubiquinone, nous en déduisons que le tocophérol n'agit pas directement sur la régulation du pore mais uniquement sur l'action inhibitrice de l'Ub₀. Une étude a montré que l'Ub₀ est capable de se lier aux résidus thiols de deux protéines mitochondriales de pancréas de rat : la α -cétoglutarate déshydrogénase et la pyruvate déshydrogénase [288]. Les auteurs montrent que l'Ub₀ peut se lier à ces protéines mais pas l'Ub₅ ni l'Ub₁₀. En revanche, ces deux autres quinones sont capables d'empêcher la fixation de l'Ub₀ sur la α -cétoglutarate déshydrogénase mais pas sur la pyruvate déshydrogénase. Nous ne pouvons dire si ces protéines sont candidates à être les sites d'action des quinones sur le pore, puisque l'activité régulatrice des quinones n'a pas été testée dans cette étude. Cependant, il est intéressant de constater que l'interaction de l'Ub₀ avec ces protéines est dépendante de l'état d'oxydo-réduction des partenaires. Ainsi, l'addition de tocophérol dans le milieu pourrait diminuer l'effet inhibiteur de l'ubiquinone 0 en empêchant son interaction par la réduction de la quinone ou de son site d'action.

La détermination de la sensibilité de l'ouverture du pore par les quinones activatrices en présence de tocophérol pourrait nous donner une information supplémentaire quant au mécanisme de l'interaction des quinones avec leur site d'action.

III. Une toxicité sélective

Nous avons vu que les différentes régulations du PTP par les quinones entraînent différentes toxicités sur les lignées hépatocytaires. Mais jusqu'à présent, les cultures cellulaires ont été traitées de manière totalement indépendante, dans des milieux de culture différents. Pour vérifier que la toxicité observée est strictement sélective envers une lignée, indépendamment des conditions de traitement, de culture, de temps d'incubation et autres conditions pouvant jouer un rôle dans ce phénomène, nous avons réalisé une étude de la toxicité induite par l'Ub₀ sur des co-cultures de cellules cancéreuses MH1C1 et immortalisées Clone 9.

III.A. Technique de marquage membranaire

Afin de différencier les types cellulaires dans les co-cultures, nous avons choisi de marquer les cellules Clone 9 avec un fluorochrome membranaire, le PKH26. Ce colorant se fixe sur les membranes cytoplasmiques et se transmet des cellules mères aux cellules filles.

Les cellules sontensemencées 24 heures avant le traitement puis incubées 24 heures après. Nous avons donc marqué les cellules Clone 9 avec quatre différentes concentrations de PKH26 puis nous avons évalué le maintien de la fluorescence membranaire sur 48 heures par cytofluorimétrie (Figure 34). La figure représente ici la visualisation de l'intensité de la fluorescence du PKH26 au cours du temps. Nous voyons ici que seule la concentration de 10⁻⁵M de PKH26 permet d'obtenir un marquage intense et stable sur 48 heures.

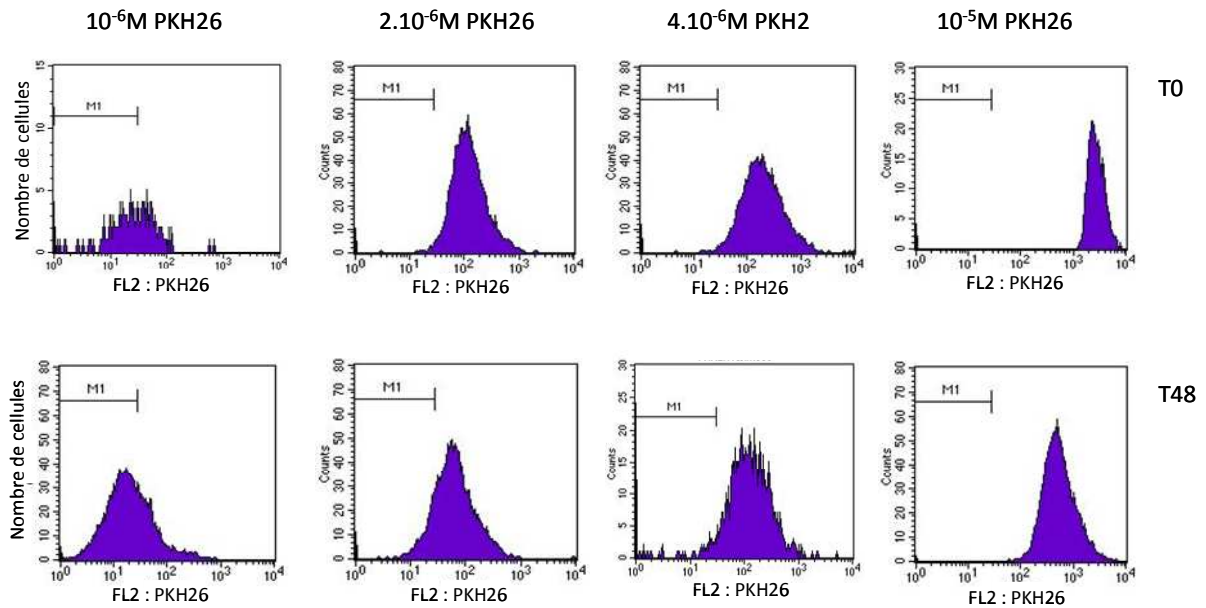


Figure 34 : Intensité du marquage PKH26 au cours du temps.

2 millions de cellules Clone 9 ont été marqués par 10^{-6} , 2.10^{-6} , 4.10^{-6} ou 10^{-5} M de colorant membranaire PKH26. L'intensité du marquage a ensuite été évaluée au cytomètre, directement après le marquage (**T0**) ou 48 heures après ensemencement des cellules (**T48**). Les résultats sont représentés sous formes d'histogrammes présentant la répartition des cellules Clone 9 en fonction de l'intensité de la fluorescence du PKH26 (FL2). La zone M1 correspond aux cellules non marquées significativement.

Le colorant se fixe sur la membrane cytoplasmique et le marquage s'effectue dans un tampon contenant de l'éthanol. Tout cela pouvant éventuellement fragiliser les cellules, nous avons vérifié que le marquage obtenu par 10^{-5} M de PKH26 n'a aucune toxicité propre par cytométrie en flux (Figure 35, Panel A). Les cellules Clone 9 marquées avec du PKH26 n'ont pas de toxicité plus élevée que les cellules Clone 9 contrôles.

Nous avons également vérifié que le marquage des cellules n'a aucune influence sur la régulation du pore. Pour cela, nous avons effectué le marquage d'une grande quantité de cellules Clone 9, puis nous avons mesuré la capacité de rétention calcique de ces cellules 48 heures plus tard. Nous avons comparé ces mesures à la CRC de cellules contrôles ensemencées en même temps et en même quantité (Figure 35, Panel B). Nous avons alors constaté que la coloration membranaire par 10^{-5} M de PKH26 n'a pas d'influence sur la CRC des cellules.

Les cellules Clone 9 et les cellules MH1C1 ne sont pas cultivées dans les mêmes milieux de culture. Afin de choisir le milieu de culture le mieux adapté à nos conditions de co-culture, nous avons ensemencé chaque lignée dans les deux milieux et nous avons comparé leur courbe de croissance et leur viabilité au bout de 72 heures (résultats non montrés). Il s'est avéré que les cellules Clone 9 se sont bien adaptées au milieu F12K qui permet la culture des MH1C1. A l'inverse, la croissance des cellules MH1C1 a nettement diminué dans le milieu de culture des cellules Clone 9, le DMEM. Nous n'avons relevé aucune toxicité particulière des deux lignées dans chaque milieu. Nous avons donc choisi de cultiver nos co-cultures dans le milieu de culture habituel des cellules MH1C1.

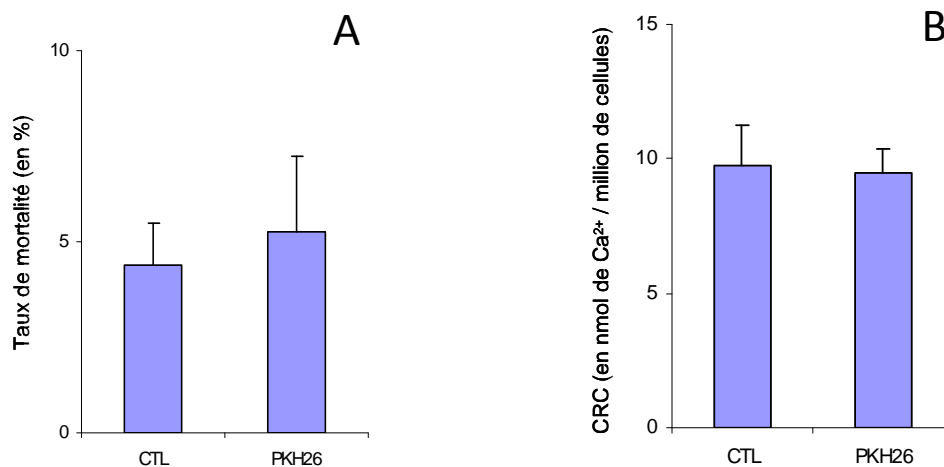


Figure 35 : Toxicité et effet sur la capacité de rétention calcique du marquage PKH26.

Panel A : Après marquage des cellules Clone 9 par 10^{-5} M de PKH26, les cellules ont été ensemencées et ont incubé 48 heures. La mortalité a ensuite été évaluée par cytométrie comme décrit à la figure 24. **Panel B :** 2 millions de cellules Clone 9 ont été marqués par 10^{-5} M de PKH26. Les cellules ont ensuite été mises en culture 48 heures puis leur capacité de rétention calcique a été mesurée comme décrit à la figure 1. Les résultats sont représentés sous la forme des moyennes + écarts-types de 3 expériences indépendantes.

III.B. Co-culture

III.B.1. Microscopie confocale

Les cellules Clone 9 marquées avec du PKH26 et les cellules MH1C1 ont été ensemencées 24 heures avant leur traitement par 10, 20, 30 et 40 μ M d'ubiquinone 0. La mortalité a ensuite été évaluée simultanément par observation de la fluorescence au microscope confocal (Figure 36).

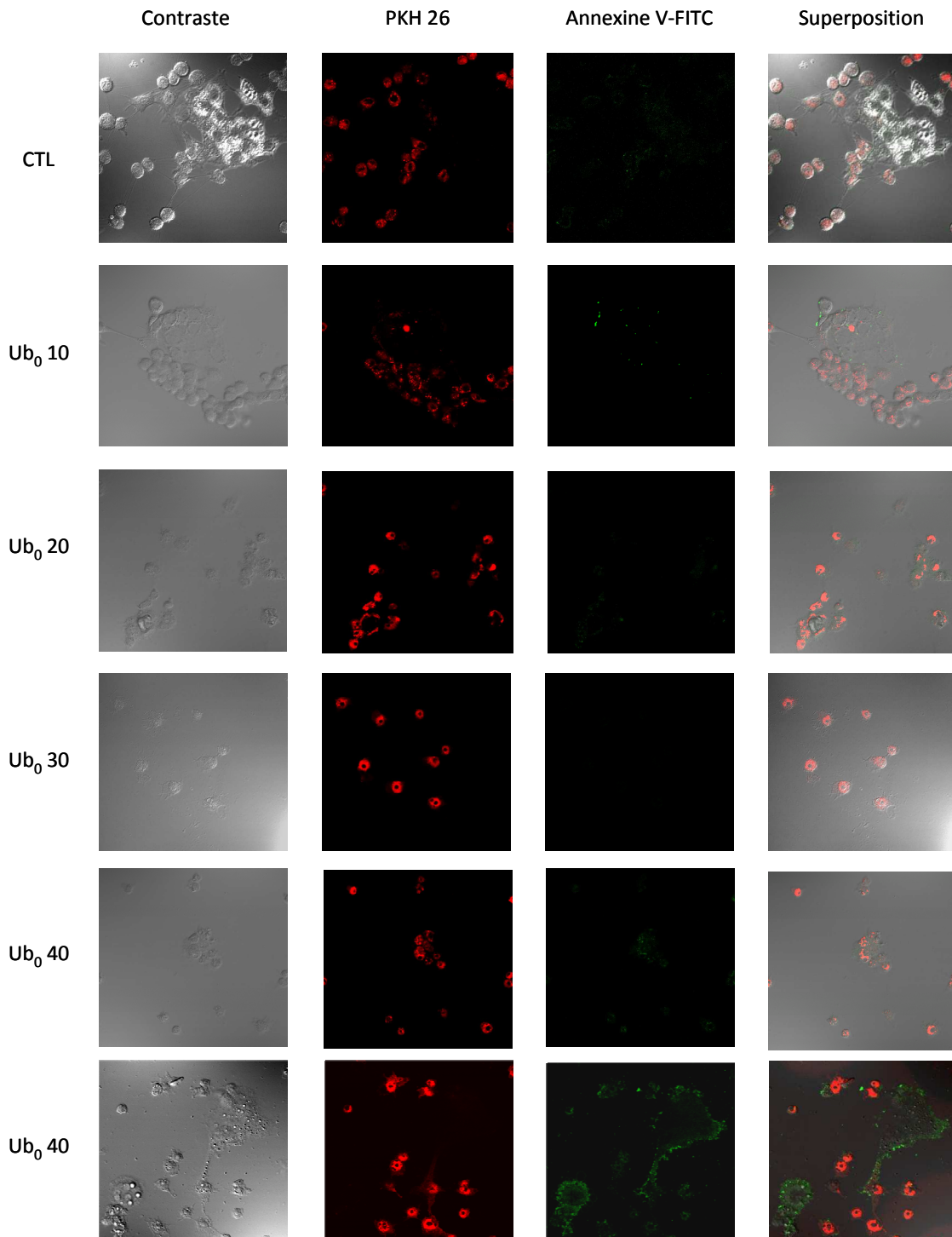


Figure 36 : Visualisation par microscopie confocale de la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures.

Les cellules MH1C1 et les cellules Clone 9 marquées avec du PKH26 ont été ensemencées sur des lamelles 24 heures avant un traitement sans (CTL) ou avec 10, 20, 30 et 40 μM d'Ub₀ (Ub₀ 10, Ub₀ 20, Ub₀ 30 et Ub₀ 40 respectivement). Après 24 heures, les cellules sont recouvertes avec un tampon contenant de l'annexine V-FITC puis sont observées au microscope confocal avec un grossissement de 63. Les images sont des photographies du contraste de phase, de la fluorescence rouge émise par le PKH26, et de la fluorescence verte émise par le FITC. Les photographies ont ensuite été superposées informatiquement. Les images sont représentatives de ce que nous avons observé lors de 4 expériences indépendantes.

Nous pouvons observer sur cette figure deux types de résultats. Tout d'abord, pour les conditions contrôles et avec 10 μM d'Ub₀, les deux lignées cellulaires ne souffrent d'aucune toxicité significative. Ensuite, aux concentrations de 20, 30 et 40 μM , l'Ub₀ devient toxique pour les deux lignées. Cette toxicité, plus que par la fluorescence verte de l'annexine V-FITC, se remarque par la faible densité cellulaire. Nous voyons que dans ces conditions, la quantité de cellules Clone 9 a diminué d'environ un tiers pour ces trois concentrations. En revanche, les cellules MH1C1 disparaissent pratiquement totalement des images. Pour la condition avec 40 μM d'Ub₀ nous avons sélectionné deux panels d'images. Celle située au-dessus est représentative de ce que nous avons observé au microscope. Celle du dessous est une image non représentative, mais où nous avons pu photographier des cellules MH1C1. Néanmoins, celles-ci sont fortement marquées par l'annexine V-FITC.

Ces résultats, bien que montrant une toxicité amplifiée, sont en accord avec ceux que nous avons obtenus précédemment sur les cultures simples.

III.B.2. Cytomètre

Pour une étude statistique de la toxicité induite par l'Ub₀ sur les co-cultures, nous avons réalisé une étude par cytométrie en flux. Nous avons procédé comme décrit ci-dessus mais nous avons analysé le surnageant et le tapis cellulaire par cytométrie en flux (Figure 37).

Sur le Panel A, nous pouvons visualiser les particules d'un échantillon réparti selon leur taille (FSC) et leur densité (SSC). Nous avons alors sélectionné une population homogène (R1) pour éliminer les débris cellulaires de l'étude statistique. Le Panel B nous donne la répartition de cette population en fonction de la fluorescence du marqueur PKH26. Nous pouvons voir ici que la population de cellules MH1C1 est non marquée, avec une fluorescence ne dépassant pas le seuil M1, et que la population Clone 9 est fortement marquée. Sur le Panel C, nous observons la répartition des cellules selon les émissions fluorescentes de l'annexine V-FITC (FL1) et du PKH26 (FL2) en fonction des doses d'ubiquinone 0 utilisées lors du traitement.

La figure 38 est la représentation statistique des taux de mortalité obtenus par cette expérience. Nous voyons que la mortalité devient significative pour les deux lignées à la dose de 20 μM et qu'elle augmente avec les concentrations d'ubiquinone 0. Ainsi, la mortalité atteint un taux de 82% pour les cellules MH1C1 et 38% pour les cellules Clone

9 à la dose de 40 μM . La toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur les co-cultures est toujours nettement plus élevée pour les cellules cancéreuses MH1C1.

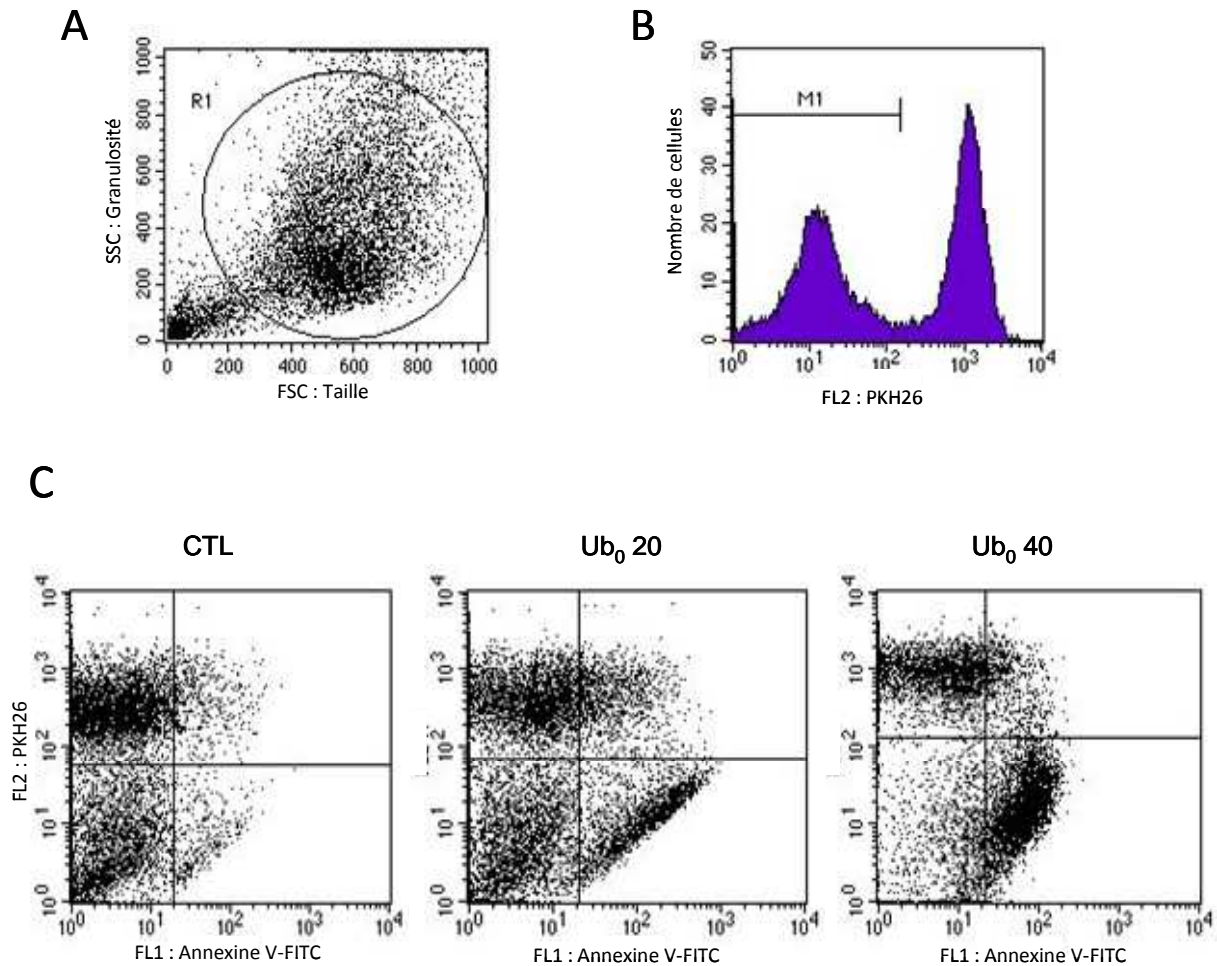


Figure 37 : Visualisation par cytométrie en flux de la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures de cellules Clone 9 et MH1C1.

Des cellules Clone 9 marquées avec le colorant PKH26 et des cellules MH1C1 ont été ensemencées ensemble puis traitées 24 heures plus tard avec du milieu sans sérum (CTL) ou du milieu sans sérum contenant 20 ou 40 μM d'ubiquinone 0 (Ub₀ 20 et Ub₀ 40 respectivement). La toxicité a été évaluée 24 heures plus tard par cytométrie en flux comme décrit à la figure 24. **Panel A** : Visualisation des échantillons cellulaires en fonction de la densité (SSC) et de la taille (FSC). La région R1 correspond à la population cellulaire étudiée. **Panel B** : Répartition de la population R1 en fonction du marquage membranaire au PKH26 (FL2). M1 correspond aux cellules non marquées significativement. **Panel C** : Répartition de la population R1 en fonction du marquage membranaire (FL2) et du marquage au FITC (FL1).

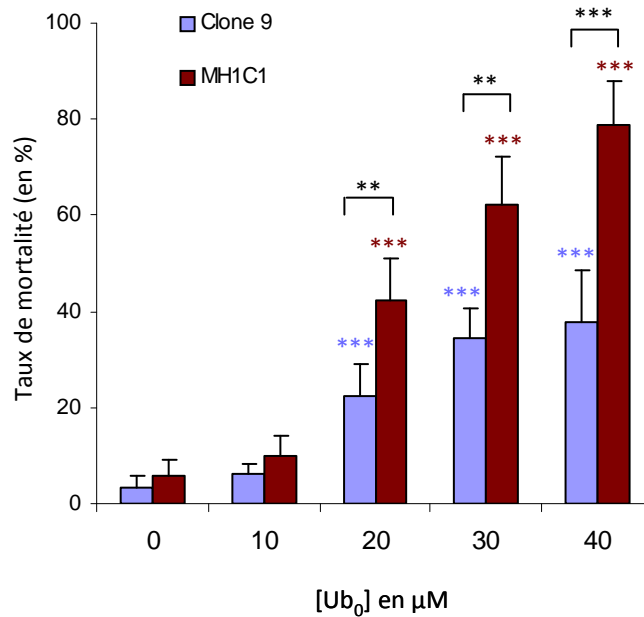


Figure 38 : Toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures de cellules Clone 9 et MH1C1.

Les co-cultures de cellules Clone 9, marquées au PKH26, et MH1C1 ont été traitées par différentes concentrations d'ubiquinone 0 comme décrit à la figure 24. La mortalité a ensuite été évaluée par la méthode décrite à la figure 37. Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes + écarts-types d'au moins 5 expériences indépendantes (**, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

III.C. Discussion

La mise en co-culture des cellules MH1C1 et Clone 9 nous a permis de démontrer que les variations de régulation précédemment observées sont strictement intrinsèques aux cellules étudiées. En effet, les deux lignées ont été cultivées, incubées, traitées, prélevées et analysées de la même manière. Au sein des co-cultures, que cela soit par microscopie ou cytométrie, nous avons vu que l'ubiquinone 0 est capable d'induire une toxicité ciblée sur la lignée pour laquelle elle entraîne l'ouverture du pore. La compréhension du mécanisme entraînant la variation de la régulation du PTP par les analogues de l'ubiquinone présente donc un intérêt certain pour les thérapies nécessitant une destruction cellulaire spécifique telles que la chimiothérapie anticancéreuse. Cependant, il est peu probable que les quinones seules servent de traitement du fait de leur toxicité aspécifique pour certaines cellules. A ce propos, l'addition d'un anti-oxydant lors du traitement par l'ubiquinone 0 des co-cultures devrait être testée pour en mesurer l'intérêt. Il faudra toutefois vérifier que cet anti-oxydant ne diminue pas l'action de cette quinone sur le PTP des cellules cancéreuses MH1C1 comme c'est le cas pour les cellules

Clone 9 (Figure 32). De plus, le tableau II, répertoriant toutes les données connues sur l'activité régulatrice du pore de l'Ub₀, nous montre que celle-ci peut induire la transition de perméabilité mitochondriale sur au moins une lignée saine.

Comme nous l'avons vu, les cellules MH1C1 et Clone 9 sont originellement très proches. La différence majeure entre les deux est leur type de transformation : l'une est cancéreuse et l'autre est immortalisée. Bien qu'elle ne le démontre pas, notre étude suggère une modification de la régulation du PTP par le site d'action des quinones au cours de la transformation cellulaire. Cependant, nos travaux ne nous permettent pas de déterminer si les mécanismes responsables de ce phénomène de variation de la régulation du PTP se situent à un niveau métabolique ou constitutif.

Nos résultats nous montrent qu'indépendamment de l'utilisation de régulateurs, le pore des lignées hépatocytaires que nous avons étudiées a des sensibilités différentes au calcium (Figures 10, 12 et 21). Ainsi, le PTP des hépatocytes fraîchement isolés de foie de rat demande 6 fois plus de calcium pour s'ouvrir que celui des hépatocytes de rat Clone 9 qui lui-même nécessite 3 fois moins de calcium que le pore des cellules MH1C1. De même, l'amplitude de la réponse à la ciclosporine A, bien qu'allant toujours dans le même sens inhibiteur, varie selon la lignée (Figure 15). Ceci nous montre bien qu'il y a des différences entre ces lignées qui ont un impact sur la transition de perméabilité mitochondriale.

Au niveau métabolique, il est admis que les cellules cancéreuses présentent un métabolisme plus glycolytique que les cellules saines, ce qui leur permet notamment de survivre dans des conditions d'hypoxie au sein des tumeurs [289]. Elles possèdent également un métabolisme oxydatif bouleversé avec une production accrue de radicaux [285]. Nous avons également vu que le contenu endogène en quinones varie selon la lignée (Tableau IV). Il avait déjà été observé une diminution de 30% de l'ubiquinone endogène dans les tissus pancréatiques cancéreux [6] et de 60% dans des carcinomes mammaires humains [290]. Ainsi, il est possible que ces variations métaboliques influencent l'action des quinones sur le PTP.

La cancérisation s'accompagne également de nombreuses mutations génétiques fréquentes au niveau de l'ADN mitochondrial car les systèmes de réparation y sont moins abondants qu'au niveau nucléaire [291]. Les différences observées peuvent provenir de mutations au niveau des gènes nucléaires et mitochondriaux codant pour des protéines mitochondriales. Ainsi, nous avons vu dans l'introduction (cf chapitre III) que de nombreux partenaires du PTP peuvent subir des différences d'expression lors de la

cancérisation qui pourraient être à l'origine des modifications observées dans nos travaux.

Les variations chaotiques de la régulation du pore par les quinones selon les cellules rendent également complexe l'approche théorique du ou des sites d'action des quinones. L'inversion de l'ubiquinone 0 semble apparaître lorsque les cellules sont transformées plutôt que par une spécificité tissulaire (Tableau II). Une caractéristique des cellules cancéreuses est leur forte capacité de mutation. Une hypothèse expliquant les variations de régulation pourrait être la mutation du site d'action des quinones.

Selon l'hypothèse où les ubiquinones interagiraient sur un site d'action unique, la mutation de ce site entraînerait donc un changement de sa configuration permettant aux quinones de réguler différemment le PTP selon leur structure. Toutes les quinones interagiraient sur ce site unique expliquant les multiples compétitions interquinones. La mutation du site d'action, ou de la protéine possédant ce site, entraînerait alors une fixation différente des quinones. Ce positionnement différent des ubiquinones changerait alors la configuration de la protéine et rendrait le pore plus ou moins sensible au calcium (Figure 39). A haute concentration, les quinones biphasiques formeraient des micelles changeant aussi leur positionnement sur le site d'action. Ce qui aurait pour conséquence une diminution de leur action inhibitrice.

Selon l'hypothèse où il existerait deux sites d'action, nos résultats nous montrent que le site activateur et le site inhibiteur sont conservés puisque les deux régulations sont conservées (Figures 9 et 13). La mutation ne rend donc pas l'un des deux sites inactif. Il se pourrait que les deux sites subissent des mutations lors de la cancérisation et l'immortalisation. Ces mutations induiraient alors des changements conformationnels des sites d'action et bouleverseraient l'affinité des quinones pour ces deux sites. Il semble toutefois peu probable que deux sites totalement indépendants mutent automatiquement lors d'un changement d'état de la cellule. Il est plus envisageable que ces deux sites soient proches, sur une même protéine et qu'une mutation entraîne le changement conformationnel des deux sites.

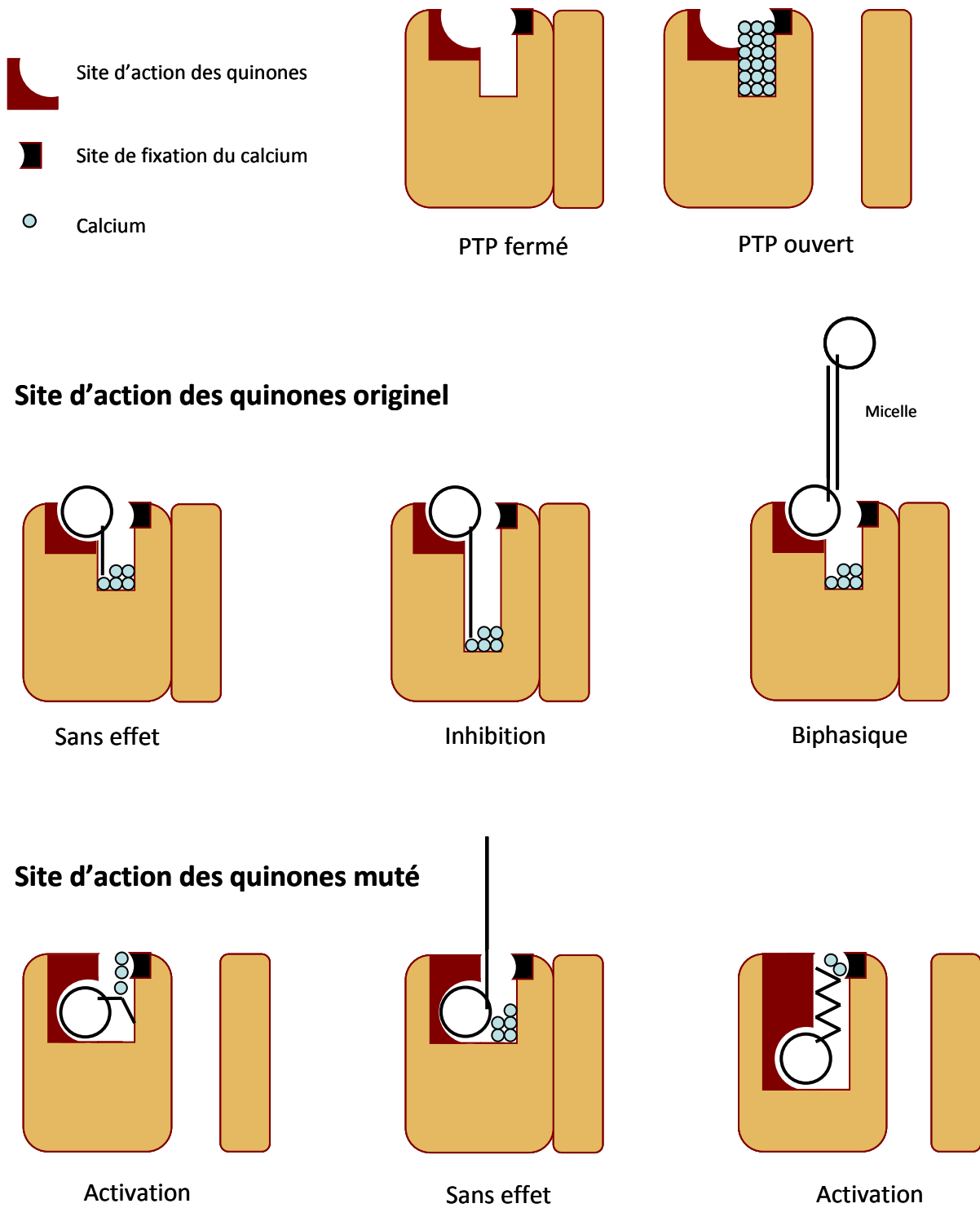


Figure 39 : Modèle hypothétique de la régulation du PTP par un site d'action unique.
 La mutation du site unique permet aux quinones de réguler le PTP différemment.

Il existe néanmoins une autre possibilité. Nous avons vu que les quinones neutres sont capables d'empêcher l'action des quinones activatrices et inhibitrices (Figure 16 et 17). De plus, il semblerait que toutes les quinones puissent acquérir toutes les régulations du PTP selon les lignées et qu'il n'existe pas de classification absolue dans les 3 groupes régulateurs (Figures 9, 13 et 21). Ces résultats nous suggèrent que toutes les quinones régulatrices, interagissent en fait sur les deux sites d'action. L'effet régulateur serait alors dû à un équilibre entre leur action activatrice et leur action inhibitrice. Autrement dit, ce serait leur affinité préférentielle pour l'un ou l'autre des sites, avec une fixation majoritaire sur l'un des deux sites, qui provoquerait l'induction ou l'inhibition de l'ouverture du pore. La mutation ou la surexpression d'un seul de ces sites changerait ainsi l'équilibre des affinités pour les deux sites et induirait un bouleversement de la régulation du PTP par les quinones (Figure 40 et 41). Sur la figure 40, nous voyons la régulation du PTP par les quinones lorsque le site n'est pas transformé. La figure 41 montre comment la mutation du site activateur pourrait modifier l'affinité relative des quinones pour les deux sites. La mutation du site inhibiteur, en diminuant son affinité envers les quinones ou en le sous-exprimant, serait également possible pour parvenir au même résultat.

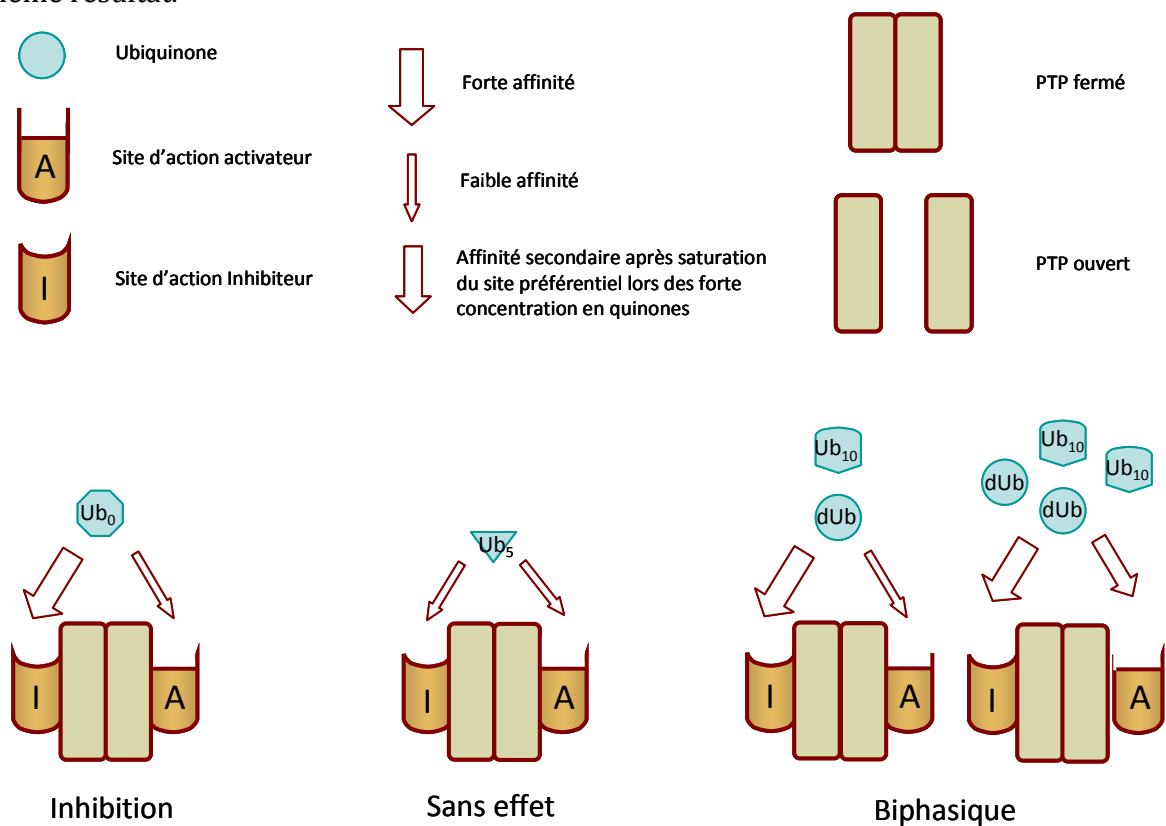


Figure 40 : Modèle hypothétique de la régulation du PTP par deux sites d'actions indépendants.

Ce modèle de la régulation du PTP par les quinones se base sur les résultats observés sur les hépatocytes isolés de foie de rat. Les quinones se fixent sur les deux sites d'action. L'affinité préférentielle déplace l'équilibre vers l'induction ou l'inhibition de l'ouverture du pore.

En tout cas, le(s) site(s) d'action des ubiquinones est(sont) situé(s) sur un site hautement mutagène car toutes les données recensées (Tableau II) tendent à montrer qu'il est toujours modifié lors de la cancérisation. Tant que leur site d'action ne sera pas connu, il sera délicat de répondre à cette question. Mais gageons que la caractéristique particulière des ubiquinones sera un outil très utile dans la découverte de leur mécanisme d'action et l'étude du PTP.

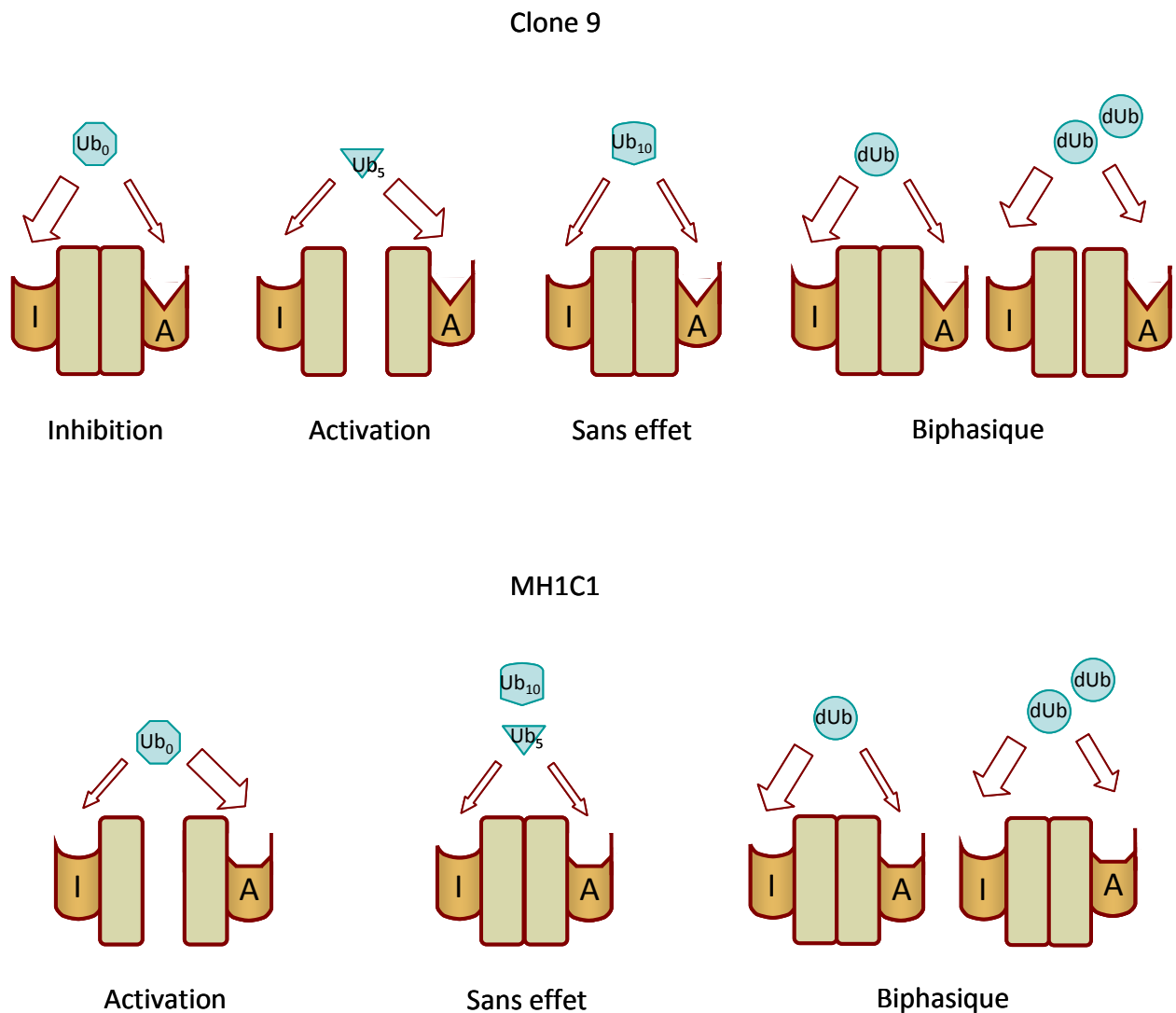


Figure 41 : Modèle hypothétique de la régulation du PTP lors de la mutation d'un des deux sites.

Ce modèle de la régulation du PTP par les ubiquinones, chez les hépatocytes Clone 9 et MH1C1, explique comment la mutation d'un des deux sites d'action, ici le site activateur, peut changer l'équilibre régulateur des quinones par rapport à celui observé chez les hépatocytes isolés de foie de rat.

CONCLUSION

La communauté scientifique porte actuellement un grand intérêt à l'organite intracellulaire qu'est la mitochondrie. Après la découverte de son rôle primordial dans le métabolisme énergétique de la cellule, c'est aujourd'hui sa situation au cœur des mécanismes de mort cellulaire qui motive nombre de recherches. En effet, la compréhension de ces mécanismes présente un fort intérêt thérapeutique car de nombreuses pathologies sont dues à une altération de la mort cellulaire programmée. C'est dans ce contexte qu'un canal de la membrane interne mitochondriale, après de longues années de doute, a fini par se faire admettre en tant que phénomène physiologique : le pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTP). Cependant, si la caractérisation de ce canal progresse de jour en jour, une multitude de questions reste à élucider.

L'ouverture à haute conductance du PTP est un phénomène hautement spécifique qui conduit à la destruction des cellules. Pourtant, sa régulation est complexe et la quantité de molécules le régulant est déconcertante. De plus, bien que de nombreux travaux nous permettent de deviner la nature de ses partenaires, le cœur du pore est toujours indéterminé.

A la fin des années 90, il a été démontré, sur des mitochondries hépatiques de rat, que les analogues d'un constituant endogène de la chaîne respiratoire, l'ubiquinone, possèdent une action spécifique sur le PTP. Plusieurs de ces molécules inhibent l'ouverture du pore, d'autres la favorisent et enfin, certaines ne régulent pas directement le pore mais entrent en compétition avec les deux autres classes. Pourtant, certaines études parallèles portant sur divers types cellulaires cancéreux viennent contredire ces résultats en indiquant que les quinones inhibitrices ne protègent pas toujours de la mort cellulaire provoquée par la transition de perméabilité mitochondriale voire qu'au contraire, elles sont toxiques.

Lors de ce travail de thèse, nous avons donc exploré la régulation du pore ainsi que la toxicité induite par les analogues de l'ubiquinone, dans différents types d'hépatocytes immortalisés ou cancéreux, afin de préciser si des changements pouvaient expliquer les résultats contradictoires rapportés dans la littérature.

Premièrement, nous avons démontré clairement que les analogues de l'ubiquinone sont les seuls composés connus dont l'action sur la régulation du PTP peut être complètement bouleversée d'une lignée à l'autre. Certains peuvent subir une perte de leur activité, d'autres connaître l'apparition d'un effet régulateur, et d'autres encore

voir leur action régulatrice s'inverser totalement. En revanche, tous les composés testés continuent d'interagir sur le(s) site(s) d'action spécifique(s) aux quinones.

En étudiant les activités de deux inhibiteurs de référence que sont la roténone et la ciclosporine A sur nos lignées, nous avons pu observer que la ciclosporine A connaît aussi des variations de sa régulation mais uniquement dans son amplitude. De même, le PTP des lignées hépatocytaires étudiées ont des sensibilités différentes à l'inducteur principal de la transition de perméabilité : le calcium. Or ces différences ne peuvent être tissulaires ni dues à l'espèce étudiée puisque nous avons travaillé uniquement sur des hépatocytes humains et de rat. L'absence d'incidence des conditions de traitement et de culture sur la modulation de la régulation du pore par les quinones, nous prouve que ces variations de régulation sont la conséquence l'état de transformation des cellules.

En revanche, nous n'avons pu faire ressortir de nos résultats une quelconque règle permettant de prédire l'activité régulatrice des ubiquinones envers le pore avant l'expérimentation. Si l'immortalisation et la cancérisation des cellules induisent des variations de l'effet des quinones, ces variations diffèrent d'une lignée immortalisée ou cancéreuse à l'autre.

Ensuite, nous avons démontré que l'induction de l'ouverture du pore par une quinone provoque systématiquement une toxicité médiée par un mécanisme de transition de perméabilité mitochondriale. Toutefois, les quinones inhibitrices peuvent également être toxiques pour certaines cellules. Nous avons constaté que cette toxicité est indépendante de l'inhibition du pore. L'utilisation d'anti-oxydants nous a permis de voir qu'elle résulte d'une augmentation de la production radicalaire induite par certains analogues de l'ubiquinone. Comme pour la régulation du pore, cette production radicalaire n'est pas caractéristique de l'analogue utilisé mais de l'environnement cellulaire étudié.

Enfin, l'étude de la toxicité induite par l'ubiquinone 0 sur des co-cultures constituées de lignées, dont les PTP répondent de manière opposée à cette quinone, nous démontre que la variabilité unique de l'effet régulateur du pore peut être utilisée pour provoquer une mort ciblée. Ce ciblage est possible pour des lignées très proches comme c'est le cas dans notre étude.

Les données que nous avons recueillies s'inscrivent dans un ensemble d'études constatant que le pore de transition de perméabilité des cellules néoplasiques subit des modifications. Une des difficultés majeures dans le traitement du cancer est l'obtention d'une cytotoxicité spécifique aux cellules malignes qui épargne les cellules saines. La plupart des chimiothérapies sont basées sur la destruction des cellules se divisant, incluant les cellules cancéreuses qui ont une multiplication incontrôlée mais également les cellules saines à division physiologique rapide. De plus, ce genre de traitement a l'inconvénient de ne pas détruire les cellules cancéreuses quiescentes, qui peuvent alors entraîner des rechutes.

Le PTP, par sa modification chez les cellules néoplasiques et son implication directe dans la mort cellulaire, pourrait donc constituer une cible de choix dans le traitement anticancéreux. Les ubiquinones, grâce à leur régulation variable, constituent des outils de choix dans la compréhension du phénomène de transition de perméabilité et peut-être, à terme, le développement de nouvelles thérapies contre le cancer.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Blanchard J.L. & Lynch M.** Organellar genes: why do they end up in the nucleus? *Trends Genet.* 2000. 16(7):315-320.
2. **Loud A.V.** A quantitative stereological description of the ultrastructure of normal rat liver parenchymal cells. *J. Cell Biol.* 1968. 37 : 27-46.
3. **Okamoto K. & Shaw J.M.** Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 2005. 39 : 503-536.
4. **Harper H.A., Granner D.K., Murray R.K., Mayes P.A. & Rodwell V.W.** Biochimie de Harper. Edition De Boeck Université. 2002.
5. **Mitchell P.** Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfert by chemi-osmotic type of mechanism. *Nature.* 1961. 191 : 144-148.
6. **Crane F.L.** Biochemical functions of coenzyme Q10. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001. 20(6):591-859.
7. **Nakamura T., Ohno T., Hamamura K. & Sato T.** Metabolism of coenzyme Q10: biliary and urinary excretion study in guinea pigs. *BioFactors.* 1999. 9 : 111-119.
8. **Di Virgilio F. & Azzone G.F.** Activation of site I redox-driven H⁺ pump by exogenous quinones in intact mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1982. **257**(8): 4106-4113.
9. **Degli Esposti M., Ngo A., McMullen G.L., Ghelli A., Sparla F., Benelli B., Ratta M. & Linnane A.W.** The specificity of mitochondrial complex I for ubiquinones. *Biochem. J.* 1996. 313 : 327-334.
10. **Miyoshi H.** Probing the ubiquinone reduction site in bovine mitochondrial complex I using a series of synthetic ubiquinones and inhibitors. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2001. 33(3):223-231.
11. **Ragan I.** The role of phospholipids in the reduction of ubiquinone analogues by the mitochondrial reduced nicotinamide-adenine dinucleotide-ubiquinone oxidoreductase complexe. *Biochem. J.* 1978. 172 : 539-547.
12. **Ernster L. & Dallner G.** Biochemical, physiological and medical aspects of ubiquinone function. *Biochim. Biophys. Acta.* 1995. 1271 : 195-204.
13. **Dutton P.L., Ohnishi T., Darrouzet E., Leonard M.A., Sharp R.E., Cibney B.R., Daldal F. & Moser C.C.** 4 Coenzyme Q oxidation reduction reactions in mitochondrial electron transport (pp 65-82) in Coenzyme Q: Molecular mechanisms in health and disease edited by Kagan VE and Quinn PJ, CRC Press (2000), Boca Raton
14. **Shindo Y., Witt E., Han D., Epstein W. & Packer L.** Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *Invest. Dermatol.* 1994. 102 : 122-124.
15. **Echtay K.S., Winkler E. & Klingenberg M.** Coenzyme Q is an obligatory cofactor for uncoupling protein function. *Nature.* 2000. 408(6812):609-613.

16. **Quinn P.J., Fabisiak J.P. & Kagan V.E.** Expansion of the antioxidant function of vitamin E by coenzyme Q. *Biofactors*. 1999. 9 : 149-154.
17. **Buffinton G.D., Ollinger K., Brunmark A. & Cadenas E.** DT-diaphorase-catalysed reduction of 1,4-naphthoquinone derivatives and glutathionyl-quinone conjugates. Effect of substituents on autoxidation rates. *Biochem. J.* 1989. 257(2):561-571.
18. **Villalba J.M. & Navas P.** Plasma membrane redox system in the control of stress induced apoptosis. *Antioxid. Redox. Signal.* 2000. 2 : 213-230.
19. **Takahashi T., Okamoto T. & Kishi T.** Characterization of NADPH dependent ubiquinone reductase activity in rat liver cytosol. *J. Biochem.* 1996. 119 : 256-263.
20. **Poon W.W., Do T.Q., Marbois B.N. & Clarke C.F.** Sensitivity to treatment with polyunsaturated fatty acids is a general characteristic of the ubiquinone-deficient yeast coq mutants. *Mol. Aspect. Med.* 1997. 18(S):121-128.
21. **Villalba J.M., Crane F.L. & Navas P.** Antioxidative role of ubiquinone in the animal plasma membrane. In Asard H., Berczi A., Caubergs R.J. (eds): "Plasma Membrane Redox Systems and their Role in Biological Stress and Disease." Dordrecht: Kluwer. 1998. 247-266.
22. **McLennan H. & Degli Esposti M.** The contribution of mitochondrial respiratory complexes to the production of reactive oxygen species. *J. Bioenerg. Biomemb.* 2000. 32 : 153-162.
23. **Kaltschmidt B., Sparna T. & Kaltschmidt C.** Activation of NFkB by reactive oxygen intermediates in the nervous system. *Antioxid. Redox. Signal.* 1999. 1:129-144.
24. **Eu J.P., Surr J., Xu L., Stamler J.S. & Meissner G.** The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell.* 2000. 102 : 499-509.
25. **Pessah I.N. & Feng W.** Functional role of hyperreactive sulfhydryl moieties within the ryanodine receptor complex. *Antiox. Redox. Signal.* 2000. 2 : 17-25.
26. **Gincel D., Zaid H. & Shoshan-Barmatz V.** Calcium binding and translocation by the voltage-dependent anion channel: a possible regulatory mechanism in mitochondrial function. *Biochem. J.* 2001. 358 : 147-155.
27. **Blachly-Dyson E. & Forte M.** VDAC Channels *IUBMB Life.* 2001. 52 : 113-118.
28. **Humphries A.D., Streimann I.C., Stojanovski D., Johnston A.J., Yano M., Hoogenraad N.J. & Ryan M.T.** Dissection of the mitochondrial import and assembly pathway for human Tom40. *J. Biol. Chem.* 2005. 280 (12): 11535-11543.
29. **Shibata A., Ikawa K., Shimooka T. & Terada H.** Significant stabilization of the phosphatidylcholine bilayer structure by incorporation of small amounts of cardiolipin. *Biochem. Biophys. Acta.* 1994. 1192 : 71-78.

30. **Yamauchi T., Ohki K., Maruyama H. & Nozawa Y.** Thermal adaptation of Tetrahymena membranes with special reference to mitochondria. Role of cardiolipin in fluidity of mitochondrial membrane. *Biochem. Biophys. Acta.* 1981. 649 : 385-392.
31. **Klingenberg M.** Dialectics in carrier research: the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1993. 25 : 447-457.
32. **Klingenberg M.** Metabolite transport in mitochondria: an example for intracellular membrane function. *Essays Biochem.* 1970. 6: 119-159.
33. **Kuan J. & Saier M.H.** The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional and evolutionary relationships. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1993. 28 : 209-233.
34. **Pebay-Peyroula E., Dahout-Gonzalez C., Kahn R., Trezeguet V., Lauquin G.J. & Bradolin G.** Structure of mitochondrial ADP/AP carrier in complex with carboxyatractyloside *Nature.* 2003. 426 : 39-44.
35. **Rizzuto R., Brini N., Murgia M. & Pozzan T.** Microdomains with high Ca^{2+} dose close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science.* 1993. 262 : 744-747.
36. **McCormack J.G., Halestrap A.P. & Denton R.M.** Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol. Rev.* 1990. 70 : 391-425.
37. **Hansford R.G.** Physiological role of mitochondrial Ca^{2+} transport. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994. 26 : 495-508.
38. **Kotlyar A.B., Sled V.D. & Vinogradov A.D.** Effect of Ca^{2+} ions on the slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta.* 1992. 1098 : 144-150.
39. **Vandecasteele G., Szabadkai G. & Rizzuto R.** Mitochondrial calcium homeostasis: mechanisms and molecules. *IUBMB Life.* 2001. 52 : 213-219.
40. **Arakaki N., Ueyama Y., Hirose M., Himeda T., Shibata H., Futaki S., Kitagawa K., & Higuti, T.** Stoichiometry of subunit e in rat liver mitochondrial HC-ATP synthase and membrane topology of its putative Ca^{2+} -dependent regulatory region. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001. 1504 : 220-228.
41. **Bernardi P.** Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol. Rev.* 1999. 79 : 1127-1155.
42. **Gunter T.E. & Pfeiffer D.R.** Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am. J. Physiol.* 1990. 258 : 755-786.
43. **Gunter T.E., Buntinas L., Sparagna G., Eliseev R. & Gunter K.** Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions. *Cell Calcium.* 2000. 28 : 285-296.
44. **Smaili S.S., Hsu Y.T., Youle R.J. & Russell J.T.** Mitochondria in Ca^{2+} signalling and apoptosis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000. 32 : 35-46.

45. **Sparagna G.C., Gunter K.K., Sheu S.S. & Gunter T.E.** Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium: a description of the rapid uptake mode. *J. Biol. Chem.* 1995. 270(46):27510-27515.
46. **Crompton M.** The regulation of mitochondrial calcium transport in heart. *Current topics in membranes and transport.* 1985. 25 : 231-276.
47. **Jouaville L.S., Ichas F. & Mazat J.P.** Modulation of cell calcium signals by mitochondria. *Mol. Cell Biochem.* 1998. 184(1-2):371-376.
48. **Baysal K., Jung D.W., Gunter K.K., Gunter T.E. & Brierley G.P.** Na⁺-dependent Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca²⁺/2Na⁺ exchanger. *Am. J. Physiol.* 1994. 266 : 800-808.
49. **Jung D.W., Baysal K. & Brierley G.P.** The sodium-calcium antiport of heart is not electroneutral. *J. Biol. Chem.* 1995. 270 : 672-678.
50. **Li W., Shariat Madar Z., Powers M., Sun X., Lane R.D. & Garlid K.D.** Reconstitution, identification, purification, and immunological characterisation of the 110-kDa Na⁺/Ca²⁺ antiporter from beef heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1992. 267 : 17983-17989.
51. **Bernardi P. & Petronilli V.** The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1996. 28 : 131-137.
52. **Ricquier D. & Bouillaud F.** The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* 2000. 345 : 161-179.
53. **Kroemer G., Dallaporta B. & Resche-Rigon M.** The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol.* 1998. 60 : 619-642.
54. **Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kuhnle S. & Nicotera P.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 1997. 185 : 1481-1486.
55. **Kroemer G., Petit P.X., Zamzami N., Vayssi`ere J.L. & Mignotte B.** The biochemistry of apoptosis. *FASEB J.* 1995. 9 : 1277-1287.
56. **Li Y.Z., Li C.J., Pinto A.V. & Pardee A.B.** Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. *Mol. Med.* 1999. 5(4):232-239.
57. **Proskuryakov S.Y., Gabai V.L. & Konoplyannikov A.G.** Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry.* 2002. 67(4):387-408.
58. **Monaghan P., Robertson D., Amos T.A.S., Dyer M. J.S., Mason D.Y. & Greaves M.F.** Ultrastructural localization of bcl-2 protein. *J. Histochem. Cytochem.* 1992. 40 : 1819-1825.

59. **Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M. J., Fenton W. & Reed J.C.** Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993. 53 : 4701-4714.
60. **De Jong D., Prins F.A., Mason D.Y., Reed J.C., van Ommen G.B. & Kluin P.M.** Subcellular localization of the bcl-2 protein in malignant and normal lymphoid cells. *Cancer Res.* 1994. 54 : 256-260.
61. **Newmeyer D.D., Farschon D.M. & Reed J.C.** Cell-free apoptosis in *Xenopus* egg extracts: inhibition by Bcl-2 and requirement for an organelle fraction enriched in mitochondria. *Cell.* 1994. 79 : 353-364.
62. **Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R. & Wang X.** Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*. *Cell.* 1996. 86 : 147-157.
63. **Li F., Srinivasan A., Wanag Y., Armstrong R.C., Tomaselli K.J. & Fritz L.C.** Cell-specific induction and apoptosis by microinjection of cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.* 1997. 272 : 30299-30305.
64. **Zhivotovsky B., Orrenius S., Brustugun O.T. & Døskeland S.O.** Injected cytochrome *c* induced apoptosis. *Nature.* 1998. 391 : 449-450.
65. **Gonzales D.H. & Neupert W.** Biogenesis of mitochondrial c-type cytochromes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1990. 22 : 753-768.
66. **Li P., Nijhawan D., Budihardjo I., Srinivasula S.M., Ahmad M., Alnemri E.S. & Wang X.** Cytochrome *c* and dATP-dependent formation of Apaf-1/Caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell.* 1997. 91 : 479-489.
67. **Kluck R. M., Bossy-Wetzell E., Green D. R. & Newmeyer D. D.** The release of cytochrome *c* from mitochondria : a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997. 275 : 1132-1136.
68. **Thornberry N.A. & Lazebnik Y.** Caspases: enemies within. *Science.* 1998. 281 : 1312-1316.
69. **Budihardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X. & Wang X.** Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 1999. 15 : 269-290.
70. **Chang, H.Y., & Yang, X.** Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2000. 64: 821-846.
71. **Ravagnan L., Roumier T. & Kroemer G.** Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J. Cell. Physiol.* 2002. 192 : 131-137.
72. **Li L.Y., Luo X. & Wang X.** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature.* 2001. 412 : 95-99.

73. **Susin S.A., Zamzami N., Castedo M., Hirsch T., Marchetti P., Macho A., Daugas E., Geuskens M. & Kroemer G.** Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J. Exp. Med.* 1996. 184 : 1331-1341.
74. **Hegde R., Srinivasula S.M., Zhang Z., Wassell R., Mukattash R., Cilenti L., DuBois G., Lazebnik Y., Zervos A.S., Fernandes-Alnemri T. & Alnemri E.S.** Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J. Biol. Chem.* 2002. 277: 432-438.
75. **Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M. & Kroemer G.** Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature.* 1999. 397 : 441-446.
76. **Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Hirsch T., Susin S.A., Masse B. & Kroemer G.** Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.* 1996. 384 : 53-57.
77. **Ekert P.G., Silke J., Hawkins C.J., Verhagen A.M. & Vaux D.L.** DIABLO promotes apoptosis by removing MIHA/XIAP from processed caspase 9. *J. Cell Biol.* 2001. 152 : 483-490.
78. **Antosson B.** Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim, the mitochondrion. *Cell Tissues Res.* 2001. 306 : 347-361.
79. **Santini M.T.** Apoptosis, cell adhesion and the extracellular matrix in the three-dimensional growth of multicellular tumor spheroids. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2000. 36 : 75-87.
80. **Krajewski S., Tanaka S., Takayama S., Schibler M.J., Fenton W. & Reed J.C.** Investigation of the subcellular distribution of the bcl-2 oncoprotein: residence in the nuclear envelope, endoplasmic reticulum, and outer mitochondrial membranes. *Cancer Res.* 1993. 53 : 4701-4714.
81. **Hsu Y.T. & Youle R.J.** Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J. Biol. Chem.* 1998. 273 : 10777-10783.
82. **Antonsson B., Montessuit S., Lauper S., Eskes R. & Martinou J. C.** Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome *c* release from mitochondria. *Biochem. J.* 2000. 345 : 271-278.
83. **Griffiths G.J., Dubrez L., Morgan C.P., Jones N.A., Whitehouse J., Corfe B.M., Dive C. & Hickman J.A.** Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell. Biol.* 1999. 144 : 903-914.
84. **Hsu Y.T., Wolter K.G. & Youle R.J.** Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 1997. 94 : 3668-3672.

85. **Goping I.S., Gross A., Lavoie J.N., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K., Korsmeyer S.J. & Shore G.C.** Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J. Cell. Biol.* 1998. 143 : 207-215.
86. **Desagher S., Osen-Sand A., Nichols A., Eskes R., Montessuit S., Lauper S., Maundrell K., Antonsson B. & Martinou J.C.** Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *J. Cell. Biol.* 1999. 144 : 891-901.
87. **Suzuki M., Youle R.J. & Tjandra N.** Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell* 2000. 103 : 645-654.
88. **Antonsson B., Montessuit S., Sanchez B. & Martinou J.C.** Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J. Biol. Chem.* 2001. 276 : 11615-11623.
89. **Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S., Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Mermod J.J., Mazzei G., Maundrell K., Gambale F., Sadoul R. & Martinou J.C.** Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science.* 1997. 277 : 370-372.
90. **Schlesinger P.H., Gross A., Yin X.M., Yamamoto K., Saito M., Waksman G. & Korsmeyer S.J.** Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. 94 : 11357-11362.
91. **Saito M., Korsmeyer S.J. & Schlesinger P.H.** BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat. Cell. Biol.* 2000. 2 : 553-555.
92. **Finucane D.M., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N.J., Cotter T.G. & Green D.R.** Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-X_L. *J. Biol. Chem.* 1999. 274 : 2225-2233.
93. **De Marchi U., Campello S., Szabo I., Tombola F., Martinou J.C. & Zoratti M.** Bax Does Not Directly Participate in the Ca²⁺-induced Permeability Transition of Isolated Mitochondria. *J. Biol. Chem.* 2004. 279 : 37415-37422.
94. **Hunter D.R., Haworth R.A. & Southard J.H.** Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1976. 251 : 5069-5077.
95. **Hunter D.R. & Haworth R.A.** The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. 195 : 453-459.
96. **Haworth R.A. & Hunter D.R.** The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. II. Nature of the Ca²⁺ trigger site. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. 195 : 460-467.
97. **Hunter D.R. & Haworth R.A.** The Ca²⁺-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca²⁺ release. *Arch. Biochem. Biophys.* 1979. 195 : 468-477.

98. **Fournier N., Ducet G., & Crevat A.** Action of cyclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1987. 19(3):297-303.
99. **Crompton M., Ellinger H., & Costi A.** Inhibition by cyclosporin A of a Ca^{2+} -dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem. J.* 1988. 255(1):357-360.
100. **Broekemeier K.M., Dempsey M.E. & Pfeiffer D.R.** Cyclosporin A is a potent inhibitor of the inner membrane permeability transition in liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1989. 264(14):7826-7830.
101. **De Macedo D.V., Da Costa C., & Pereira-Da-Silva L.** The permeability transition pore opening in intact mitochondria and submitochondrial particles. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 1997. 118(1):209-216.
102. **Custodio J.B., Moreno A.J. & Wallace K.B.** Tamoxifen inhibits induction of the mitochondrial permeability transition by Ca^{2+} and inorganic phosphate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1998. 152(1): 10-17.
103. **LeQuoc K. & LeQuoc D.** Involvement of the ADP/ATP carrier in calcium-induced perturbations of the mitochondrial inner membrane permeability: importance of the orientation of the nucleotide binding site. *Arch. Biochem. Biophys.* 1988. 265 : 249-257.
104. **Schultheiss H.P. & Klingenberg M.** Immunochemical characterization of the adenine nucleotide translocator. Organ specificity and conformation specificity. *Eur. J. Biochem.* 1984. 143 : 599-605.
105. **Haworth R.A. & Hunter D.R.** Control of the mitochondrial permeability transition pore by high-affinity ADP-binding at the ADP/ATP translocase in permeabilized mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000. 32 : 91-96.
106. **Halestrap A.P. & Davidson A.M.** Inhibition of Ca^{2+} -induced large-amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* 1990. 268 : 153-160.
107. **Woodfield K.Y., Ruck A., Brdiczka D. & Halestrap A.P.** Direct demonstration of a specific interaction between cyclophilin-D and the adenine nucleotide translocase confirms their role in the mitochondrial permeability transition. *Biochem. J.* 1998. 336 : 287-290.
108. **Brustovetsky N. & Klingenberg M.** Mitochondrial ADP/ATP Carrier Can Be Reversibly Converted into a Large Channel by Ca^{2+} . *Biochemistry.* 1996. 35 : 8483-8488
109. **Bauer M.K., Schubert A., Rocks O. & Grimm S.** Adenine Nucleotide Translocase-1, a Component of the Permeability Transition Pore, Can Dominantly Induce Apoptosis. *J. Cell. Biol.* 1999. 147(7):1493-1501.

110. **Kokoszka J.E., Waymire K.G., Levy S.E., Sligh J.E., Cai J., Jones D.P., MacGregor G.R. & Wallace D.C.** The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*. 2004. 427(6973):461-465.
111. **Rodić N., Oka M., Hamazaki T., Murawski M.R., Jorgensen M., Maatouk D.M., Resnick J.L., Li E. & Terada N.** DNA methylation is required for silencing of *ant4*, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells*. 2005. 23:1314-1323.
112. **Greenhalf W., Stephan C. & Chaudhuri B.** Role of mitochondria and C-terminal membrane anchor of Bcl-2 in Bax induced growth arrest and mortality in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1996. 380(1-2):169-175.
113. **Marzo I., Brenner C., Naoufal Zamzami N., Susin S.A., Beutner G., Brdiczka D., Rémy R., Zhi-Hua Xie Z.H., Reed J.C. & Kroemer G.** The Permeability Transition Pore Complex: A Target for Apoptosis Regulation by Caspases and Bcl-2-related Proteins. *J. Exp. Med*. 1998. 187(8):1261-1271.
114. **Crompton M.** The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J*. 1999. 341 : 233-249.
115. **Buhler S., Michels J., Wendt S., Ruck A., Brdiczka D., Welte W. & Przybylski M.** Mass spectrometric mapping of ion channel proteins (porins) and identification of their supramolecular membrane assembly. *Proteins*. 1998. S2 : 63-73.
116. **Fontaine E., Eriksson O., Ichas F. & Bernardi P.** Regulation of the permeability transition pore in skeletal muscle mitochondria. Modulation by electron flow through the respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem*. 1998. 273 : 12662-12668.
117. **Fontaine E. & Bernardi P.** Progress on the Mitochondrial Permeability Transition Pore: Regulation by Complex I and Ubiquinone Analogs. *J. Bioenerg. Biomembr*. 1999. 31(4):335-345.
118. **Kotlyar A.B. & Vinogradov A.D.** Slow active/inactive transition of the mitochondrial NADH-ubiquinone reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 1990. 1019 : 151-158.
119. **Jung D.W., Bradshaw P.C. & Pfeiffer D.R.** Properties of a cyclosporine-insensitive permeability transition pore in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem*. 1997. 272 : 21104-21112.
120. **Fischer G., Wittmann-Liebold B., Lang K., Kiefhaber T. & Schmid F.X.** Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins. *Nature*. 1989. 337(6206):476-478.
121. **Basso E., Fante L., Fowlkes J., Petronilli V., Forte M.A. & Bernardi P.** Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J. Biol. Chem*. 2005. 280(19):18558-18561.
122. **Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T. & Tsujimoto Y.** Cyclophilin D-dependent mitochondrial

permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic death. *Nature*. 2005. 434 : 652-658.

123. **Nicolli A., Basso E., Petronilli V., Wenger R. M. & Bernardi P.** Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 1996. 271 : 2185-2192.

124. **Scorrano L., Nicolli A., Basso E., Petronilli V. & Bernardi P.** Two modes of activation of the permeability transition pore: the role of mitochondrial cyclophilin. *Mol. Cell. Biochem.* 1997. 174 : 181-184.

125. **Novgorodov S.A., Gudz T.I., Milgrom Y.M. & Brierley G.P.** The permeability transition in heart mitochondria is regulated synergistically by ADP and cyclosporin A. *J. Biol. Chem.* 1992. 267 : 16274-16282

126. **Crompton M. & Andreeva L.** On the interactions of Ca^{2+} and cyclosporin A with a mitochondrial inner membrane pore: a study using cobaltamine complex inhibitors of the Ca^{2+} uniporter. *Biochem. J.* 1994. 302 : 181-185.

127. **De Marchi U., Basso E., Szabò I. & Zoratti M.** Electrophysiological characterization of the Cyclophilin D-deleted mitochondrial permeability transition pore. *Mol. Membr. Biol.* 2006. 23(6):521-530.

128. **McEnery M.W., Snowman A.M., Trifiletti R.R. & Snyder S.H.** Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992. 89(8):3170-3174.

129. **Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H. & Tsujimoto Y.** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome *c* release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95 : 14681-14686.

130. **Beutner G., Ruck A., Riede B., Welte W. & Brdiczka D.** Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett.* 1996. 396(2-3):189-195.

131. **Crompton M.** Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J. Physiol.* 2000. 529 : 11-21.

132. **Szabo I. & Zoratti M.** The mitochondrial permeability transition molecules pore may comprise VDAC. I. Binary structure and voltage dependence of the pore. *FEBS.* 330(2):201-205.

133. **Szabo I., De Pintob V. & Zoratti M.** The mitochondrial permeability transition molecules pore may comprise VDAC. II. The electrophysiological properties of VDAC are compatible with those of the mitochondrial megachannel. *FEBS.* 1993. 330(2):206-210.

134. **Krause J., Hay R., Kowolik C. & Brdiczka D.** Cross-linking analysis of yeast mitochondrial outer membrane. *Biochim. Biophys. Acta.* 1986. 860(3):690-698.

136. **Beutner G., Ruck A., Riede B. & Brdiczka D.** Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore by the kinases. *Biochem. Biophys. Acta.* 1998. 1368 : 7-18.
137. **Tsujimoto Y. & Shimizu S.** The voltage-dependent anion channel: an essential player in apoptosis. *Biochimie.* 2002. 84 : 187-193.
138. **Gincel D. & Shoshan-Barmatz V.** Glutamate Interacts With VDAC and Modulates Opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore. *J. Bio. Biomemb.* 2004. 3(2): 179-186.
139. **Baines C.P., Kaiser R.A., Sheiko T., Craigen W.J. & Molkenstin J.D.** Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat. Cell. Biol.* 2007. 9(5):550-555.
140. **Shimizu S., Matsuoka Y., Shinohara Y., Yoneda Y. & Tsujimoto Y.** Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell. Biol.* 2001. 152 : 237-250.
141. **Sun L., Shukair S., Naik T.J., Moazed F. & Ardehali H.** Glucose phosphorylation and mitochondrial binding are required for the protective effects of hexokinase I and II. *Mol. Cell. Biol.* 2008. 28(3):1007-1017.
142. **Pastorino J.G. & Hoek J.B.** Hexokinase II: the integration of energy metabolism and control of apoptosis. *Curr. Med. Chem.* 2003. 10(16):1535-1551.
143. **Bryson J. M., Coy P.E., Gottlob K., Hay N., & Robey R.B.** Increased hexokinase activity, of either ectopic or endogenous origin, protects renal epithelial cells against acute oxidant-induced cell death. *J. Biol. Chem.* 2002. 277 : 11392-11400.
144. **Ahmad A., Ahmad S., Schneider B.K., Allen C.B., Chang L.Y., & White C.W.** Elevated expression of hexokinase II protects human lung epithelial-like A549 cells against oxidative injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2002. 283 : 573-584.
145. **Azoulay-Zohar H., Israelson A., Abu-Hamad S. & Shoshan-Barmatz V.** In self-defence: hexokinase promotes voltage-dependent anion channel closure and prevents mitochondria-mediated apoptotic cell death. *Biochem. J.* 2004. 377 : 347-355.
146. **Aflalo C. & Azoulay H.** Binding of rat brain hexokinase to recombinant yeast mitochondria: effect of environmental factors and the source of porin. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1998. 30 : 245-255.
147. **Linden M., Gellerfors P. & Nelson B.D.** Pore protein and the hexokinase-binding protein from the outer membrane of rat liver mitochondria are identical. 1982. *FEBS Lett.* 141 : 189-192.
148. **Fiek C., Benz R., Roos N. & Brdiczka D.** 1982. Evidence for identity between the hexokinase-binding protein and the mitochondrial porin in the outer membrane of rat liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 688 : 429-40.

149. **Baines C.P., Kaiser R.A., Purcell N.H., Blair N.S., Osinska H., Hambleton M.A., Brunskill E.W., Sayen M.R., Gottlieb R.A., Dorn G.W., Robbins J. & Molkenin J.D.** Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 2005. 434(7033):658-662.
150. **Nakagawa T., Shimizu S., Watanabe T., Yamaguchi O., Otsu K., Yamagata H., Inohara H., Kubo T. & Tsujimoto Y.** Cyclophilin D519 dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature*. 2005. 434 : 652-658.
151. **Schinzl A.C., Takeuchi O., Huang Z., Fisher J.K., 548 Z. Zhou, Rubens J., Hetz C., Danial N.N., Moskowitz M.A., & Korsmeyer S.J.** Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102 : 12005-12010.
152. **Pastorino J.G., Shulga N., & Hoek J.B.** Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol. Chem.* 2002. 277 : 7610-7608.
153. **Majewski N., Nogueira V., Bhaskar P., Coy P.E., Skeen J.E., Gottlob K., Chandel N.S., Thompson C.B., Robey R.B. & Hay N.** Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak. *Mol. Cell.* 2004. 16 : 819-830.
154. **Machida K., Ohta Y. & Osada H.** Suppression of apoptosis by cyclophilin D via stabilization of hexokinase II mitochondrial binding in cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2006. 281(20):14314-14320.
155. **Pastorino J.G., Hoek J.B. & Shulga N.** Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res.* 2005. 65(22):10545-10554.
156. **O'Gorman E., Beutner G., Dolder M., Koretsky A.P., Brdiczka D & Wallimann T.** The role of creatine kinase in inhibition of mitochondrial permeability transition. *FEBS Lett.* 1997. 414(2):253-257.
157. **Dolder M., Wendt S. & Wallimann T.** Mitochondrial creatine kinase in contact sites: interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol. Sign. Recept.* 2001. 10(1-2):93-111.
158. **Dolder M., Walzel B., Speer O., Schlattner U. & Wallimann T.** Inhibition of the mitochondrial permeability transition by creatine kinase substrates. Requirement for microcompartmentation. *J. Biol. Chem.* 2003. 278(20):17760-17766.
159. **Anholt R.R., Pedersen P.L., De Souza E.B. & Snyder S.H.** The peripheral-type benzodiazepine receptor. Localization to the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* 1986. 261 : 576-583.
160. **McEnery M.W., Snowman A.M., Trifiletti R.R. & Snyder S.H.** Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion

channel and the adenine nucleotide carrier. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992. 89 : 3170-3174.

161. **Kinnally K.W., Zorov D.B., Antonenko Y.N., Snyder S.H., McEnery M.W. & Tedeschi H.** Mitochondrial

benzodiazepine receptor linked to inner membrane ion channels by nanomolar actions of ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. 90 : 1374-1378.

162. **Bono F., Lamarche I., Prabonnaud V., Le Fur G. & Herbert J.M.** Peripheral benzodiazepine receptor agonists exhibit potent antiapoptotic activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999. 265 : 457-461.

163. **Chelli B., Falleni A., Salvetti F., Gremigni V., Lucacchini A. & Martini C.** Peripheral-type benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial permeability transition induction in rat cardiac tissue. *Biochem. Pharmacol.* 2001. 61 : 695-705.

164. **Berson A., Descatoire V., Sutton A., Fau D., Maulny B., Vadrot N., Feldmann G., Berthon B., Tordjmann T. & Pessayre D.** Toxicity of alpidem, a peripheral benzodiazepine receptor ligand, but not zolpidem, in rat hepatocytes: role of mitochondrial permeability transition and metabolic activation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001. 299 : 793-800.

165. **Kletsas D., Li W., Han Z. & Papadopoulos V.** Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) and PBR drug ligands in fibroblast and fibrosarcoma cell proliferation: role of ERK, c-Jun and ligand-activated PBR-independent pathways. *Biochem. Pharmacol.* 2004. 67 : 1927-1932.

166. **Gonzalez-Polo R.A., Carvalho G., Braun T., Decaudin D., Fabre C., Larochette N., Perfettini J.L., Djavaheri-Mergny M., Youlyouz-Marfak I., Codogno P., Raphael M., Feuillard J. & Kroemer G.** PK11195 potently sensitizes to apoptosis induction independently from the peripheral benzodiazepine receptor. *Oncogene.* 2005. 24 : 7503-7513.

167. **Hans G., Wislet-Gendebien S., Lallemand F., Robe P., Rogister B., Belachew S., Nguyen L., Malgrange B., Moonen G. & Rigo J.M.** Peripheral benzodiazepine receptor (PBR) ligand cytotoxicity unrelated to PBR expression. *Biochem. Pharmacol.* 2005. 69 : 819-830.

168. **Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H. & Tsujimoto Y.** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome *c* release in isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95 : 14681-14686.

169. **Shimizu S., Narita M. & Tsujimoto Y.** Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome *c* by the mitochondrial channel VDAC. *Nature.* 1999. 399 : 483-487.

170. **Vieira H.L.A., Haouzi D., El Hamel C., Jacotot E., Belzacq A.S., Brenner C. & Kroemer G.** Permeabilization of the mitochondrial inner membrane during apoptosis: impact of the adenine nucleotide translocator. *Cell Death Diff.* 2000. 7 : 1146-1154.

171. **Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jurgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prevost M.C., Xie Z.H., Matsuyama S., Reed J.C. & Kroemer G.** Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science*. 1998. 281 : 2027-2031.
172. **Belzacq A.S., Vieira H.L., Kroemer G. & Brenner C.** The adenine nucleotide translocator in apoptosis. *Biochimie*. 2002. 84(2-3):167-176.
173. **Kroemer G. & Reed J.C.** Mitochondrial control of cell death. *Nat. Med.* 2000. 6 : 513-519.
174. **Shimizu S., Eguchi Y., Kamiike W., Funahashi Y., Mignon A., Lacronique V., Matsuda H. & Tsujimoto Y.** Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95(4):1455-1459.
175. **Nicolli A., Basso E., Petronilli V., Wenger R.M. & Bernardi P.** Interactions of cyclophilin with the mitochondrial inner membrane and regulation of the permeability transition pore, a cyclosporin A-sensitive channel. *J. Biol. Chem.* 1996. 271 : 2185-2192.
176. **Connern C.P. & Halestrap A.P.** Chaotropic agents and increased matrix volume enhance binding of mitochondrial cyclophilin to the inner membrane and sensitize the mitochondrial permeability transition to $[Ca^{2+}]$. *Biochemistry*. 1996. 35 : 8172-8180.
177. **Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Susin S.A., Beutner G., Brdiczka D., Remy R., Xie Z.H., Reed J.C. & Kroemer G.** The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and Bcl-2-related proteins. *J. Exp. Med.* 1998. 187 : 1261-1271.
178. **Szabó I., Bernardi P. & Zoratti M.** Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J. Biol. Chem.* 1992. 267 : 2940-2946.
179. **Bernardi P., Veronese P. & Petronilli V.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. Evidence for two separate Me^{2+} binding sites with opposing effects on the pore open probability. *J. Biol. Chem.* 1993. 268 : 1005-1010.
180. **Petronilli V., Cola C. & Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore. II. The minimal requirements for pore induction underscore a key role for transmembrane electrical potential, matrix pH, and matrix Ca^{2+} . *J. Biol. Chem.* 1993. 268 : 1011-1016.
181. **Israelson A., Abu-Hamad S., Zaid H., Nahon E. & Shoshan-Barmatz V.** Localization of the voltage-dependent anion channel-1 Ca^{2+} -binding sites. *Cell Calcium*. 2007. 41(3):235-244.
182. **Szabó I., Bernardi P. & Zoratti M.** Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J. Biol. Chem.* 1992. 267(5):2940-2946.
183. **Nicolli A., Petronilli V. & Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-

closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry*. 1993. 32(16):4461-4465.

184. **Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarisation. *J. Biol. Chem.* 1992. 267 : 8834-8839.

185. **Bernardi P., Broekemeier K.M. & Pfeiffer D.R.** Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore; a cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994. 26 : 509-518.

186. **Eriksson O., Fontaine E. & Bernardi P.** Chemical modification of arginine by 2,3-butanedione and phenylglyoxal cause closure of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 1998. 273 : 12669-12674.

187. **Eriksson O., Fontaine E., Petronilli V. & Bernardi P.** Inhibition of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the arginine reagent phenylglyoxal. *FEBS Lett.* 1997. 409 : 361-364.

188. **Linder M.D., Morkunaite-Haimi S., Kinnunen P.K.J., Bernardi P. & Eriksson O.** Ligand-selective modulation of the permeability transition pore by arginine modification. Opposing effects of p-hydroxyphenylglyoxal and phenylglyoxal. *J. Biol. Chem.* 2002. 277 : 937-942.

189. **Takeyama N., Matsuo N. & Tanaka T.** Oxidative damage to mitochondria is mediated by the Ca(2+)-dependent inner-membrane permeability transition. *Biochem. J.* 1993. 294(3):719-725.

190. **Petronilli V., Cola C., Massari S., Colonna R. & Bernardi P.** Physiological effectors modify voltage sensing by the cyclosporin A-sensitive permeability transition pore of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1993. 268(29):21939-21945.

191. **Crompton M., Costi A. & Hayat L.** Evidence for the presence of a reversible Ca²⁺-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem. J.* 1987. 245(3):915-918.

192. **Beatrice M.C., Stiers D. L. & Pfeiffer D.R.** The role of glutathione in the retention of Ca²⁺ by liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1984. 259 : 1279-1287.

193. **Petronilli V., Costantini P., Scorrano L., Colonna R., Passamonti S. & Bernardi P.** The voltage sensor of the mitochondrial permeability transition pore is tuned by the oxidation-reduction state of vicinal thiols. Increase of the gating potential by oxidants and its reversal by reducing agents. *J. Biol. Chem.* 1994. 269 : 16638-16642.

194. **Costantini P., Chernyak B.V., Petronilli V. & Bernardi P.** Selective inhibition of the mitochondrial permeability transition pore at the oxidation-reduction sensitive dithiol by monobromobimane. *FEBS Lett.* 1995. 362 : 239-242.

195. **Chernyak B.V. & Bernardi P.** The mitochondrial permeability transition pore is modulated by oxidative agents through both pyridine nucleotides and glutathione at two separate sites. *Eur. J. Biochem.* 1996. 238 : 623-630.

196. **Costantini P., Chernyak B.V., Petronilli V. & Bernardi P.** Modulation of the mitochondrial permeability transition pore by pyridine nucleotides and dithiol oxidation at two separate sites. *J. Biol. Chem.* 1996. 271 : 6746-6751.
197. **Halestrap A.P., Woodfield K.Y. & Connern C.P.** Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J. Biol. Chem.* 1997. 272 : 3346-3354.
198. **Kanno T., Sato E.E., Muranaka S., Fujita H., Fujiwara T., Utsumi T., Inoue M. & Utsumi K.** Oxidative stress underlies the mechanism for Ca²⁺-induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic. Res.* 2004. 38(1):27-35.
199. **Halestrap A.P. & Davidson A.M.** Inhibition of Ca²⁺-induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by Cyclosporin A is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidyl-prolyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem. J.* 1990. 268 : 153-160.
200. **Lehninger A.L., Vercesi A. & Bababunmi E.A.** Regulation of Ca²⁺ release from mitochondria by the oxidation-reduction state of pyridine nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1978. 75 : 1690-1694.
201. **Rossi C.S. & Lehninger A.L.** Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca⁺⁺ and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 1964. 239 : 3971-3980.
202. **Lapidus R.G. & Sokolove P.M.** The mitochondrial permeability transition. Interactions of spermine, ADP, and inorganic phosphate. *J. Biol. Chem.* 1994. 269(29):18931-18936.
203. **Guigas B., Detaille D., Chauvin C., Batandier C., De Oliveira F., Fontaine E. & Leverve X.** Metformin inhibits mitochondrial permeability transition and cell death: a pharmacological in vitro study. *Biochem. J.* 2004. 382(3):877-884.
204. **Chauvin C., De Oliveira F., Ronot X., Mousseau M., Leverve X. & Fontaine E.** Rotenone inhibits the mitochondrial permeability transition-induced cell death in U937 and KB cells. *J. Biol. Chem.* 2001. 276(44):41394-41398.
205. **Fontaine E., Ichas F. & Bernardi P.** A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 1998. 273 : 25734-25740.
206. **Martinucci S., Szabo I., Francesco Tombola F. & Zoratti M.** Ca²⁺-reversible inhibition of the mitochondrial megachannel by ubiquinone analogs. *FEBS Lett.* 2000. 480 : 89-94.
207. **Walter L., Nogueira V., Leverve X., Heitz M.P., Bernardi P. & Fontaine E.** Three classes of ubiquinone analogs regulate the mitochondrial permeability transition pore through a common site. *J. Biol. Chem.* 2000. 275 : 29521-29527.

208. **Degli Esposti M.** Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. 1364 : 222-235.
209. **Cesura A.M., Pinard E., Schubel R., Goetschy V., Friedlein A., Langen H., Polcic P., Forte M.A., Bernardi P. & Kemp J.A.** The voltage-dependent anion channel is the target for a new class of inhibitors of the mitochondrial permeability transition pore. *J. Biol. Chem.* 2003. 278(50):49812-49818.
210. **Krauskopf A., Eriksson O., Craigen W.J., Forte M.A. & Bernardi P.** Properties of the permeability transition in VDAC1(-/-) mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. 1757(5-6):590-595.
211. **Schultz T. W., Sinks G. D. & Cronin M. T. D.** Quinone-induced toxicity to *Tetrahymena*: structure-activity relationships. *Aqu. Tox.* 1997. 39(3-4):267-278.
212. **O'Brien P.J.** Molecular mechanisms of quinone cytotoxicity. *Chem. Biol. Interact.* 1991. 80(1):1-41.
213. **Noack H., Kube U. & Augustin W.** Relations between tocopherol depletion and coenzyme Q during lipid peroxidation in rat liver mitochondria. *Free Radic. Res.* 1994. 20(6):375-386.
214. **Pobezhimova T.P. & Voinikov V.K.** Biochemical and physiological aspects of ubiquinone function. *Membr. Cell Biol.* 2000. 13(5):595-602.
215. **Naderi J., Somayajulu-Nitu M., Mukerji A., Sharda P., Sikorska M., Borowy-Borowski H., Antonsson B. & Pandey S.** Water-soluble formulation of Coenzyme Q10 inhibits Bax-induced destabilization of mitochondria in mammalian cells. *Apoptosis.* 2006. 11(8):1359-1369.
216. **Papucci L., Schiavone N., Witort E., Donnini M., Lapucci A., Tempestini A., Formigli L., Zecchi-Orlandini S., Orlandini G., Carella G., Brancato R. & Capaccioli S.** Coenzyme q10 prevents apoptosis by inhibiting mitochondrial depolarization independently of its free radical scavenging property. *J. Biol. Chem.* 2003. 278(30):28220-28228.
217. **Armstrong J.S., Whiteman M., Rose P. & Jones D.P.** The Coenzyme Q10 analog decylubiquinone inhibits the redox-activated mitochondrial permeability transition: role of mitochondrial complex III. *J. Biol. Chem.* 2003. 278(49):49079-49084.
218. **Petronilli V., Giovanni M., Canton M., Brini M., Colonna R., Bernardi P. & Di Lisa F.** Transient and Long-Lasting Openings of the Mitochondrial Permeability Transition Pore Can Be Monitored Directly in Intact Cells by Changes in Mitochondrial Calcein Fluorescence. *Biophysical J.* 1999. 76 : 725-734.
219. **Ichas F., Jouaville L.S. & Mazat J.P.** Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell.* 1997. 89(7):1145-1153.
220. **Berridge M.J.** Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu. Rev. Biochem.* 1987. 56 : 159-193.

221. **Berridge M.J.** Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 1993. 361(6410):315-325.
222. **Berridge M.J.** Calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 1990. 265 : 9583-9586.
223. **Ichas F., Jouaville L.S., Sidash S.S., Mazat J.-P. & Holmuhamedov E.L.** Mitochondrial calcium spiking: a transduction mechanism based on calcium-induced permeability transition involved in cell calcium signaling. *FEBS Lett.* 1994. 348 : 211-215.
224. **Hajnóczky G., Robb-Gaspers L.D., Seitz M.B. & Thomas A.P.** Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell*. 1995. 82(3):415-424.
225. **Duchen M.R., Leysens A. & Crompton M.** Transient mitochondrial depolarizations reflect focal sarcoplasmic reticular calcium release in single rat cardiomyocytes. *J. Cell Biol.* 1998. 142(4):975-988.
226. **Rizzuto R., Brini N., Murgia M. & Pozzan T.** Microdomains with high Ca^{2+} dose close to IP_3 -sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 1993. 262 : 744-747.
227. **Simpson P.B. & Russell J.T.** Mitochondria support inositol 1,4,5-trisphosphate-mediated Ca^{2+} waves in cultured oligodendrocytes. *J. Biol. Chem.* 1996. 271:33493-33501.
228. **Jacobson J. & Duchon M.R.** Mitochondrial oxidative stress and cell death in astrocytes—requirement for stored Ca^{2+} and sustained opening of the permeability transition pore. *J. Cell. Sci.* 2002. 115 : 1175-1188.
229. **Bowser D.N., Petrou S., Panchal R.G., Smart M.L. & Williams D.A.** Release of mitochondrial Ca^{2+} via the permeability transition activates endoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake. *Faseb J.* 2002. 16(9):1105-1107.
230. **Crompton M. & Costi A.** Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress. A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. *Eur. J. Biochem.* 1988. 178 : 489-501.
231. **Broekemeier K.M., Carpenter-Deyo L., Reed D.J. & Pfeiffer D.R.** Cyclosporin A protects hepatocytes subjected to high Ca^{2+} and oxidative stress. *FEBS Lett.* 1992. 304 : 192-194.
232. **Pastorino J.G., Snyder J.W., Serroni A., Hoek J.B. & Farber J.L.** Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 1993. 268 : 13791-13798.
233. **Zoetewij J.P., Van DeWater B., De Bont H.J., Mulder G.J. & Nagelkerke J.F.** Calcium-induced cytotoxicity in hepatocytes after exposure to extracellular ATP is dependent on inorganic phosphate. Effects on mitochondrial calcium. *J. Biol. Chem.* 1993. 268 : 3384-3388.

234. **Shi Y.F., Sahai B.M. & Green D.R.** Cyclosporin A inhibits activation-induced cell death in T-cell hybridomas and lymphocytes. *Nature*. 1989. 339:625-626.
235. **Zamzami N., Marchetti P., Castedo M., Hirsch T., Susin S.A., Mace B. & Kroemer G.** Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett.* 1996. 384 : 53-57.
236. **Zamzami N. & Kroemer G.** The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2001. 2 : 67-71.
237. **Green D.R. & Kroemer G.** The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004. 305 : 626-629.
238. **Newmeyer D.D. & Ferguson-Miller S.** Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell*. 2003. 112 : 481-490.
239. **Pastorino J.G., Chen S.T., Tafani M., Snyder J.W. & Farber J.L.** The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 1998. **273**(13):7770-7775.
240. **Friberg H., Ferrand-Drake M., Bengtsson F., Halestrap A.P. & Wieloch T.** Cyclosporin A, but not FK 506, protects mitochondria and neurons against hypoglycemic damage and implicates the mitochondrial permeability transition in cell death. *J. Neurosci.* 1998. 18(14):5151-5159.
241. **Pastorino J.G. & J.B. Hoek.** Ethanol potentiates tumor necrosis factor- α cytotoxicity in hepatoma cells and primary rat hepatocytes by promoting induction of the mitochondrial permeability transition. *Hepatology*. 2000. 31(5):1141-1152.
242. **Pastorino J.G., Snyder J.W., Serroni A., Hoek J.B. & Farber J.L.** Cyclosporin and carnitine prevent the anoxic death of cultured hepatocytes by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 1993. 268(19):13791-13798.
243. **Bernardi P. & Petronilli V.** The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1996. 28(2):131-138.
244. **Nicholls D.G. & Budd S.L.** Mitochondria and Neuronal Survival. *Physiol. Rev.* 2000. 80(1):315-360.
245. **Martinou I., Desagher S., Eskes R., Antonsson B., André E., Fakan S. & Martinou J.C.** The release of cytochrome *c* from mitochondria during apoptosis of NGF-deprived sympathetic neurons is a reversible event. *J. Cell. Biol.* 1999. 144 : 883-889.
246. **Jurgensmeier J.M., Xie Z., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D. & Reed J.C.** Bax directly induces release of cytochrome *c* from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998. 95 : 4997-5002.
247. **Finucane D.M., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N.J., Cotter T.G. & Green D.R.** Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome *c* release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 1999. 274 : 2225-2233.

248. **Kluck R.M., Esposti M.D., Perkins G., Renken C., Kuwana T., Bossy-Wetzel E., Goldberg M., Allen T., Barber M.J., Green D.R. & Newmeyer D.D.** The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol. *J. Cell Biol.* 1999. 147 : 809-822.
249. **Eskes R., Antonsson B., Osen-Sand A., Montessuit S., Richter C., Sadoul R., Mazzei G., Nichols A. & Martinou J.C.** Bax-induced cytochrome C release from mitochondria is independent of the permeability transition pore but highly dependent on Mg²⁺ ions. *J. Cell Biol.* 1998. 143 : 217-224.
250. **Desagher S. & Martinou J.C.** Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell. Biol.* 2000. 10 : 369-377.
251. **Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P. & Wang X.** Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome *c* from mitochondria blocked. *Science.* 1997. 275 : 1129-1132.
252. **Kluck R.M., Bossy-Wetzel E., Green D.R. & Newmeyer D.D.** The release of cytochrome *c* from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997. 275 : 1132-1136.
253. **Goldstein J.C., Waterhouse N.J., Juin P., Evan G.I. & Green D.R.** The coordinate release of cytochrome *c* during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat. Cell. Biol.* 2000. 2 : 156-162.
254. **Bossy-Wetzel E., Newmeyer D.D. & Green D.R.** Mitochondrial cytochrome *c* release in apoptosis occurs upstream of specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 1998. 17 : 37-49.
255. **Lemasters J.J.** Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am. J. Physiol.* 1999. 276(1 Pt 1):G1-6.
256. **Kroemer G., Dallaporta B. & Resche-Rigon M.** *The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis.* *Annu. Rev. Physiol.* 1998. 60 : 619-642.
257. **Grimm S. & Brdiczka D.** The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis.* 2007. 12 : 841-855.
258. **Boise L.H. & Thompson C.B.** Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997. 94 : 3759-3764.
259. **Miossec C., Dutilleul V., Fassy F. & Diu-Hercend A.** Evidence for CPP32 activation in the absence of apoptosis during T lymphocyte stimulation. *J. Biol. Chem.* 1997. 272 : 13459-13462.
260. **Bernardi P., Scorrano L., Colonna R., Petronilli V. & Di Lisa F.** Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur. J. Biochem.* 1999. 264(3):687-701.

261. **Pastorino J.G., Chen S.T., Tafani M., Snyder J.W. & Farber J.L.** The overexpression of Bax produces cell death upon induction of the mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem.* 1998. 273 : 7770-7775.
262. **Marzo I., Brenner C., Zamzami N., Jürgensmeier J.M., Susin S.A., Vieira H.L., Prévost M.C., Xie Z., Matsuyama S., Reed J.C. & Kroemer G.** Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science.* 1998. 281 : 2027-2031.
263. **Bernardi P., Krauskopf A., Basso E. et al.** The mitochondrial permeability transition from *in vitro* artifact to disease target. *FEBS J.* 2006. 273 : 2077-2099.
264. **Forte M. & Bernardi P.** The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents? *Cell Death Differ.* 2006. 13 : 1287-1290.
265. **Kroemer G. & Reed J.C.** Mitochondrial control of cell death. 2000. *Nat. Med.* 6 : 513-519.
266. **Guihard G., Bellot G., Moreau C., Pradal G., Ferry N., Thomy R., Fichet P., Meflah K. & Vallette F.M.** The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *J. Biol. Chem.* 2004. 279 : 46542-46550.
267. **De Giorgi F., Lartigue L., Bauer M.K., Schubert A., Grimm S., Hanson G.T., Remington S.J., Youle R.J. & Ichas F.** The permeability transition pore signals apoptosis by directing Bax translocation and multimerization. *FASEB J.* 2002. 16 : 607-609.
268. **Scorrano L., Ashiya M., Buttle K., Weiler S., Oakes S.A., Mannella C.A. & Korsmeyer S.J.** A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev. Cell.* 2002. 2(1):55-67.
269. **Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S. & Woodfield K.Y.** Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury in the heart. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. 1366 : 79-94.
270. **Halestrap, A.P.** (1999) in *Mitochondria and Cell Death* (Brown, G. C., Nicholls, D. G. and Cooper, C. E., eds.), pp. 181–203, Portland Press, London.
271. **Lemasters J.J., Nieminen A.L., Qian T., Trost L.C., Elmore S.P. Nishimura Y., Crowe R.A., Cascio W.E., Bradham C.A., Brenner D.A. & Herman B.** The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. 1366 : 177-196.
272. **Crompton M. & Costi A.** A heart mitochondrial Ca²⁺(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem. J.* 1990. 266 : 33-39.
273. **Leist M., Single B., Castoldi A.F., Kühnle S. & Nicotera P.** Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J. Exp. Med.* 1997. 185 : 1481-1486.

274. **Halestrap A.P.** The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochem. Soc. Symp.* 1999. 66 : 181-203.
275. **Townson J.L., Naumov G.N. & Chambers A.F.** The role of apoptosis in tumor progression and metastasis. *Curr. Mol. Med.* 2003. (7) : 631-642.
276. **Brenner C. & Grimm S.** The permeability transition pore complex in cancer cell death. *Oncogene.* 2006. 25 : 4744-4756
277. **Sourdeval M., Lemaire C., Deniaud A., Taysse L., Daulon S., Breton P., Brenner C., Boisvieux-Ulrich E. & Marano F.** Inhibition of caspase-dependent mitochondrial permeability transition protects airway epithelial cells against mustard-induced apoptosis. *Apoptosis.* 2006. 11(9):1545-1559.
278. **Green D.R. & Evan G.I.** A matter of life and death. *Cancer Cell.* 2002. 1 : 19-30.
279. **Chandra J., Mansson E., Gogvadze V., Kaufmann S.H., Albertioni F. & Orrenius S.** Resistance of leukemic cells to 2-chlorodeoxyadenosine is due to a lack of calcium-dependent cytochrome c release. *Blood.* 2002. 99(2):655-663.
280. **Hardwick M., Fertikh D., Culty M., Li H., Vidic B. & Papadopoulos V.** Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol. *Cancer Res.* 1999. 59 : 831-842.
281. **Inoue K., Kohno T., Takakura S., Hayashi Y., Mizoguchi H. & Yokota J.** Frequent microsatellite instability and BAX mutations in T cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk. Res.* 2001. 24(3):255-262.
282. **Djan T.I. & Gunber D.L.** Percutaneous absorption of two steroids dissolved in dimethyl sulfoxide in the immature female rat. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1967. 141: 406-413.
283. **Elfbaum S.G., & Laden K.** Effect of dimethyl sulfoxide on percutaneous absorption--a mechanistic study. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 1968. 19 : 841-847.
284. **Rich P.R. & Harper R.** Partition coefficients of quinones and hydroquinones and their relation to biochemical reactivity *FEBS Lett.* 1990. 269(1) : 139-144.
285. **Schumacker P.T.** Reactive oxygen species in cancer cells: live by the sword, die by the sword. *Cancer Cell.* 2006. 10(3):175-176.
286. **Galinier A., Carrière A., Fernandez Y., Bessac A. M., Caspar-Bauguil S., Periquet B., Comtat M., Thouvenot J. P. & Casteilla L.** Biological validation of coenzyme Q redox state by HPLC-EC measurement: relationship between coenzyme Q redox state and coenzyme Q content in rat tissues. 2004. 578(1-2):53-57.
287. **Batandier C., Leverve X. & Fontaine E.** Opening of the mitochondrial permeability transition pore induces reactive oxygen species production at the level of the respiratory chain complex I. *J Biol. Chem.* 2004. 279(17):17197-17204.

288. **MacDonald M.J., Husain R.D., Hoffmann-Benning S. & Baker T.R.** Immunochemical identification of coenzyme Q0-dihydrolipoamide adducts in the E2 components of the alpha-ketoglutarate and pyruvate dehydrogenase complexes partially explains the cellular toxicity of coenzyme Q0. *J. Biol. Chem.* 2004. 279(26):27278-27285.
289. **Alirol E. & Martinou J.C.** Mitochondria and cancer: is there a morphological connection? *Oncogene.* 2006. 25(34):4706-4716.
290. **Portakal O., Ozkaya O., Erden Inal M., Bozan B., Koşan M. & Sayek I.** Coenzyme Q10 concentrations and antioxidant status in tissues of breast cancer patients. *Clin. Biochem.* 2000. 33(4):279-284.
291. **Augenlicht L.H. & Heerdt B.G.** Mitochondria: integrators in tumorigenesis? *Nat. Genet.* 2001. 28(2): 104-105.
292. **Kristián T., Gertsch J., Bates T.E. & Siesjö B.K.** Characteristics of the calcium-triggered mitochondrial permeability transition in nonsynaptic brain mitochondria: effect of cyclosporin A and ubiquinone O. *J. Neurochem.* 2000. 74(5):1999-2009.
293. **Gant T.W., Rao D.N., Mason R.P. & Cohen G.M.** Redox cycling and sulphydryl arylation; their relative importance in the mechanism of quinone cytotoxicity to isolated hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.* 1988. 65(2):157-173.

RÉGULATION DU PORE DE TRANSITION DE PERMÉABILITÉ MITOCHONDRIAL ET TOXICITÉ INDUITE PAR LES ANALOGUES DE L'UBIQUINONE DANS LES HÉPATOCYTES CANCÉREUX

La mitochondrie joue un rôle majeur dans la mort cellulaire par nécrose et apoptose. Un des phénomènes hautement régulés conduisant à cette mort cellulaire est la transition de perméabilité mitochondriale qui est médiée par l'ouverture du pore de transition de perméabilité (PTP) localisé dans la membrane interne. Dans les mitochondries de foie de rat, il a été constaté que les analogues de l'ubiquinone ont trois types d'action sur l'ouverture du PTP : l'induction, l'inhibition ou l'interaction sans effet régulateur. Bien que l'inhibition du PTP soit habituellement protectrice de la mort cellulaire, il a été rapporté que des quinones inhibitrices provoquent une toxicité sur certaines lignées cellulaires.

Dans notre étude, nous nous sommes attachés à comprendre d'où peuvent provenir ces divergences, en travaillant sur des lignées hépatocytaires immortalisées et cancéreuses. Nous avons observé que la régulation du PTP par les analogues de l'ubiquinone peut être bouleversée par l'immortalisation et/ou la cancérisation, alors que l'effet de la ciclosporine A demeure inchangé. Tant en culture qu'en co-culture, cette caractéristique unique permet une toxicité ciblée, même entre deux lignées cellulaires très proches. Dans certaines lignées, certaines ubiquinones inhibitrices entraînent malgré tout une mort cellulaire. Nous avons pu montrer que cette toxicité est due à l'augmentation de la production radicalaire. Ce travail ouvre de nouvelles perspectives dans l'utilisation du PTP comme cible moléculaire de thérapie anticancéreuse sélective.

MOTS CLÉS : Pore de Transition de Perméabilité mitochondrial, Régulation, Ubiquinone, Cytotoxicité, Hépatocytes, Cancer.

Mitochondria play a key role in apoptotic and necrotic cell death. One of the key mitochondrial events leading to cell death is the Mitochondrial Permeability Transition (MPT), a highly regulated phenomenon mediated by an inner membrane channel opening. In rat liver mitochondria, ubiquinone analogs have showed their ability to modulate pore opening by three functional ways: activation, inhibition and inactive interaction. Although MPT inhibitors usually protect from cell death, unexpected toxicity from inhibiting ubiquinone has been reported in different cell lines.

In this work, we aimed at understanding this opposite effects using immortalized and cancerous hepatocyte cell lines. We observed that MPT regulation by ubiquinone analogs might dramatically change after immortalization or transformation into cancer, whereas the effect of cyclosporin A remained unaffected. Studies on cell cultures and co-cultures shown that this unique characteristic can lead to a selective toxicity on similar cells, depending on their status (cancer vs. immortalization). Some inhibiting ubiquinones were cytotoxic in cells where they induced a dramatic oxidative stress, whereas they were non toxic for cells where they did not affect free radical production. These findings open new perspectives in the use of MPT as a molecular targeted in cell death therapies.

KEY WORDS : Mitochondrial Permeability Transition Pore, Regulation, Ubiquinone, Toxicity, Hepatocytes, Cancer.