



HAL
open science

Étude de l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous-unités du complexe I mitochondrial humain

Pierre Lescuyer

► **To cite this version:**

Pierre Lescuyer. Étude de l'expression des gènes nucléaires codant pour les sous-unités du complexe I mitochondrial humain. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2002. Français. NNT: . tel-00175098

HAL Id: tel-00175098

<https://theses.hal.science/tel-00175098>

Submitted on 26 Sep 2007

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.

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER- GRENOBLE I
SCIENCES & GÉOGRAPHIE

/ / / / / / / / / / / / / / / /

THÈSE

pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER
Discipline : BIOLOGIE

Présentée et soutenue publiquement par

Pierre LESCUYER

Le 25 octobre 2002

ETUDE DE L'EXPRESSION DES GÈNES NUCLÉAIRES
CODANT POUR LES SOUS-UNITÉS DU COMPLEXE I
MITOCHONDRIAL HUMAIN

Directeur de thèse : Joël LUNARDI

JURY

| | | |
|-----|------------|------------|
| M. | A. FAVIER | |
| M. | J.J. DIAZ | Rapporteur |
| M. | P. REYNIER | Rapporteur |
| Mme | A. LOMBES | |
| M. | J. LUNARDI | |

Je tiens à remercier tous ceux qui m'ont aidé au cours de la
préparation de cette thèse

Je remercie également Mme Lombes, M. Favier, M. Diaz et M.
Reynier d'avoir accepté de faire partie de mon jury

LISTES DES PUBLICATIONS

Human *NDUFS3* gene coding for the 30-kDa subunit of mitochondrial complex I: genomic organization and expression (2000)

Procaccio V, Lescuyer P, Bourges I, Beugnot R, Duborjal H, Depetris D, Mousson B, Montfort MF, Lunardi J, Smeets H, De Coo R et Issartel JP.

Mammalian Genome **11** : 808-810.

YY1 and Sp1 activate transcription of the human *NDUFS8* gene encoding the mitochondrial complex I TYKY subunit (2002)

Lescuyer P, Martinez P et Lunardi J.

Biochimica et Biophysica Acta **1574** : 166-176.

Progress in the definition of a reference human mitochondrial proteome.

Lescuyer P, Strub JM, Luche S, Diemer H, Martinez P, Van Dorselaer A, J Lunardi et Rabilloud T.

Proteomics (accepté pour publication)

Elément d'ADN promoteur de l'activité de transcription, actif dans les cellules humaines et méthode générale pour en ajuster l'activité.

Lescuyer P et Issartel JP.

Brevet français n° FR2812305 du 01/02/2002 et brevet international (PCT) n° WO0210334 A du 07/02/2002 - Déposants : CEA / CNRS / UJF.

ABREVIATIONS

- ADN : acide désoxyribonucléique
- ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire
- ADP : adénosine diphosphate
- ARN : acide ribonucléique
- ARNm : acide ribonucléique messenger
- ARNr : acide ribonucléique ribosomal
- ARNt : acide ribonucléique de transfert
- ATP : adénosine triphosphate
- CoA : coenzyme A
- cpm : coups par minute
- dATP : désoxyadénosine-5'-triphosphate
- dCTP : désoxycytidine-5'-triphosphate
- dGTP : désoxyguanosine-5'-triphosphate
- DMEM : Dulbecco's modified Eagles medium
- dNTP : désoxyribonucléotide-5'-triphosphate
- DO : densité optique
- dTTP : désoxythymidine-5'-triphosphate
- DTT : dithiothréitol
- EDTA : acide éthylène diaminetétracétique
- EGTA : acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétracétique
- EOR : espèce oxygénée réactive
- EST : expressed sequence tag
- FAD : flavine adénine dinucléotide
- FMN : flavine mononucléotide
- Fe-S : fer-soufre
- HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)piperazine-1-éthanesulfonique
- IPG : gradient de pH immobilisé
- IPTG : isopropylthio- β -galactoside
- IRP : iron regulatory protein
- kDa : kilodalton
- kV : kilo-volt
- MALDI-TOF : matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight
- MS-MS : spectrométrie de masse en tandem
- μ Ci : microcurie
- m/m : masse/masse
- m/v : masse/volume
- NAD : nicotinamide adénine dinucléotide
- NE : nuclear extract
- PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
- pb : paire de bases
- PBS : phosphate-buffered saline
- PCR : polymerase chain reaction
- pI : point isoélectrique
- RNase : ribonucléase
- RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction
- SDS : sodium dodécylsulfate
- TAE : Tris acétate EDTA
- TBE : Tris borate EDTA
- UV : ultra-violet
- X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

INTRODUCTION

| | |
|---|----|
| 1. La mitochondrie | 1 |
| 1.1. Structure | 1 |
| 1.2. Métabolisme énergétique | 2 |
| 1.2.1. La β -oxydation | 2 |
| 1.2.2. Le cycle de Krebs | 3 |
| 1.2.3. La phosphorylation oxydative | 3 |
| 1.2.4. Chaîne respiratoire et stress oxydant | 6 |
| 1.3. Le génome mitochondrial | 7 |
| 1.3.1. Organisation | 7 |
| 1.3.2. Particularités génétiques | 9 |
| 1.3.2.1. Transmission maternelle | 9 |
| 1.3.2.2. Hétéroplasmie, effet de seuil | 9 |
| 1.3.2.3. Ségrégation mitotique | 9 |
| 1.3.3. Réplication de l'ADN mitochondrial | 10 |
| 1.3.3.1. Modèle de réplication asynchrone et asymétrique | 10 |
| 1.3.3.2. Modèle de réplication synchrone | 11 |
| 1.3.3.3. Contrôle du nombre de copies | 11 |
| 1.3.4. Transcription de l'ADN mitochondrial | 12 |
| 1.4. Protéome mitochondrial | 13 |
| 1.4.1. Synthèse protéique mitochondriale | 13 |
| 1.4.2. Protéines mitochondriales d'origine nucléaire | 15 |
| 1.4.2.1. Séquence d'adressage | 15 |
| 1.4.2.2. Protéines cytosoliques | 15 |
| 1.4.2.3. Import à travers la membrane externe | 15 |
| 1.4.2.4. Import au travers de la membrane interne | 16 |
| 2. Le complexe I | 17 |
| 2.1. Les sous-unités | 17 |
| 2.2. Fractionnement | 17 |
| 2.3. Structure tridimensionnelle | 19 |
| 2.4. Cofacteurs | 20 |
| 2.4.1. NADH | 20 |
| 2.4.2. FMN | 21 |
| 2.4.3. Centres Fe-S | 21 |
| 2.4.4. Quinones | 22 |
| 2.5. La sous-unité 23 kDa (TYKY) | 22 |
| 2.6. La sous-unité 20 kDa (PSST) | 23 |
| 3. Régulation de l'expression des gènes du système d'oxydation phosphorylante | 24 |
| 3.1. Régulation transcriptionnelle | 24 |
| 3.1.1. Facteurs de transcription nucléaires | 24 |
| 3.1.1.1. NRF-1 | 24 |
| 3.1.1.2. NRF-2 | 28 |
| 3.1.1.3. YY1 | 29 |
| 3.1.1.4. Sp1 | 29 |
| 3.1.1.5. CREB | 30 |
| 3.1.1.6. Facteurs tissu-spécifiques | 31 |
| 3.1.2. Coordination de l'expression des différents constituants du système de phosphorylation oxydative | 32 |
| 3.1.3. Cofacteurs transcriptionnels | 33 |

| | |
|--|----|
| 3.1.3.1. <u>PGC-1</u> | 33 |
| 3.1.3.2. <u>PRC</u> | 34 |
| 3.1.3.3. <u>PGC-1β</u> | 35 |
| 3.1.3.4. <u>HCF</u> | 35 |
| 3.2. Régulations post-transcriptionnelles de l'expression de sous-unités du complexe I | 36 |
| 3.2.1. Régulation de l'expression de la sous-unité 75 kDa par le fer | 36 |
| 3.2.2. Régulation de l'expression de la sous-unité 18 kDa (AQDQ) par phosphorylation | 36 |
| 3.3. Facteurs d'assemblage | 37 |
| | |
| 4. Etude de l'expression des sous-unités du complexe I mitochondrial humain | 37 |
| | |
| MATERIELS ET METHODES | |
| A/ Analyse de promoteurs | 39 |
| 1. Extension d'amorce | 39 |
| 1.1. Principe | 39 |
| 1.2. Protocole | 39 |
| 1.3. Solutions utilisées | 40 |
| 2. Vecteurs plasmidiques utilisés | 41 |
| 3. Préparations des clones plasmidiques concernant le gène <i>NDUFS8</i> | 42 |
| 3.1. Description des constructions | 42 |
| 3.2. Réactions PCR | 42 |
| 3.3. Préparation des inserts et ligations | 43 |
| 3.4. Solutions utilisées | 43 |
| 4. Préparations des clones plasmidiques concernant le gène <i>NDUFS7</i> | 44 |
| 4.1. Description des constructions | 44 |
| 4.2. Réaction PCR | 44 |
| 4.3. Préparation des inserts et ligations | 44 |
| 5. Transformations | 45 |
| 5.1. Protocole | 45 |
| 5.2. Solutions utilisées | 46 |
| 6. Préparation d'ADN plasmidique | 47 |
| 6.1. Protocole | 47 |
| 6.2. Solutions utilisées | 48 |
| 7. Culture de cellules eucaryotes | 49 |
| 8. Transfection transitoire | 50 |
| 8.1. Principe | 50 |
| 8.2. Protocole | 50 |
| 9. Analyse informatique | 51 |
| 10. Réactions de gel-retard | 52 |
| 10.1. Principe | 52 |
| 10.2. Protocole | 52 |
| 11. Mutagenèse dirigée | 54 |
| 11.1. Promoteur <i>NDUFS8</i> | 54 |
| 11.2. Promoteur <i>NDUFS7</i> | 55 |
| B/ Etude du protéome mitochondrial | 57 |
| 1. Préparation de mitochondries | 57 |
| 1.1. Mitochondries de placenta | 57 |

| | |
|---|-----|
| 1.2. Mitochondries de cellules en culture | 57 |
| 1.3. Solutions utilisées | 58 |
| 2. Culture de cellules eucaryotes | 59 |
| 3. Electrophorèse bidimensionnelle | 59 |
| 3.1. Principe | 59 |
| 3.2. Préparation des échantillons protéiques | 59 |
| 3.3. Focalisation sur gradient de pH | 60 |
| 3.3.1. Préparation des gradients | 60 |
| 3.3.2. Réhydratation des bandelettes IPG et focalisation | 60 |
| 3.4. Equilibration, SDS-PAGE et coloration | 61 |
| 4. Identification des protéines par spectrométrie de masse | 62 |
| | |
| RESULTATS | |
| A/ Analyse du promoteur du gène <i>NDUFS8</i> | 63 |
| 1. Détermination du départ de transcription | 63 |
| 2. Caractérisation de la région promotrice | 63 |
| 3. Fixation de facteurs de transcription dans la région promotrice | 68 |
| 4. Analyse des sites YY1 et Sp1 par mutagenèse dirigée | 74 |
| | |
| B/ Analyse du promoteur du gène <i>NDUFS7</i> | 76 |
| 1. Caractérisation de la région promotrice | 76 |
| 2. Analyse des sites NRF-1 et Sp1 par mutagenèse dirigée | 79 |
| | |
| C/ Etude du protéome mitochondrial | 82 |
| 1. Extraction de mitochondries | 82 |
| 2. Analyse des cartes de références et identification des protéines | 82 |
| 3. Etude de l'expression des protéines mitochondriales en fonction de la concentration en fer | 82 |
| | |
| DISCUSSION | 97 |
| Analyse du promoteur du gène <i>NDUFS8</i> | 98 |
| Analyse du promoteur du gène <i>NDUFS7</i> | 102 |
| Limites des études de promoteur et intérêt de l'analyse protéomique | 104 |
| Préparation des cartes du protéome mitochondrial | 107 |
| Etude de l'expression des protéines mitochondriales en fonction de la concentration en fer | 116 |
| | |
| CONCLUSION | 121 |
| | |
| BIBLIOGRAPHIE | 124 |
| | |
| ANNEXES | |
| Annexe I | 142 |
| Annexe II | 143 |

INTRODUCTION

1. La mitochondrie :

1.1. Structure :

Les mitochondries sont des organelles cytoplasmiques ovoïdes d'une longueur d'environ 1 à 2 μm . Leur nombre est variable en fonction du type cellulaire, de quelques dizaines à quelques milliers, et le compartiment mitochondrial peut occuper jusqu'à 20 % de l'espace cellulaire. La morphologie et la localisation intracellulaire diffèrent également selon les tissus. Leur demi-vie est de l'ordre de 6 à 10 jours suivant les cellules.

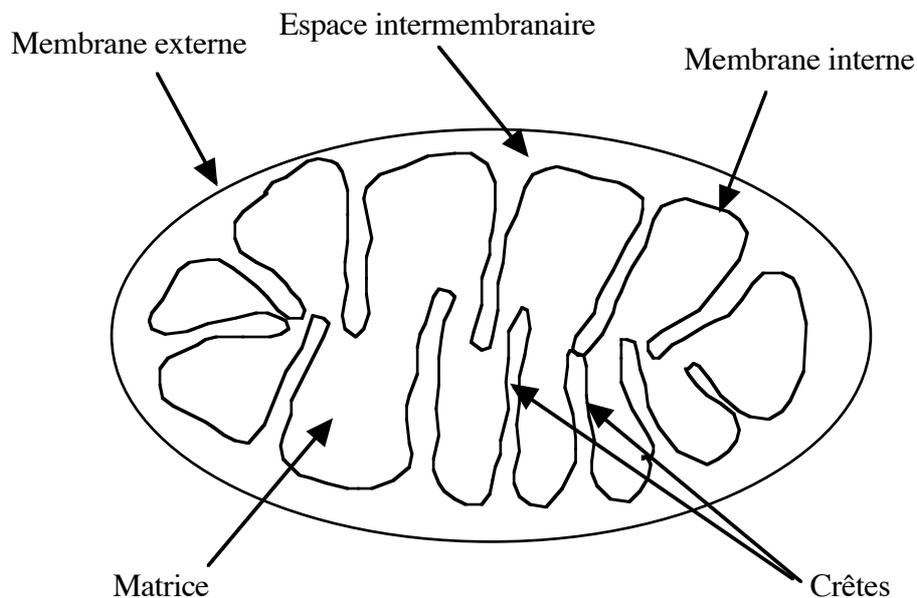


Figure 1 : Représentation schématique d'une mitochondrie

Ces organelles présentent plusieurs compartiments délimités par deux membranes (figure 1) :

- la membrane externe, perméable à de nombreuses molécules de faible masse moléculaire,
 - l'espace intermembranaire,
 - la membrane interne qui constitue une barrière sélective, y compris pour les petites molécules.
- Elle s'invagine, formant les crêtes mitochondriales dont le nombre et l'organisation varient en fonction du type cellulaire. Les différents complexes protéiques réalisant la phosphorylation

oxydative sont localisés au niveau de la membrane interne,

- la matrice mitochondriale limitée par la membrane interne est le siège de nombreuses voies métaboliques comme le cycle de Krebs et la β -oxydation des acides gras. Elle contient plusieurs copies de l'ADN mitochondrial ainsi que les éléments nécessaires à sa réplication et à son expression.

1.2. Métabolisme énergétique

La mitochondrie peut être définie comme la centrale énergétique de la cellule. Elle est, en effet, le siège des voies métaboliques terminales de dégradation des molécules énergétiques (β -oxydation des acides gras, cycle de Krebs) et de la phosphorylation oxydative. La mitochondrie produit ainsi l'essentiel de l'ATP cellulaire qui est le principal intermédiaire donneur d'énergie libre dans les systèmes biologiques. Le taux de renouvellement de l'ATP est très important et les besoins quotidiens pour un homme adulte sont estimés à 70 kg.

1.2.1. La β -oxydation :

Les acides gras sont stockés dans le tissu adipeux sous forme de triglycérides. Ils sont libérés par l'action de lipases puis activés en acyl-coenzyme A (acyl-CoA) par l'acyl-CoA synthétase, en présence d'ATP et de coenzyme A. Les acides gras activés doivent ensuite pénétrer dans la matrice mitochondriale pour y être dégradés. Ce transport se fait par simple diffusion pour les acides gras à chaîne courte ou moyenne. Pour les acides gras à longue chaîne, un mécanisme de transport spécifique est nécessaire : à la face externe de la membrane mitochondriale interne, le groupement acyle est condensé avec la carnitine par la carnitine palmitoyl transférase I. Une translocase transporte ensuite l'acyl-carnitine dans la matrice en échange d'une carnitine libre. La carnitine palmitoyl transférase II, localisée au niveau de la face matricielle de la membrane interne, catalyse la transformation de l'acyl-carnitine en acyl-CoA.

Dans la matrice mitochondriale, les acyl-CoA sont dégradés par un cycle récurrent de 4 réactions : la β -oxydation. La première étape est une oxydation liée au FAD (flavine adénine dinucléotide). Les trois réactions suivantes correspondent à une hydratation, une oxydation liée au NAD^+ (nicotinamide adénine dinucléotide) et une réaction de thiolyse par le groupe thiol d'une molécule de coenzyme A. Cette dernière réaction, catalysée par la β -cétotliolase, libère une

molécule d'acétyl-CoA et un acyl-CoA amputé de 2 atomes de carbone. A chaque cycle, la chaîne est ainsi réduite de 2 carbones produisant de l'acétyl-CoA qui entre dans le cycle de Krebs ainsi que 2 coenzymes réduits NADH et FADH₂.

1.2.2. Le cycle de Krebs :

Le cycle de Krebs, également appelé cycle de l'acide citrique ou cycle des acides tricarboxyliques, est la voie terminale commune d'oxydation des molécules énergétiques : aminoacides, acides gras et glucides.

La plupart des molécules énergétiques entrent dans le cycle sous forme d'acétyl-CoA. Le pyruvate provenant de la glycolyse est transformé en acétyl-CoA par une réaction de décarboxylation oxydative catalysée par un gros complexe multienzymatique, la pyruvate déshydrogénase. Cette réaction s'effectue dans la matrice mitochondriale. Les acides gras sont dégradés en acétyl-CoA par la β -oxydation. Les atomes de carbone des différents aminoacides sont transformés en pyruvate, en acétyl-CoA ou en intermédiaires du cycle de Krebs.

Les étapes d'oxydation du cycle de Krebs produisent des équivalents réducteurs qui sont acceptés par le NAD et le FAD. Chaque cycle produit ainsi 3 NADH et un FADH₂.

Les coenzymes réduits, NADH et FADH₂, produits par la β -oxydation et le cycle de Krebs transfèrent ensuite leurs équivalents réducteurs à la chaîne respiratoire mitochondriale.

Il est à noter que le pouvoir réducteur du NADH formé lors de la glycolyse est transféré dans la mitochondrie par un système de navettes : navette du glycérol 3-phosphate et navette malate-aspartate.

1.2.3. La phosphorylation oxydative :

Le système d'oxydation phosphorylante est composé de 5 complexes enzymatiques localisés dans la membrane mitochondriale interne (tableau I). Les complexes I à IV constituent la chaîne respiratoire dont la fonction est de transférer les électrons fournis par les coenzymes réduits, NADH et FADH₂ jusqu'à l'oxygène moléculaire (figure 2). Pour transférer ces électrons, les enzymes de la chaîne respiratoire utilisent de multiples centres d'oxydoréduction : flavines, complexes fer-soufre (Fe-S), hèmes, ions cuivres. L'oxygène, accepteur final d'électrons, est réduit en eau. Les électrons fournis par le NADH entrent dans la chaîne respiratoire au niveau

du complexe I et ceux fournis par le FADH_2 au niveau du complexe II. Ces quatre complexes enzymatiques sont connectés par des transporteurs mobiles d'électrons : l'ubiquinone (coenzyme Q) qui fait le lien entre les complexes I et II et le complexe III, le cytochrome c qui fait le lien entre le complexe III et le complexe IV.

| Complexes | Nom | Sous-unités codées par le génome nucléaire | Sous-unités codées par le génome mitochondrial |
|-----------|----------------------------------|--|--|
| I | NADH:ubiquinone oxydoréductase | 36 | 7 |
| II | Succinate déshydrogénase | 4 | 0 |
| III | Ubiquinol-cytochrome c réductase | 10 | 1 |
| IV | Cytochrome c oxydase | 10 | 3 |
| V | ATP synthase | 12 | 2 |

Tableau I : Complexes enzymatiques du système d'oxydation phosphorylante

Le transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire est couplé à une translocation de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Cette translocation intervient au niveau des complexes I, III et IV. La concentration en protons devient plus élevée du côté cytosolique de la membrane interne créant un gradient électrochimique. L'énergie libérée par le transfert des électrons à haut potentiel le long de la chaîne respiratoire génère ainsi une force proton-motrice Δp (en volts). Elle résulte de la contribution d'un potentiel de membrane E_m (accumulation de charges positives sur la face cytosolique) et d'un gradient chimique ΔpH . Ce gradient de protons est dissipé par le cinquième complexe enzymatique, l'ATP synthase, qui couple le retour des protons vers la matrice mitochondriale à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Cette enzyme utilise donc la force proton-motrice pour la synthèse d'ATP. Le rendement est d'environ 2,5 ATP par paire d'électrons provenant du NADH et 1,5 ATP par paire d'électrons fournie par le FADH_2 .

Ce principe du couplage du transport des électrons et de la synthèse d'ATP par l'intermédiaire d'un gradient de protons à travers la membrane mitochondriale a été proposé par Mitchell en 1961. C'est l'hypothèse chimiosmotique.

Une autre protéine est essentielle au fonctionnement du système d'oxydation phosphorylante : la translocase ADP/ATP (ou transporteur de nucléotides adényliques) qui contrôle l'échange de ces nucléotides au niveau de la membrane interne. Le transport catalysé par la translocase est couplé de sorte que l'ATP n'entre dans la matrice que si de l'ADP en sort, et vice-versa. Cette protéine, très abondante, représente environ 14 % des protéines de la membrane mitochondriale interne.

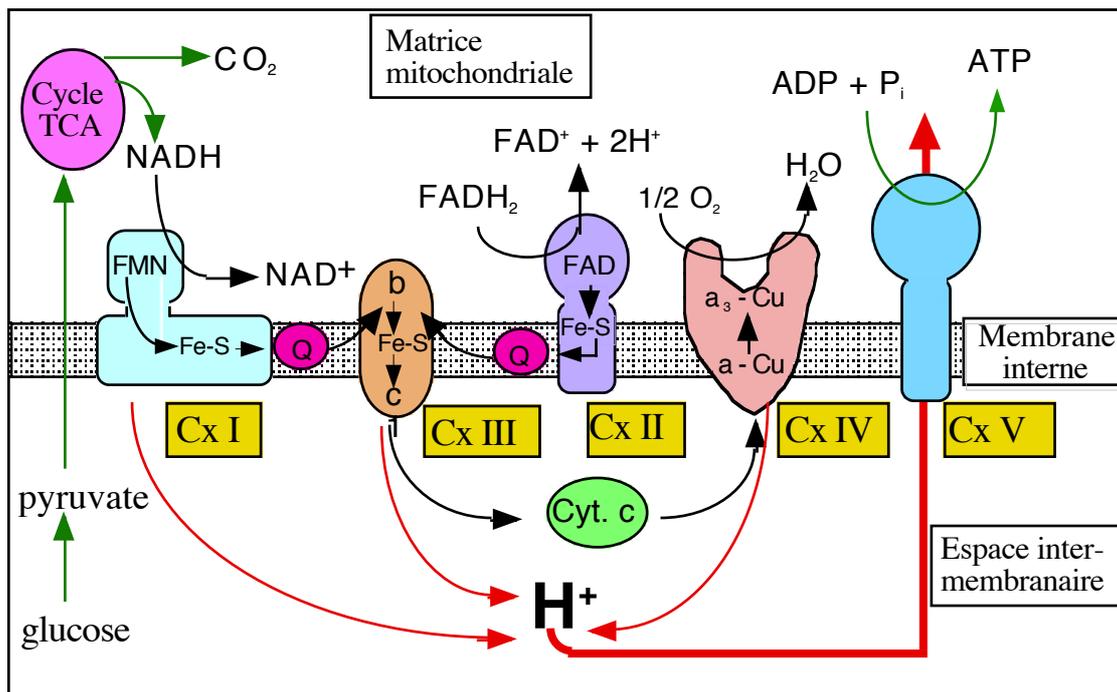


Figure 2 : Représentation schématique du système d'oxydation phosphorylante.

Les complexes (Cx) I à IV constituent la chaîne respiratoire qui transfère les électrons du NADH et du FADH_2 vers l'oxygène moléculaire. Le transport d'électrons est couplé à une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire générant un gradient électrochimique. Les protons retournent dans la matrice par l'intermédiaire du complexe V avec synthèse concomitante d'ATP. Les cofacteurs redox des complexes de la chaîne respiratoire sont indiqués : FMN : flavine mononucléotide ; Fe-S : centre fer-soufre ; FAD : flavine adénine dinucléotide ; b, c, et a-Cu : cytochromes.

NAD : nicotinamide adénine dinucléotide, cycle TCA : cycle de Krebs, Q : ubiquinone.

1.2.4. Chaîne respiratoire et stress oxydant :

La mitochondrie est une des sources majeures d'espèces oxygénées réactives (EORs) dans la cellule (Raha et Robinson, 2000 ; Lenaz, 2001). Le principal site de production est la chaîne respiratoire au niveau des complexes I et III, et dans une moindre mesure au niveau du complexe II. Ce phénomène est lié à l'échappement d'électrons de la chaîne respiratoire qui vont réagir avec l'oxygène pour former un anion superoxyde (O_2^-). L'anion superoxyde peut ensuite être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en radical hydroxyl (OH \cdot). D'autres sites de production moins importants ont également été identifiés dans la mitochondrie : glycérol-1-phosphate déshydrogénase et dihydroorotate déshydrogénase.

Les EORs libérées dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale sont des molécules toxiques. L'anion superoxyde est capable d'inactiver des enzymes contenant des centres Fe-S comme le complexe I ou l'aconitase. Le peroxyde d'hydrogène est relativement stable mais en présence de fer ferreux (Fe^{2+}), il peut être transformé en radical hydroxyl par la réaction de Fenton. Cette espèce radicalaire extrêmement réactive attaque les protéines, les lipides insaturés (formant des peroxydes) et les acides nucléiques.

Plusieurs systèmes antioxydants permettant à la mitochondrie de lutter contre cette production continue d'EORs ont été identifiés. La superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD), présente dans la matrice mitochondriale, est connue depuis longtemps. Cette enzyme catalyse la transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène. Le peroxyde est ensuite détruit par différents systèmes dont l'importance biologique respective n'est pas encore bien déterminée. Un premier système est constitué par la peroxyrédoxine 3, la thiorédoxine mitochondriale et la thiorédoxine réductase mitochondriale (Rabilloud et al., 2002a). Une autre protéine mitochondriale capable de détruire le peroxyde d'hydrogène est la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase (Arai et al., 1999). Cette enzyme peut également réduire les phospholipides peroxydés dans les membranes. Une autre glutathion peroxydase, dite classique, a également été décrite dans la mitochondrie mais elle serait présente en très petite quantité (Arai et al., 1999). Enfin, l'isocitrate déshydrogénase NADP-dépendante mitochondriale jouerait un rôle important dans la lutte contre le stress oxydant en étant une source majeure de NADPH, un équivalent réducteur nécessaire à la régénération des formes réduites du glutathion et de la thiorédoxine (Jo et al., 2001).

Différents processus physiopathologiques ont été associés à la production d'EORs par la chaîne respiratoire. Tout d'abord, il a été montré que des dysfonctionnements du complexe I entraînent

une augmentation de la production d'EORs et une induction de la MnSOD (Pitkänen et Robinson, 1996). Ce phénomène jouerait un rôle important dans la pathogénicité des déficits du complexe I en induisant un important stress oxydant via la production de radical hydroxyl (Raha et Robinson, 2000). D'autre part, la mitochondrie aurait un rôle clé dans la pathogénicité de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique ou l'ataxie de Friedreich, notamment par l'intermédiaire de dommages oxydatifs (Beal, 1998). Le rôle majeur du stress oxydant mitochondrial évoqué dans le phénomène d'apoptose pourrait expliquer ce lien (Tatton et Olanow, 1999 ; Raha et Robinson, 2001). Enfin, l'accumulation de dommages liés aux EORs produites dans la mitochondrie, en particulier au niveau de l'ADN mitochondrial, pourrait jouer un rôle important dans le vieillissement (Cadenas et Davies, 2000).

1.3. Le génome mitochondrial :

1.3.1. Organisation :

La mitochondrie possède son propre génome sous forme d'un ADN bicaténaire et circulaire. L'ADN mitochondrial représente environ 1 % de l'ADN cellulaire total (environ 1 000 à 10 000 copies par cellule). Le nombre de copies par mitochondrie varie de 5 à 10.

Chez l'homme, cet ADN est composé de 16 569 paires de bases (pb) et ne comporte pas d'introns. Sa séquence est entièrement connue (Anderson et al., 1981). Les deux brins peuvent être séparés physiquement en un brin lourd (H) riche en bases puriques (G et A) et un brin léger (L) riche en bases pyrimidiques (C et T).

L'ADN mitochondrial contient 37 gènes qui codent pour 13 protéines, 22 ARN de transfert et les ARN ribosomiaux 12S et 16S (figure 3). Toutes les protéines codées sont des sous-unités de complexes enzymatiques du système de la phosphorylation oxydative. Les 2 ARN ribosomiaux, les 12 protéines et les 14 ARN de transfert (ARNt) sont codés par le brin lourd. Le brin léger code quant à lui 8 ARN de transfert et une protéine. Seules 2 régions de l'ADN mitochondrial ne sont pas codantes : une séquence de 1122 paires de bases (pb), appelée D-Loop, qui contient l'origine de répllication du brin lourd et les promoteurs des brins lourds et légers, ainsi qu'une séquence de 30 pb contenant l'origine de répllication du brin léger.

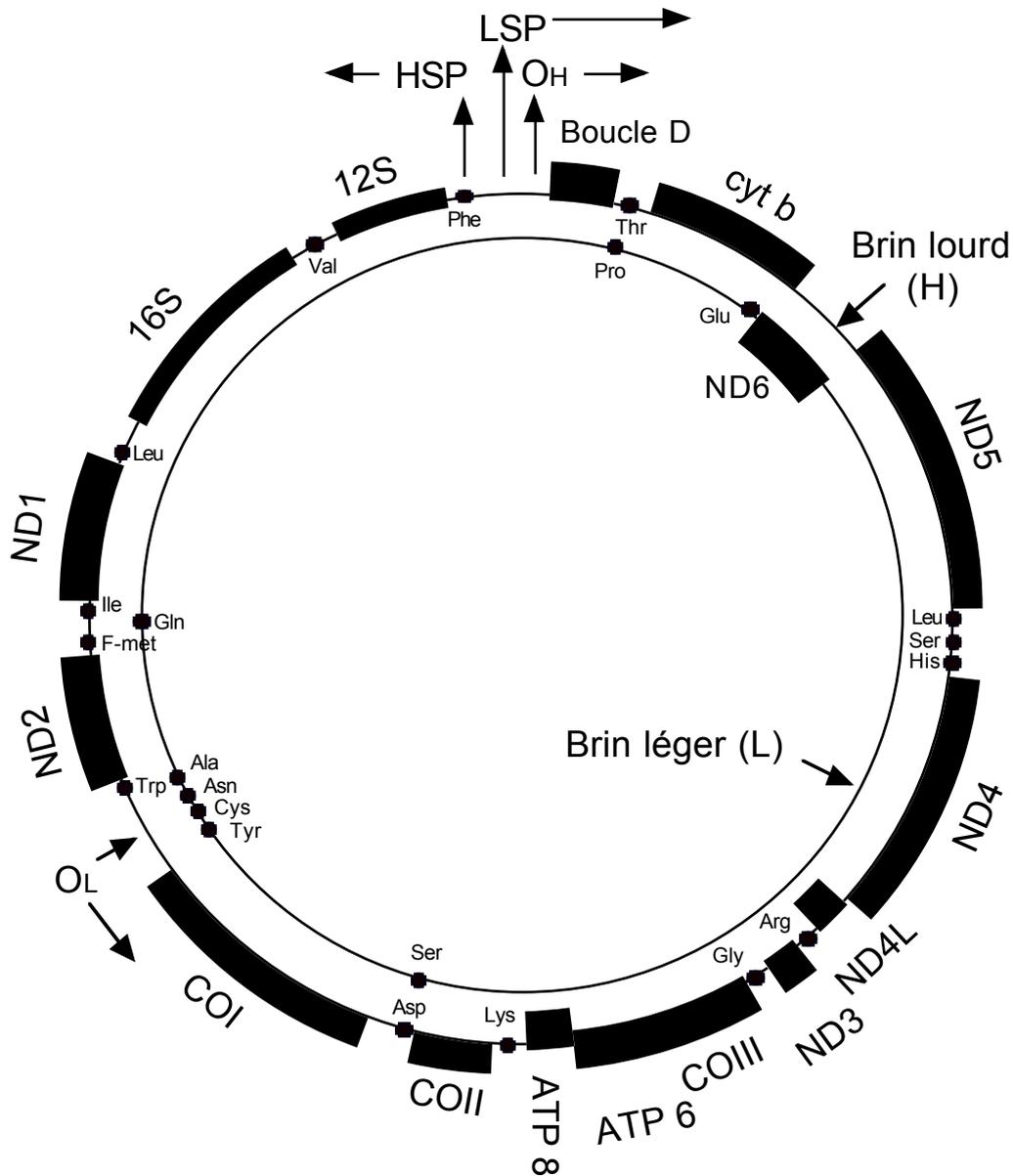


Figure 3 : Organisation de l'ADN mitochondrial humain (d'après Anderson et al., 1981).

HSP : promoteur du brin lourd, LSP : promoteur du brin léger, O_H : origine de réplication du brin lourd. O_L : origine de réplication du brin léger. Boucle D : boucle de déplacement ou D-Loop. ND : gènes des sous-unités du complexe I. Cyt b : gène du cytochrome b (complexe III). CO : gènes des sous-unités du complexe IV. ATP : gènes de sous-unités de l'ATPase. 12S et 16S : gènes des ARN ribosomiaux. Ala, Asn, Asp, Arg, Cys, F-met, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr, Val : ARN de transfert.

Le génome mitochondrial présente un taux de mutations en moyenne 10 fois plus élevé que celui

du génome nucléaire. Plusieurs éléments peuvent expliquer cette caractéristique : un système de réparation de l'ADN moins efficace que dans le noyau et l'absence de protection par des protéines de type histone. D'autre part, la proximité de la chaîne respiratoire qui génère des quantités importantes d'espèces oxygénées réactives, expose le génome mitochondrial à des dommages oxydatifs. Ce risque est d'autant plus important que lors de la réplication car l'ADN mitochondrial reste longtemps exposé sous forme simple brin (chapitre 1.3.3), ce qui le rend particulièrement sensible aux attaques radicalaires.

1.3.2. Particularités génétiques :

1.3.2.1. Transmission maternelle :

L'ADN mitochondrial est d'origine maternelle (Giles et al., 1980). Cette transmission maternelle explique la génétique particulière des maladies liées à des anomalies du génome mitochondrial.

1.3.2.2. Hétéroplasmie, effet de seuil :

L'hétéroplasmie correspond à la coexistence dans une même cellule de deux espèces d'ADN mitochondrial. Cette notion est notamment importante en cas de présence d'une mutation pathologique car en fonction du pourcentage d'ADN muté, l'impact sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire et la capacité à produire de l'ATP sera variable.

L'effet de seuil correspond au pourcentage d'ADN muté à partir duquel un tissu ou un organe ne peut plus assurer la production d'énergie minimale permettant de maintenir ses fonctions normales. L'expression phénotypique d'une mutation pathologique de l'ADN mitochondrial, au niveau d'un tissu ou d'un organe donné dépendra donc d'une part, de ses besoins énergétiques, et d'autre part, du rapport ADN normal/ADN muté.

1.3.2.3. Ségrégation mitotique :

Au cours des divisions cellulaires, les mitochondries d'une cellule ne se répartissent pas de manière homogène dans les cellules filles. Ainsi, à partir d'une cellule présentant 2 types de populations mitochondriales, des cellules filles avec des taux variables de chacune des 2 populations peuvent être obtenues. Ce phénomène appelé ségrégation mitotique explique qu'à partir d'un ovule contenant une proportion donnée d'ADN mitochondriaux normaux et mutés,

un individu peut avoir des rapports ADN normal/ADN muté très variables dans ses différents tissus et organes. Associé à l'effet de seuil, ce phénomène explique la grande hétérogénéité de l'expression clinique des maladies liées à l'ADN mitochondrial (Di Mauro, 2001).

1.3.3. Réplication de l'ADN mitochondrial :

1.3.3.1. Modèle de réplication asynchrone et asymétrique :

Les deux brins H et L de l'ADN mitochondrial sont répliqués de manière asynchrone et asymétrique (Shadel et Clayton, 1997) à partir de deux origines de réplication distinctes O_H et O_L (figure 3).

La réplication fait intervenir une ADN γ -polymérase spécifique de la mitochondrie. Cette enzyme est un hétérodimère constitué d'une sous-unité catalytique α (140 kDa) et d'une sous-unité β (55 kDa) qui se lie à l'ADN, augmentant l'affinité de l'enzyme pour l'ADN et sa processivité. La sous-unité β possède de plus une activité 3'-5' exonucléase.

La réplication est initiée par la synthèse du brin lourd. La première étape est la production d'une amorce ARN par transcription du brin léger. Cette opération est sous le contrôle du facteur de transcription mitochondrial mtTFA. L'amorce ribonucléotidique forme un hybride ARN/ADN stable, appelé R-Loop, au niveau des régions CSBI à III (Conserved Sequence Box) localisées dans la D-Loop (figure 4). L'amorce ARN est clivée en aval de CSBI par une ribonucléoprotéine, la RNase MRP (Mitochondrial RNA Processing). L'ADN γ -polymérase prend alors le relais pour synthétiser le néobrin H.

L'élongation du brin H néosynthétisé crée une boucle de déplacement au niveau de laquelle le brin lourd est sous forme simple brin. Lorsque cette boucle arrive au niveau de l'origine de réplication O_L , celle-ci adopte une conformation en épingle à cheveux reconnue par une ADN primase qui synthétise une amorce ARN. La boucle est riche en nucléotides T et la transition ARN/ADN se fait au niveau d'une séquence riche en GC à la base de l'épingle.

Chez les vertébrés, l'élongation de la majorité des brins H néosynthétisés s'arrête rapidement au niveau de séquences de 15 nucléotides appelées séquences TAS (Termination Associated Sequence), formant une structure ADN triple brins à l'origine de la D-Loop. Chez l'homme, il n'existe qu'une séquence TAS (figure 4). Le brin H tronqué, appelé ADN 7S, a une demi-vie de 1 à 3 heures. Le mécanisme contrôlant cet arrêt de l'élongation du brin lourd n'est pas élucidé. Il permettrait de réguler le nombre de copies de l'ADN mitochondrial.

Les structures d'ADN simple brin générées lors de la réplication sont stabilisées par la protéine mtSSB (mitochondrial Single Strand Binding Protein) qui fixe l'ADN sous forme d'un tétramère. Enfin, différentes enzymes participant à la réplication de l'ADN mitochondrial ont été identifiées : une hélicase, des topoisomérases de type I et II, une ADN ligase III.

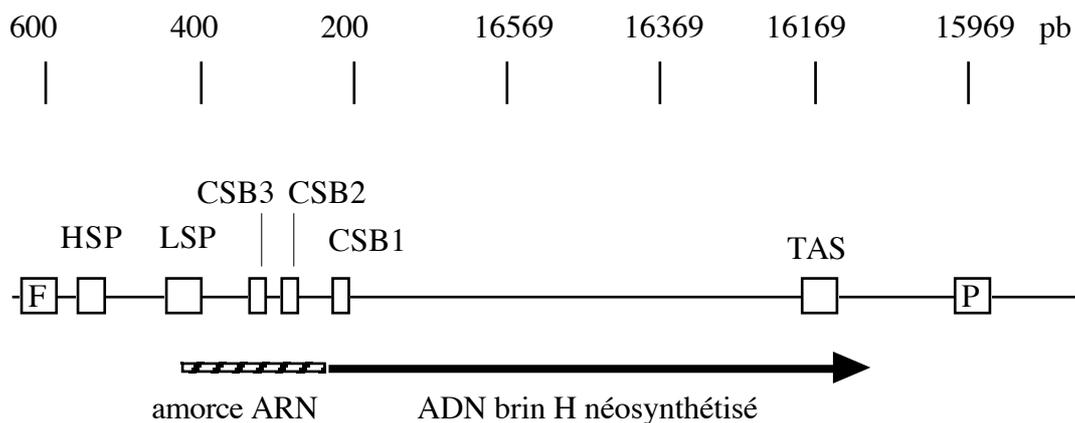


Figure 4 : Représentation schématique de la D-Loop.

Les positions par rapport à la séquence nucléotidique de l'ADN mitochondrial, exprimées en paires de bases, sont indiquées au-dessus. HSP : promoteur du brin lourd, LSP : promoteur du brin léger, CSB : Conserved Sequence Box, TAS : Termination Associated Sequence, F : ARNt phénylalanine, P : ARNt proline.

1.3.3.2. Modèle de réplication synchrone :

Un autre modèle de réplication synchrone et symétrique a été récemment proposé (Holt et al., 2000). Ce mécanisme serait comparable à celui de l'ADN nucléaire avec une fourche de réplication bidirectionnelle et une synthèse discontinue du brin L par fragments d'Okasaki successifs. Les deux modes de réplication, synchrone et asynchrone, coexisteraient dans la cellule et l'utilisation de l'un ou l'autre pourrait dépendre des conditions physiologiques.

1.3.3.3. Contrôle du nombre de copies :

Les mécanismes mis en jeu sont mal connus. Ils pourraient intervenir à différentes étapes : initiation, élongation. Les facteurs régulateurs évoqués sont notamment mtTFA, la RNase MRP, mtSSB, l'ADN γ -polymérase.

La régulation du pool des désoxyribonucléotides (dNTP) mitochondriaux serait également un élément important du contrôle de la réplication de l'ADN mitochondrial. La mitochondrie ne possédant pas d'activité ribonucléotide réductase, les dNTP mitochondriaux proviennent du pool cytosolique.

1.3.4. Transcription de l'ADN mitochondrial :

Les deux brins de l'ADN mitochondrial sont transcrits sous forme polycistronique. Leurs promoteurs respectifs, orientés en sens inverse, sont situés dans la D-Loop (figure 3). Ils sont séparés par environ 150 pb et fonctionnent de manière indépendante.

Le brin lourd possède deux sites d'initiation de la transcription : un site principal H1, localisé au niveau du promoteur HSP et un site mineur H2, localisé 77 pb en aval à l'extrémité 3' du gène de l'ARNt Phe. Le brin léger possède un seul départ de transcription localisé au niveau du promoteur LSP.

La transcription de l'ADN mitochondrial est sous la dépendance d'au moins deux protéines : une ARN polymérase mitochondriale peu sélective et le facteur de transcription mtTFA qui confère sa spécificité à la polymérase (Taanman, 1999). Le facteur mtTFA se fixe sur des séquences situées immédiatement en amont des promoteurs HSP et LSP. Il agit en modifiant la conformation de l'ADN mitochondrial et permettrait ainsi l'accès de la polymérase au niveau du site d'initiation de la transcription. Un autre facteur de transcription de l'ADN mitochondrial, mtTFB, a récemment été caractérisé chez l'homme (McCulloch et al., 2002). Ce facteur est capable de lier l'ADN mitochondrial de manière non spécifique et d'activer la transcription du brin léger en présence de mtTFA. L'effet de mtTFA est très marqué au niveau du promoteur LSP mais il est plus modéré sur la transcription du brin lourd. D'autres facteurs de transcription pourraient donc intervenir au niveau du promoteur HSP.

Le brin léger est transcrit sous forme d'un ARN polycistronique unique. Concernant le brin lourd, le phénomène est plus complexe car deux types d'ARN peuvent être transcrits. Le premier, se terminant à la fin de l'ARNr 16S, serait initié au site H1. Le second, correspondant à l'ensemble de la séquence codante du brin lourd, serait initié au site H2. Parce que l'initiation de la transcription est plus fréquente au niveau du site H1, ce système conduit à une production plus importante des deux ARNr 12S et 16S. Une autre hypothèse avancée pour expliquer la genèse de ces deux types de transcrits est l'intervention d'un facteur de terminaison de la

transcription, mTERF ou mTERM. Ce facteur se fixe à la jonction du gène de l'ARNr 16S et du gène de l'ARNt Leu et bloquerait physiquement l'élongation de la transcription. Ce facteur serait composé de plusieurs sous-unités. Cette complexité n'est pas surprenante car son activité doit être modulée en fonction des besoins cellulaires en ARNr mais aussi en ARNt et en ARNm. Enfin, mTERM pourrait également être un facteur de terminaison de la transcription du brin léger.

La maturation des ARN polycistroniques fait intervenir plusieurs activités enzymatiques. Deux endonucléases clivent respectivement les ARNt à leurs extrémités 5' et 3'. L'endonucléase responsable du clivage 5' est une ribonucléoprotéine, la RNase P mitochondriale. La seconde endonucléase n'est pas caractérisée. La maturation des ARN de transfert est complétée par l'ajout d'une séquence CCA à leur extrémité 3' catalysée par l'ATP(CTP):tRNA nucléotidyltransférase. Les ARN messagers sont polyadénylés par une poly(A)polymérase mitochondriale. Les ARN ribosomiaux sont eux modifiés par ajout d'une courte chaîne poly(A).

1.4. Protéome mitochondrial :

Le nombre de protéines mitochondriales est évalué à un millier, soit environ 10 % du protéome cellulaire total. Parmi ces protéines mitochondriales, la moitié seulement est référencée dans les bases de données.

Le génome mitochondrial code pour 13 protéines qui sont toutes des sous-unités de complexes enzymatiques du système de la phosphorylation oxydative. Toutes les autres protéines sont codées par le génome nucléaire puis importées dans la mitochondrie. Ce sont notamment :

- les autres composants du système de la phosphorylation oxydative,
- les protéines impliquées dans la répllication, la transcription et la traduction de l'ADN mitochondrial,
- les protéines des diverses voies métaboliques mitochondriales (cycle de Krebs, complexe de la pyruvate déshydrogénase, β -oxydation des acides gras, synthèse de l'hème, synthèse des protéines fer-soufre (Fe-S)...))
- des protéines de lutte contre le stress oxydant,
- des protéines impliquées dans l'apoptose,
- divers transporteurs membranaires.

1.4.1. Synthèse protéique mitochondriale :

Par certains aspects, le système de traduction mitochondrial est proche du système bactérien. Il est, en effet, inhibé par le chloramphénicol et l'initiation est réalisée par une formyl-méthionine. Une autre particularité de ce système est l'utilisation d'un code génétique qui diverge du code génétique universel pour plusieurs codons (tableau II).

D'autre part, quasiment tous les composants du système de traduction sont différents de leurs équivalents cytoplasmiques. Les ribosomes mitochondriaux, localisés dans la matrice mitochondriale, sont constitués des ARNr 12S et 16S synthétisés dans la mitochondrie et d'environ 85 protéines importées du cytosol. Le nombre de mitoribosomes est estimé à environ 100 par mitochondrie.

| Codon | Mitochondrie de mammifères | code universel |
|-------|----------------------------|----------------|
| UGA | Trp | Stop |
| AUA | Met | Ile |
| CUA | Leu | Leu |
| AGA | Stop | Leu |
| AGG | Stop | Arg |

Tableau II : Différences entre le code génétique universel et le code génétique des mitochondries de mammifère.

Le déroulement de la traduction mitochondriale est mal connu et peu de facteurs auxiliaires ont été identifiés (Taanman, 1999). Les ARNm mitochondriaux n'ont pas de séquence "leader" ni de coiffe 7-méthylguanilate. De plus, aucun signal de reconnaissance du ribosome n'a été détecté dans la région 5'. Ces données pourraient expliquer la faible efficacité de traduction des ARNm mitochondriaux.

Les constituants du système de la phosphorylation oxydative codés par le génome mitochondrial sont pour la plupart des sous-unités hydrophobes intégrées dans la membrane mitochondriale interne. L'insertion dans la membrane fait intervenir la translocase OXA1 et dépend du gradient de potentiel transmembranaire.

Enfin, de nombreuses cytopathies mitochondriales à transmission maternelle sont associées à

des mutations ponctuelles de gènes mitochondriaux codant des ARNt.

1.4.2. Protéines mitochondriales d'origine nucléaire :

Les protéines mitochondriales codées par des gènes nucléaires sont synthétisées dans le cytoplasme et doivent être importées dans la mitochondrie (Pfanner et Geissler, 2001). Ce phénomène fait intervenir des séquences d'adressage au niveau de la chaîne polypeptidique et différentes protéines d'import spécifiques.

1.4.2.1. Séquence d'adressage :

La plupart des protéines de la matrice mitochondriale ainsi que certaines protéines de la membrane interne et de l'espace intermembranaire sont synthétisées sous forme d'un précurseur porteur d'une préséquence d'import aminoterminal qui sera clivée après son entrée dans la mitochondrie. La composition en acides aminés de cette séquence d'adressage est assez peu conservée et sa taille varie de 10 à 80 résidus environ. Elle est riche en acides aminés basiques (chargés positivement), hydrophobes et hydroxylés. Elle adopte une structure secondaire en hélice α amphiphile avec une face hydrophobe et une face chargée positivement. Certaines protéines ne possèdent pas de préséquence aminoterminal mais un signal d'adressage contenu dans la séquence de la protéine mature. Ce groupe correspond aux protéines de la membrane externe, à des protéines de l'espace intermembranaire et à la majorité des protéines de la membrane interne.

1.4.2.2. Protéines cytosoliques :

Dans le cytoplasme, différentes protéines sont associées aux protéines mitochondriales néosynthétisées. Ces chaperonnes empêchent les polypeptides de s'agréger entre eux et les maintiennent dans une conformation permettant leur entrée dans la mitochondrie. Ce sont notamment des protéines de la famille Hsp 70 (Heat shock protein), une protéine de 28 kDa appelée MSF (Mitochondrial import Stimulating Factor) et le facteur PBF (Presequence Binding Factor) qui se lierait à la préséquence d'adressage.

1.4.2.3. Import à travers la membrane externe :

La translocation au travers de la membrane mitochondriale externe des protéines cytosoliques

destinées à la mitochondrie est contrôlée par le complexe TOM (Translocase Outer Membrane). Cette translocase est composée de récepteurs chargés de reconnaître les protéines à importer, d'un pore transmembranaire appelé GIP (General Import Pore) et de sous-unités régulant l'interaction entre le canal et les récepteurs. Les protéines à importer sont reconnues par des récepteurs différents suivant qu'elles portent une préséquence aminoterminal ou qu'elles soient des protéines hydrophobes arborant une séquence d'adressage interne. Les protéines destinées à demeurer dans la membrane mitochondriale externe n'ont pas de préséquence clivable. Elles sont arrêtées au niveau de la translocase et diffusent dans la membrane. Les protéines destinées à la matrice ou à la membrane interne sont adressées aux translocases de la membrane interne.

1.4.2.4. Import au travers de la membrane interne :

Deux translocases sont localisées dans la membrane interne :

- le complexe TIM23 permet l'import dans la matrice des protéines possédant une séquence d'adressage aminoterminal,
- le complexe TIM22 contrôle l'insertion dans la membrane interne des protéines hydrophobes possédant une séquence d'adressage interne.

L'import des protéines par le complexe TIM 23 dépend du potentiel de membrane et utilise un moteur moléculaire ATP-dépendant. Ce moteur comprend plusieurs protéines matricielles et une sous-unité du complexe TIM23. La chaperonne Hsp 70 mitochondriale (mtHsp70) lie le précurseur protéique et lui permet de traverser le pore transmembranaire. Ce processus nécessite l'hydrolyse d'ATP. mtHsp70 interagit avec la translocase par l'intermédiaire de la sous-unité Tim44. Mge1, un facteur d'échange de nucléotides, est également associé à mtHsp70. Une autre chaperonne, Hsp 60, permet en présence d'ATP à la protéine d'adopter sa structure tertiaire. La préséquence d'adressage aminoterminal est clivée par la protéase MPP (Mitochondrial Processing Peptidase).

Le fonctionnement du complexe TIM22 est lui aussi strictement dépendant du potentiel de membrane. Les protéines hydrophobes prises en charge par ce complexe sont liées dans l'espace intermembranaire par des protéines qui les protègent de l'agrégation et les adressent à la translocase. Le mécanisme par lequel les protéines sont ensuite libérées dans la membrane interne est inconnu.

2. Le complexe I :

Le complexe I ou NADH:ubiquinone oxydoréductase (EC 1.6.5.3) catalyse le transfert des électrons du NADH vers l'ubiquinone et participe à la translocation des protons au travers de la membrane mitochondriale interne.

2.1. Les sous-unités :

Chez les mammifères, ce complexe d'environ 900 kDa est constitué d'au moins 43 sous-unités (Walker, 1995 ; Skehel et al., 1998 ; Fearnley et al., 2001). Ces sous-unités sont listées dans le tableau III (voir aussi MitoPick).

Parmi ces protéines, 7 sont codées par le génome mitochondrial et 36 sont codées dans le noyau. Chez les procaryotes, le complexe I comprend 14 sous-unités qui constituent la structure minimale permettant le fonctionnement de l'enzyme (Dupuis et al., 1998).

Tous les cofacteurs redox identifiés dans les complexes I procaryotes et eucaryotes (flavine mononucléotide (FMN), centres Fe-S, quinones) sont distribués parmi ces 14 sous-unités. Les homologues de ces 14 protéines chez les mammifères sont donc considérés comme responsables du transfert d'électrons et du pompage des protons bien que le rôle de chacune de ces sous-unités ne soit pas encore précisément établi. La fonction des autres sous-unités n'est pas connue.

2.2. Fractionnement :

En utilisant des techniques de purification et de fragmentation, le complexe I bovin a pu être dissocié en diverses sous-fractions. Les données obtenues permettent de localiser les groupements prosthétiques et de réaliser une topographie sommaire du complexe I.

Hatefi en 1985 a été en mesure de séparer 3 sous-complexes :

- la fraction HP (hydrophobic fraction) contient 32 sous-unités dont notamment les sous-unités membranaires ND codées par le génome mitochondrial,

| Nom Swiss-Prot | Autres noms | Gènes | Localisations |
|----------------|--------------|---------|-----------------|
| NIMM | MWFE | NDUFA1 | Xq25-q26 |
| NI8M | B8 | NDUFA2 | 5q31.2 |
| NI9M | B9 | NDUFA3 | 19 |
| NUML | MLRQ | NDUFA4 | 7 |
| NUFM | B13 | NDUFA5 | 7q13.3 |
| NB4M | B14 | NDUFA6 | 22q13.1 |
| N4AM | B14.5a | NDUFA7 | 19p13.2 |
| NUPM | PGIV | NDUFA8 | 9q33.2-q34.11 |
| NUEM | 39 kDa | NDUFA9 | 12p13 |
| NUDM | 42 kDa | NDUFA10 | 2 |
| ACPM | SDAP | NDUFAB1 | 16p12.3-p12.1 |
| NINM | MNLL | NDUFB1 | 14q31.3 |
| NIGM | AGGG | NDUFB2 | 7q32q34 |
| NB2M | B12 | NDUFB3 | 2 |
| NB5M | B15 | NDUFB4 | 3 |
| NISM | SGDH | NDUFB5 | 3 |
| NB7M | B17 | NDUFB6 | 9p13.2 |
| NB8M | B18 | NDUFB7 | 19p13.12-p13.11 |
| NIAM | ASHI | NDUFB8 | 10q23.2-q23.33 |
| NI2M | B22 | NDUFB9 | 8q |
| NIDM | PDSW | NDUFB10 | 16p13.3 |
| NIKM | KFYI | NDUFC1 | 4q28.2-q28.3 |
| N4BM | B14.5b | NDUFC2 | 11 |
| NUAM | 75 kDa | NDUFS1 | 2q33-34 |
| NUCM | 49 kDa | NDUFS2 | 1q23 |
| NUGM | 30 kDa | NDUFS3 | 11p11.11 |
| NUYM | 18 kDa, AQDQ | NDUFS4 | 5q11.1 |
| NIPM | 15 kDa | NDUFS5 | 1p34.2 |
| NUMM | 13 kDa | NDUFS6 | 5pter-p15.33 |
| NUKM | 20 kDa, PSST | NDUFS7 | 19p13.3 |
| NUIM | 23 kDa, TYKY | NDUFS8 | 11q13 |
| NUBM | 51 kDa | NDUFV1 | 11q13 |
| NUHM | 24 kDa | NDUFV2 | 18p11 |
| NUOM | 10 kDa | NDUFV3 | 21q22.3 |
| NB6M | B16.6 | GRIM19 | nucléaire |
| N7BM | B17.2 | DAP13 | nucléaire |
| NU1M | | ND1 | mitochondrie |
| NU2M | | ND2 | mitochondrie |
| NU3M | | ND3 | mitochondrie |
| NU4M | | ND4 | mitochondrie |
| NU5M | | ND5 | mitochondrie |
| NU6M | | ND6 | mitochondrie |
| NULM | | ND4L | mitochondrie |

Tableau III : Liste des sous-unités du complexe I mitochondrial humain indiquant le nom attribué dans la base Swiss-Prot, les autres noms usités, le nom et la localisation du gène.

- la fraction FP (flavoprotéine) correspond aux sous-unités 51 kDa, 24 kDa et 10 kDa. Elle contient également une molécule de FMN et 6 atomes de fer,
- la fraction IP (iron protein) correspond aux sous-unités 75 kDa, 49 kDa, 30 kDa, 18 kDa, 15 kDa et 13 kDa. Elle contient 9 à 10 atomes de fer. En fonction de la méthode de fractionnement utilisée, les sous-unités 23 kDa et 20 kDa sont présentes de façon inconstante dans la fraction IP.

En utilisant une autre technique, Finel et al. (1992) ont obtenu 2 sous-fractions I α et I β . Le sous-complexe I α contient 22 sous-unités dont la majorité est constituée de protéines hydrophiles. Dans cette fraction sont retrouvés les sites de fixation du NADH et de la FMN, ainsi que tous les centres Fe-S. Le sous-complexe I β contient environ 13 sous-unités dont une majorité de sous-unités hydrophobes. De nouveaux travaux (Finel et al., 1994) ont permis de purifier un sous-complexe I α S composé de 13 sous-unités qui contient comme I α tous les groupements prosthétiques du complexe I. Cette fraction contient les sous-unités 75 kDa, 51 kDa, 49 kDa, 30 kDa, 24 kDa, 23 kDa et 20 kDa qui formeraient le centre fonctionnel de l'enzyme.

Plus récemment, Sazanov et al. (2000) ont pu préparer 3 fractions : 2 correspondant aux fractions I α et I β précédemment décrites par Finel et al. (1992) plus une troisième fraction I α qui contient les sous-unités ND1, ND2, ND3, ND4L et KFYI.

2.3. Structure tridimensionnelle :

Les structures tridimensionnelles disponibles du complexe I ont été obtenues par analyse d'images de microscopie électronique. Une image du complexe I de mitochondrie de cœur de bœuf est présentée dans la figure 5 (Grigorieff, 1998).

L'enzyme a une forme générale de L majuscule avec 2 bras de taille équivalente. L'un des bras correspond à un domaine hydrophobe enchâssé dans la membrane mitochondriale interne, l'autre est un domaine hydrophile matriciel. La zone charnière rétrécie entre les 2 domaines pourrait être impliquée dans la fixation des quinones.

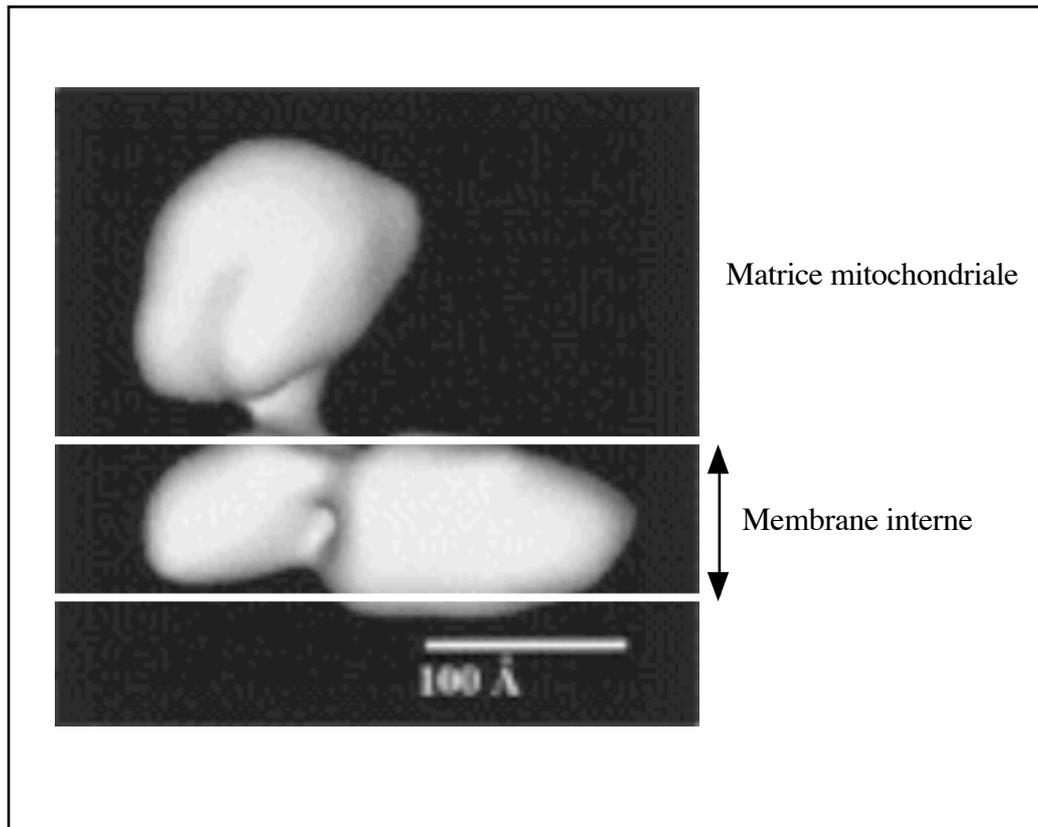


Figure 5 : Structure tridimensionnelle du complexe I de mitochondrie de coeur de bœuf à une résolution de 40 Å (Grigorieff, 1998).

2.4. Cofacteurs :

Les réactions catalysées par le complexe I font intervenir différents cofacteurs. La localisation de leurs sites de fixation fait appel à l'analyse des sous-fractions du complexe I décrites dans le chapitre précédent, à la mise en évidence de motifs consensus de fixation dans la séquence primaire des sous-unités, ainsi qu'à des expériences d'inactivation de gènes. Actuellement, le nombre et la localisation de plusieurs de ces cofacteurs ne sont pas connus précisément.

2.4.1. NADH :

Le site de fixation du NADH est localisé dans la fraction FP et il est porté par la sous-unité 51 kDa (Chen et Guillory, 1981 ; Deng et al., 1990). Deux motifs consensus ont été identifiés dans la séquence de cette protéine (Walker, 1992).

D'après certains auteurs (Chen et Guillory, 1984), un second site serait présent au niveau de la

sous-unité 42 kDa.

2.4.2. FMN :

Le site de fixation de la FMN est localisé dans la fraction FP. Il a été associé à la sous-unité 51 kDa (Fecke et al., 1994). Ce site pourrait correspondre à une séquence conservée, riche en résidus glycine (Walker, 1992).

Le nombre de molécules de FMN présentes dans le complexe I est encore débattu. Albracht et Hedderich (2000) ont émis l'hypothèse de l'existence d'un deuxième site de fixation au niveau de la sous-unités 20 kDa.

2.4.3. Centres Fe-S :

Les centres Fe-S peuvent être mis en évidence par résonance paramagnétique électronique (RPE). Cette technique permet également de déterminer le type de centre : binucléaire (2Fe-2S) ou tétranucléaire (4Fe-4S). Dans le cœur de bœuf, six centres Fe-S ont été identifiés par RPE : 2 centres binucléaires N1a et N1b, et 4 centres tétranucléaires N2, N3, N4, N5 (Ohnishi, 1998). En se basant sur la détection de motifs consensus dans les différentes sous-unités, Albracht et al. (1997) ont trouvé 8 sites pouvant permettre la nucléation de centres Fe-S.

Le centre N3 a été localisé au niveau de la sous-unité 51 kDa (Fecke et al., 1994). Le centre N1a est situé sur la sous-unité 24 kDa (Yano et al., 1994a et 1994b). Yano et al. (1995) ont également détecté 2 centres Fe-S associés à la sous-unité 75 kDa : un centre 4Fe-4S et un centre 2Fe-2S qui sont respectivement N4 et N1b. Un troisième centre tétranucléaire, le centre N5, a été identifié dans cette protéine (Yano et al., 1999). La localisation du centre N2 est très controversée. Certains auteurs avaient localisé N2 au niveau de la sous-unité 23 kDa (Chevallet et al., 1997 ; Albracht et al., 1997) mais des études plus récentes suggèrent qu'il serait plutôt associé à la sous-unité 20 kDa (Ohnishi et al., 1998 ; Schuler et al., 1999 ; Duarte et al., 2002). De plus, les résultats d'une autre étude indiquent que la sous-unité 49 kDa serait impliquée dans la formation du centre N2 qui se situerait à l'interface entre cette sous-unité et la 20 kDa (Kashani-Poor et al., 2001 ; Kersch et al., 2001). Les séquences consensus identifiées au niveau de la sous-unité 23 kDa correspondraient en fait à deux centres tétranucléaires qui n'avaient pas été détectés par RPE : N6a et N6b (Friedrich et al., 2000 ; Rasmussen et al., 2001).

La fonction de ces différents centres Fe-S est également très discutée. Selon les modèles les plus récents (Brandt, 1997 et 1999 ; Dutton et al., 1998) tous les centres participeraient au transport d'électrons. Le centre N2 aurait un rôle central et pourrait intervenir dans la transmission des électrons à la quinone. Il pourrait également être impliqué dans la translocation des protons (Brandt, 1997 et 1999).

Enfin, le centre Fe-S N2 pourrait être impliqué dans le phénomène d'échappement des électrons et la formation d'EORs (Lenaz et al., 2002).

2.4.4. Quinones :

Le nombre des quinones impliquées dans le fonctionnement du complexe I, leurs sites de fixation et leurs rôles précis dans le transfert des électrons ne sont pas connus. Le mécanisme en jeu est probablement très complexe. Le site de fixation, localisé à la charnière entre les domaines matriciel et membranaire du complexe I, occuperait une surface importante et serait constitué de plusieurs sous-sites se chevauchant (Okun, 1999). Les sous-unités 20 et 49 kDa pourraient être impliquées dans la fixation des quinones (Dupuis et al., 2001).

2.5. La sous-unité 23 kDa (TYKY) :

La sous-unité 23 kDa du complexe I mitochondrial humain est codée par le gène nucléaire *NDUFS8*, localisé sur le chromosome 11q13 (Procaccio et al., 1997). Cette sous-unité a été fortement conservée au cours de l'évolution et des homologues sont décrits chez les procaryotes (Dupuis, 1992 ; Weidner et al., 1993) et les eucaryotes (Walker, 1992 ; Duarte et al., 1996).

La séquence de cette protéine contient deux motifs à 4 cystéines qui structurent deux centres fer-soufre [4Fe-4S] (motifs PROSITE PS00198 : CIACKLCEAICP et CIYCGFCQEACP). Ces séquences ont tout d'abord été impliquées dans la constitution du centre Fe-S N2 qui joue un rôle clé dans le fonctionnement du complexe I (Albracht et al., 1997 ; Dupuis et al., 1998). Cependant cette hypothèse a toujours été sujette à controverse et des données récentes suggèrent que la sous-unité TYKY porte en fait 2 centres Fe-S qui n'avaient pas été détectés par RPE mais dont l'existence avait été prédite sur la base d'analyses des structures primaires des sous-unités : N6a et N6b (Friedrich et al., 2000 ; Rasmussen et al., 2001). Le rôle de N6a et N6b dans le

fonctionnement du complexe I n'est pas établi mais Albracht et Hedderich (2000) ont proposé l'implication des deux centres de TYKY dans le pompage des protons.

Des études d'inactivation du gène et de mutagenèse dirigée chez *Rhodobacter capsulatus* et *Neurospora crassa* ont également montré que la sous-unité 23 kDa est indispensable à l'assemblage du complexe I (Chevallet et al., 1997 ; Duarte et Videira, 2000). La conséquence de l'inactivation du gène chez *Neurospora crassa* est l'absence du bras matriciel et une accumulation du bras membranaire. L'observation de ce phénotype avec des souches mutées au niveau de résidus cystéines impliqués dans la constitution des centres Fe-S montre le rôle structural de ces centres dans le complexe I.

L'importance de cette sous-unité est également soulignée par la découverte de mutations dans le gène *NDUFS8* chez un patient souffrant du syndrome de Leigh (Loeffen et al., 1998). L'étude de ces mutations chez la levure *Yarrowia lipolytica* montre un dysfonctionnement important du complexe I avec une diminution de la V_{max} d'environ 50 % et une modification de la fixation des quinones (Ahlers et al., 2000a).

2.6. La sous-unité 20 kDa (PSST) :

La sous-unité 20 kDa (PSST) du complexe I mitochondrial humain est codée par le gène nucléaire *NDUFS7* localisé dans la région p13 chromosome 19 (Hyslop et al., 1996). Elle fait partie des 14 sous-unités constituant la structure fonctionnelle basale de l'enzyme. A l'instar de la sous-unité 23 kDa, des homologues ont été décrits chez les procaryotes (Xu et al, 1992 ; Weidner et al., 1993 ; Dupuis et al., 1998) et les eucaryotes (Walker, 1992 ; Peterson et al., 1993 ; Sousa et al., 1999).

La question du positionnement du centre Fe-S N2 sur cette sous-unité ou sur la sous-unité 23 kDa a été longuement débattue. Cependant, des données récentes sont en faveur d'une localisation sur PSST (Schuler et al., 1999 ; Duarte et al., 2002). Ces résultats sont de plus complétés par d'autres travaux qui suggèrent que N2 serait situé à l'interface des sous-unités PSST et 49 kDa (Kashani-Poor et al., 2001 ; Kerscher et al., 2001). Du fait du rôle central attribué à N2 dans le fonctionnement du complexe I, la sous-unité PSST serait donc impliquée à la fois dans le transport des électrons et dans la translocation des protons (Brandt, 1997 et 1999). D'autre part, l'hypothèse d'une participation de PSST au site de fixation des quinones a

été récemment proposée (Dupuis et al., 2001). Cette hypothèse est confortée par les résultats de 2 études utilisant des techniques différentes. La première, basée sur l'analyse de mutants ponctuels, confirmerait également le rôle de PSST dans la translocation des protons (Ahlers et al., 2000b). La deuxième, basée sur des marquages par photoaffinité, suggère de plus une interaction fonctionnelle entre PSST et la sous-unité ND1 (Schuler et Casida, 2001). Enfin, le centre N2, et donc PSST, pourrait être directement impliqué dans le transfert d'électrons à l'oxygène et dans la formation d'EORs (Lenaz et al., 2002).

Le rôle central de cette sous-unité est souligné par la mise en évidence d'une mutation du gène *NDUFS7* chez deux patients d'une même fratrie atteints par le syndrome de Leigh (Triepels et al., 1999). Les conséquences de cette mutation ont été étudiées chez *Yarrowia lipolytica* : elle perturbe très clairement le fonctionnement du complexe I avec une chute de la V_{max} d'environ 50 % et une modification de l'affinité pour les quinones (Ahlers et al., 2000a). Il est très intéressant de constater que ces effets sont similaires à ceux obtenus en reproduisant des mutations détectées dans le gène codant la sous-unité 23 kDa.

3. Régulation de l'expression des gènes du système d'oxydation phosphorylante :

Un gène peut être régulé à toutes les étapes de son expression : transcription, épissage, transport nucléocytoplasmique, stabilité de l'ARNm, traduction, modifications post-traductionnelles. Plusieurs facteurs de transcription régulant l'expression des gènes nucléaires du système d'oxydation phosphorylante ont été identifiés. Certains de ces facteurs, NRF-1 et NRF-2, contrôlent indirectement la transcription des gènes mitochondriaux, répondant, au moins en partie, aux questions relatives à la coordination de l'expression des deux génomes. De plus, des cofacteurs intégrant NRF-1 et NRF-2 dans des réponses cellulaires complexes ont été récemment décrits. D'autre part, des mécanismes de régulation post-transcriptionnels ont été mis en évidence pour deux sous-unités du complexe I. Enfin, le rôle possible de facteurs d'assemblage sera évoqué.

3.1. Régulation transcriptionnelle :

3.1.1. Facteurs de transcription nucléaires :

3.1.1.1. NRF-1 :

Le facteur de transcription NRF-1 (Nuclear Respiratory factor 1) a tout d'abord été identifié comme un activateur de la transcription du gène codant le cytochrome c chez le rat (Evans et Scarpulla, 1989). Depuis, des sites fonctionnels fixant ce facteur de transcription ont été identifiés dans un grand nombre de promoteurs de gènes codant des sous-unités du système d'oxydation phosphorylante (tableau IV). Le spectre d'action de cet activateur transcriptionnel s'étend également à des gènes codant pour des protéines mitochondriales indirectement associées à la phosphorylation oxydative : réplication et transcription de l'ADN mitochondrial, assemblage du complexe IV de la chaîne respiratoire. Il régule aussi l'expression d'enzymes cytosoliques participant à la biosynthèse de l'hème, constituant des cytochromes. Il est donc probable que NRF-1 soit un élément clé dans le contrôle exercé par le noyau sur la mitochondrie pour activer et coordonner les différents systèmes dont dépend la phosphorylation oxydative. Cette hypothèse est confortée par plusieurs études qui montrent que le taux de l'ARNm de

NRF-1 et la capacité de la protéine à lier l'ADN augmentent en réponse à divers stimuli induisant une prolifération mitochondriale et/ou une élévation de la respiration cellulaire (Scarpulla, 2002). De plus certaines de ces études ont montré un lien entre l'activation de NRF-1 et l'augmentation de l'expression des gènes du cytochrome c et de la 5-aminolévulinate synthase.

D'autre part, des sites NRF-1 fonctionnels ont été mis en évidence dans le promoteur de gènes qui ne sont pas directement liés au métabolisme mitochondrial : facteur d'initiation de la traduction eIF-2 β , tyrosine aminotransférase (Chau et al., 1992), histone h5 (Gomez-Cuadrado et al., 1995), enzymes de la voie de synthèse *de novo* des purines (Chen et al., 1997), récepteur du glutamate (Myers et al., 1998), récepteur de chémokines (Wegner et al., 1998), récepteur du virus de la poliomyélite (Solecki et al., 2000). Ces données laissent entrevoir un rôle plus général de ce facteur de transcription dans le fonctionnement cellulaire.

Le facteur NRF-1 a été purifié à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa (Chau et al., 1992) et l'ADN complémentaire a été cloné (Virbasius et al., 1993a). C'est une protéine de 68 kDa présentant un domaine d'activation de la transcription central constitué d'enchaînements arrangés en tandem d'acides aminés hydrophobes associés à des glutamines (Gugneja et al., 1996). La forme active de NRF-1 est un homodimère. De plus, la protéine peut être phosphorylée au niveau d'un petit domaine aminoterminal avec comme conséquence une augmentation de sa capacité à fixer l'ADN (Gugneja et Scarpulla, 1997).

NRF-1 présente au niveau de son domaine de liaison à l'ADN des homologies avec des protéines impliquées dans la régulation du développement chez l'oursin et la drosophile (Virbasius et al., 1993a). Aucune isoforme n'a été identifiée chez les mammifères mais des homologues ont été caractérisés chez la souris (Schaefer et al., 2000), le poulet (Gomez-Cuadrado et al., 1995) et chez le poisson *Danio rerio* (Becker et al., 1998).

L'étude de l'ARNm a montré une grande hétérogénéité dans la séquence de la région 5' non traduite (Huo et Scarpulla, 1999). Les auteurs ont détecté 6 exons non traduits permettant, par épissage alternatif, la synthèse d'une variété importante de transcrits. Ce phénomène pourrait intervenir dans la régulation de l'expression de NRF-1. En effet, certains exons forment des structures secondaires inhibant la traduction.

| | NRF-1 | NRF-2 | YY1 | Sp1 | Références |
|--|-------|-------|-----|-----|------------|
| Phosphorylation oxydative | | | | | |
| <i>Complexe II</i> | | | | | |
| SDHB (humain) | + | + | | | 1 |
| <i>Complexe III</i> | | | | | |
| Ubiquinone binding protein (humain) | + | | | | 2 |
| Cytochrome c1 (humain) | | | | + | 3 |
| UCR1 (humain) | + | | | | 3 |
| <i>complexe IV</i> | | | | | |
| COX IV (rat) | | + | | | 5 |
| COX IV (souris) | | + | | + | 6 |
| COX Vb (souris) | + | + | + | + | 7 ; 8 ; 9 |
| COX VIc (rat) | + | | | | 2 |
| COX VIaL (humain) | + | + | + | | 10 |
| COX VIIaL (bœuf) | + | + | | + | 11 |
| COX VIIc (bœuf) | | + | + | | 12 |
| <i>Complexe V</i> | | | | | |
| ATP synthase gamma (bœuf) | + | | | | 13 |
| ATP synthase beta (humain) | | + | | + | 5 ; 14 |
| ATP synthase alpha (humain) | | | + | | 15 |
| ATP synthase alpha (bœuf) | | | + | | 15 |
| <i>Transporteurs mobiles d'électrons</i> | | | | | |
| Cytochrome c (humain) | + | | | | 2 |
| Cytochrome c (rat) | + | | | + | 16 |
| <i>Transporteurs de nucléotides</i> | | | | | |
| ANT2 (humain) | | | | + | 17 |
| <i>Assemblage complexe IV</i> | | | | | |
| SURF-1 (humain) | | + | + | + | 18 ; 19 |
| COX17 (souris) | + | + | | + | 20 |
| Transcription et réplication ADNmt | | | | | |
| mtTFA (humain) | + | + | | + | 21 ; 22 |
| MRP RNA (souris) | + | | | | 2 |
| MRP RNA (humain) | + | | | | 2 |
| Synthèse de l'hème | | | | | |
| 5-aminolévulinate synthase (rat) | + | | | | 23 ; 24 |
| Navette glycérol phosphate | | | | | |
| Glycérol phosphate déshydrogénase (humain) | | + | | | 25 |

Tableau IV : Sites fonctionnels NRF-1, NRF-2, YY1 et Sp1 dans les gènes nucléaires associés à la phosphorylation oxydative.

Références : (1) : Au et Scheffler, 1998 ; (2) : Evans et Scarpulla, 1990 ; (3) : Li et al., 1996a ; (4) : Scarpulla, 1997 ; (5) : Virbasius et Scarpulla, 1991 ; (6) : Carter et al. 1992 ; (7) : Virbasius et al., 1993a ; (8) : Virbasius et al., 1993b ; (9) : Basu et al., 1993 ; (10) : Wong-Riley et al., 2000 ; (11) : Seelan et al., 1996 ; (12) : Seelan et Grossman, 1997 ; (13) : Chau et al., 1992 ; (14) : Villena et al., 1994 ; (15) : Breen et al., 1996 ; (16) : Evans et Scarpulla, 1989 ; (17) : Li et al., 1996b ; (18) : Gaston et Fried, 1995 ; (19) : Cole et Gaston, 1995 ; (20) : Takahashi et al., 2002 ; (21) : Virbasius et Scarpulla, 1994 ; (22) : Zaid et al., 1999 ; (23) : Braidotti et al., 1993 ; (24) : Li et al., 1999 ; (25) : Gong et al., 2000.

3.1.1.2. NRF-2 :

Le facteur de transcription NRF-2 (Nuclear Respiratory factor 2) a été identifié par l'équipe de Scarpulla en étudiant le promoteur du gène de rat codant pour la sous-unité IV de la cytochrome c oxydase (Virbasius et Scarpulla, 1991). Comme NRF-1, ce facteur active la transcription de nombreux gènes impliqués non seulement dans la phosphorylation oxydative mais également dans d'autres systèmes mitochondriaux indirectement associés à ce métabolisme (tableau IV). Il régule ainsi l'expression de facteurs d'assemblage du complexe IV de la chaîne respiratoire et d'un composant de la navette glycérol phosphate qui transfère les équivalents réducteurs du cytosol vers la matrice mitochondriale

D'autre part, NRF-2 contrôle également l'expression de gènes codant pour des protéines qui ne sont pas directement impliquées dans le métabolisme mitochondrial : protéines ribosomales (Genuario et al., 1993), enzyme de la synthèse des purines (Marie et al., 2002). Il est intéressant de noter que NRF-1 et NRF-2 contrôlent chacun l'expression d'une enzyme de cette voie de biosynthèse.

Le site de fixation de NRF-2 sur l'ADN contient le motif GGAA qui est caractéristique de la famille des facteurs de transcription à domaine ETS. La purification du facteur NRF-2 à partir d'extraits nucléaires de cellules HeLa a montré qu'il est constitué de 5 sous-unités : α , β_1 , β_2 , γ et δ et a mis en évidence l'homologie avec un facteur de transcription murin appelé GABP (Virbasius et al., 1993b). Seule la sous-unité α se lie à l'ADN. Les quatre autres sous-unités, probablement produites par épissage alternatif à partir d'un gène unique, s'associent à la sous-unité α pour former différents complexes (Gugneja et al., 1995). Les sous-unités β possèdent un domaine de dimérisation permettant la formation de complexes hétérotétramériques $\alpha\beta_2$ qui se fixent avec une forte affinité sur des sites de reconnaissance arrangés en tandem. Les sous-unités γ ne possèdent pas de sites de dimérisation et forment des hétérodimères $\alpha\gamma$ qui reconnaissent les mêmes sites que les complexes $\alpha\beta_2$ mais se lient à l'ADN avec une moins grande affinité. D'autre part, les sous-unités β et δ portent le domaine d'activation de la transcription. Ce domaine constitué par des enchaînements de résidus hydrophobes contenant des glutamines ressemble à celui du facteur NRF-1. Les sous-unités β_1 et δ se distinguent respectivement de β_2 et γ par l'insertion d'un petit domaine dont la fonction est inconnue.

La capacité de la sous-unité α à fixer l'ADN est influencée par les conditions redox. L'oxydation de résidus cystéines spécifiques inhibe en effet sa liaison à l'ADN (Martin et al., 1996). Ce phénomène pourrait permettre de diminuer l'expression de gènes impliqués dans la

respiration cellulaire en réponse à la production d'EORs. Une étude récente suggère également que l'expression de la sous-unité α est stimulée par les hormones thyroïdiennes (Rodriguez-Pena et al., 2002). D'autre part, un mécanisme de régulation supplémentaire ferait intervenir la localisation subcellulaire de la sous-unité β : elle pourrait être stockée dans le cytoplasme et serait transférée dans le noyau en réponse à une activation cellulaire (Zang et Wong-Riley, 2000).

3.1.1.3. YY1 :

YY1 (Yin Yang 1) est un facteur ubiquitaire participant à la régulation de l'expression de nombreux gènes et exerçant des effets divers sur la transcription. Il peut être activateur, répresseur ou participer à l'étape d'initiation. Ces effets variés s'expliquent par sa capacité à interagir avec de nombreuses protéines clés de la transcription : des facteurs d'initiation comme TBP ou TFIIB, des complexes histones acétyltransférases, coactivateurs transcriptionnels, ou des complexes histones désacétylases, corépresseurs transcriptionnels (Thomas et Seto, 1999).

Il régule l'expression de plusieurs gènes codant pour des protéines associées à la phosphorylation oxydative : des sous-unités de la cytochrome oxydase, la sous-unité α de l'ATP synthase et la protéine d'assemblage SURF-1 (tableau IV).

Le promoteur du gène *COX5B* de souris contient deux sites YY1. L'un des deux, localisé au niveau du départ de transcription, participerait à l'étape d'initiation (Basu et al., 1993). L'autre, situé en amont, a un effet inhibiteur en bloquant de manière compétitive la fixation d'un facteur activateur (Basu et al., 1997). Cette inhibition serait levée lors de la myogenèse permettant une expression accrue dans le muscle. Dans les autres gènes cités YY1 agit comme activateur transcriptionnel. Il pourrait participer à l'initiation dans les promoteurs *ATPA* et *COX7C* (Breen et al., 1996 ; Seelan et Grossman, 1997). Une étude a d'autre part montré que le site YY1 présent dans le promoteur *Surf-1* est nécessaire et suffisant pour activer l'expression du gène en réponse à des facteurs de croissance (Cole et Gaston, 1997).

3.1.1.4. Sp1 :

Sp1 est, comme YY1, un facteur de transcription ubiquitaire agissant sur de très nombreux promoteurs et pouvant intervenir aussi bien comme activateur que comme répresseur (Suske, 1999). Il interagit avec d'autres protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle comme TBP, TAFs ou YY1. L'activité de Sp1 pourrait être régulée par phosphorylation et

glycosylation. D'autre part, une étude a montré qu'*in vitro* la capacité de Sp1 à fixer l'ADN est influencée par les conditions redox : en conditions de stress oxydant, la liaison à l'ADN est inhibée (Ammendola et al., 1994). Un autre facteur de la même famille, Sp3, peut se fixer sur les sites Sp1. Ce facteur, exprimé de manière ubiquitaire, peut être activateur ou inhibiteur. Dans ce dernier cas, il inhibe l'activation de la transcription dépendante de Sp1 en se fixant sur les mêmes sites.

Des sites Sp1 fonctionnels ont été identifiés dans les promoteurs de gènes codant pour des protéines liées à la phosphorylation oxydative : cytochrome c1 (complexe III), plusieurs sous-unités de la cytochrome c oxydase, cytochrome c, sous-unité β de l'ATP synthase, transporteur de nucléotide ANT2, facteur d'assemblage COX17, facteur de transcription de l'ADN mitochondrial mtTFA (tableau IV). Le facteur Sp1 a un rôle positif sur la transcription des cytochromes c1 et c, des sous-unités de la cytochrome c oxydase, de COX17 et de mtTFA. Dans le cas du promoteur ANT2, Sp1 a un double effet : deux sites amonts activent de manière synergique la transcription tandis qu'un troisième, adjacent au départ de transcription, a un effet inhibiteur (Li et al., 1996b ; Zaid et al, 1999). La coexistence de sites Sp1 activateurs et d'un site répresseur a également été décrite dans le promoteur ATPB (Zaid et al, 1999).

Une étude récente a montré que Sp1 est impliqué dans l'activation de la transcription du cytochrome c dans le muscle squelettique en réponse à une activité contractile (Connor et al., 2001).

3.1.1.5. CREB :

Le promoteur du cytochrome c contient 2 sites CRE (cAMP Responsive Element) fixant des facteurs de la famille ATF/CREB (Activating Transcription Factor/CRE Binding protein). Ces sites permettent d'activer la transcription du gène en réponse à une augmentation du taux d'AMPc (Gopalakrishnan et Scarpulla, 1994). Cette activation fait intervenir la phosphorylation de la protéine CREB par la protéine kinase A.

Cette voie de régulation est impliquée dans la réponse à des facteurs de croissance sériques. Lorsque des cellules quiescentes sont stimulées par du sérum, elles se divisent avec une augmentation concomitante de la respiration cellulaire et de la synthèse d'ATP. Il a été démontré que cette stimulation de la respiration résulte d'une augmentation de l'expression du cytochrome c induite par l'action coordonnée des facteurs de transcription NRF-1 et CREB (Herzig et al., 2000).

3.1.1.6. Facteurs tissu-spécifiques :

La caractérisation des promoteurs d'isoformes musculaires de sous-unités de la cytochrome c oxydase a montré qu'ils sont activés par des sites fixant des facteurs de transcription spécifiques de la différenciation musculaire : MEF2 et E-Box (Wan et Moreadith, 1995 ; Lenka et al., 1996 ; Yu et al., 2002).

Un autre élément *cis*-régulateur, OXBOX/REBOX, a été identifié dans les promoteurs de l'isoforme musculaire du translocateur de nucléotide (ANT1) et de la sous-unité β de l'ATP synthase (Chung et al., 1992). La séquence OXBOX fixe des protéines activatrices qui ne sont présentes que dans les cellules musculaires. La séquence REBOX, partiellement chevauchante, fixe des facteurs ubiquitaires dont la liaison est modulée *in vitro* par des agents réducteurs et les hormones thyroïdiennes. La fixation des facteurs OXBOX et REBOX est mutuellement exclusive.

3.1.2. Coordination de l'expression des différents constituants du système de phosphorylation oxydative :

L'analyse du spectre d'activité de NRF-1 et NRF-2 (tableau IV) permet d'imaginer comment, par l'intermédiaire de ces facteurs de transcription, le noyau peut contrôler la synthèse et le fonctionnement du système d'oxydation phosphorylante.

Ces facteurs permettent notamment de coordonner l'expression de composants codés par les génomes nucléaire et mitochondrial. NRF-1 et NRF-2 activent en effet l'expression de plusieurs protéines de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase codées dans le noyau et il est probable que de nombreuses sous-unités dont les promoteurs n'ont pas encore été étudiés sont régulées par ces mêmes facteurs. De plus, ils contrôlent par l'intermédiaire de mtTFA et de la RNase MRP la synthèse des sous-unités codées dans la mitochondrie. D'une part, NRF-1 et NRF-2 régulent l'expression de mtTFA, facteur de transcription de l'ADN mitochondrial. D'autre part, NRF-1 active le promoteur du gène codant la fraction ARN de la RNase MRP. Cette ribonucléoprotéine permet de cliver les ARN mitochondriaux transcrits à partir du brin léger pour former l'amorce nucléotidique permettant l'initiation de la transcription du brin lourd (voir Introduction, chapitre 1.3.3.). Par son intermédiaire, NRF-1 agit donc sur la répllication de l'ADN mitochondrial.

NRF-1 et NRF-2 contrôlent aussi l'expression de protéines SURF-1 et COX17 qui sont

essentielles à l'assemblage du complexe IV. Ils régulent également la synthèse de la 5-aminolévulinate synthase, enzyme limitante de la voie de biosynthèse de l'hème, le groupement prosthétique des cytochromes.

Enfin, un site NRF-2 fonctionnel est présent dans le promoteur de la glycérol phosphate déshydrogénase. Cette enzyme est un élément de la navette glycérol phosphate qui permet le transfert d'équivalents réducteurs produits dans le cytoplasme vers la matrice mitochondriale et elle participe ainsi à l'approvisionnement de la chaîne respiratoire en électrons.

Comme le montre la figure 6, les facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 pourraient donc être des acteurs clés de la communication entre le noyau et la mitochondrie en coordonnant différents aspects de la biosynthèse et du fonctionnement du système de la phosphorylation oxydative.

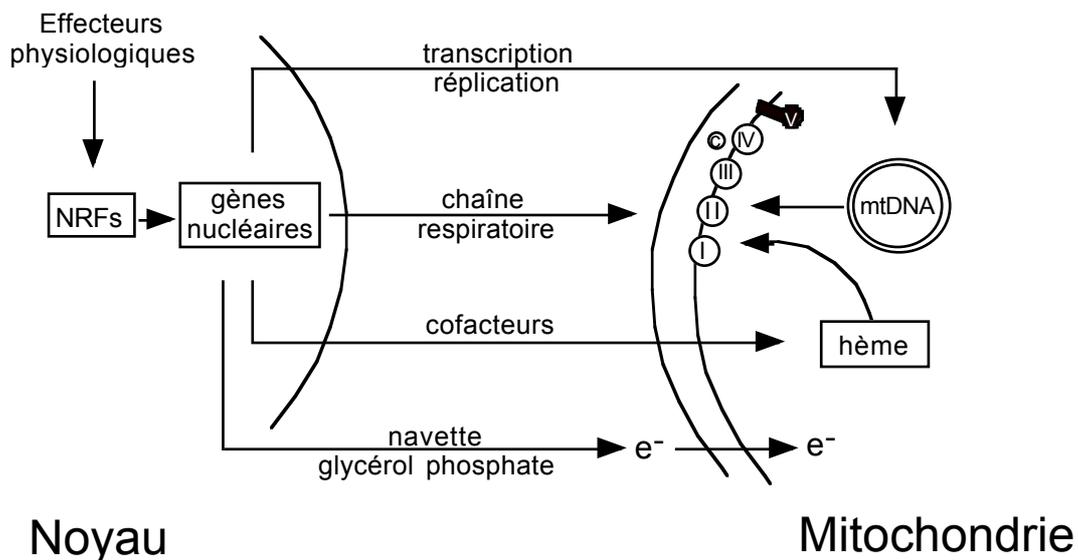


Figure 6 : Contrôle nucléaire intervenant sur le métabolisme de phosphorylation oxydative par l'intermédiaire des facteurs NRF-1 et NRF-2 (d'après Scarpulla, 1997).

Les facteurs NRF-1 et NRF-2 (NRFS) activent l'expression de gènes nucléaires codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase, des facteurs de transcription et de réplication de l'ADN mitochondrial, une enzyme catalysant une étape limitante de la biosynthèse de l'hème et une enzyme de la navette glycérol phosphate qui permet le transfert d'équivalents réducteurs du cytoplasme vers la matrice mitochondriale. NRF-1 et NRF-2 agissent indirectement sur la biosynthèse des complexes II, III, IV et V par l'intermédiaire de gènes nucléaires contrôlant l'expression de l'ADN mitochondrial.

3.1.3. Cofacteurs transcriptionnels :

Les cofacteurs transcriptionnels sont des protéines qui ne lient pas l'ADN mais interagissent avec plusieurs facteurs de transcription pour activer ou réprimer la transcription. Ils permettent ainsi d'intégrer dans un même programme biologique des gènes régulés par des facteurs de transcription différents.

3.1.3.1. PGC-1 :

PGC-1 est un coactivateur transcriptionnel de récepteurs nucléaires tels que PPAR α (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) et le récepteur des hormones thyroïdiennes. Il intervient dans l'activation de plusieurs éléments du programme de thermogenèse adaptative, un processus physiologique qui permet la dissipation de l'énergie métabolique sous forme de chaleur (pour une revue : Lowell et Spiegelman, 2000). Il est activé en réponse à un stimulus externe comme l'exposition au froid ou l'ingestion d'aliments riches en calories. Chez les petits mammifères, le siège de la thermogenèse adaptative est la graisse brune. Chez l'homme, c'est le muscle squelettique.

Ce programme est caractérisé par une stimulation de la biogenèse mitochondriale et par une augmentation de l'expression des enzymes de la chaîne respiratoire et des protéines de découplage (UCPs). Les protéines de découplage localisées dans la membrane mitochondriale interne permettent de dissiper le gradient de protons généré par la chaîne respiratoire indépendamment de la synthèse d'ATP (Ricquier et Bouillaud, 2000). Il a été montré que le taux de l'ARNm de PGC-1 est augmenté dans le tissu adipeux brun et le muscle de souris exposées au froid, probablement du fait de l'activation du système nerveux sympathique et de la stimulation de récepteurs β -adrénergiques (Puigserver et al., 1998). De plus, l'augmentation de l'expression de PGC-1 entraîne une augmentation de l'expression de la protéine de découplage UCP1, de plusieurs protéines de l'oxydation phosphorylante d'origine nucléaire et mitochondriale, un accroissement de la consommation d'oxygène et le doublement du contenu cellulaire en ADN mitochondrial. PGC-1 augmente l'expression de la protéine de découplage en stimulant l'activité transcriptionnelle de deux facteurs qui se fixent au niveau du promoteur *UCP1* : PPAR α et le récepteur des hormones thyroïdiennes.

Une autre étude a ensuite montré que PGC-1 interagit avec NRF-1 et augmente sa capacité à activer la transcription de ses gènes cibles (Wu et al., 1999). PGC-1 entraîne également une augmentation de l'expression de NRF-1 et NRF-2. Du fait que ces deux facteurs de

transcription contrôlent des étapes clés de la biogenèse mitochondriale et de la phosphorylation oxydative, les résultats de cette étude mettent en évidence un lien direct entre un stimulus physiologique externe et ces événements métaboliques (figure 7).

D'autre part, PGC-1 est capable d'augmenter l'expression des gènes de la β -oxydation des acides gras par l'intermédiaire du facteur PPAR α (Vega et al., 2000). PPAR α est un activateur majeur de cette voie métabolique et son taux augmente dans les tissus à forte demande énergétique. PGC-1 interagit avec PPAR α et accroît sa capacité à *trans*-activer ses promoteurs cibles. L'action de PGC-1 sur la β -oxydation est associée à un accroissement du catabolisme des acides gras. Ces données sont très intéressantes puisque la β -oxydation est un pourvoyeur majeur d'équivalents réducteurs pour la chaîne respiratoire.

PGC-1 active également l'expression d'enzymes de la gluconéogenèse en réponse à l'action des glucocorticoïdes et de l'AMPc (Yoon et al., 2001). Cette action conduit à une augmentation de la production de glucose. PGC-1 stimule notamment la transcription du gène de la phosphoénolpyruvate carboxykinase, enzyme catalysant l'étape limitante de la gluconéogenèse, en interagissant avec le récepteur aux glucocorticoïdes et le facteur nucléaire hépatique β . Dans ce système, l'activation de l'expression de PGC-1 par l'AMPc fait intervenir le facteur de transcription CREB (Herzig et al., 2001). Dans ce contexte, il est intéressant de noter qu'un site NRF-1 fonctionnel est présent dans le promoteur d'une autre enzyme de la gluconéogenèse, la tyrosine aminotransférase (Chau et al., 1992).

Le cofacteur PGC-1 régule donc et coordonne de nombreux processus cellulaires impliqués dans la production d'énergie (figure 7).

Le mode d'action de PGC-1 passerait par le recrutement de coactivateurs ayant une activité histone acétyltransférase (Puigserver et al., 1999). PGC-1 agirait également sur l'épissage de l'ARN messager (Monsalve et al., 2000).

3.1.3.2. PRC :

Comme PGC-1, le cofacteur PRC (PGC-1 Related Coactivator) interagit avec NRF-1 et accroît sa capacité à activer la transcription (Andersson et Scarpulla, 2001). Les deux facteurs présentent des homologies au niveau de plusieurs domaines. L'expression de PRC est augmentée dans des cellules qui prolifèrent en réponse à une activation par le sérum. Ce cofacteur permettrait donc de coordonner différentes activités métaboliques en réponse aux besoins énergétiques lié à la croissance cellulaire (figure 7).

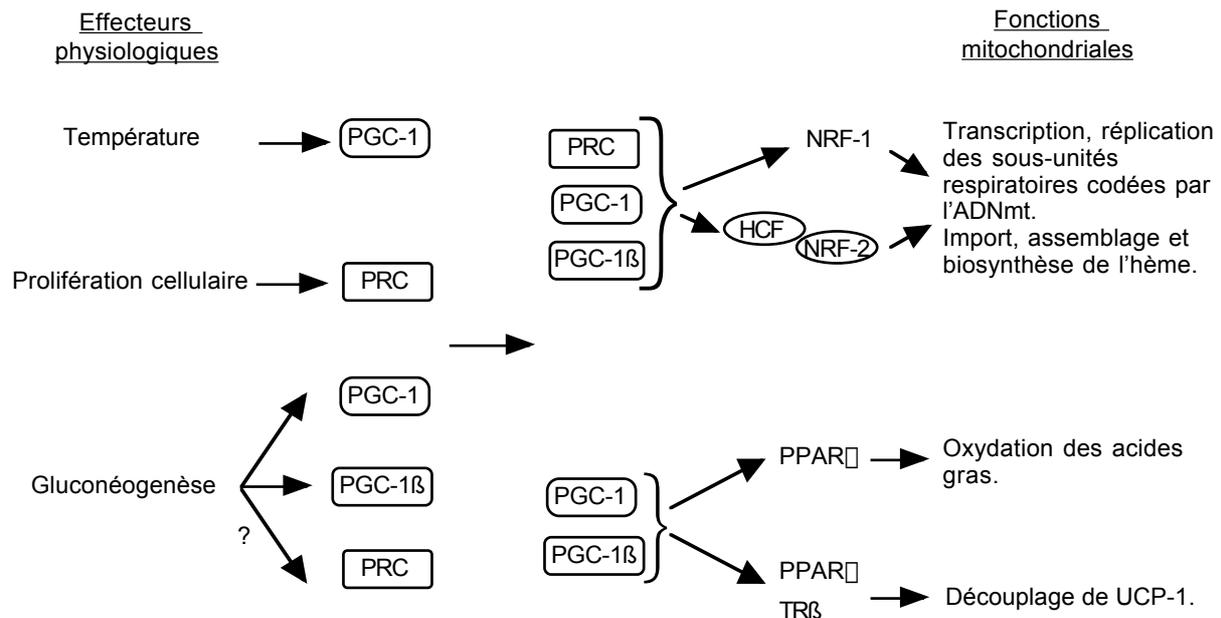


Figure 7 : Représentation schématique du réseau d'activateurs et de coactivateurs de la transcription impliqués dans le contrôle nucléaire de la biogenèse et des fonctions mitochondriales (d'après Scarpulla, 2002).

Les membres de la famille PGC-1 (PGC-1, PGC-1 β ou PRC) sont des protéines nucléaires dont l'expression est induite par des signaux extracellulaires liés à la thermogenèse, la gluconéogenèse ou la prolifération cellulaire. Ce sont des coactivateurs qui interagissent avec des facteurs de transcription et augmentent ainsi l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la biogenèse et les fonctions mitochondriales. Facteurs de transcription et coactivateurs interagissent directement ou par l'intermédiaire d'autres protéines, comme dans le cas de HCF et NRF-2(GABP). Les complexes ainsi formés permettraient le recrutement d'enzymes de modification des histones et de facteurs d'épissage (non représentés).

3.1.3.3. PGC-1 β :

PGC-1 β possède une forte homologie avec PGC-1 sur l'ensemble de sa séquence (Lin et al., 2002). Il peut activer la transcription en interagissant avec différents facteurs : HNF-4 \square , PPAR \square et NRF-1.

3.1.3.4. HCF :

Le cofacteur HCF (Host Cell Factor) interagit avec le domaine d'activation de l'ADN de la sous-unité β du facteur GABP/NRF-2 (Vogel et Kristie, 2000). HCF interagirait également avec les coactivateurs PGC-1, PGC-1 β et PRC. Comme il ne semble pas exister d'interaction directe entre les coactivateurs de la famille PGC-1 et NRF-2, HCF pourrait être le lien entre ces protéines. Par cet intermédiaire, les stimuli physiologiques activant les cofacteurs PGC-1, PGC-

1 β et PRC pourraient donc réguler l'expression des gènes dont la transcription est induite par le facteur NRF-2 (figure 7). Des gènes comme *COX4*, *ATPB* ou *Surf-1* qui ne sont pas contrôlés par NRF-1 (tableau IV) seraient de cette façon intégrés dans ce réseau de régulation cellulaire.

3.2. Régulations post-transcriptionnelles de l'expression de sous-unités du complexe I :

3.2.1. Régulation de l'expression de la sous-unité 75 kDa par le fer :

La sous-unité 75 kDa du complexe I de la chaîne respiratoire est une protéine à centre Fe-S. Une étude récente a montré que son expression dans des cellules COS-7 est inhibée lorsque la concentration en fer diminue (Lin et al., 2001). Cette inhibition est liée à une régulation traductionnelle faisant intervenir une protéine de type IRP (Iron Regulatory Protein). Lorsque le taux du fer est abaissé, cette protéine se fixe au niveau de la région 5' non traduite de l'ARNm et stabilise une structure en épingle à cheveux. De tels arrangements bloquent la progression du ribosome et inhibent la traduction (Pesole et al., 2001).

3.2.2. Régulation de l'expression de la sous-unité 18 kDa (AQDQ) par phosphorylation :

La stimulation de fibroblastes quiescents par l'AMPc induit une augmentation d'un facteur 2 à 3 de l'activité de la chaîne respiratoire (Scacco et al., 2000). Cette augmentation est uniquement supportée par le complexe I sans activation des autres complexes. Cet effet est associé à la phosphorylation de la sous-unité 18 kDa par une protéine kinase AMPc-dépendante localisée dans la membrane mitochondriale interne dont semble dépendre, au moins en partie, l'augmentation de l'activité catalytique du complexe I. L'importance fonctionnelle de cette sous-unité est soulignée par la mise en évidence de mutations dans le gène *NDUFS4* chez quatre patients souffrant d'un déficit sévère du complexe I (van den Heuvel et al., 1998 ; Budde et al., 2000 ; Petruzzella et al., 2001). L'une de ces mutations détruit le site de phosphorylation empêchant la modification de la protéine et l'activation de la respiration mitochondriale en réponse à l'AMPc (Papa et al., 2001).

3.3. Facteurs d'assemblage :

S'ils ne sont pas à proprement parler des sous-unités des complexes respiratoires, les facteurs d'assemblage sont néanmoins indispensables pour que les protéines constituant ces complexes exercent leur fonction. A ce titre, ils peuvent être considérés comme une étape du processus d'expression des gènes codant ces sous-unités. Ils peuvent être ainsi des points clés de régulation du fonctionnement d'un complexe comme le serait le contrôle de l'expression d'une ou plusieurs sous-unités. Cette hypothèse est confortée par les exemples de deux facteurs d'assemblage du complexe IV *Surf-1* et *COX17* dont les promoteurs sont régulés par les mêmes facteurs de transcription que ceux des gènes codant les sous-unités (tableau IV). Deux facteurs d'assemblage du complexe I ont été décrits chez *Neurospora crassa* (Küffner et al., 1998) et l'homologue humain d'une de ces protéines a été récemment caractérisé (Janssen et al., 2002).

4. Etude de l'expression des sous-unités du complexe I mitochondrial humain :

Le travail qui a été réalisé durant cette thèse sur la régulation de l'expression des sous-unités du complexe I mitochondrial humain peut être divisé en deux étapes.

Dans un premier temps, l'étude a été axée sur la régulation transcriptionnelle. En effet, sur ce thème, aucune donnée concernant les sous-unités nucléaires du complexe I n'était disponible dans la littérature. Les promoteurs des gènes codant deux protéines essentielles au fonctionnement du complexe, les sous-unités 23 kDa (TYKY) et 20 kDa (PSST), ont ainsi été caractérisés permettant d'identifier les facteurs de transcription mis en jeu.

Dans un deuxième temps des cartes du protéome mitochondrial ont été développées en essayant d'identifier un maximum de sous-unités du complexe I. Ces cartes permettent d'analyser de manière simultanée l'expression d'un grand nombre de protéines mitochondriales. Le but est donc de disposer, grâce à l'analyse protéomique, d'un outil permettant d'aborder toute la complexité des régulations mises en jeu :

- identifier quelles protéines du complexe I humain parmi plus de 40 sous-unités peuvent être la cible d'une régulation spécifique,

- intégrer les multiples mécanismes de régulation possibles : régulation transcriptionnelle, régulation traductionnelle, modifications post-traductionnelles...
- visualiser des réseaux complexes de régulation impliquant d'autres protéines du métabolisme énergétique.

Dans le but de valider cet outil, une étude par protéomique comparative de l'expression des protéines mitochondriales en fonction de la concentration en fer a été ensuite réalisée.

MATERIELS ET METHODES

A/ Analyse de promoteurs :

1. Extension d'amorce :

1.1. Principe :

Cette technique permet de définir l'extrémité 5' d'un ARN messager (ARNm) et ainsi d'identifier le départ de transcription du gène correspondant. Elle est basée sur l'hybridation spécifique d'une amorce nucléotidique antisens avec l'ARNm puis la synthèse, à partir de cette amorce, du brin d'ADN complémentaire (ADNc) jusqu'à l'extrémité 5'. La transcription inverse est réalisée en présence d'un nucléotide marqué au phosphore 32 (^{32}P). Le produit de la réaction, marqué radioactivement, est analysé sur un gel d'acrylamide parallèlement à une réaction de séquence qui sert d'échelle de poids moléculaire. La taille du produit d'extension d'amorce est égale au nombre de nucléotides présents entre l'extrémité 5' de l'amorce et l'extrémité 5' de l'ARNm. Le report de cette donnée sur la séquence génomique permet d'identifier le nucléotide correspondant au départ de transcription du gène.

1.2. Protocole :

Les ARN totaux de fibroblastes humains en culture primaire sont extraits en utilisant le système RNeasy Mini Kit (Qiagen). Deux séries de réactions d'extension d'amorce ont ensuite été réalisées : - l'une avec une amorce de 19 mers correspondant aux nucléotides 87 à 69 du premier exon du gène *NDUFS8* (RT1 : 5'-CTTGAAGCGCCGCGCTAC-3'),

- l'autre avec une amorce de 20 mers correspondant aux nucléotides 29 à 10 du deuxième exon (RT2 : 5'-AGCAGCATAGGCGTGGTCAG-3').

La réaction d'hybridation est réalisée à 58 °C avec 5 μg d'ARN totaux et 15 pmoles d'amorce. L'ADNc est synthétisé en utilisant 25 unités d'Expand Reverse Transcriptase (Roche Diagnostics) à 48 °C pendant 45 minutes dans un volume total de 20 μl contenant : 2,8 mM de pyrophosphate de sodium, 1 mM de dATP, dGTP et dTTP, 30 μCi de [^{32}P] dCTP et 40 unités de RNase Out (Life Technologies). Les produits d'extension sont ensuite analysés sur un gel de séquençage.

Une réaction de séquençage servant d'échelle de poids moléculaire est déposée en parallèle sur

le gel. Cette réaction est réalisée avec le kit Sequenase T7 Sequencing (USB) en utilisant l'amorce RT1 et, comme matrice, l'ADN du clone 23A (voir Matériels et méthodes, chapitre A/3.1) qui contient la région 5'-flanquante, le premier exon et les 119 pb de l'intron 1 du gène *NDUFS8*. Cet ADN (4 µg) est dénaturé par 16 µl de soude 2 M dans un volume final de 80 µl pendant 10 minutes à température ambiante. La solution est ensuite neutralisée en ajoutant 14 µl d'acétate d'ammonium 3 M pH 4,7. Le volume est complété à 100 µl avec de l'eau distillée et l'ADN dénaturé est précipité par ajout de 240 µl d'éthanol absolu. L'ADN est récupéré par une centrifugation de 15 minutes à 25 000 g et 4 °C. Le culot est lavé successivement par 500 µl d'éthanol 70% et 500 µl d'éthanol absolu. A chaque lavage, le culot est récupéré par une centrifugation de 15 minutes à 25 000 g et 4 °C. L'ADN est alors solubilisé dans 15 µl d'eau distillée. L'étape d'hybridation est réalisée en ajoutant 10 pmoles de l'amorce RT2 (2 µl) et 2 µl de tampon d'hybridation à 10 µl d'ADN et en incubant le tout 5 minutes à 65 °C, 10 minutes à 37 °C puis 15 minutes à température ambiante. Concernant l'étape de marquage, 3 µl de Labelling Mix dATP, 10 µCi de [³⁵S] dATP et 2 µl de Sequenase T7 DNA polymérase diluée au 1/5^{ème} sont ajoutés à la réaction d'hybridation et le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante. Pendant ce temps, 2,5 µl de chacune des solutions A-, C-, G- et T-MixShort (contenant le didéoxynucléotide correspondant) sont incubés dans 4 tubes différents. Pour la dernière étape de terminaison, 4,5 µl de la réaction de marquage sont ajoutés dans chacun des tubes contenant une des solutions MixShort. Après 5 minutes d'incubation à 37 °C, les réactions sont arrêtées par 4 µl de solution stop (formamide 97,5 %, EDTA 10 mM, bleu de bromophénol 0,3 %, xylène cyanol 0,3 %). Le mélange est porté à 95 °C pendant 2 minutes afin de dénaturer l'ADN et 3,5 µl de chaque réaction sont déposés dans les puits du gel de séquence. Avant la migration des réactions de séquence et d'extension d'amorce, le gel est préchauffé pendant 30 minutes à 40 mA. La migration est ensuite réalisée à 40 mA jusqu'à la sortie du bleu. Le gel est séché puis autoradiographié sur la nuit à - 80 °C.

1.3. Solutions utilisées :

- TBE 10X :

| | |
|---------------|---------|
| Tris base | 107,8 g |
| acide borique | 50 g |
| EDTA 0,5 M | 7,44 g |

H₂O qsp 800 ml

ajuster à pH 8,3 avec de l'acide borique

H₂O qsp 1 litre

- Gel de séquençage (acrylamide 6%/urée 8M)

| | |
|---|-------|
| urée | 96 g |
| TBE 10X | 20 ml |
| acrylamide 40 % (rapport acrylamide/bisacrylamide 40:1) | 30 ml |
| H ₂ O | 60 ml |

filtrer sur membrane Millipore 0,45 µM

2. Vecteurs plasmidiques utilisés :

- Plasmide pBluescript (Stratagene) :

Amp^r, gène lac Z, site de clonage multiple, origine du phage f1

Taille : 2966 paires de bases (pb).

- Vecteur pGL3-basic (Promega Corp.) :

Amp^r, gène Luciférase (*luc+*), site de clonage multiple, origine du phage f1

Taille : 4818 pb.

- Vecteur pRL-TK (Promega Corp.) :

Amp^r, promoteur HSV-TK, gène *Rluc*

Taille : 4045 pb.

3. Préparations des clones plasmidiques concernant le gène *NDUFS8* :

3.1. Description des constructions :

Un fragment de 2084 pb comprenant la région 5'-flanquante, le premier exon et les 119 pb du premier intron du gène *NDUFS8* est excisé d'un clone génomique (De Sury et al., 1998) par les enzymes de restriction Sac I et Bam HI. Ce fragment d'ADN est ensuite cloné dans le vecteur pGL3-basic digéré par Sac I et Bgl II, en amont du gène rapporteur codant pour la luciférase. Le clone obtenu est appelé clone 23A. Le clone 23B, produit à partir du clone 23A par délétion d'un fragment Apa I-Apa I de 1437 pb, contient la majeure partie de la région 5'-flanquante du gène *NDUFS8*. Des amorces ont été synthétisées afin d'amplifier et de cloner 5 fragments d'ADN de 452 pb (clone 23C), 387 pb (clone 23D), 321 pb (clone 23E), 291 pb (clone 23F) et 255 pb (clone 23G) à partir de l'extrémité 3' de l'insert du clone 23A (2084 pb). Les produits PCR sont clonés dans le vecteur pGL3-basic en utilisant des sites de restriction Mlu I et Bam HI présents dans les amorces.

3.2. Réactions PCR :

Les amorces sens, flanquées à l'extrémité 5' d'un site de restriction Mlu I synthétique, ont pour séquence : 5'-ACGCGTCACCCTCTGCACCCACGGCG-3' (clone 23C), 5'-ACGCGTGCTCGGAGGTCTTCACTTATTGG-3' (clone 23D), 5'-ACGCGTCGGTCTCTCCTAGCCAATCAAAA-3' (clone 23E), 5'-ACGCGTATTTCTGAATCCCGCCTCTTTC-3' (clone 23F), 5'-ACGCGTCCAATCAGACCACACCATGAAGC-3' (clone 23G). Une seule amorce antisens contenant un site de restriction Bam HI a été utilisée pour toutes les amplifications : 5'-GGATCCTGAGTGAGCCGAG-3'. Les réactions de PCR sont réalisées avec l'ADN polymérase Pfu Turbo (Stratagene) dans un volume total de 50 μ l en présence de 2,5 ng de clone A, 0,5 μ M de chaque amorce et 0,2 mM de chaque désoxyribonucléotide (dNTP). Les conditions d'amplification sont les suivantes : 5 minutes de dénaturation initiale à 95 °C, 30 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 94 °C, 30 secondes d'hybridation à une température dépendant des amorces et 1 minute d'élongation à 72 °C et enfin 5 minutes d'élongation finale à 72 °C. Les réactions sont contrôlées par électrophorèse en tampon TAE 1 X sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,5 μ g/ml de bromure d'éthidium. Après la migration, les produits d'amplification sont visualisés sous lumière UV.

3.3. Préparation des inserts et ligations :

Pour construire le clone 23A, un fragment d'ADN de 2084 pb a été préparé par digestion d'un clone génomique cosmique avec les enzymes de restriction Bam HI et Sac I (Roche Diagnostics). Le produit de restriction a été déposé sur un gel d'agarose SeaKem® GTG® (FMC Bioproducts) 0,7 % contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium. Après électrophorèse en tampon TAE 1 X, le fragment d'intérêt a été excisé sous lumière UV et purifié avec le système QIAEX® II (Qiagen) suivant les instructions du fabricant. Le fragment d'ADN Sac I - Bam HI a ensuite été intégré en utilisant la T4 DNA ligase (Promega Corp.) dans un vecteur pGL3-basic préalablement digéré par les enzymes de restriction Sac I et Bgl II (Roche Diagnostics) puis purifié sur une colonne QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen).

Le clone 23B a été préparé par digestion du clone 23A avec l'enzyme de restriction Apa I (Promega Corp.). Le fragment d'intérêt a été séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose SeaKem® GTG® à 0,7 %, purifié avec le système QIAEX® II puis circularisé en présence de T4 ligase.

En ce qui concerne la préparation des clones 23C à 23G, les produits des réactions PCR ont été sous-clonés dans un vecteur pBluescript qui avait été préalablement linéarisé par l'endonucléase Eco RV (Promega Corp.) et purifié sur une colonne QIAquick®. Les ligations ont été réalisées avec la T4 DNA ligase à 16 °C en présence de 5 unités d'enzyme Eco RV afin de linéariser les vecteurs qui n'auraient pas intégré l'insert. Après ligation dans pBluescript, les fragments amplifiés par PCR ont été excisés en utilisant les sites Mlu I et Bam HI présents au niveau des amorces, séparés du vecteur par électrophorèse sur un gel d'agarose NuSieve® GTG® (BMA) à 2 %, purifiés avec le système QIAEX® II puis insérés dans le vecteur pGL3-basic ouvert par les enzymes de restriction Bgl II et Mlu I (Roche Diagnostics) suivant le protocole décrit précédemment.

3.4. Solutions utilisées :

- TAE 1 X :

| | |
|----------------|-------|
| Tris base | 40 mM |
| acide acétique | 20 mM |
| EDTA | 1 mM |
| pH 8,5 | |

4. Préparations des clones plasmidiques concernant le gène *NDUFS7* :

4.1. Description des constructions :

Une séquence correspondant aux 1000 pb en amont du codon initiateur ATG du gène *NDUFS7* a été amplifiée par PCR à partir d'un clone génomique précédemment isolé dans le laboratoire. Cette séquence a été clonée dans le vecteur pGL3-basic en amont du gène rapporteur luciférase en utilisant des sites de restriction Sma I et Hind III présents dans les amorces. Le clone obtenu est appelé clone 20A. Les clones 20B, 20C et 20D ont été produits à partir du clone 20A par délétion à partir de l'extrémité 5' de la séquence clonée, respectivement, d'un fragment Bgl II-Bgl II de 472 pb, d'un fragment Hpa I-Hpa I de 673 pb et d'un fragment Sma I-Sma I de 942 pb. Ces délétions ont été réalisées en utilisant des sites de restriction qui, d'une part, avaient été introduits dans l'amorce PCR amont et, d'autre part, étaient présents dans la séquence clonée.

4.2. Réaction PCR :

L'amorce sens utilisée pour amplifier la séquence de 1000 pb est flanquée à l'extrémité 5' de trois sites de restriction : Sma I, Hpa I et Bgl II. Elle a pour séquence : 5'-CCCGGGTTAACA GATCTCCACCGCACCGGCCTTTGCC-3'. L'amorce antisens dont la séquence est : 5'-TTC GAAGGCCTCGGCCTTCAGACAACC-3', permet la création d'un site de restriction Hind III. La réaction de PCR est réalisée avec l'ADN polymérase Pfu Turbo (Stratagene) dans un volume total de 50 μ l en présence de 2,5 ng du clone génomique, 0,5 μ M de chaque amorce et 0,2 mM de chaque dNTP. Les conditions d'amplification sont les suivantes : 5 minutes de dénaturation initiale à 95 °C, 30 cycles comprenant chacun 30 secondes de dénaturation à 94° C, 30 secondes d'hybridation à 58 °C et 1 minute d'élongation à 72 °C et enfin 5 minutes d'élongation finale à 72°C. Les réactions sont contrôlées par électrophorèse en tampon TAE 1 X sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,5 μ g/ml de bromure d'éthidium. Après la migration, les produits d'amplification sont visualisés sous lumière UV.

4.3. Préparation des inserts et ligations :

Pour la préparation du clone 20A, le produit de la réaction PCR précédemment obtenu a été sous-cloné dans un vecteur pBluescript préalablement linéarisé par l'endonucléase Eco RV et

purifié sur une colonne QIAquick®. Les ligations ont été réalisées avec la T4 DNA ligase à 16 °C et en présence de 5 unités de l'enzyme Eco RV afin de linéariser tout vecteur n'ayant pas intégré d'insert. Après intégration dans pBluescript, les fragments amplifiés par PCR ont été excisés en utilisant les sites Sma I et Hind III présents au niveau des amorces, séparés du vecteur par électrophorèse sur un gel d'agarose SeaKem® GTG® à 1 %, purifiés avec le système QIAEX® II puis insérés dans le vecteur pGL3-basic digéré par les mêmes enzymes de restriction suivant le protocole décrit précédemment.

Les clones 20B, 20C et 20D ont été préparés en réalisant des délétions de tailles variables dans l'insert du clone 20A. Ce dernier a été digéré avec les enzymes de restriction Bgl II, Hpa I et Hind III, respectivement. Dans chaque cas, le fragment d'intérêt a été séparé par électrophorèse sur un gel d'agarose SeaKem® GTG® à 0,7 %, purifié par le système QIAEX® II puis circularisé en présence de T4 DNA ligase.

5. Transformations :

5.1. Protocole :

Les transformations sont réalisées dans des cellules DH5α™ compétentes (Library Efficiency DH5α™ competent Cells, Life Technologies) suivant les instructions du fabricant. Brièvement, 5 à 10 µl d'une réaction de ligation sont mélangés à 100 µl de cellules compétentes et l'ensemble est incubé 30 minutes dans la glace. Les cellules sont alors soumises à un choc thermique de 45 secondes à 42 °C puis replacées dans la glace pendant 2 minutes. Ensuite, 900 µl de milieu SOC sont ajoutés et les bactéries sont incubées 1 heure à 37°C sous agitation (225 tours par minute). Les bactéries transformées sont ensuite étalées sur des boîtes de Petri contenant du milieu LB-agar en même temps que 100 µl d'ampicilline à 100 mg/ml. Pour la sélection blanc/bleu des clones préparés dans le vecteur pBluescript, 10 µl d'IPTG 100 mM et 75 µl de X-Gal à 2 % (m/v) dans du DMF sont déposés sur la boîte de Petri en même temps que l'ampicilline.

Génotype des cellules DH5α™ : F'80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r_k⁻, m_k⁺) *phoA supE44* thi-1 *gyrA96 relA1*.

5.2. Solutions utilisées :

- Milieu SOC :

Milieu SOB + 20 ml/litre de glucose 20 % (filtré sur membrane Millipore 0,22 μ M)

- Milieu SOB :

| | |
|-----------------------------|----------|
| Bactotryptone | 20 g/l |
| Bacto Yeast Extract | 5 g/l |
| NaCl | 0,5 g/l |
| MgSO ₄ (anhydre) | 2,4 g/l |
| KCl | 0,186g/l |

Autoclavage 20 minutes à 120 °C.

- Milieu LB-Agar :

1,5 g Agar + 100 ml milieu LB

- Milieu LB :

| | |
|---------------------|------|
| Tryptone | 10 g |
| Bacto Yeast Extract | 5 g |
| NaCl | 10 g |

H₂O qsp 800 ml,

ajuster à pH 7,4 avec NaOH 5 N,

H₂O qsp 1 litre.

Autoclavage 20 minutes à 120 °C.

6. Préparation d'ADN plasmidique :

6.1. Protocole :

Les colonies bactériennes obtenues sur boîte de Petri après transformation sont mises en culture dans 3 ml de milieu liquide LB contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. La suspension bactérienne est incubée 16 heures à 37 °C avec agitation. Une minipréparation d'ADN plasmidique est réalisée par la technique de lyse alcaline à partir d'1 ml de culture. Les bactéries sont récupérées par centrifugation pendant 5 minutes à 5 000 g et à 4 °C puis remises en suspension dans 100 μl d'un tampon de resuspension. Les bactéries sont lysées par 200 μl d'une solution de lyse. Une neutralisation rapide par 150 μl solution de neutralisation permet de précipiter les protéines, le chromosome bactérien, les débris cellulaires et le SDS. L'ADN plasmidique et les ARN restent quant à eux en solution. Après 10 minutes de centrifugation à 25 000 g et à 4 °C, le surnageant est mélangé avec 0,4 volumes d'acétate de potassium 5 M et 2 volumes d'isopropanol afin de précipiter les acides nucléiques. L'ensemble est incubé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé 10 minutes à 25 000 g et à 20 °C. Le culot contenant l'ADN plasmidique et les ARN bactériens est lavé deux fois par 500 μl d'éthanol à 70 % puis dissous dans 50 μl d'eau distillée.

L'ADN ainsi extrait est analysé par digestion enzymatique afin de vérifier son intégrité. La digestion enzymatique est réalisée avec 5 μl de solution plasmidique, 10 unités de(s) l'enzyme(s) de restriction correspondante(s) et en présence de 100 $\mu\text{g/ml}$ de RNase A (Roche Diagnostics). Le produit de digestion est analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose contenant 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de bromure d'éthidium dans du tampon TAE 1 X. Après la migration, les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV et leur taille est estimée par rapport à un marqueur de poids moléculaires (1 kb Ladder, Life Technologies).

Un clone bactérien contenant un ADN plasmique dont la qualité est satisfaisante est sélectionné. Un ml de culture est utilisé pour ensemercer 100 ml de milieu liquide LB contenant 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline. La culture est mise à incuber 18 à 20 heures à 37 °C avec agitation. Les bactéries sont ensuite récupérées par centrifugation pendant 5 minutes à 5 000 g et à 4 °C. L'ADN plasmidique est purifié en réalisant une maxipréparation selon un protocole dérivé de la technique publiée par Dadhu et Gedamu (1988). Le culot est remis en suspension dans 2 ml de tampon de resuspension. Les bactéries sont lysées par 5 ml d'une solution de lyse. Une neutralisation rapide est réalisée avec 3,75 ml de solution de neutralisation. Après 10 minutes de

centrifugation à 25 000 g et à 4 °C, le surnageant est mélangé à 0,4 ml volumes de potassium 5 M et 2 volumes d'isopropanol. L'ensemble est incubé 10 minutes à température ambiante puis centrifugé à température ambiante pendant 10 minutes à 25 000 g. Le culot composé d'ADN plasmidique et d'ARN bactérien est dissous dans 300 µl d'eau distillée. Les ARN sont dégradés par un traitement avec 20 µl de RNase A à 10 mg/ml pendant 30 minutes à 37 °C. Deux extractions au phénol/chloroforme sont ensuite réalisées afin d'éliminer les protéines. La phase aqueuse est alors récupérée, son volume mesuré puis ajusté à 500 µl avec de l'eau distillée. Deux cents µl d'une solution de polyéthylène glycol/NaCl sont ajoutés. Le mélange est vortexé, incubé de 4 heures à une nuit dans de la glace puis centrifugé 10 minutes à 25 000 g et à 4 °C. L'ADN plasmidique est entraîné avec le polyéthylène glycol tandis que les fragments d'ARN restent en solution. Le culot est repris dans 100 µl d'eau distillée stérile. L'ADN plasmidique est ensuite précipité par ajout de 20 µl d'acétate de sodium 3 M pH 6 et 250 µl d'éthanol absolu. La pelote d'ADN est lavée dans un bain d'éthanol à 70 % puis dans de l'éthanol absolu avant d'être dissoute dans 500 µl de tampon Tris-HCl 10 mM pH 8,0.

La concentration de l'ADN plasmidique est déterminée par mesure de la densité optique à 260 nm (DO_{260}). La contamination par les protéines est estimée avec le rapport de la DO_{260} sur DO_{280} : l'ADN est considéré pur si ce rapport est supérieur ou égal à 1,8. Pour vérifier la présence de l'insert et l'absence d'un réarrangement important, l'ADN est digéré par des enzymes de restriction et analysé par électrophorèse sur un gel d'agarose contenant 0,5 µg/ml de bromure d'éthidium dans du tampon TAE 1 X. Après la migration, les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière UV et leur taille est estimée par rapport à un marqueur de poids moléculaires (1 kb Ladder, Life Technologies). Enfin, la région du plasmide correspondant à l'insert est analysée par séquençage (Genome Express SA).

6.2. Solutions utilisées :

- Solution de resuspension :

| | |
|--------------------|--------|
| Glucose | 0,96 g |
| EDTA 0,5 M | 2 ml |
| Tris-HCl 1M pH 8,0 | 2,5 ml |

H₂O qsp 100 ml.

- Solution de lyse :

NaOH 0,2 N

SDS 1 %

A réaliser extemporanément.

- Solution de neutralisation (acétate 5 M potassium 3 M, pH 4,8) :

Acétate de potassium 49,07 g dans 100 ml H₂O

Ajuster à pH 4,8 avec de l'acide acétique glacial (environ 65 ml)

- Solution de polyéthylène glycol/NaCl :

PEG 6000 30 g

NaCl 10,5 g

H₂O qsp 100 ml.

7. Culture de cellules eucaryotes :

Les cultures de cellules humaines de choriocarcinome cervical HeLa (CCI-2, American Cell Type Collection), de myoblastes murins C2C12 (CRL-1772, American Cell Type Collection) et les cultures primaires de fibroblastes humains ont été réalisées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium, Sigma) supplémenté par 10 % de sérum de veau foetal (Biomedica) et 1 mM de pyruvate de sodium. Les cultures sont mises à incuber à 37°C dans une atmosphère contenant 5 % de CO₂. Afin de prévenir la différenciation, les myoblastes murins sont cultivés à faible densité (confluence < 60 %).

Des myotubes sont obtenus à partir des myoblastes C2C12 en laissant pousser les cellules à confluence puis en remplaçant le milieu contenant 10 % de sérum de veau foetal par un milieu contenant 2 % de sérum de cheval (Life Technologies).

8. Transfection transitoire :

8.1. Principe :

La force promotrice de la séquence étudiée est mesurée en analysant sa capacité à activer la transcription d'un gène rapporteur dont l'expression est quantifiable. Par exemple un gène codant pour une luciférase dont l'expression peut être mesurée par luminescence. La séquence d'ADN est clonée dans un vecteur plasmidique en amont du gène rapporteur. Le plasmide recombinant est transfecté dans des cellules eucaryotes où le gène rapporteur est transcrit sous le contrôle de la séquence étudiée. Après 24 ou 48 heures d'incubation, les cellules sont lysées et le produit d'expression du gène rapporteur est quantifié.

La réalisation de délétions en série à partir de l'extrémité 5' de la séquence permet d'identifier les régions transcriptionnellement actives. Si une délétion induit une diminution de la force promotrice, cela suggère que la région délétée contient un ou des éléments activant la transcription. A l'inverse, une augmentation de l'activité évoque la fixation d'un ou de plusieurs facteurs répresseurs.

8.2. Protocole :

Les cellules HeLa ($2,5 \times 10^4$ cellules par puits) et les myoblastes C2C12 (2×10^4 cellules par puits) sont mis en culture dans des plaques 24 puits, 24 heures avant la transfection. A 50-70 % de confluence, les cellules sont cotransfectées par 975 ng de plasmide rapporteur et 25 ng de plasmide pRL-TK (Promega Corp.) en utilisant 3 μ l de FuGENE 6 (Roche Diagnostics) selon les recommandations du fabricant. Le plasmide rapporteur est un vecteur pGL3-basic contenant la séquence promotrice à étudier clonée en amont de l'ADN complémentaire (ADNc) *luc+*. Cet ADNc code pour une luciférase de luciole. Le vecteur pRL-TK contient l'ADNc *RLuc* codant pour la luciférase de *Renilla reniformis*. Cet ADNc, placé sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase du virus *Herpes simplex*, est exprimé de façon constitutive et le plasmide pRL-TK sert de contrôle interne de transfection. Un contrôle négatif est réalisé avec le vecteur pGL3-basic qui ne contient pas de séquences eucaryotes promotrices, ni d'enhancers. Les cellules sont incubées pendant 48 heures puis lavées avec du tampon PBS (Phosphate-Buffered Saline, Sigma) et lysées dans 100 μ l de tampon PLB (Promega Corp.).

Dans le cas d'expériences menées sur des myotubes, des plaques de culture 6 puits sontensemencées avec des myoblastes C2C12 (8×10^4 par puits) 24 heures avant la transfection. Lorsque les cellules atteignent 50-70 % de confluence, elles sont cotransfectées par 1950 ng de plasmide rapporteur et 50 ng de plasmide pRL-TK en utilisant 6 μ l de FuGENE 6. Les cellules sont incubées 24 heures supplémentaires puis la différenciation en myotubes est induite selon le protocole indiqué précédemment (chapitre A/7 "culture de cellules eucaryotes"). Après 72 à 96 heures de culture, les myotubes sont lavés avec du tampon PBS et lysés par 500 μ l de tampon PLB.

Les activités de la luciférase de luciole et de la luciférase de *Renilla reniformis* sont mesurées successivement dans les lysats cellulaires (10 à 20 μ l) en utilisant le kit Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega Corp.) suivant les recommandations du fabricant. Les mesures de luminescence sont réalisées avec un luminomètre Lumat LB 9501 (Berthold). L'activité de la luciférase de luciole qui correspond au plasmide rapporteur est normalisée par l'activité de la luciférase de *Renilla reniformis* associée contrôle interne. Chaque essai est réalisé en double ou en triple et les transfections sont répétées deux fois au moins.

9. Analyse informatique :

Les régions identifiées comme transcriptionnellement actives à la suite des expériences de transfection transitoire ont été analysées avec des logiciels permettant de rechercher des séquences consensus de sites de fixation de facteurs de transcription. Deux logiciels disponibles sur le réseau internet ont été utilisés : TFSEARCH (Akiyama) et MatInspector (Quandt et al., 1995). Ces deux programmes sont basés sur l'interrogation de la base de données TRANSFAC (Heinemeyer et al., 1998). Pour certains sites de fixation de facteurs de transcription non répertoriés dans la version public de TRANSFAC (par exemple, le site NRF-1), une séquence consensus a été déterminée à partir des données de la littérature et le logiciel MacVector (Accelrys) a été utilisé pour analyser les séquences.

10. Réactions de gel-retard :

10.1. Principe :

Cette technique permet d'analyser la fixation de facteurs protéiques sur une séquence d'ADN. Une sonde ADN double brin marquée, correspondant à une séquence contenant un site potentiel de fixation d'un facteur de transcription, est mise à incuber en présence d'un extrait nucléaire. Le mélange est ensuite analysé par électrophorèse sur un gel d'acrylamide : si un complexe ADN/protéine s'est formé, sa migration est retardée par rapport au fragment d'ADN seul. La spécificité du complexe nucléoprotéique est contrôlée par des expériences de compétition avec des oligonucléotides non marqués homologues et non homologues. La nature du facteur de transcription peut être déterminée en utilisant un anticorps spécifique. La fixation de l'anticorps sur le facteur protéique peut avoir deux conséquences : l'inhibition de la formation du complexe nucléoprotéique ou la formation d'un supercomplexe ADN/facteur/anticorps dont la migration est retardée par rapport au premier complexe (supershift).

10.2. Protocole :

Les oligonucléotides utilisés pour la préparation des sondes marquées et des ADN compétiteurs ont été synthétisés par Oligo Express SA. La séquence du brin sens de chacune de ces sondes est représentée dans le tableau V. Les oligonucléotides complémentaires sont hybridés et marqués en 5' avec de l'ATP [32 P] en utilisant de la polynucléotide kinase T4 (Roche Diagnostics). Les sondes ADN marquées sont séparées des nucléotides libres grâce à des colonnes Sephadex[®] Quick Spin[™] (Roche Diagnostics). L'activité spécifique de chaque sonde est mesurée avec un compteur à scintillation et exprimée en coups par minute (cpm).

Les réactions sont réalisées dans un volume total de 20 μ l contenant 20 mM d'HEPES pH 7,9, 50 mM de NaCl, 1 mM de ZnCl₂, 1 mM de dithiothréitol, 1 mM d'EDTA, 10 % (v/v) de glycérol et 1 μ g de poly(dI-dC).(dI-dC) (Amersham Pharmacia). Après l'ajout de 5 μ g d'extrait nucléaire de cellules HeLa (Promega Corp.), le mélange est incubé 5 minutes à 37°C. La réaction est initiée par l'addition de 100 000 cpm de sonde marquée (environ 50 fmoles) puis l'ensemble est incubé 20 minutes à 37°C. Les échantillons sont analysés immédiatement par électrophorèse sur un gel 4 % (m/v) polyacrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide = 40:1) dans du tampon TBE 0,5 X. Les gels sont ensuite séchés et autoradiographiés. Lors des essais de compétition, un

excès de 25 à 250 fois (mole à mole) d'ADN homologue ou non homologue non marqué est ajouté lors de la préincubation. Dans les échantillons indiqués, 1 μ l de sérum anti-YY1 (références sc-281x ou sc-1703x, Santa-Cruz Biotech) ou 1 μ l de sérum dirigé contre la sous-unité β de l'ATP synthase bovine a été ajouté avec l'extrait nucléaire et l'ensemble est incubé 1 heure dans de la glace avant l'ajout de la sonde marquée.

| Oligonucléotides | Séquences (5' vers 3' ; brin sens) |
|------------------|--|
| YY1 | ⁻¹⁵⁷ CTCCCCAAACCAACATGGCGGCCCCCTAC ⁻¹²⁹ |
| YY1m | ⁻¹⁵⁷ CTCCCCAAACCAACAT aat GGGCCCCCTAC ⁻¹²⁹ |
| Sp1(A/B) | ⁻²¹³ TAAACCACGCCCCGGATGTCCCGCCTCCAGCG ⁻¹⁸² |
| Sp1(C) | ⁻⁸¹ CTGAATCCCGCCTCTTTCAG ⁻⁶² |
| Sp1(Am/B) | ⁻²¹³ TAAACCA aGa CCCCGGATGTCCCGCCTCCAGCG ⁻¹⁸² |
| Sp1(A/Bm) | ⁻²¹³ TAAACCACGCCCCGGATGTCCC aCa TCCAGCG ⁻¹⁸² |
| Sp1(Cm) | ⁻⁸¹ CTGAATCCC aCa TCTTTCAG ⁻⁶² |
| CCAAT(A) | ⁻¹⁷⁴ GGTCTTCACTTATTGGCCTCCCCAAAC ⁻¹⁴⁸ |
| CCAAT(B) | ⁻⁵⁷ CTTGCTGGCCAATCAGACCAC ⁻³⁷ |

Tableau V : Oligonucléotides utilisés dans les expériences de gel-retard.

Les lettres minuscules en gras représentent les séquences mutées. Les positions des nucléotides sont données par rapport au site principal d'initiation de la transcription du gène *NDUFS8*.

11. Mutagenèse dirigée :

11.1. Promoteur *NDUFS8* :

Pour l'étude du promoteur *NDUFS8*, les mutations ont été créées en utilisant le kit Gene Editor™ *in vitro* Site Directed Mutagenesis System (Promega Corp.) suivant les instructions du fabricant. Brièvement, l'ADN plasmidique est dénaturé puis l'oligonucléotide portant la mutation est hybridé dans des conditions de faible stringence avec la forme simple brin. Un deuxième oligonucléotide permettant d'introduire une mutation au niveau du gène de résistance à l'ampicilline est utilisé de manière concomitante. La mutation introduite par cet oligonucléotide confère la résistance à un mélange antibiotique et facilite la sélection des clones porteurs de la mutation désirée. L'ajout d'ADN polymérase T4 permet la synthèse du brin complémentaire à partir des amorces nucléotidiques. Le second brin néosynthétisé est fermé grâce à l'action de la T4 DNA ligase. Une première transformation est réalisée dans des cellules compétentes BMH 71-8 *mutS*. Cette souche est mutée au niveau de systèmes de réparation de l'ADN évitant ainsi la correction des mésappariements présents au niveau des hybrides. Une deuxième transformation dans des cellules JM109 permet de sélectionner les plasmides mutants et de les produire en grande quantité.

Le clone 23C a été utilisé comme matrice dans toutes les réactions de mutagenèse. Les substitutions introduites sont identiques à celles présentes dans les oligonucléotides mutés utilisés lors des expériences de gel-retard (tableau V). Le site YY1 a été muté en utilisant l'oligonucléotide correspondant au brin sens de la sonde YY1m. Les séquences consensus Sp1(A), Sp1(B) et Sp1(C) ont été mutées en utilisant respectivement les oligonucléotides 5'-CTCTTTCTAAACCAAGACCCGGATGTCCCG-3', 5'-CCCGGATGTCCCACATCCAGCGGCTCGG-3' et 5'-GATATTTCTGAATCCCACATCTTTCAGCAGCC-3'.

Les colonies bactériennes obtenues sur boîtes de Petri ont été traitées comme décrit dans le chapitre A/3.5. Les clones porteurs des mutations désirées ont été identifiés par séquençage (Genome Express S.A.).

11.2. Promoteur *NDUFS7* :

Dans le cas du promoteur *NDUFS7*, les mutations ont été introduites en utilisant le système QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Brièvement, une réaction de PCR est réalisée en utilisant :

- l'ADN plasmidique double brin contenant la séquence à modifier comme matrice,
- deux amorces oligonucléotidiques portant la mutation que l'on désire introduire, chacune complémentaire d'un des brins plasmidiques,
- l'ADN polymérase Pfu Turbo.

Cette polymérase réplique l'ADN plasmidique sur toute sa longueur avec une grande fidélité, sans déplacer les amorces. Les plasmides mutants générés par la réaction de PCR sont porteurs sur chaque brin d'une coupure liée à l'absence de liaison phosphate-hydroxyle entre l'extrémité 5' de l'amorce et l'extrémité 3' du brin répliqué. Le produit de la PCR est traité ensuite par l'endonucléase Dpn I, spécifique de l'ADN méthylé et hémiméthylé. Cette enzyme permet donc d'éliminer le brin parental sauvage et de sélectionner l'ADN néosynthétisé porteur de la mutation. Les plasmides sont ensuite transformés dans des cellules compétentes XL1-Blue qui réparent les coupures et permettent l'amplification et la sélection des mutants.

Les substitutions réalisées sont présentées dans le tableau VI. Le clone 20A a servi de matrice lors de la mutation du site *Sp1* distal (clone 20E). Les amorces utilisées sont les suivantes : 5'-GCTGAAATTATGACCTCTTAGGGTTTGGGAAGAGGAGGCTTTGGG-3' et 5'-CCCAA GCCTCCTCTTCCAAACCCTAAGAGGTCATAATTCAGC-3'. Le clone 20B a été utilisé comme matrice lors de la préparation des autres mutants. Les amorces employées sont :

- site *Sp1* proximal (clone 20H) : 5'-GCTCCGAGCCGCTTTGAGAGGCGGCCCGGGAA CC-3' et 5'-GGTTCGCGGGCCGCCTCTCAAAGCGGCTCGGAGC-3',
- site NRF-1 distal (clone 20F) : 5'-GCGCTGCGCCTTCCCTGCATAGTAGCAGTCGTTTC GCGTCAG-3' et 5'-CTGACGCGAAACGACTGCTACTATGCAGGGAAGGCGCAGCGC -3',
- site NRF-1 proximal (clone 20G) : 5'-CTCCAGGTTCCGTTTCCATATTAGCTCCGAGC CGCTTTGGG-3' et 5'-CCCAAAGCGGCTCGGAGCTAATATGGAAACCGGAACCTGGA G-3'.

Pour chaque clone, deux réactions ont été réalisées avec 10 et 50 ng d'ADN plasmidique. L'étape de synthèse des brins mutés a été réalisée avec 16 cycles d'amplification et une température d'hybridation des amorces de 55 °C. Les colonies bactériennes obtenues sur boîtes

de Petri ont été traitées comme décrit dans le chapitre A/3.5. Les clones porteurs des mutations désirées ont été identifiés par séquençage (Genome Express S.A.).

| Sites | Séquence sauvage | Mutations |
|----------------|---|---|
| Sp1 distal | ⁻⁷⁵² TAGGGGTGGGAAG ⁻⁷⁴⁰ | ⁻⁷⁵² TAGGG t T t GGAAG ⁻⁷⁴⁰ |
| Sp1 proximal | ⁻⁷⁵ TTTGGGCGGCGGC ⁻⁶³ | ⁻⁷⁵ TTT Gt Gt GGCGGC ⁻⁶³ |
| NRF-1 distal | ⁻⁴⁴¹ TGCGCAGGCGCA ⁻⁴³⁰ | ⁻⁴⁴¹ TG Ca tAG ta GCA ⁻⁴³⁰ |
| NRF-1 proximal | ⁻⁹⁶ TCCGCATGCGCT ⁻⁸⁵ | ⁻⁹⁶ TCC Ca tAT ta GCT ⁻⁸⁵ |

Tableau VI : Mutations introduites dans le promoteur du gène *NDUFS7*.

Les lettres minuscules en gras représentent les substitutions réalisées. Les positions des nucléotides sont données par rapport au codon d'initiation de la traduction du gène *NDUFS7*.

B/ Etude du protéome mitochondrial :

1. Préparation de mitochondries :

Les techniques de préparation de mitochondries à partir de placenta humain et de cellules en culture sont dérivées de la méthode publiée par Ausenda et Chomyn (1996).

1.1. Mitochondries de placenta :

Les placentas humains, provenant du CHU de Grenoble (service de Gynécologie-Obstétrique), sont récupérés dans un délai d'une heure après la délivrance et transportés dans de la glace au laboratoire. Toutes les étapes sont réalisées à 4°C sauf mention explicite. Le placenta débarrassé du maximum de tissu conjonctif est découpé en petits morceaux et lavé avec 2 litres d'une solution PBS 10 mM pH 7,4. Le tissu lavé et égoutté est passé pendant 1 minute au Waring blender à basse vitesse en présence de 500 ml de tampon d'homogénéisation A. L'homogénat est centrifugé 10 minutes à 800 g. Le surnageant est filtré à travers de la gaze puis centrifugé 15 minutes à 12 000 g. Le culot est remis en suspension dans 100 ml de tampon B et centrifugé 10 minutes à 1000 g. Les mitochondries sont alors culottées par centrifugation du surnageant 15 minutes à 12 000 g, remises en suspension dans le même tampon puis lavées deux fois. La suspension de mitochondries est aliquotée et stockée dans de l'azote liquide.

1.2. Mitochondries de cellules en culture :

Toutes les étapes sont réalisées à 4°C sauf mention explicite. Les extractions sont réalisées à partir d'un litre de culture de cellules HeLa S3 en suspension (environ 3×10^8 cellules). Les cellules sont collectées par une centrifugation de 10 minutes à 1200 g, lavées dans 50 ml de solution PBS 10 mM pH 7,4 et récupérées par une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 1200 g. Le culot est remis en suspension dans 10 ml de tampon C, passé 10 fois au potter à basse vitesse puis 5 fois au penbrock (piston B). La suspension obtenue est centrifugée 10 minutes à 1200 g. Le surnageant est conservé. Le culot est remis en suspension dans 10 ml du même tampon et passé 10 fois au potter à basse vitesse. La suspension est centrifugée 10 minutes à 1200 g. Le surnageant ainsi obtenu et celui récolté à l'étape précédente sont centrifugés 10

minutes à 13 000 g. Les 2 culots de mitochondries, remis en suspension chacun dans 5 ml du tampon C, sont réunis et centrifugés 10 minutes à 1 200 g. Le surnageant est centrifugé 15 minutes à 13 000 g. Le culot obtenu est remis en suspension dans 1 ml de tampon D et une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 13 000 g est réalisée. Les mitochondries sont remises en suspension dans un volume minimum de tampon D, aliquotées et conservées dans l'azote liquide.

1.3. Solutions utilisées :

- Tampon A :

| | |
|---------------------------|-------------|
| saccharose | 250 mM |
| KCl | 150 mM |
| Tris-HCl pH 7,5 | 10 mM |
| EDTA | 1 mM |
| albumine sans acides gras | 0,5 % (m/v) |

- Tampon B :

| | |
|-----------------|--------|
| saccharose | 250 mM |
| mannitol | 75 mM |
| Tris-HCl pH 7,5 | 5 mM |
| EDTA | 1 mM |

- Tampon C :

| | |
|-----------------------------------|--------|
| saccharose | 250 mM |
| acétate de triéthanolamine pH 7,0 | 10 mM |
| EGTA | 1 mM |

- Tampon D :

| | |
|-----------------|--------|
| saccharose | 250 mM |
| Tris-HCl pH 7,5 | 5 mM |

2. Culture de cellules eucaryotes :

Les cellules HeLa S3 (CCI-2.2, American Cell Type Collection) sont cultivées en suspension dans du milieu DMEM supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal, 1 mM de pyruvate de sodium, 10 mM d'HEPES, 100 unités/ml d'ampicilline, 100 µg/ml de streptomycine, 0,25 µg/ml d'amphotéricine B. Les cultures sont incubées à 37°C avec agitation lente.

Concernant les expériences menées sur la régulation de l'expression des protéines du complexe I en réponse à des variations de la concentration en fer, les cellules sont cultivées soit dans un milieu carencé en fer par l'ajout de 100 µM d'un agent chélateur, la déferoxamine (Sigma), soit dans un milieu enrichi en fer par l'ajout de 20 µM d'hémine (Sigma). Des cellules témoins sont cultivées dans du milieu ne contenant ni déferoxamine ni hémine. Pour chaque condition, 1 litre de milieu estensemencé avec 9×10^7 cellules et les mitochondries sont isolées après 24 ou 48 heures de culture.

3. Electrophorèse bidimensionnelle :

3.1. Principe :

Un mélange protéique complexe est traité successivement par 2 techniques électrophorétiques. La première séparation est réalisée en fonction du point isoélectrique (pI) par focalisation des protéines sur un gradient de pH immobilisé (IPG). Dans une deuxième étape, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE).

3.2. Préparation des échantillons protéiques :

La suspension de mitochondries est diluée au cinquième dans une solution de lyse concentrée constituée d'urée 9 M, de thiourée 2,5 M, de CHAPS 5 % (m/v), de DTT 12,5 mM et d'ampholytes porteurs (Pharmalytes 3-10) 0,5 % (m/v) (Rabilloud et al., 1997). Lorsque la première dimension est réalisée en utilisant un gradient de pH basique (5,5-12), la solution de lyse contient en plus 5 mM de Tris cyanoéthyl phosphine (Molecular Probes).

La quantité de protéines analysées dépend des techniques de fixation et de coloration réalisées après l'électrophorèse bidimensionnelle :

- 150 μg pour un gel analytique préparé avec un gradient de pH 4-8, fixé à l'acide acétique et coloré au nitrate d'argent avec tétrathionate,
- 100 μg pour un gel analytique préparé avec un gradient de pH 5,5-12, fixé au formaldéhyde et coloré à l'argent ammoniacal,
- 400 μg pour un gel préparatif coloré au ruthénium,
- 500 μg à 1 mg pour un gel préparatif coloré au bleu de Coomassie colloïdal.

La technique de dépôt de l'échantillon varie suivant le type de gradient de pH utilisé. Dans le cas d'un gradient 4-8, les protéines sont solubilisées dans un volume final de 600 μl et cette solution est directement utilisée pour la réhydratation des bandelettes IPG. Avec un gradient basique, les protéines sont solubilisées dans un volume final de 100 μl et déposées en coupelle lors de la première dimension.

3.3. Focalisation sur gradient de pH :

3.3.1. Préparation des gradients :

Deux types de gradient ont été utilisés : l'un classique s'étendant de pH 4 à 8 et l'autre basique de pH 5,5 à 12. Les concentrations d'immobilines utilisées lors de la préparation des gradients de pH (pouvoir tampon moyen = 3 mequiv.l⁻¹.pH⁻¹) sont calculées suivant des protocoles publiés (Righetti, 1990). Le gradient de pH 5,5-12 est interpolé à partir du gradient 4-12 précédemment décrit (Görg et al., 1998). Dans tous les cas, des gradients de pH avec des plateaux ont été utilisés (Rabilloud et al., 1994). Les gels ont une concentration de 4,5 % d'acrylamide et sont polymérisés à 50 °C.

3.3.2. Réhydratation des bandelettes IPG et focalisation :

Des bandelettes de 4 mm de large sont découpées à partir du gel sec en utilisant un massicot. Les bandelettes sont réhydratées sur la nuit dans une solution d'urée 7M, thiourée 2 M, CHAPS 4 % (m/v), DTT 10 mM, ampholytes porteurs (Pharmalytes 3-10) 0,4 % (m/v). Pour les gradients de pH 5,5-12, la solution contient en plus 5 mM de Tris cyanoéthyl phosphine.

Dans le cas des gradients de pH 4-8, la bandelette est réhydratée avec la solution qui a servi à la solubilisation de l'échantillon protéique, soit un volume de 600 μl . Le dépôt des protéines se fait donc directement par réhydratation. Dans le cas des gradients basiques (pH 5,5-12 et pH 3-12),

la réhydratation est réalisée avec 500 μ l de solution (ne contenant pas de protéines) et l'échantillon protéique (100 μ l) est déposé avec une coupelle au moment de la focalisation.

L'isoélectrofocalisation est réalisée avec le système Dry-strip kit selon les instructions du fabricant et en suivant les modifications décrites par Rabilloud et al. (1994). Les bandelettes sont recouvertes d'huile minérale. La température est maintenue à 22 °C. La migration est poursuivie jusqu'à un total de 60 kV/heure (Rabilloud et al., 1997).

3.4. Equilibration, SDS-PAGE et coloration :

Après la focalisation, l'huile est éliminée et les bandelettes sont équilibrées tout en étant maintenues en place dans le système de migration. L'équilibration se fait par deux bains successifs de 15 minutes dans une solution urée 6M, Tris 125 mM-HCl 0,1M, SDS 2,5 %, glycérol 30 %, DTT 50 mM puis dans une solution urée 6M, Tris 125 mM-HCl 0,8M, SDS 2,5 %, glycérol 30 %, iodoacétamide 0,2 M (Görg et al., 1987). Les bandelettes sont alors placées au sommet d'un gel de polyacrylamide de 1,5 mm d'épaisseur (Bio-Rad vertical system) et scellées avec de l'agarose bas point de fusion à 1 % dans un tampon Tris 125 mM-HCl 0,1M, SDS 0,4 % contenant du bleu de bromophénol comme marqueur coloré.

En fonction de la taille des protéines à analyser, deux types de gels de polyacrylamide ont été utilisés. Les protéines d'un poids moléculaire supérieur à 20 kDa sont séparées sur des gels à 10 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide 37,5:1) dans du tampon Tris 0,15 M-HCl 0,1 M. Pour visualiser des protéines de plus petit poids moléculaire, la migration est réalisée sur des gels à 11 % d'acrylamide (rapport acrylamide/bisacrylamide 37,5:1) dans du tampon Tris 0,2 M-HCl 0,1 M.

La migration est réalisée à 10 °C avec un voltage constant de 25 V pendant 1 heure puis une puissance constante de 12,5 W par gel jusqu'à ce que le marqueur coloré atteigne le bas du gel. Le tampon d'électrode contient 50 mM de Tris, 0,2 M de taurine, 0,1% de SDS et celui de la cuve contient 50 mM de Tris, 0,37 M de glycine, 0,1% de SDS.

Les gels préparés avec un gradient de pH 4-8 sont colorés à l'argent (Sinha et al., 2001). Les gels basiques sont colorés par une technique à l'argent ammoniacal (Rabilloud et Charmont, 1999). Dans ce cas, deux protocoles de fixation peuvent être employés :

- soit fixation par une solution formaldéhyde 4 %, éthanol 25 % puis traitement par une solution de naphthalène disulfonate 0,05 %, éthanol 20 %,

- soit fixation par une solution de naphthalène disulfonate 0,05 %, acide acétique 5%, éthanol 20 %.

Les gels préparatifs servant à la découpe des spots à analyser en spectrométrie de masse sont généralement colorés avec un complexe ruthénium fluorescent (Rabilloud et al., 2001). Dans certains cas, les gels préparatifs ont été colorés au bleu de Coomassie colloïdal (Neuhoff et al., 1988).

4. Identification des protéines par spectrométrie de masse :

L'identification des protéines est réalisée dans le cadre d'une collaboration avec le laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique (ECPM, Strasbourg) dirigé par le Dr Alain van Dorsselaer.

Brièvement, les spots ou les bandes de protéines colorées sont découpés à partir du gel (sur une table UV dans le cas d'une détection par fluorescence). Les fragments de gels peuvent être conservés à - 20°C. Après digestion à la trypsine de la protéine incluse dans le gel, les peptides obtenus sont extraits et analysés sur un appareil Bruker BIFLEX™ MALDI-TOF. L'identification des protéines est basée sur la comparaison des masses mesurées par le spectromètre avec les masses peptidiques calculées par digestion théorique à la trypsine à partir de bases de données de protéines. Dans certains cas, l'identification est confirmée par analyse de peptides en spectrométrie de masse en tandem (MS-MS).

RESULTATS

A/ Analyse du promoteur du gène *NDUFS8*

1. Détermination du départ de transcription :

Le départ de transcription du gène *NDUFS8* a été localisé par extension d'amorce en utilisant de l'ARN total extrait de fibroblastes humains comme substrat. Les expériences réalisées avec l'amorce RT1 fournissent 2 produits d'extension principaux de 83 et 87 nucléotides ainsi que 3 produits mineurs de 97, 98 et 113 nucléotides (figure 8). Une deuxième extension d'amorce a été réalisée avec l'amorce RT2 afin de contrôler la spécificité des résultats obtenus avec RT1. Deux produits d'extension de 116 et 142 nucléotides ont été transcrits correspondant aux fragments de 87 et 113 nucléotides obtenus avec RT1. Ces résultats indiquent que le gène *NDUFS8* possède au moins deux départs de transcription. Le site principal est une base 'T' localisée 5 nucléotides en aval par rapport à l'extrémité 5' décrite par de Sury et al. (1998). Ce précédent résultat avait été déduit de la séquence de l'EST (Expressed Sequence Tag) le plus long identifié dans les bases de données. Le départ de transcription secondaire est un résidu 'A' localisé 26 nucléotides en amont du site principal.

2. Caractérisation de la région promotrice :

Comme le montre la figure 9A, ce travail a été réalisé à partir d'une séquence qui s'étend de l'extrémité 3' du gène *ALDH7* jusqu'au premier intron (non codant) du gène *NDUFS8*. Pour analyser la régulation transcriptionnelle du gène *NDUFS8*, des constructions plasmidiques contenant soit la séquence totale, soit une séquence délétée à différents niveaux dans la région 5' flanquante ont été préparés dans le vecteur pGL3-Basic. Ces inserts ont été clonés en amont du gène luciférase et l'activité transcriptionnelle de chaque séquence a été mesurée par des expériences de transfection transitoire. Les résultats de ces essais réalisés dans des cellules HeLa, des myoblastes murins C2C12 et dans des myotubes C2C12 sont présentés dans la figure 9B. La plus grande séquence analysée (clone 23A) correspond aux nucléotides -1882 à +206 par rapport au départ de transcription principal.

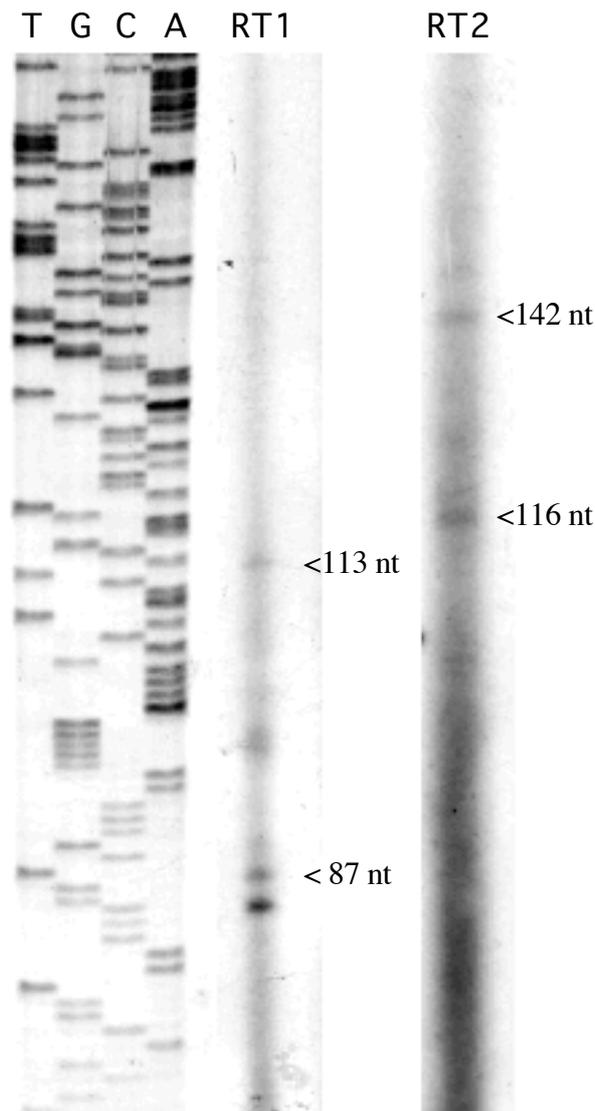


Figure 8 : Localisation des sites d'initiation de la transcription du gène *NDUF58*.

Les réactions d'extension d'amorce ont été réalisées avec de l'ARN total extrait de cultures primaires de fibroblastes humains. Deux amorces s'hybridant dans l'exon 1 (RT1) et dans l'exon 2 (RT2) ont été utilisées. Cinq produits d'extension d'amorce de 83, 87, 97, 98 et 113 nucléotides ont été obtenus avec l'amorce RT1 (ligne RT1). Avec l'amorce RT2, la réaction a généré deux produits d'extension de 116 et 142 nucléotides qui correspondent aux produits de 87 et 113 nucléotides obtenus avec l'amorce RT1 (ligne RT2). Les produits de 83, 97 et 98 nucléotides détectés avec l'amorce RT1 sont donc considérés comme étant non spécifiques. Les produits des réactions d'extension d'amorce ont été analysés sur des gels 6 % acrylamide, urée 8M. Une réaction de séquence a été utilisée comme échelle de poids moléculaire (lignes T, G, C, A). Cette réaction de séquence a été préparée avec l'amorce RT1 en utilisant comme matrice le clone 23A qui contient la région 5' du gène *NDUF58*.

La délétion d'un fragment Apa I-Apa I s'étendant de la position -1682 à -246 (clone 23B) n'a pas d'effet significatif sur l'activité transcriptionnelle, suggérant l'absence d'éléments de régulation dans cette région. Des résultats similaires sont observés quand la séquence de 200 pb en amont du site Apa I (nucléotides -1882 à -1681) est délétée du clone B (clone 23C). Ces données indiquent que l'activité du promoteur *NDUFS8* est principalement supportée par les nucléotides -247 à +206.

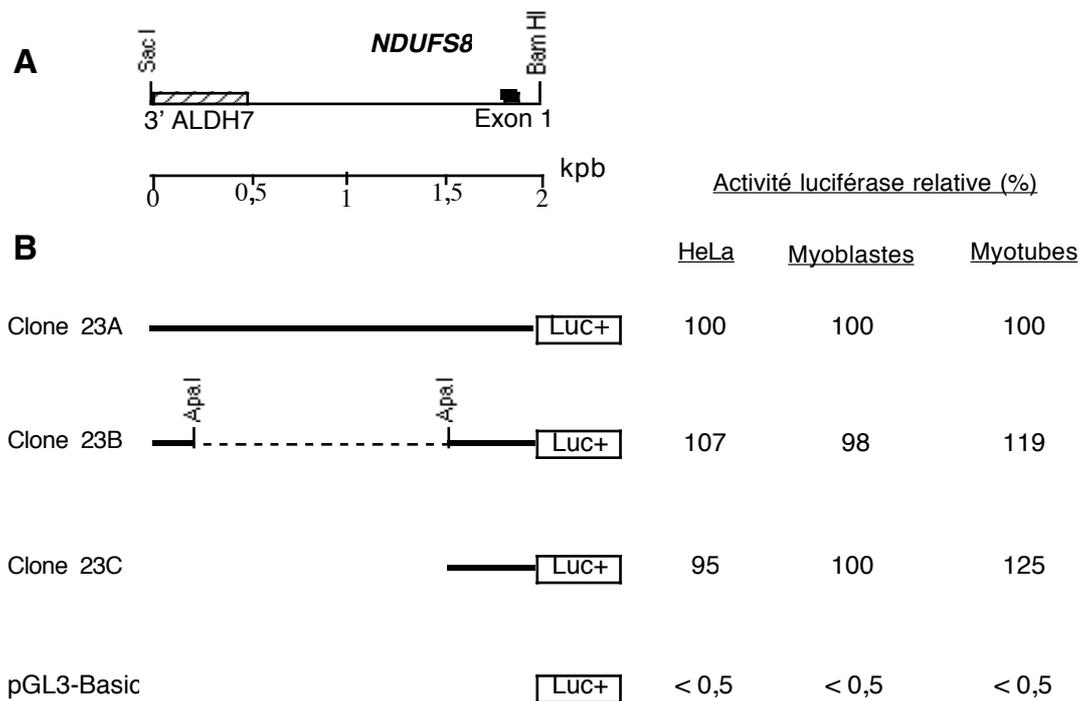


Figure 9 : Identification de la région promotrice en amont du gène *NDUFS8*.

(A) Représentation schématique du fragment d'ADN Sac I-Bam HI correspondant aux nucléotides -1882 à +206 par rapport au site principal d'initiation de la transcription du gène *NDUFS8*. 3' ALDH7 = extrémité 3' du gène codant pour l'ALDH7. (B) Expériences de transfection transitoire. Le clone 23A a été préparé par ligation du fragment d'ADN Sac I-Bam HI dans le vecteur pGL3-basic. Le clone 23B a été obtenu par délétion des nucléotides -1682 à -246 avec l'enzyme de restriction Apa I. Le clone 23C contient la séquence -246 à +206. Chaque plasmide a été cotransfecté avec le vecteur pRL-TK codant pour la luciférase de *Renilla reniformis* dans des cellules HeLa, des myoblastes C2C12 et des myotubes C2C12. Les activités transcriptionnelles ont été mesurées en utilisant le système Dual-Luciférase. Pour chaque essai, l'activité de la luciférase de luciole est normalisée par l'activité de la luciférase de *Renilla reniformis* et exprimée relativement à l'activité du clone 23A (100 %). Les résultats présentés correspondent aux moyennes de trois expériences indépendantes.

Cette région transcriptionnellement active a été analysée à l'aide des programmes informatiques TFSEARCH et MatInspector (Akiyama ; Quandt et al., 1995 ; Heinemeyer et al., 1998) afin de rechercher des séquences consensus de sites de fixation de facteurs de transcription. Plusieurs sites potentiels ont été identifiés en amont du départ de transcription principal : un site YY1 (-153 à -134), trois sites Sp1 (-210 à -201, -197 à -185, -78 à -67) et 3 boîtes CCAAT (-166 à -154, -107 à -95, -54 à -41). La position de ces sites sur la séquence promotrice du gène *NDUFS8* est indiquée dans la figure 10A. Aucun site de fixation pour d'autres facteurs de transcription connus comme des régulateurs de l'expression de gènes du système d'oxydation phosphorylante (NRF-1, NRF-2, OXBOX/REBOX) n'a été détecté.

Afin de définir plus précisément la position des séquences transcriptionnellement actives dans cette région promotrice, 5 clones ont été construits dans le vecteur pGL3-Basic. Le clone 23C contient l'intégralité du promoteur basal. Les clones 23D à 23G présentent des délétions de taille croissante à partir de l'extrémité 5' (jusqu'à la position -49). Des cellules HeLa ont ensuite été transfectées par ces plasmides afin de mesurer leurs activités luciférase (figure 10B). La délétion des nucléotides -247 à -182 (clone 23D) entraîne la perte de la moitié de l'activité transcriptionnelle. Comme indiqué précédemment, 2 sites Sp1 potentiels ont été identifiés dans cette zone par analyse informatique. Quand la délétion est étendue jusqu'à la position -116, seulement 11 % de l'activité transcriptionnelle sont conservés. Le fragment délété contient les séquences consensus d'un site YY1 et d'une boîte CCAAT. Ces résultats montrent que la région -247 à -116 contrôle environ 90 % de l'activité promotrice. La faible différence entre les activités luciférase mesurées pour les clones 23E et 23F suggère l'absence d'éléments de régulation de la transcription entre les nucléotides -115 et -85. Enfin, la délétion du fragment d'ADN -85 à -50 (clone 23G) contenant un site Sp1 potentiel et une partie de la séquence consensus d'une boîte CCAAT est associée à une diminution de l'activité transcriptionnelle restante de 7 à 3 %. L'activité luciférase résiduelle associée au clone 23G suggère que les principaux éléments de régulation de la transcription du promoteur *NDUFS8* sont localisés dans la région s'étendant de la position -247 à la position -50 par rapport au site principal d'initiation de la transcription.

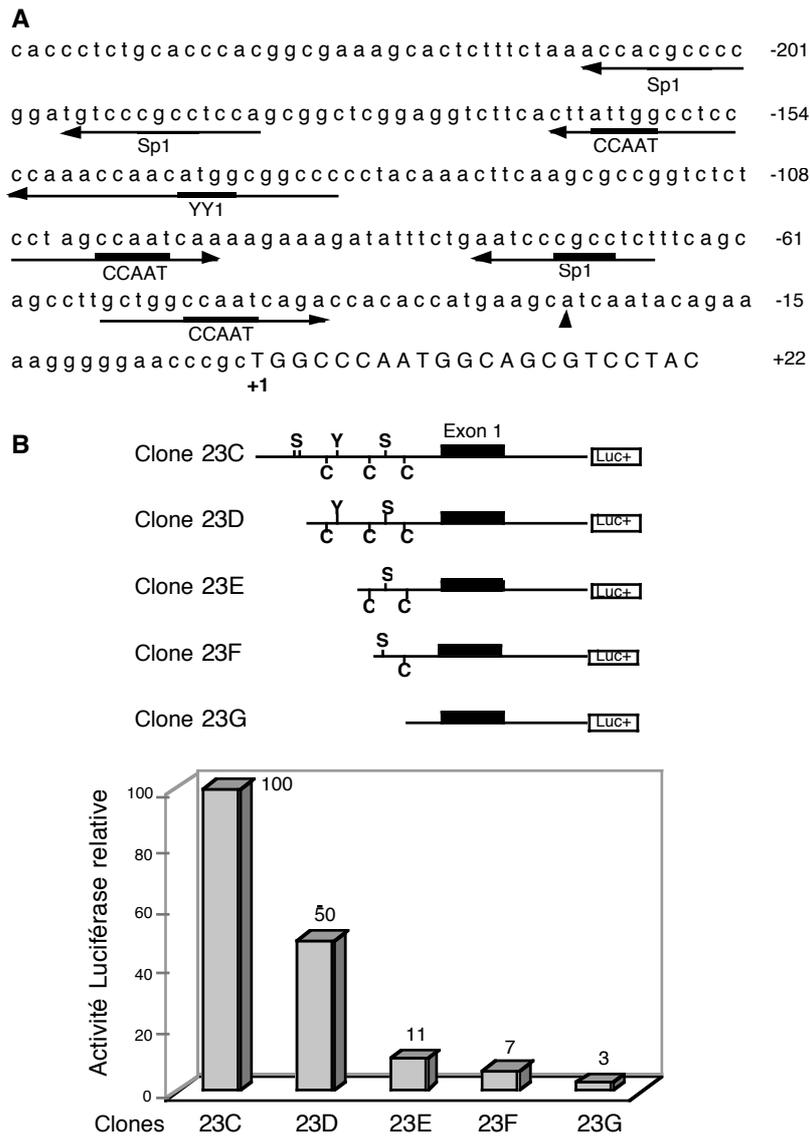


Figure 10 : Recherche de séquences *cis*-régulatrices dans le promoteur *NDUFS8*.

(A) Séquence nucléotidique du promoteur *NDUFS8* humain et de l'extrémité 5' du premier exon. Les séquences du promoteur et de l'exon sont, respectivement, en minuscule et en majuscule. Le site principal d'initiation de la transcription correspond à la position +1. Le site d'initiation mineur (position -26) est indiqué par un triangle noir. Les séquences consensus des sites de fixation de facteurs de transcription sont soulignées et le nom de la protéine correspondante est écrit en dessous. Les flèches indiquent l'orientation sens ou antisens de ces séquences consensus.

(B) Analyse par délétion du promoteur *NDUFS8*. Des fragments d'ADN correspondant aux nucléotides -247 à +206 (clone 23C), -181 à +206 (clone 23D), -115 à +206 (clone 23E), -85 à +206 (clone 23F) et -49 à +206 (clone 23G) ont été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur pGL3-basic en amont du gène de la luciférase de luciole. Une description schématique de chaque clone est présentée avec S, C et Y indiquant la position des séquences consensus Sp1, CCAAT et YY1. Ces clones ont été cotransfectés avec le vecteur pRL-TK dans des cellules HeLa et les activités transcriptionnelles ont été mesurées comme décrit dans la section 2. Pour chaque essai, l'activité de la luciférase de luciole est normalisée par l'activité de la luciférase de *Renilla reniformis* et exprimée relativement à l'activité du clone 23C (100 %). Les résultats présentés correspondent aux moyennes de trois expériences indépendantes.

3. Fixation de facteurs de transcription dans la région promotrice :

Des expériences de gel-retard ont été réalisées avec des extraits nucléaires de cellules HeLa afin de déterminer la capacité des éléments *cis* identifiés par transfection transitoire à fixer les facteurs de transcription correspondants.

Le premier oligonucléotide testé contient le site YY1 (tableau V). En présence d'extraits nucléaires, une bande dont la migration est retardée apparaît en plus de la sonde marquée libre (Figure 11A). Les essais de compétition montrent que ce complexe nucléoprotéique est spécifique : sa formation est inhibée par compétition avec un oligonucléotide YY1 froid 25 fois plus concentré mais ne l'est pas en présence d'un oligonucléotide non spécifique 250 fois plus concentré (Figure 11A). Une sonde YY1m, mutée dans la séquence consensus du site YY1 (tableau V), a également été testée avec comme conséquence la disparition quasi totale de la bande retardée observée avec la sonde sauvage. Dans les expériences de compétition, cet oligonucléotide YY1m est incapable d'inhiber la formation du complexe nucléoprotéique impliquant la sonde YY1 (Figure 11B). La formation de ce complexe requiert donc en *cis* une séquence consensus YY1 intacte. Dans le but d'identifier le facteur se fixant sur cette sonde, deux antisérums dirigés contre la protéine YY1 ont été utilisés dans des expériences de gel-retard réalisés avec la sonde YY1. Comme le montre la figure 11C, la formation du complexe ADN-protéine est inhibée par ces antisérums. Avec l'antisérum sc-281x reconnaissant l'extrémité carboxyterminale du facteur YY1 humain, l'inhibition est partielle. Elle est par contre totale en présence de l'antisérum sc-1703x dirigée contre l'ensemble de la séquence protéique. La formation de la bande retardée n'est, par contre, pas affectée en présence d'un antisérum dirigé contre la sous-unité β de l'ATPase mitochondriale bovine démontrant la spécificité de l'inhibition par les antisérums YY1.

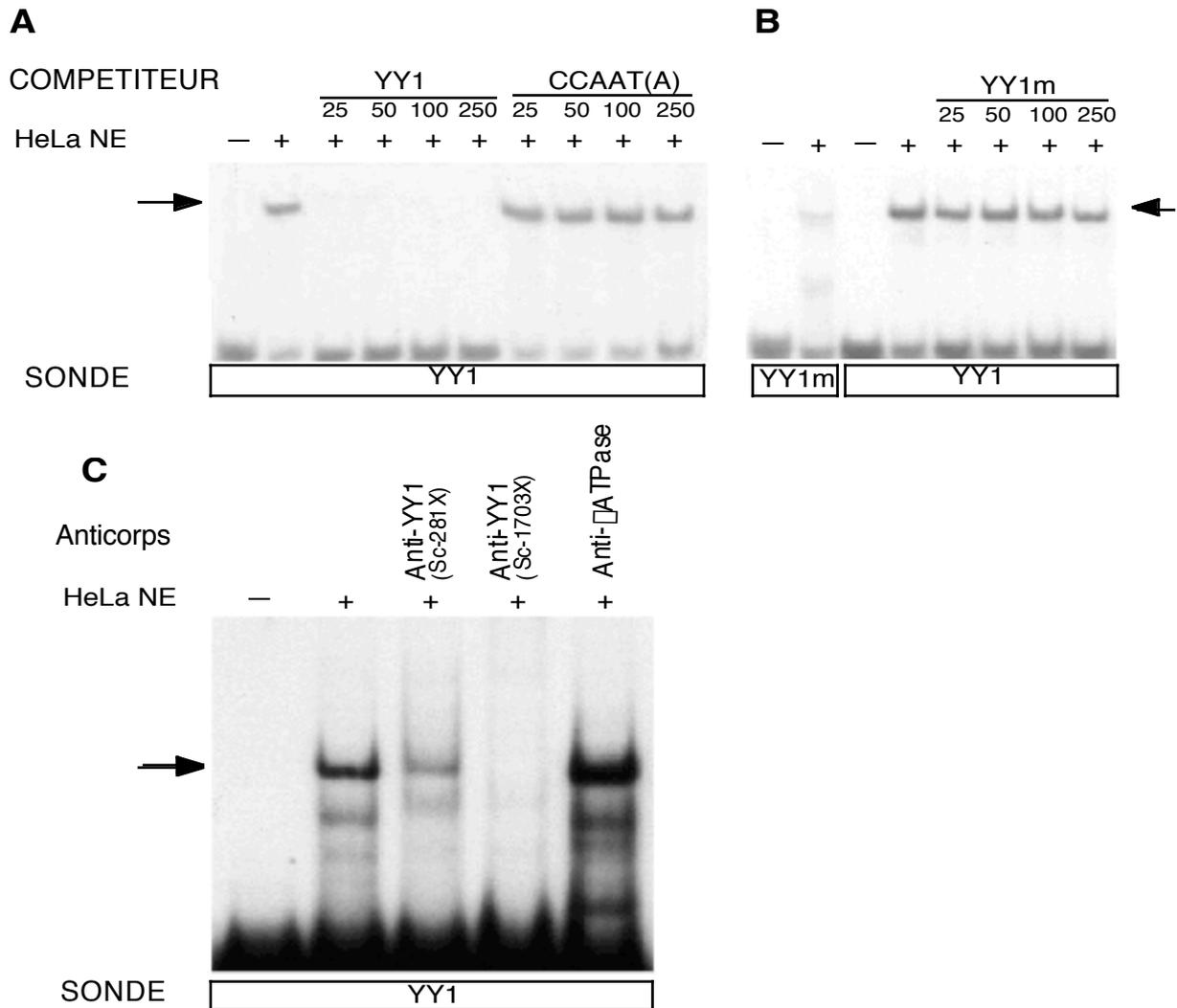


Figure 11 : Liaison de YY1 sur le site consensus du promoteur *NDUF58*.

(A) Formation d'un complexe ADN-protéine spécifique (flèche) avec la sonde YY1. Les réactions de gel-retard ont été réalisées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes en utilisant la sonde YY1 marquée. L'ajout d'un extrait nucléaire de cellules HeLa (HeLa NE) est indiqué par le signe +. Un compétiteur non marqué spécifique (oligonucléotide YY1) ou non spécifique (oligonucléotide CCAAT(A)) a été ajouté à une concentration 25 à 250 fois supérieure à celle de la sonde comme indiqué sur la figure. (B) Des mutations dans la séquence consensus YY1 inhibent la formation du complexe nucléoprotéique. Les réactions de gel-retard ont été réalisées en utilisant les sondes YY1m ou YY1. L'ajout d'un extrait nucléaire de cellules HeLa est indiqué par le signe +. L'oligonucléotide YY1m non marqué, utilisé comme compétiteur, a été ajouté à une concentration 25 à 250 fois supérieure à celle de la sonde comme indiqué sur la figure. (C) La formation du complexe est inhibée par des anticorps anti-YY1. La réaction de gel-retard a été réalisée en utilisant la sonde YY1 marquée. L'ajout d'un extrait nucléaire de cellules HeLa est indiqué par le signe +. Les antisérums YY1 (sc-281x ou sc-1703x) ou l'antisérum ATP synthase sous-unité β ($1 \mu\text{l}$) sont ajoutés comme indiqué sur la figure.

D'autres expériences de gel-retard ont été réalisées avec un oligonucléotide Sp1(A/B) contenant les 2 sites Sp1 distaux (tableau V). Comme le montre la figure 12A, la sonde Sp1(A/B) forme un complexe nucléoprotéique en présence d'un extrait nucléaire de cellules HeLa. La formation de ce complexe est spécifique car elle est bloquée par un compétiteur homologue non marqué 25 fois plus concentré alors qu'elle ne l'est pas avec un excès dix fois plus important d'un compétiteur non homologue (figure 12A). Deux autres oligonucléotides ont été utilisés afin de déterminer les capacités de fixation respectives de chaque site : Sp1(Am/B) muté au niveau du site -210/-201 et Sp1(A/Bm) muté au niveau du site -197/-185 (tableau V). Lorsque l'un ou l'autre de ces oligonucléotides est utilisé comme sonde, une bande retardée est observée mais de moindre intensité que celle générée avec la sonde correspondant à la séquence non mutée. Cette bande retardée présente la même mobilité électrophorétique que celle obtenue avec la sonde Sp1(A/B) (figure 12B). Quand ces oligonucléotides sont utilisés comme compétiteurs non marqués au cours de réactions réalisées avec la sonde Sp1(A/B), ils inhibent la formation du complexe nucléoprotéique (figure 12B). Cependant, cette inhibition n'est pas totale contrairement à ce qui est observé lorsque l'oligonucléotide Sp1(A/B) est employé comme compétiteur homologue (figure 12A). D'une manière globale, ces résultats indiquent que les 2 sites Sp1 fixent le même facteur protéique avec une affinité similaire.

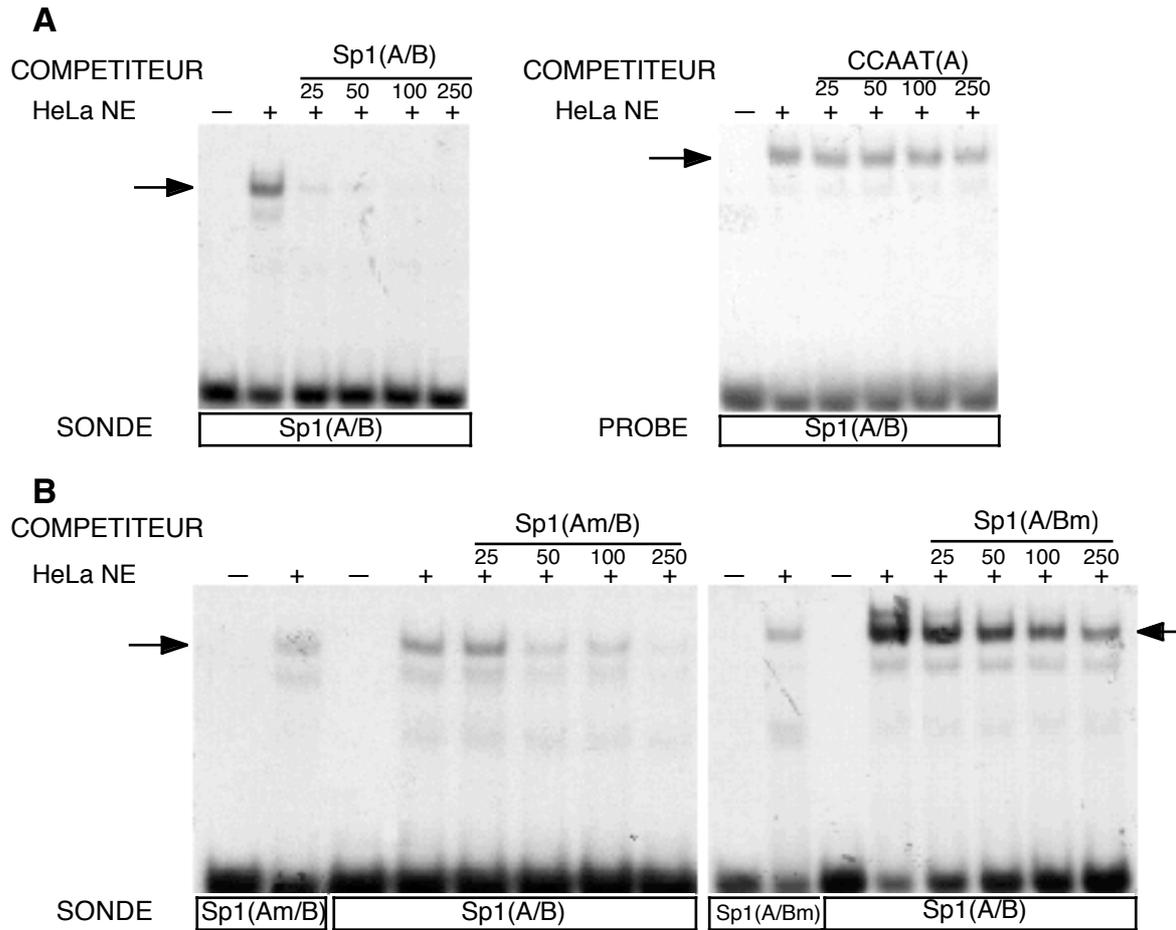


Figure 12 : Analyse par gel-retard des sites Sp1 -210/-201 et -197/-185.

(A) Formation d'un complexe ADN-protéine spécifique (flèche) avec la sonde Sp1(A/B). Les réactions de gel-retard ont été réalisées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes en utilisant la sonde Sp1(A/B) contenant les sites Sp1 -210/-201 et -197/-185. L'ajout d'un extrait nucléaire de cellules HeLa (HeLa NE) est indiqué par le signe +. Un compétiteur non marqué spécifique (oligonucléotide Sp1(A/B)) ou non spécifique (oligonucléotide CCAAT(A)) a été ajouté à une concentration 25 à 250 fois supérieure à celle de la sonde comme indiqué sur la figure. (B) Fixation de protéines sur les deux sites Sp1. Les réactions de gel-retard ont été réalisées en utilisant les sondes Sp1(Am/B), Sp1(A/Bm) ou Sp1(A). L'ajout d'un extrait nucléaire de cellules HeLa (HeLa NE) est indiqué par le signe +. Les oligonucléotides Sp1(Am/B) et Sp1(A/Bm) non marqués, utilisés comme compétiteur, ont été ajoutés à une concentration 25 à 250 fois supérieure à celle de la sonde comme indiqué sur la figure.

Le troisième site Sp1 potentiel identifié dans le promoteur *NDUFS8*, correspondant aux nucléotides -78 à -67, a été analysé par la technique de gel-retard en utilisant la sonde Sp1(C) (tableau V). En présence d'un extrait nucléaire, cette sonde permet d'obtenir une bande retardée (figure 13A). Ce complexe nucléoprotéique est toujours observé en présence d'un oligonucléotide non spécifique froid 250 fois plus concentré. Lorsque les essais de compétition sont réalisés avec l'oligonucléotide Sp1(C), la formation du complexe est inhibée. Cependant, une bande retardée de faible intensité est toujours présente avec une concentration 100 fois supérieure à celle du compétiteur spécifique. Ce résultat ne permettant pas de conclure définitivement quant à la spécificité du complexe nucléoprotéique formé avec la sonde Sp1(C), des expériences complémentaires de compétition ont été réalisées avec l'oligonucléotide Sp1(A/B) non marqué. L'ajout de ce compétiteur inhibe fortement la formation du complexe. En effet, la bande retardée disparaît complètement avec une concentration de Sp1 (A/B) 25 fois supérieure à celle de la sonde. Ce résultat suggère que le même facteur nucléaire se fixe sur les différents sites Sp1 du promoteur *NDUFS8* (figure 13A). Un oligonucléotide Sp1(Cm), muté dans la séquence consensus du site -78/-67 (tableau V), a été utilisé lors d'expériences de gel-retard, soit comme sonde, soit comme compétiteur froid contre la sonde Sp1(C) non mutée (figure 13B). Les mutations du site Sp1 ont pour conséquence la disparition totale de la bande retardée précédemment observée. De plus, l'oligonucléotide Sp1(Cm) est incapable de bloquer la formation du complexe obtenu avec la sonde non mutée. Cette observation indique que la fixation de la protéine nucléaire au site Sp1(C) nécessite une séquence consensus Sp1 intacte. Enfin, des expériences de gel-retard ont été réalisées avec les oligonucléotides CCAAT(A) et CCAAT(B) contenant les boîtes CCAAT -16/-154 et -54/-41. Comme les essais de transfection transitoire l'ont démontré par, ces deux séquences sont localisées dans des régions contenant des éléments de régulation de la transcription (figure 10B). La boîte CCAAT -166/-154 est localisée juste en amont du site YY1. La boîte CCAAT -54/-41, située en aval du site Sp1(C), est présente dans le clone G. Quand ces oligonucléotides sont utilisés comme sonde, aucun n'est capable de former un complexe nucléoprotéique en présence d'un extrait nucléaire de cellules HeLa (résultats non présentés). Ces données suggèrent que ces séquences ne participent pas à la régulation transcriptionnelle du gène *NDUFS8*.

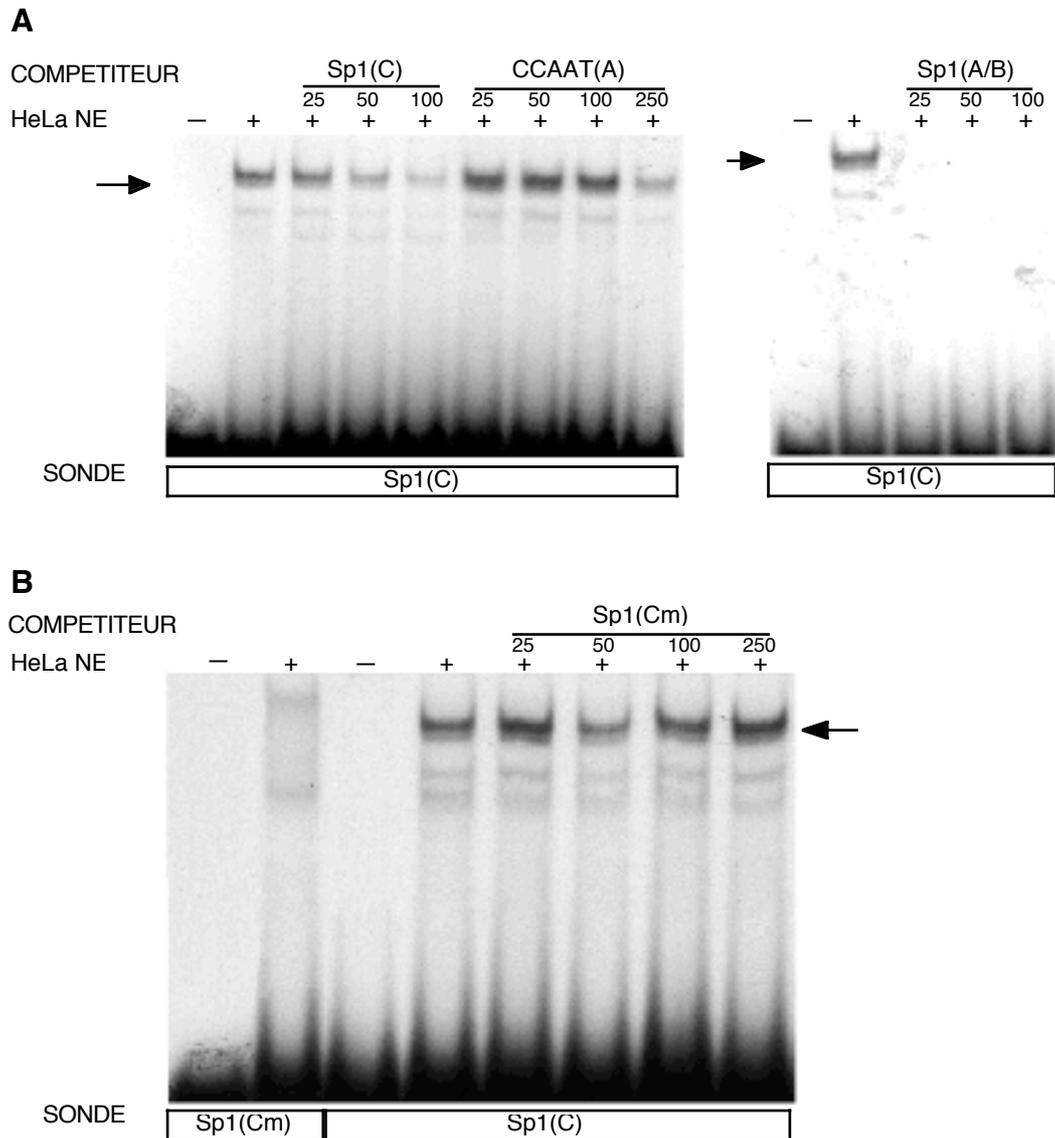


Figure 13 : Analyse par gel-retard du site Sp1 -78/-67.

(A) Formation d'un complexe ADN-protéine spécifique (flèche) avec la sonde Sp1(C). Les réactions de gel-retard ont été réalisées comme décrit dans la section Matériels et Méthodes en utilisant la sonde Sp1(C) contenant le site Sp1 -78/-67. L'ajout d'un extrait nucléaire de cellules HeLa (HeLa NE) est indiqué par le signe +. Les oligonucléotides Sp1(C), Sp1(A/B) et CCAAT(A) non marqués, utilisés comme compétiteurs, ont été ajoutés à une concentration 25 à 250 fois supérieure à celle de la sonde comme indiqué sur la figure. (B) Des mutations de la séquence consensus Sp1 inhibent la formation du complexe ADN-protéine. Les réactions de gel-retard ont été réalisées en utilisant les sondes Sp1(Cm) ou Sp1(C). L'ajout d'un extrait nucléaire de cellules HeLa est indiqué par le signe +. L'oligonucléotide Sp1(Cm) non marqué, utilisé comme compétiteur, a été ajouté à une concentration 25 à 250 fois supérieure à celle de la sonde comme indiqué sur la figure.

4. Analyse des sites YY1 et Sp1 par mutagenèse dirigée :

Après avoir montré que les sites YY1 et Sp1 fixent de manière spécifique des facteurs protéiques nucléaires, leur rôle dans la régulation de la transcription du gène *NDUFS8* a été analysé. Dans ce but, des mutations ont été introduites au niveau des sites YY1, Sp1(A), Sp1(B) et Sp1(C) dans le contexte de la séquence -247 /+206 (figure 14A) puis l'effet de ces mutations sur l'activité du promoteur a été analysé par des expériences de transfection transitoire dans des cellules HeLa. Comme le montre la figure 14B, toutes les mutations entraînent une diminution de la force promotrice, mesurée par une baisse de l'activité luciférase. Ces résultats suggèrent que tous les sites étudiés sont fonctionnels. Ces données permettent également d'évaluer l'importance de chacun de ces sites dans le contrôle de l'expression du gène *NDUFS8*. Le site YY1 apparaît comme jouant le rôle le plus important puisque sa destruction diminue l'activité du promoteur de 62 %. Les mutations introduites dans les séquences Sp1(A) et Sp1(B) provoquent respectivement une diminution de l'activité de 37 % et 46 %. Le site Sp1(C) semble avoir une influence moindre puisque 87 % de l'activité promotrice est conservée lorsqu'il est muté.

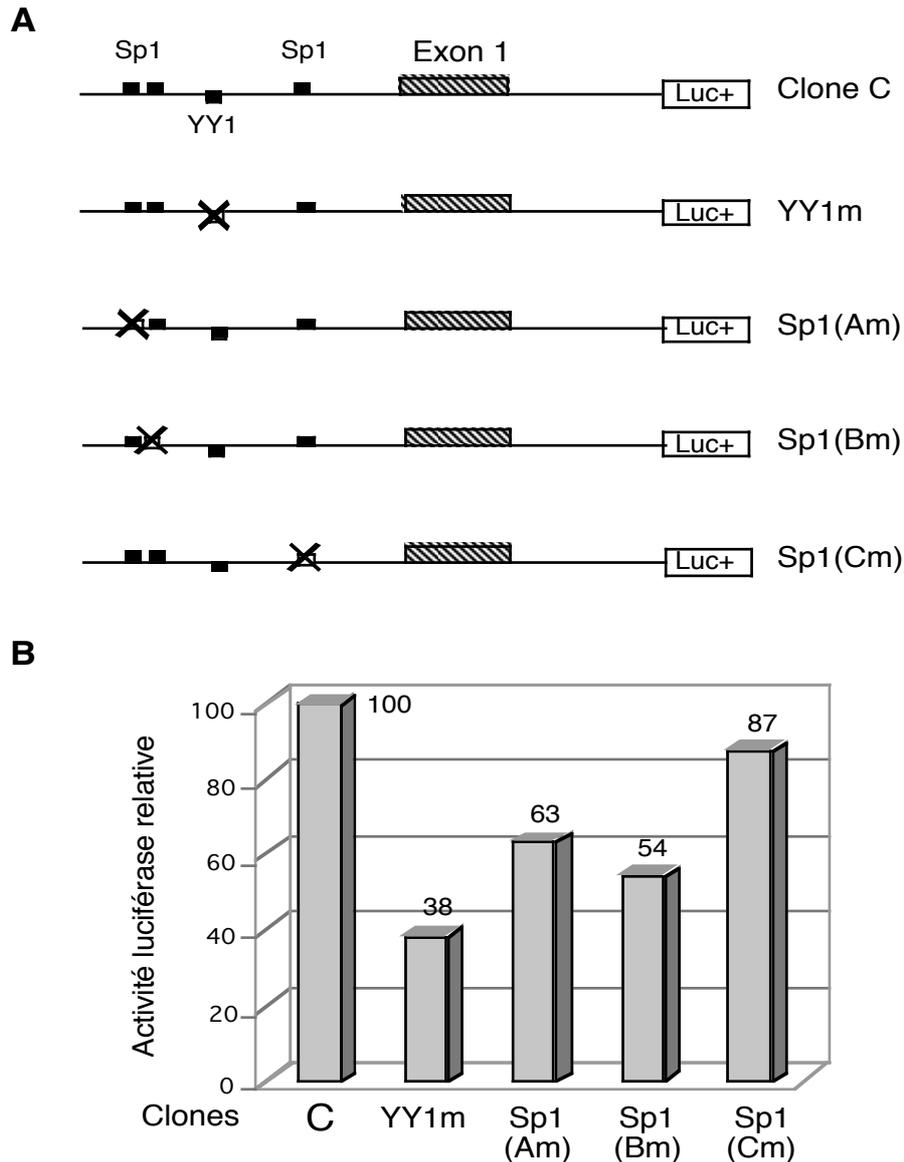


Figure 14 : Analyse par mutagenèse dirigée des sites YY1 et Sp1 du promoteur *NDUFS8*.

(A) Représentation schématique des constructions préparées dans le vecteur pGL3-Basic contenant le gène de la luciférase de luciole. La préparation de ces plasmides est décrite dans Matériels et Méthodes. Chaque clone contient la séquence -247 à +206 du promoteur *NDUFS8*. Les sites de fixation de facteurs de transcription mutés sont indiqués par une croix. (B) Conséquences des mutations sur l'activité luciférase. Les plasmides sont cotransfectés dans des cellules HeLa avec le vecteur pRL-TK contenant le gène de la luciférase de *Renilla reniformis*. Les activités transcriptionnelles sont mesurées avec le système Dual-Luciférase comme décrit dans Matériels et Méthodes. Pour chaque essai, l'activité de la luciférase de luciole est normalisée par l'activité de la luciférase de *Renilla reniformis* et exprimée relativement à l'activité du clone 23C (100 %). Les résultats présentés correspondent aux moyennes de trois expériences indépendantes.

B/ Analyse du promoteur du gène *NDUFS7*

1. Caractérisation de la région promotrice :

Une région de 1 000 pb en amont du codon initiateur ATG du gène *NDUFS7* a été étudiée avec les programmes TFSEARCH et MatInspector (Akiyama ; Quandt et al., 1995 ; Heinemeyer et al., 1998) qui permettent de rechercher des séquences consensus de sites de fixation de facteurs de transcription. Cette analyse a été ciblée sur 4 facteurs de transcription dont le rôle dans la régulation de l'expression de gènes du système de phosphorylation oxydative est bien documentée : NRF-1, NRF-2, Sp1 et YY1. Ces quatre protéines ont chacune été identifiées comme régulateur de la transcription de plusieurs gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire, de l'ATP synthase ou des isoformes du translocateur ADP/ATP. Comme le montre la figure 15, cette recherche a permis de mettre en évidence 2 séquences NRF-1 (-441 à -430 et -96 à -85) et 2 séquences Sp1 (-752 à -740 et -75 à -63). D'autre part, une recherche a été réalisée avec cette séquence dans la base de données GenBank pour identifier des EST homologues à l'extrémité 5' du gène *NDUFS7*. Les deux EST les plus longs ayant ainsi été mis en évidence ont leur extrémité 5' localisée respectivement en -330 et en -39 par rapport au codon initiateur ATG. Ces données suggèrent que le gène *NDUFS7* ne possède pas d'exons non codant en amont et donc que la région étudiée contient les éléments de régulation transcriptionnelle du promoteur basal.

aaccaccgcaccggcctttgcctctgttttgtaatcataaaacaggcagacaaaacctccagtgg -935
aattgtgaaaattaaatgatatgcatgcagaaagcgttctgcaaactctgttttgctagtttggtgt -867
ttagtgtagttttatatacattagtagtgggtgtaaacttatcaatftaagcaagatggaaaatcgag -798
ggtgtgacaggaaggggaagtttgagctgaaattatgacctcttaggggtgggaagaggag -735
gctttggggttgtaggtctgagccccctactttgggatgagtcacatcgcggcgactcctct -670
gcagaatgcggtgatgttgcggttaaggggtccgggatagctgcgaggcagctggaccaatcc -608
tgaacgaaagacatcagtgatcgcaagaggcgtaaaacttctgccgaaacctgggatcgaac -545
caggacctttagatcttcagtctaacgctctcccaactgagctatttcggctgggcggcagagt -480
cgctctcgccgggactccgtcccgcgctgcgccttccctgcgagggcagtcgtttcgctca -416
gcaggccccacatcctttgtaaggtctcccagggcgccggagcgcagtgctctctgtggcg -353
caatcggttagcgcgttcggctgtaaccgaaaggttggtggttcgagcccaccaggacgc -290
gtggtgacttttgcctcctggaataacaagaaaatgagtgctgcctctgttttgcggtccgccg -223
cagaccgcggccccacgtgagcactccgatgaccttccgcctcgggtgatctgggggtgc -160
acggcgcaacacgaccacggaggccgaaagcgcagcggaaacctccggctccaggtccgg -99
ttccgcatgcgctccgagccgctttggcgggcgccccgggaacctggagcgttaaggaga -37
acggacctcagaggtgtctgaaggccgaggccaagA
+1

Figure 15 : Séquence nucléotidique de la région en amont du gène *NDUFS7* humain.

Le nucléotide A du codon d'initiation de la traduction est noté en majuscule et correspond à la position +1. Les triangles noirs indiquent les positions correspondant à l'extrémité 5' des deux plus grands EST (Expressed Sequence Tag) identifiés dans la base de données GenBank. Les séquences consensus des sites de fixation de facteurs de transcription sont soulignées et le nom de la protéine correspondante est écrit en dessous. Les flèches indiquent l'orientation sens ou antisens de ces séquences consensus.

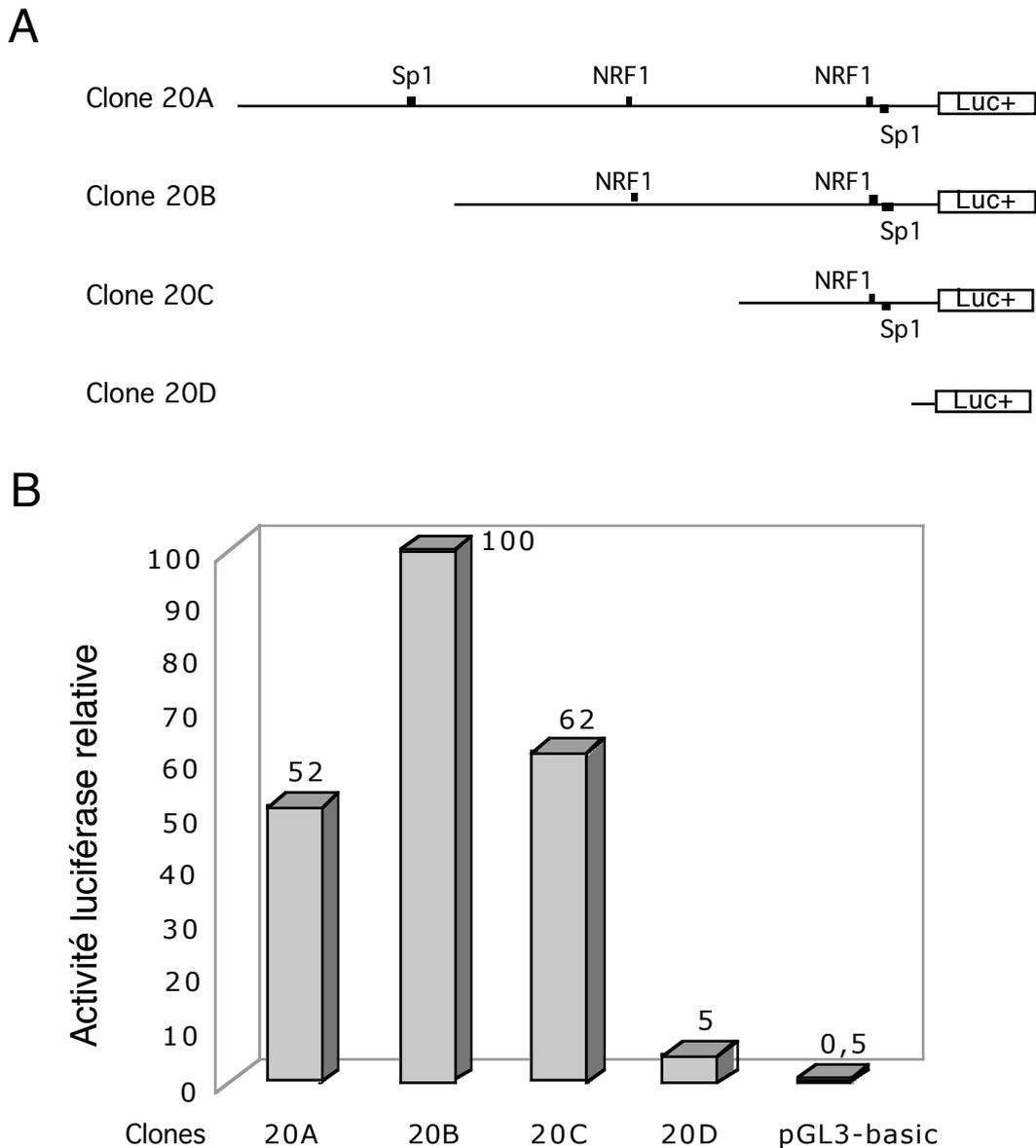


Figure 16 : Analyse par délétion du promoteur *NDUFS7*.

(A) Représentation schématique des clones 20A, 20B, 20C et 20D. Un fragment d'ADN correspondant aux 1000 pb en amont du codon initiateur ATG du gène *NDUFS7* a été amplifié par PCR et cloné dans le vecteur pGL3-basic en amont du gène de la luciférase de luciole (clone 20A). Les clones 20B, 20C et 20D ont été obtenus à partir du clone 20A par délétion à partir de l'extrémité 5' de la séquence clonée de fragments de 472 pb, 673 pb et 942 pb, respectivement. La position des séquences consensus Sp1 et NRF-1 est indiquée par des carrés noirs. (B) Mesure de l'activité transcriptionnelle. Ces clones ont été cotransfectés avec le vecteur pRL-TK dans des cellules HeLa et les activités transcriptionnelles ont été mesurées comme décrit dans la section 2. Pour chaque essai, l'activité de la luciférase de luciole est normalisée par l'activité de la luciférase de *Renilla reniformis* et exprimée relativement à l'activité du clone 20B (100 %). Les résultats présentés correspondent aux moyennes de trois expériences indépendantes.

Afin d'analyser l'activité transcriptionnelle de cette région flanquant le gène *NDUFS7* en 5', la séquence de 1000 pb a été clonée dans le vecteur pGL3-basic en amont du gène luciférase (Clone 20A). Une série de 3 clones présentant des délétions réalisées à partir de l'extrémité 5' de taille croissante a ensuite été étudiée (figure 16A). Dans le clone 20B, la délétion s'étend jusqu'à la position -529 supprimant de ce fait la séquence Sp1 distale. Dans le clone 20C, les nucléotides -1000 à -328 sont délétés, éliminant en plus la séquence NRF-1 distale. Le clone 20D contient la séquence -59 à +1. Dans ce clone, les 4 sites potentiels NRF-1 et Sp1 sont donc absents. La capacité de chacun de ces clones à activer la transcription du gène luciférase a été mesurée par des expériences de transfection transitoire réalisées dans des cellules HeLa. Les résultats présentés dans la figure 16B montrent que la région -1000 à -529 contenant le site Sp1 distal a un effet inhibiteur sur la transcription puisque l'activité luciférase relative augmente d'un facteur 2 lorsque cette séquence est délétée. A l'inverse, les deux autres délétions entraînent une baisse de la force promotrice, ce qui indique la présence d'éléments activateurs de la transcription dans les séquences correspondantes. L'activité du clone C, ayant perdu le site NRF-1 distal, représente 60 % environ de celle du clone B. Le clone D qui ne contient plus aucun des sites potentiels NRF-1 et Sp1 identifiés ne conserve qu'une activité résiduelle de 5 % par rapport au clone B. Ces résultats suggèrent que la séquence génomique de 1000 pb en amont du codon initiateur contient des éléments *cis* essentiels à la régulation de la transcription du gène *NDUFS7*.

2. Analyse des sites NRF-1 et Sp1 par mutagenèse dirigée :

Les expériences précédentes ont montré que les régions contenant les séquences Sp1 et NRF-1 sont nécessaires au fonctionnement du promoteur du gène *NDUFS7*. L'objectif de cette étude par mutagenèse dirigée est de préciser le rôle de chacun des quatre sites potentiels. Il s'agit, premièrement, de déterminer s'ils sont actifs. Deuxièmement, dans le cas où leur activité est démontrée, d'estimer leur importance fonctionnelle. Troisièmement, la comparaison entre l'effet résultant de la destruction spécifique d'une séquence consensus et l'effet lié à la délétion de la région contenant le site permettra de savoir si d'autres séquences *cis*-régulatrices sont présentes. A cette fin, quatre clones ont été préparés, présentant chacun des mutations ponctuelles détruisant la séquence consensus de l'un des sites (figure 17A). Premièrement, la mutation du

site Sp1 distal (clone 20E) a été réalisée en utilisant le clone 20A comme matrice. Le but de cette mutation est de déterminer si ce site Sp1 est responsable de l'activité inhibitrice de la région -1000 à -529. Dans cette hypothèse, la mutation du site Sp1 distal doit restaurer une activité comparable à celle du clone 20B. Deuxièmement, dans le but d'étudier les 2 sites NRF-1 (clones 20F et 20G) et le site Sp1 proximal (clone H), des mutations ont été introduites dans la séquence -528 à +1 (clone 20B) représentant l'activité transcriptionnelle maximale. L'objectif est de déterminer si la suppression de chacun de ces 3 sites reproduit les baisses de l'activité promotrice observées avec les délétions réalisées dans les clones 20C et 20D.

Ces clones mutés ont été transfectés dans des cellules HeLa et leur capacité à activer la transcription du gène rapporteur luciférase a été mesurée. Les clones 20A et 20B, contenant la séquence promotrice non mutée, sont analysés en parallèle. Les résultats de ces essais sont présentés dans la figure 17B. La destruction du site Sp1 distal (clone 20E) entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'un facteur 1,5. Ce site est donc fonctionnel et exerce un effet inhibiteur dans le contexte du promoteur *NDUFS7*. Cependant, le fait que l'activité du clone 20E reste de 25 % inférieure à celle du clone 20B suggère qu'au moins un autre élément de régulation négatif de la transcription est localisé dans la région -1000 à -529. Les clones 20F, 20G et 20H, mutés respectivement au niveau du site NRF-1 distal, du site NRF-1 proximal et du site Sp1 proximal, ont tous une activité luciférase inférieure à celle du clone 20B. Ces trois sites ont donc un rôle d'activation de la transcription dans le promoteur *NDUFS7*. L'importance de l'effet de ces mutations permet d'expliquer les variations d'activité observées lorsque les séquences contenant les sites correspondants sont délétées. Il est donc probable que ces sites représentent les principaux éléments activateurs de la transcription du gène *NDUFS7* dans la région étudiée. D'autre part, l'effet des mutations dans les sites NRF-1 et Sp1 proximaux, distants de 9 pb, suggèrent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre ces deux éléments. En effet, la destruction du site NRF-1 provoque une perte de 64 % de l'activité luciférase par rapport au clone sauvage (20B) et celle du site Sp1, une baisse de 71 %. En comparaison, la différence d'activité entre le clone 20C et le clone 20D, dans lequel la séquence contenant les 2 sites est délétée, n'est que de 57 %. Ces valeurs sont plus en faveur d'un effet synergique entre les 2 sites que d'un effet additif.

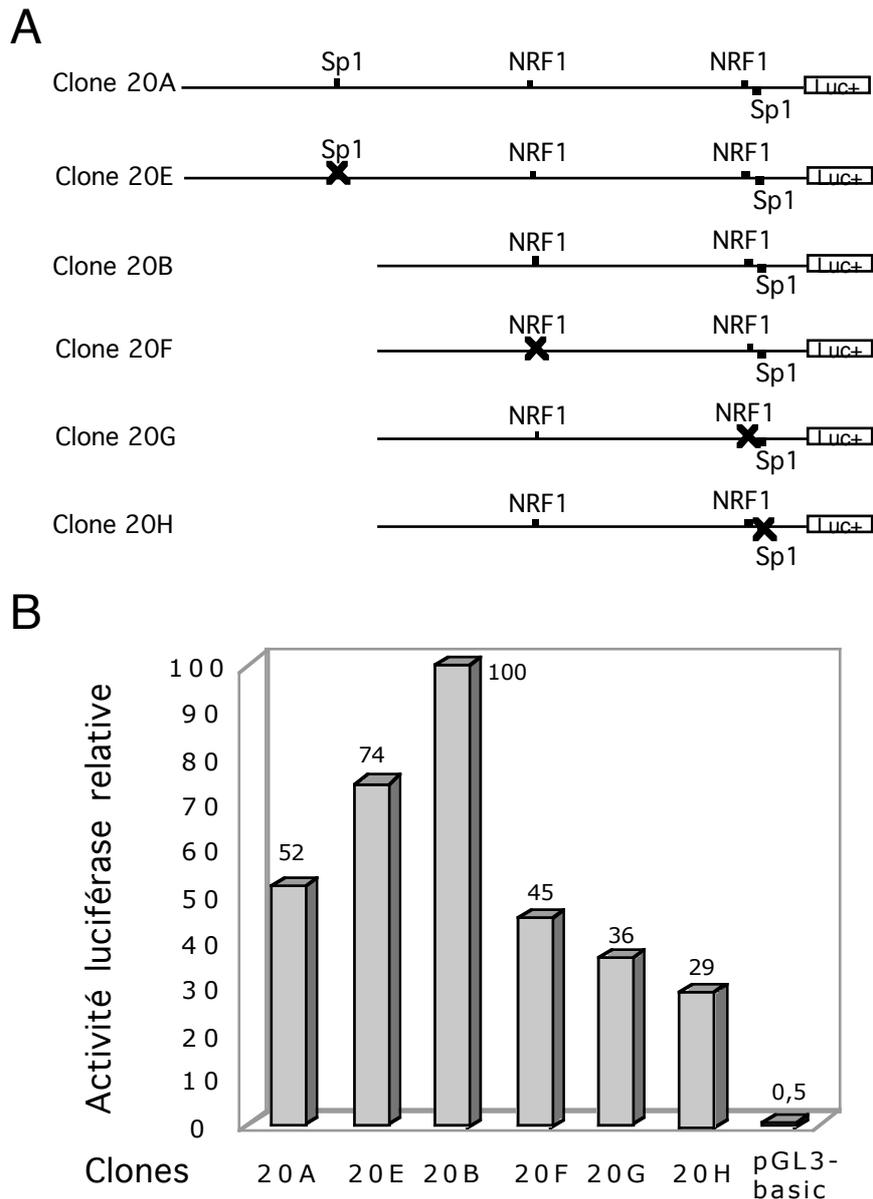


Figure 17 : Analyse par mutagenèse dirigée des sites NRF-1 et Sp1 du promoteur *NDUFS7*.

(A) Représentation schématique des constructions préparées dans le vecteur pGL3-Basic contenant le gène de la luciférase de luciole. La préparation de ces plasmides est décrite dans la section 2. Les clones 20A et 20E contiennent la séquence -1000 à +1 du promoteur *NDUFS7*. Les clones 20B, 20F, 20G et 20H contiennent la séquence -528 à +1 du promoteur *NDUFS7*. Les sites de fixation de facteurs de transcription mutés sont indiqués par une croix. (B) Conséquences des mutations sur l'activité luciférase. Les plasmides sont cotransfectés dans des cellules HeLa avec le vecteur pRL-TK contenant le gène de la luciférase de *Renilla reniformis*. Les activités transcriptionnelles sont mesurées avec le système Dual-Luciférase comme décrit dans la section 2. Pour chaque essai, l'activité de la luciférase de luciole est normalisée par l'activité de la luciférase de *Renilla reniformis* et exprimée relativement à l'activité du clone 20B (100 %). Les résultats présentés correspondent aux moyennes de trois expériences indépendantes.

C/ Etude du protéome mitochondrial

1. Extraction de mitochondries :

La technique d'extraction des mitochondries permet d'obtenir de 50 à 100 mg de protéines à partir d'un placenta humain. Dans le cas de mitochondries extraites de cellules HeLa S3 en culture, les quantités obtenues sont plus faibles avec des quantités de protéines de l'ordre de 2 à 3 mg pour un litre de culture (environ 8×10^8 cellules). Les mitochondries sont stockées sous forme d'une suspension concentrée avec des taux de protéines d'environ 15 à 40 mg/ml.

2. Analyse des cartes de références et identification des protéines :

Les cartes de référence du protéome mitochondrial de placenta humain sont présentées dans les figures 18, 19, 20 et 21. L'utilisation du programme Melanie (Appel et al., 1997a ; Appel et al., 1997b) a permis de détecter environ 1500 spots protéiques sur la carte de référence "acide" colorée à l'argent (figure 19), c'est-à-dire dans une gamme de pI de 4 à 8 et dans une gamme de poids moléculaires de 6 à 200 kDa. Sur la carte de référence basique pH 5,5-12 (figure 21), 1250 spots ont été détectés. La gamme dynamique varie de 30 à 7500 unités de détection arbitraire pour une densité intégrée totale de 350 000. Cela signifie que des protéines présentes à 0,01 % de la quantité totale peuvent être visualisées sur le gel. Cependant, les protéines les moins abondantes ayant pu être identifiées à ce jour par les méthodes de spectrométrie de masse (c'est-à-dire ni par comigration, ni par immunodétection) représentent 0,03 % de l'échantillon de départ, tandis que la moyenne des spots identifiés se situe dans une gamme de 0,1 à 0,5 %.

La liste des protéines identifiées est présentée dans les tableaux VII, VIII et IX. L'identification par spectrométrie MALDI-TOF n'a pas posé de problème pour des protéines d'un poids moléculaire supérieur à 15-20 kDa. En dessous de cette masse, le nombre de peptides obtenus est souvent réduit, ne permettant pas une identification certaine de la protéine. Par exemple, COXA, COXB et COXE ont pu être identifiées par MALDI-TOF, tandis qu'une confirmation par MS/MS a été nécessaire avec ATPD et BAF. Deux exemples de spectres MALDI sont présentés en annexe I : NUML du complexe I et l'isoforme ANT2 du translocateur ADP/ATP.

FIGURE 18

FIGURE 19

FIGURE 20

FIGURE 21

| Swiss-Pro | Nom | N° accession | masse (Da) | pI | Recouvrement (%) |
|-----------|---|--------------|------------|------|------------------|
| AATM | Aspartate aminotransférase | P00505 | 44695 | 8,98 | 31 |
| ACDS | acyl-CoA déshydrogénase, chaîne courte | P16219 | 41721 | 6,15 | 29 |
| ACDM | Acyl-CoA déshydrogénase, chaîne moyenne | P11310 | 43643 | 7,02 | 32 |
| ACDV | Acyl-CoA déshydrogénase, très longue chaîne | P49748 | 66175 | 7,74 | 32 |
| ACON | Aconitase | Q99798 | 82426 | 6,85 | 11 |
| ADT2 | Isoforme 2 du translocateur ADP/ATP ; ANT2 | P05141 | 32895 | 9,76 | 36 |
| ATPA | ATP synthase alpha | P25705 | 55209 | 8,28 | 45 |
| ATPB | ATP synthase beta | P06576 | 51769 | 5 | 20 |
| ATPD | ATP synthase delta | P30049 | 15020 | 4,53 | ND |
| ATPE | ATP synthase E | P56381 | 7928 | 9,34 | 72 |
| ATPN | ATP synthase G | O75964 | 11386 | 9,6 | 33 |
| ATPO | ATP synthase O | P48047 | 20875 | 9,81 | 47 |
| C11A | Cytochrome P450 11A1 | P05108 | 56117 | 7,94 | 38 |
| CH60 | 60 kDa heat shock protein | P10809 | 57963 | 5,24 | ND |
| COXA | Cytochrome c oxydase Va | P20674 | 12513 | 4,88 | ND |
| COXB | Cytochrome c oxydase Vb | P10606 | 10612 | 6,33 | 19 |
| COXE | Cytochrome c oxydase VIa-L | Q02221 | 9619 | 6,42 | ND |
| COXG | Cytochrome c oxydase VIb | P14854 | 10061 | 6,78 | 65 |
| CYC | Cytochrome c | P00001 | 11617 | 9,59 | 62 |
| D3D2 | 3,2 trans énoyl-CoA isomérase | P42126 | 28736 | 6 | 23 |
| D3HI | 3 hydroxyisobutyrate déshydrogénase | P31937 | 31537 | 5,54 | 37 |
| DHA X | Antiquitine | P49419 | 55366 | 6,44 | 26 |
| DHE3 | Glutamate déshydrogénase | P00367 | 56008 | 6,71 | 51 |
| DHSA | Succinate déshydrogénase A | P31040 | 68012 | 6,25 | 21 |
| DLDH | Dihydrolipoamide déshydrogénase | P09622 | 50148 | 6,35 | 11 |
| ECH1 | Delta3,5-delta2,4-diénoyl-CoA isomérase | Q13011 | 35994 | 6,61 | 53 |
| ECHA | Trifunctional enzyme alpha | P40939 | 78970 | 8,98 | 34 |
| ECHB | Trifunctional enzyme beta | P55084 | 47485 | 9,24 | 42 |
| ECHM | Enoyl CoA hydratase, chaîne courte | P30084 | 28355 | 5,88 | 53 |
| EFTU | Elongation factor Tu | P49411 | 45045 | 6,31 | 46 |
| ETFA | Electron transfer flavoprotein alpha | P13804 | 35079 | 8,62 | 67 |
| ETFB | Electron transfer flavoprotein beta | P38117 | 27843 | 8,25 | 45 |
| ETFD | Electron transfer flavoprotein déshydrogénase | Q16134 | 64676 | 6,52 | 32 |
| FUMH | Fumarate hydratase | P07954 | 50082 | 6,99 | 32 |
| GPDM | Glycérol-3-phosphate déshydrogénase | P43304 | 76323 | 6,17 | 23 |
| GR75 | Stress-70 protein | P38646 | 68858 | 5,51 | ND |
| HCD2 | 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase type II | Q99714 | 26923 | 7,66 | 72 |
| IDHA | Isocitrate déshydrogénase [NAD] alpha | P50213 | 36640 | 5,71 | 24 |
| IDHP | Isocitrate déshydrogénase [NADP] | P48735 | 50909 | 8,88 | 45 |
| IVD | Isovaléryl-CoA déshydrogénase | P26440 | 43069 | 6,9 | 20 |
| KAD3 | GTP:AMP phosphotransférase mitochondriale | Q9UIJ7 | 25507 | 9,3 | 31 |
| KCRU | Créatine kinase, ubiquitaire mitochondriale | P12532 | 43080 | 7,31 | 44 |
| MDHM | Malate déshydrogénase | P40926 | 33000 | 8,54 | 47 |
| MPPA | Mitochondrial processing peptidase alpha | Q10713 | 55625 | 5,75 | 32 |
| MTX2 | Métaxine 2 | O75431 | 29763 | 5,9 | 32 |
| N7BM | NADH-ubiquinone oxydoréductase B17.2 | Q9UI09 | 17144 | 9,63 | 48 |
| NB6M | NADH-ubiquinone oxydoréductase B16.6 | Q9P0J0 | 16698 | 8,04 | 41 |
| NB7M | NADH-ubiquinone oxydoréductase B17 | O95139 | 15358 | 9,63 | 36 |
| NB8M | NADH-ubiquinone oxydoréductase B18 | P17568 | 16271 | 9,1 | 42 |

| Swissprot | Nom | N° accession | masse (Da) | pI | Recouvrement (%) |
|-----------|---|--------------|------------|------|------------------|
| NI2M | NADH-ubiquinone oxydoréductase B22 | Q9Y6M9 | 21700 | 8,59 | 71 |
| NI9M | NADH-ubiquinone oxydoréductase B9 | O95167 | 9279 | 7,98 | 41 |
| NIPM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 15 kDa | O43920 | 12386 | 9,29 | 64 |
| NUAM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 75 kDa | P28331 | 77053 | 5,36 | 42 |
| NUCM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 49 kDa | O75306 | 53869 | 7,21 | 41 |
| NUDM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 42 kDa | O95299 | 37147 | 6,87 | 60 |
| NUEM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 39 kDa | Q16795 | 38899 | 9,7 | 41 |
| NUFM | NADH-ubiquinone oxydoréductase B13 | Q16718 | 13327 | 5,76 | 44 |
| NUGM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 30 kDa | O75489 | 26415 | 5,48 | 80 |
| NUHM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 24 kDa | P19404 | 23760 | 5,71 | 53 |
| NUIM | NADH-ubiquinone oxydoréductase 23 kDa | O00217 | 20290 | 5,1 | ND |
| NUML | NADH-ubiquinone oxydoréductase MLRQ | O00483 | 9370 | 9,42 | 76 |
| NUPM | NADH-ubiquinone oxydoréductase PGIV | P51970 | 19974 | 7,93 | 47 |
| OAT | Ornithine amino transférases | P04181 | 44808 | 5,72 | 21 |
| ODB2 | Lipoamide acyltransferase of branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase complex | P11182 | 46710 | 6,4 | 45 |
| ODPA | Pyruvate déshydrogénase E1 alpha, somatique | P08559 | 40229 | 6,51 | 49 |
| ODPB | Pyruvate déshydrogénase E1 beta | P11177 | 35890 | 5,38 | ND |
| ODO1 | 2-oxoglutarate déshydrogénase E1 | Q02218 | 108880 | 6,24 | 24 |
| ORN | Oligoribonucléase | Q9Y3B8 | 26861 | 6,4 | 19 |
| PDX3 | Peroxyde réductase thioredoxine-dépendante | P30048 | 21468 | 5,77 | 40 |
| POR1 | Voltage-dependent anion-selective channel 1 | P21796 | 30641 | 8,63 | 58 |
| POR2 | Voltage-dependent anion selective channel 2 | P45880 | 38639 | 6,32 | 41 |
| PPCM | Phosphoénolpyruvate carboxykinase | Q16822 | 67005 | 6,58 | ND |
| PUT2 | Delta-1-pyrroline 5 carboxylate déshydrogénase | Q16882 | 59066 | 6,96 | 42 |
| SFX3 | Sidéroflexine | Q9BWM7 | 35823 | 9,26 | 50 |
| SODM | Superoxide dismutase [Mn] | P04179 | 22204 | 6,86 | 75 |
| SSB | Single-strand DNA-binding protein | Q04837 | 15195 | 8,24 | 43 |
| THTR | Thiosulfate sulfurtransférase, rhodanese | Q16762 | 33298 | 6,83 | 53 |
| TRAL | Heat shock protein 75 kDa | Q12931 | 80011 | 8,05 | ND |
| UCR1 | Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein | P31930 | 49102 | 5,43 | 46 |
| UCR2 | Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein | P22695 | 48443 | 8,74 | 40 |
| UCR6 | Ubiquinol-cytochrome C réductase 14 kDa | P14927 | 13399 | 8,73 | 43 |
| UCRI | Ubiquinol-cytochrome C réductase Rieske | P47985 | 21617 | 6,3 | 35 |
| | Thioredoxine réductase mitochondriale | Q9NNW7 | 56204 | 7,24 | ND |
| | Mitofiline | Q16891 | 68187 | 5,57 | ND |
| | NADH-cytochrome b5 réductase | Q9UHQ9 | 34095 | 9,41 | 45 |

Tableau VII : Liste des protéines mitochondriales identifiées sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

Des mitochondries sont extraites de placenta humain et les protéines résolues par électrophorèse bidimensionnelle (chapitre Matériels et Méthodes). Après la migration, les protéines sont révélées par coloration des gels avec un complexe ruthénium fluorescent (Rabilloud et al., 2001). Les identifications ont été réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Dans certains cas, l'identification est confirmée par analyse de peptides en spectrométrie de masse en tandem. Les protéines sont classées en fonction de la nomenclature dans la base de données Swiss-Prot. Le numéro d'accèsion est celui de Swiss-Prot. Le recouvrement indique la proportion de la séquence protéique totale représentée par les peptides ayant servi à l'identification. ND : non déterminé.

| Swissprot | Nom | N° accession | masse (Da) | pI | Recouvrement (%) |
|-----------|---|--------------|------------|-------|------------------|
| 143Z | 14-3-3 zeta/delta | P29312 | 27745 | 4.73 | 24 |
| ACTB | Actine, cytoplasmique 1 | P02570 | 41606 | 5.29 | ND |
| ACTZ | Alpha-centractine | P42024 | 42613 | 6.19 | 50 |
| ALBU | Albumine sérique | P02769 | 66432 | 5.60 | 44 |
| ANX1 | Anexine I (fragment) | P04083 | 38787 | 6.64 | 16 |
| ANX2 | Anexine II | P07355 | 38472 | 7.56 | 52 |
| AOP2 | Protéine antioxydante 2 | P30041 | 24904 | 6.02 | ND |
| AOPP | Enzyme antioxydante péroxisomale | P30044 | 16863 | 6.84 | 30 |
| AR20 | ARP2/3 complex 20 kDa | O15509 | 19667 | 8.53 | 36 |
| ARP3 | Actin-like protein 3 | P32391 | 47371 | 5.61 | 55 |
| COF1 | Cofiline, isoforme non musculaire | P23528 | 18502 | 8.22 | 38 |
| CRAB | Alpha crystallin B | P02511 | 20159 | 6.76 | 40 |
| CYPB | Peptidyl-propyl cis-trans isomérase B | P23284 | 20289 | 9.25 | 33 |
| ENPL | Endoplasmine | P14625 | 90178 | 4.73 | 51 |
| EZR1 | Ezrine (fragment) | P15311 | 69267 | 5.95 | 18 |
| FIBB | Fibrinogène beta | P02675 | 55928 | 8.54 | 67 |
| FLT1 | Flotilline-1 | O75955 | 47332 | 7.04 | 49 |
| GR78 | 78 kDa glucose-regulated protein | P11021 | 70479 | 5.01 | 51 |
| GTP | glutathione S transférase P | P09211 | 23224 | 5.44 | 56 |
| H4 | Histone H4 (fragment) | P02304 | 11236 | 11.36 | 30 |
| K2C1 | Kératine type II (fragment) | P04264 | 65886 | 8.16 | 17 |
| PDA3 | Protéine disulfide isomérase A3 ; ERP60 | P30101 | 57146 | 5.98 | 51 |
| PDA6 | Protéine disulfide isomérase A6 | Q15084 | 46171 | 4.95 | 17 |
| PDI | Protein disulfide isomérase | P07237 | 55294 | 4.69 | 43 |
| PDX4 | Peroxyredoxine 4 | Q13162 | 30540 | 5.86 | 49 |
| PERM | Myéloperoxydase | P05164 | 66107 | 9.22 | 19 |
| PHB | Prohibitine | P35232 | 29804 | 5.57 | 80 |
| PLL | Choriomammotrophine | P01243 | 22308 | 5.33 | ND |
| PSA7 | Proteasome alpha type 7 | O14818 | 28041 | 8.60 | 17 |
| S110 | Calpactine I chaîne légère | P08206 | 11179 | 7.3 | 52 |
| TRFE | Transferrine | P02787 | 75181 | 6.7 | 43 |
| | Protéine associée au récepteur des cellules B, D-prohibitin | Q99623 | 33296 | 9.83 | 59 |
| | Hémoglobine alpha 1 globin chain (fragment) | Q9BX83 | 10703 | 7.07 | 40 |
| | Région variable de la chaîne lourde des immunoglobulines (fragment) | U00530 (OWL) | 12099 | 8.64 | 40 |
| | PI 5.3 beta 2-microglobuline | Q9UDF4 | 11618 | 6.07 | 55 |

Tableau VIII : Liste des protéines contaminantes (non mitochondriales) identifiées sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle.

Des mitochondries sont extraites de placenta humain et les protéines résolues par électrophorèse bidimensionnelle (chapitre Matériels et méthodes). Après la migration, les protéines sont révélées par coloration des gels avec un complexe ruthénium fluorescent (Rabilloud et al., 2001). Les identifications ont été réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Dans certains cas, l'identification est confirmée par analyse de peptides en spectrométrie de masse en tandem. Les protéines sont classées en fonction de la nomenclature dans la base de données Swiss-Prot. Le numéro d'accèsion est celui de Swiss-Prot, sauf mention explicite. Le recouvrement indique la proportion de la séquence protéique totale représentée par les peptides ayant servi à l'identification. ND : non déterminé.

| Swissprot | Nom | N° accession | masse (Da) | pI | Recouvrement (%) |
|------------|---|-----------------|------------|------|------------------|
| | AD025 | Q9HBL7 | 17190 | 9,58 | 34 |
| BAF | Barrier-to-autointegration factor | O75 531 | 10059 | 5,81 | 65 |
| | Brain my025 | Q9H3J9 | 20199 | 9,35 | 36 |
| CG51 | Protéine CGI-51 | Q9Y512 | 51976 | 6,44 | 43 |
| DJ568C11.3 | Nouvelle enzyme fixant l'AMP semblable à l'acétyl-CoA synthase (acétate-coA ligase) | Q9NUB1 | 52592 | 5,85 | ND |
| | Protéine homeotique Hox-4.8 (fragment) | A56563 | 9889 | 10,4 | 45 |
| | Protéine hypothétique de 14.5 kDa | O95329 | 14635 | 5,86 | 25 |
| | Protéine hypothétique de 23.7 kDa (Fragment) | Q9BVM2 | 23847 | 9,1 | 23 |
| | Transposase A présumée | AAK50868 (NCBI) | 10182 | 9,79 | 43 |
| | SH3BGRL2-like protein | Q9BPY5 | 12326 | 6,29 | 70 |
| | Similaire à l'Acétyl-CoA carboxylase beta | BAB74063 (NCBI) | 35718 | 7,67 | 14 |
| | Protéine non caractérisée des cellules souches hématopoïétiques MDS030 | Q9NZ44 | 17218 | 9,69 | 34 |
| | Protéine hypothalamique non caractérisée HT012 ; PNAS-27 | Q9NPJ3 | 14960 | 9,23 | 50 |

Tableau IX : Liste des protéines dont la localisation subcellulaire est inconnue et des protéines incomplètement caractérisées dans les bases de données.

Des mitochondries sont extraites de placenta humain et les protéines résolues par électrophorèse bidimensionnelle (chapitre Matériels et Méthodes). Après la migration, les protéines sont révélées par coloration des gels avec un complexe ruthénium fluorescent (Rabilloud et al., 2001). Les identifications ont été réalisées par spectrométrie de masse MALDI-TOF. Dans certains cas, l'identification est confirmée par analyse de peptides en spectrométrie de masse en tandem. Les protéines sont classées en fonction de la nomenclature dans la base de données Swiss-Prot. Le numéro d'accèsion est celui de Swiss-Prot, sauf mention explicite. Le recouvrement indique la proportion de la séquence protéique totale représentée par les peptides ayant servi à l'identification. ND : non déterminé.

3. Etude de l'expression des protéines mitochondriales en fonction de la concentration en fer :

Dans le cadre de cette étude, des cellules HeLa S3 sont cultivées soit dans un milieu carencé en fer par l'utilisation d'un agent chélateur, la déferoxamine (100 μM), soit dans un milieu enrichi en fer par l'ajout d'hémine (20 μM), un complexe ferrique (ferriprotoporphyrine IX). En parallèle, des cellules témoins sont cultivées dans un milieu dépourvu de déferoxamine et d'hémine. Après une incubation de 48 heures, les mitochondries sont isolées et les protéines mitochondriales analysées par électrophorèse bidimensionnelle. Deux types de gradients de pH sont employés lors de la première dimension (isoélectrofocalisation) : pH 4-8 et pH 5,5-12. La deuxième migration (SDS-PAGE) est réalisée avec des gels à 10 % et 11 % d'acrylamide permettant de couvrir une gamme de poids moléculaires de 6 à 200 kDa. Les gels sont colorés à l'argent et les variations d'intensité des spots entre les gels sont appréciées visuellement.

Deux séries d'extraits mitochondriaux ont été préparées lors d'expériences conduites de manière indépendante. A partir de chaque extrait, plusieurs gels représentant les différentes conditions d'électrophorèse bidimensionnelle ont été réalisés. Lorsque des variations d'intensité de spots ont été observées de manière reproductible, les protéines correspondantes ont été analysées en spectrométrie de masse pour être identifiées.

Les gels préparés en utilisant le gradient de pH 4-8 sont présentés dans les figures 22 et 23. Lorsque le milieu est carencé en fer, l'expression de cinq protéines est diminuée de manière sensible et reproductible. Deux de ces protéines sont des sous-unités à centres fer-soufre du complexe I : NUIM (23 kDa, TYKY) et NUGM (30 kDa). Une troisième protéine est la sous-unité UCRI (Rieske) du complexe III qui contient, elle aussi, un centre Fe-S. Le taux d'une autre sous-unité du complexe I, NUHM (24 kDa), est diminué en présence de déferoxamine mais cette variation semble moins importante que pour les protéines précédentes. Cette sous-unité ne contient pas de centres Fe-S. A l'inverse, une protéine est exprimée plus fortement lorsque la concentration en fer diminue (spot F). Cette protéine d'environ 14 kDa avec un pI approximatif de 5,7 n'a pas encore été identifiée par spectrométrie de masse. Enfin, l'expression de la sous-unité NUCM (49 kDa) du complexe I qui participerait à la structuration d'un centre Fe-S apparaît diminuée. Cependant, le spot de cette protéine n'est pas parfaitement résolu sur certains gels, ne permettant pas toujours d'apprécier son intensité sans ambiguïté.

L'analyse avec un gradient de pH 4-8 d'extraits mitochondriaux de cellules cultivées en présence d'un excès de fer permet d'observer différentes variations d'intensité de spots

reproductibles. Tout d'abord, l'expression de plusieurs protéines est abaissée. L'une est la sous-unité NUAM (75 kDa) du complexe I mitochondrial qui contient trois centres Fe-S. Une deuxième protéine est une enzyme, la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de type II ou HCD2. Le taux de plusieurs autres protéines, non identifiées, est fortement diminué en présence d'hémine : une protéine présentant un poids moléculaire d'environ 50 kDa et un pI voisin de 5,6 (spot A) ; une protéine d'environ 20 kDa de pI voisin de 6,3 (spot B) ; une protéine d'environ 14 kDa avec un pI voisin de 5,7 (spot F) et 3 protéines d'un poids moléculaire de 10 kDa environ ayant un pI proche de 4,8 pour les deux premières (spots C, D) et 5,3 pour la troisième (spot E). L'expression de la protéine F est de plus augmentée en présence de déféroxamine. Enfin, une augmentation modérée du taux de la forme oxydée de la protéine antioxydante PDX3 (AOP) est observée lors de l'augmentation de la concentration en fer.

L'expression des protéines basiques a été étudiée en utilisant un gradient de pH 5,5-12. Les gels d'électrophorèse bidimensionnelle préparés avec ce type de gradient sont présentés dans les figures 24 et 25. La comparaison des résultats obtenus dans les différentes conditions de culture cellulaire a permis de détecter plusieurs spots protéiques dont l'intensité varie de manière reproductible. Tout d'abord, l'expression de quatre protéines est réprimée en présence de déféroxamine. Une de ces protéines est la sous-unité NUEM (39 kDa) du complexe I. Cette sous-unité ne contient pas de centres Fe-S. Les variations du taux de NUEM suivant les conditions de culture sont bien visibles sur les gels à 11% d'acrylamide (figure 25). Par contre, NUEM est mal résolu sur les gels à 10 % d'acrylamide. L'expression de la sous-unité UCR6 du complexe III est également inhibée en présence de déféroxamine. Les deux autres protéines (spots N et O), d'un poids moléculaire compris entre 10 et 15 kDa, n'ont pas été identifiées.

Une protéine non identifiée d'environ 22 kDa (spot J) présente un comportement différent : son expression est induite dans le milieu carencé en fer alors qu'elle est quasiment indécélable dans les cellules témoins ou en présence d'hémine.

Avec les mitochondries provenant de cellules cultivées en condition de surcharge en fer, une baisse importante et reproductible de l'expression de six protéines non identifiées est observée (spots G, H, I, K, L et M). Ces protéines ont des poids moléculaires compris entre 21 et 32 kDa environ et des pI compris entre 7,2 et 9,7 environ.

Afin d'étudier la cinétique des modifications observées, des mitochondries ont également été isolées de cellules HeLa S3 cultivées 24 heures dans les mêmes conditions de carence ou de surcharge en fer. L'analyse de ces extraits n'a permis de détecter aucune des modifications d'expression observées dans les mitochondries de cellules traitées pendant 48 heures.

FIGURE 22

FIGURE 23

FIGURE 24

FIGURE 25

DISCUSSION

De nombreuses études ont été publiées sur la régulation de la transcription de gènes codant des sous-unités de la chaîne respiratoire ou d'autres composants du système d'oxydation phosphorylante (voir tableau IV). Cependant, aucune analyse de promoteur n'a encore été réalisée concernant un gène nucléaire codant une sous-unité du complexe I. Plusieurs gènes nucléaires humains de ce complexe ont été clonés et séquencés dans notre laboratoire : le gène *NDUFS8* codant la sous-unité 23 kDa (de Sury et al., 1998), le gène *NDUFS3* codant la sous-unité 30 kDa (Procaccio et al., 2000) ainsi que les gènes *NDUFS1*, *NDUFS2*, *NDUFS7* et *NDUFA4* codant respectivement les sous-unités 75 kDa, 49 kDa, 20 kDa (PSST) et MLRQ (résultats non publiés). Ces travaux ont fourni des sous-clones génomiques et des données de séquences pouvant servir de base à la réalisation d'analyses de promoteurs.

Le choix du gène à étudier en première intention s'est porté sur *NDUFS8*, codant la sous-unité 23 kDa, car des travaux réalisés dans le laboratoire suggéraient que cette protéine joue un rôle fondamental dans l'assemblage et le fonctionnement (structuration du centre Fe-S N2) du complexe I (Chevallet et al., 1997 ; Dupuis et al., 1998). La décision d'étudier ensuite le promoteur du gène *NDUFS7* dépend de plusieurs raisons. Premièrement, des données récemment publiées sont plutôt en faveur d'une localisation du centre Fe-S N2 sur PSST (Schuler et al., 1999 ; Duarte et al., 2002). Deuxièmement, les protéines TYKY et PSST pourraient être toutes les deux impliquées dans le mécanisme de la translocation de protons catalysée par le complexe I (Albracht et Hedderich, 2000 ; Brandt, 1997 et 1999). Troisièmement, Alhers et al. (2000a) ont reproduit chez une levure, deux mutations de TYKY et PSST décrites chez des patients souffrant de déficits du complexe I et les résultats montrent des effets similaires sur le fonctionnement de l'enzyme. Il semblait donc intéressant de déterminer comment deux sous-unités essentielles du complexe I humain et "fonctionnellement proches" sont régulées au niveau de la transcription.

Analyse du promoteur du gène *NDUFS8* :

La première étape de ce travail a été de localiser le départ de transcription par une réaction d'extension d'amorce. Les résultats obtenus montrent que le gène *NDUFS8* possède au moins deux départs de transcription. La présence de multiples sites d'initiation de la transcription est une caractéristique commune aux gènes exprimés de manière constitutive. Deux séries de réactions utilisant deux amorces différentes ont été réalisées car la transcriptase inverse peut s'arrêter de manière prématurée générant des produits d'extension incomplets (figure 8). C'est pour cette raison que seuls les résultats des deux réactions indiquant un même site d'initiation ont été retenus.

Une portion d'ADN génomique d'environ 2000 pb située en amont du site principal d'initiation de la transcription a ensuite été analysée en vue de rechercher la présence d'éléments *cis*-régulateurs (figure 9A). Cette séquence a été clonée en amont d'un gène rapporteur luciférase, permettant de mesurer par des expériences de transfection transitoire son activité transcriptionnelle. La région analysée est limitée en amont par l'extrémité 3' du gène *ALDH7* (de Sury et al., 1998). En effet, il est probable que la majorité des sites régulant la transcription du gène *NDUFS8* se situent dans la région intergénique bien que des éléments de type enhancer puissent être localisés à de grandes distances (Blackwood et Kadonaga, 1998). En aval, la séquence s'étend jusqu'à l'extrémité 5' du premier intron du gène *NDUFS8*, englobant le premier exon. Ce choix, lié à des facilités de clonage, n'a pas de conséquence sur la traduction de la luciférase puisque le premier exon du gène *NDUFS8* n'est pas codant.

L'activité luciférase mesurée en présence de la séquence génomique est plus de 200 fois supérieure à celle d'un vecteur contrôle sans insert, ce qui indique qu'elle contient très probablement des éléments *cis* activant la transcription du gène *NDUFS8* (figure 9B). Différentes délétions ont également été réalisées dans cette séquence et les conséquences sur l'activité transcriptionnelle ont été analysées par transfection transitoire. Ces essais suggèrent l'absence d'éléments de régulation dans les 1600 premières paires de bases de la séquence étudiée. L'essentiel de l'activité transcriptionnelle serait donc contrôlé par un promoteur basal localisé dans une région de 247 pb immédiatement en amont du principal départ de transcription. Dans cette séquence de 247 pb, quatre sites pouvant potentiellement fixer des facteurs de transcription connus pour contrôler des promoteurs de gènes du système de phosphorylation oxydative (Scarpulla, 2002) ont été identifiés par analyse informatique : trois sites pour le facteur

Sp1 et un pour le facteur YY1 (figure 10A). Trois boîtes CCAAT, un élément *cis*-régulateur présent dans de très nombreux promoteurs eucaryotes (Montavi, 1999), ont aussi été détectées. Quatre délétions de taille croissante ont été réalisées à partir de l'extrémité 5' de la séquence de 247 pb. Elles suppriment de manière séquentielle les éléments régulateurs potentiels identifiés par analyse informatique. Les effets de ces délétions sur la transcription d'un gène rapporteur luciférase ont été étudiés, avec comme référence un clone contenant la séquence intacte (figure 10B). Les résultats montrent que les séquences contenant les 2 sites Sp1 distaux, le site YY1 et la boîte CCAAT distale sont essentielles à l'activité du promoteur basal. La séquence contenant les sites Sp1 et CCAAT proximaux semble avoir, d'après les valeurs obtenues, un rôle beaucoup plus limité. Enfin, la différence d'activité liée à la délétion de la séquence contenant la boîte CCAAT intermédiaire a été considérée négligeable.

La capacité des sites Sp1, YY1 et des deux boîtes CCAAT distale et proximale à fixer les facteurs de transcription a été étudiée par des expériences de gel-retard. Les résultats montrent que les sites Sp1 et le site YY1 fixent des facteurs protéiques (figures 11, 12 et 13). La spécificité de ces interactions est démontrée par des expériences de compétition et par la nécessité d'une séquence consensus intacte. Par contre, aucun complexe nucléoprotéique n'a été obtenu lors des essais réalisés avec les séquences CCAAT (résultats non présentés) suggérant que ces sites ne sont pas fonctionnels. De plus, la protéine se fixant sur le site YY1 a été formellement identifiée comme étant le facteur de transcription YY1 grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques (figure 11). L'identification de la protéine se liant sur les sites Sp1 avec des antisérums n'a pas été réalisée. Cependant, plusieurs données concordantes suggèrent que le facteur qui se fixe sur les trois sites du promoteur est Sp1 : (i) ces séquences sont identifiées comme des sites Sp1 par les programmes de recherche de séquences consensus, (ii) la formation des complexes ADN protéine est inhibée par des mutations ponctuelles détruisant la séquence consensus Sp1 (figures 12 et 13), (iii) les sondes Sp1(A/B) et Sp1(C) entrent mutuellement en compétition pour la formation du complexe nucléoprotéique suggérant qu'elles fixent la même protéine (figure 13). Toutefois, il n'est pas exclu que ce facteur protéique puisse être un autre membre de la famille Sp, comme Sp3 qui est un facteur de régulation coexprimé avec Sp1 dans la cellule (Suske, 1999).

Après avoir démontré qu'ils fixent des facteurs protéiques, l'importance fonctionnelle des sites Sp1 et du site YY1 a été déterminée par mutagenèse dirigée. Chaque site est muté par substitution de quelques nucléotides clés au niveau de la séquence consensus reconnue par le facteur de transcription (Hyde-DeRuyscher et al., 1995 ; Heinemeyer et al., 1998). Ces

mutations sont introduites dans la séquence du promoteur basal et leur effet sur l'activité transcriptionnelle est déterminé par mesure de l'expression d'un gène rapporteur lors d'expériences de transfection transitoire (figure 14). Les résultats de cette analyse montrent que l'essentiel de l'activité du promoteur basal est contrôlé par la combinaison du site YY1 et des deux sites Sp1 distaux. Le site Sp1 proximal ne représente qu'environ 10 % de l'activité promotrice.

D'autre part, la comparaison des résultats de l'analyse par délétion et de la mutagenèse dirigée suggèrent l'existence d'une interaction fonctionnelle entre les deux sites adjacents Sp1(A) et Sp1(B). En effet, la délétion de la séquence -247 à -182, contenant les deux sites, a pour conséquence une diminution de l'activité promotrice de 50 % (figure 10). En comparaison, la destruction isolée du site Sp1(A) ou du site Sp1(B) conduit, respectivement, à une baisse de l'activité promotrice de 37 % et 46 % (figure 14). De tels résultats suggèrent un effet synergique plutôt qu'additif entre les deux sites. La comparaison des résultats de l'analyse par délétion et de la mutagenèse dirigée entraîne une deuxième remarque : la mutation isolée du site YY1 diminue l'activité transcriptionnelle de 62 % (figure 14) tandis que la délétion du fragment d'ADN -181 à -116 contenant la séquence YY1 est associée à une baisse de l'activité transcriptionnelle de 50 à 11 %, soit un écart de seulement 39 % (figure 10). Cette différence pourrait être expliquée par une activation synergique du site YY1 par les sites Sp1(A) et Sp1(B) situés en amont et fonctionnant en tandem. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle d'un site YY1 par des sites Sp1 localisés en amont a été précédemment décrite. Cet effet résulte d'une interaction directe entre les facteurs YY1 et Sp1 (Lee et al., 1993 ; Seto et al., 1993).

Des expériences de transfection transitoire ont également été réalisées dans une lignée de cellules musculaires dans le but de rechercher des éléments *cis*-régulateurs pouvant être impliqués dans un contrôle tissu-spécifique de la transcription du gène *NDUFS8*. En effet, dans une précédente étude, une analyse par Northern-blot avait montré que le taux de l'ARNm messager est plus élevé dans le cœur et le muscle squelettique que dans d'autres tissus (de Sury et al., 1998). Cette caractéristique est commune aux gènes codant des composants de la chaîne respiratoire, intervenant dans la synthèse d'ATP. Les expériences ont été conduites dans des myoblastes murins C2C12 différenciés en myotubes ou non. Cette lignée de cellules de souris a été utilisée car il n'existe pas de lignée myoblastique humaine. Lors de l'étude de la région de 2000 pb en amont du départ de transcription (figure 9), les résultats obtenus furent similaires à ceux obtenus avec des cellules HeLa suggérant qu'il n'y a pas d'éléments de régulation spécifiques du tissu musculaire, ni dans le promoteur basal, ni dans la région de 1600 pb située

en amont. Les clones préparés pour les analyses délétionnelles et de mutagenèse dirigée du promoteur basal présentées dans les figures 10 et 14 ont également été transfectés dans des myoblastes et des myotubes C2C12. Ces expériences préliminaires donnent des résultats qui ne sont pas significativement différents de ceux obtenus avec les cellules HeLa (données non présentées) suggérant là aussi l'absence d'éléments de régulation spécifique du tissu musculaire. Cependant, l'interprétation de ces données doit prendre en compte le fait que l'utilisation d'une lignée cellulaire murine ne permet pas d'identifier des éléments régulateurs qui ne seraient pas conservés entre l'homme et la souris.

Il est intéressant de noter que le facteur YY1 intervient dans la régulation de plusieurs gènes durant la différenciation musculaire (Lee et al., 1992 ; Basu et al., 1997 ; Galvagni et al., 1998). Dans les myoblastes indifférenciés, YY1 agit sur le promoteur de ces gènes comme un régulateur négatif en inhibant de manière compétitive la fixation d'un facteur positif. Au cours de la différenciation myogénique, la dégradation de YY1 par une protéase lève l'inhibition compétitive (Walowitz et al., 1998). Le site YY1 présent dans le promoteur *NDUFS8*, ne peut pas intervenir dans une telle régulation puisqu'il agit comme un activateur de la transcription.

Les facteurs YY1 et Sp1 sont bien connus comme régulateurs de gènes du système de la phosphorylation oxydative. Chez différents mammifères, ils contrôlent, ensembles ou indépendamment, l'expression des gènes du cytochrome c (Evans et Scarpulla, 1989), du cytochrome c1 (Li et al., 1996a), des sous-unités COX IV (Carter et al., 1992), COX Vb (Basu et al., 1993), COX VIaL (Wong-Riley et al., 2000), COX VIIaL (Seelan et al., 1996) et COX VIIc (Seelan et Grossman, 1997) de la cytochrome c oxydase, des sous-unités α et β de l'ATP synthase (Breen et al., 1996 ; Villena et al., 1994), des facteurs d'assemblage du complexe IV SURF-1 (Gaston et Fried, 1995) et COX17 (Takahashi et al., 2002), du facteur de transcription de l'ADN mitochondrial mtTFA (Zaid et al., 1999) et du translocateur de nucléotide ANT2 (Li et al., 1996b) (voir aussi tableau IV). Nos résultats montrent donc désormais que le spectre de régulation de YY1 et Sp1 s'étend au complexe I de la chaîne respiratoire. En fait, ces deux facteurs de transcription contrôlent l'expression de protéines participant à pratiquement toutes les étapes du métabolisme ubiquitaire d'oxydation phosphorylante : synthèse des complexes I, III et IV de la chaîne de transport d'électrons, synthèse de l'ATP synthase, expression de l'ADN mitochondrial et échange ADP/ATP entre le cytosol et la mitochondrie.

Analyse du promoteur du gène *NDUFS7* :

L'analyse par informatique d'une région de 1000 paires de bases localisée immédiatement en amont de la séquence codante du gène *NDUFS7* a permis de repérer quatre sites susceptibles de fixer des facteurs de transcription connus pour réguler l'expression de protéines du système de la phosphorylation oxydative : deux sites Sp1 et deux sites NRF-1 (figure 15). Cette séquence a également été utilisée pour rechercher dans la base de données GenBank des EST homologues. Tous les EST identifiés présentent une homologie avec la partie 3' de la séquence étudiée et dans tous les cas, cette homologie s'étend jusqu'à l'extrémité 5' de l'EST. Ceci suggère l'absence d'un exon non codant en amont et donc que la région étudiée correspond effectivement à la région promotrice.

La séquence de 1000 pb a ensuite été clonée en amont d'un gène rapporteur luciférase et analysée par transfection transitoire. Une série de trois clones présentant des délétions de taille croissante de l'extrémité 5' a été étudiée en parallèle (figure 16). Ces délétions suppriment successivement le site Sp1 distal, le site NRF-1 distal puis les deux sites Sp1 et NRF-1 proximaux. L'activité luciférase mesurée avec la séquence totale est 200 fois supérieure à celle d'un vecteur contrôle sans insert. Ce résultat confirme que cette séquence contient au moins une partie, sinon la totalité, de la région promotrice du gène *NDUFS7*. D'autre part, la comparaison des activités mesurées avec les différents clones indique que les régions délétées ont toutes un rôle dans l'activité du promoteur : la séquence contenant le site Sp1 distal inhibe la transcription tandis que les séquences aval contenant l'autre site Sp1 et les sites NRF-1 ont un effet activateur.

Afin de déterminer si les activités associées aux séquences délétées dépendent des sites potentiels identifiés, la séquence consensus de chacun a été détruite par mutagenèse dirigée puis les conséquences de ces mutations sur la transcription d'un gène rapporteur ont été analysées par transfection transitoire (figure 17). Les résultats montrent que les quatre sites identifiés sont fonctionnels. Les deux sites NRF-1 et le site Sp1 proximal ont un rôle d'activation de la transcription. Le site Sp1 distal exerce par contre un effet inhibiteur. La présence dans un même promoteur de sites Sp1 activateurs et répresseurs n'est pas surprenante. Elle a déjà été décrite pour d'autres gènes du métabolisme d'oxydation phosphorylante : *ANT2* et *ATPB* (Li et al., 1996b ; Zaid et al, 1999).

La comparaison des résultats des expériences de délétions et de mutagenèse dirigée (figures 16

et 17) indique que l'essentiel de l'activité du promoteur basal du gène *NDUFS7* est contrôlé par les deux sites NRF-1 et le site Sp1 proximal. En effet, après la délétion des séquences contenant ces trois sites (clone 20D), il ne persiste qu'une activité résiduelle représentant 5 % de l'activité promotrice maximale (clone 20B). D'autre part, les mutations introduites successivement dans ces trois sites (clones 20F, 20G et 20H) reproduisent en totalité les effets observés lorsque les séquences correspondantes sont déléetées, indiquant qu'il n'existe probablement pas d'autres éléments *cis*-régulateurs à ce niveau.

L'analyse de ces deux séries d'expériences suggère, de plus, l'existence d'interactions fonctionnelles entre les facteurs se fixant sur les sites activateurs. En effet, lorsque l'on fait la somme des activités associées à chacun de ces sites (clones 20F, 20G et 20H), la valeur obtenue (190 %) représente presque le double de l'activité mesurée avec le clone 20B (100 %). Cette donnée est en faveur de l'existence d'effets synergiques entre les sites plutôt que d'effets additifs. Ceci est particulièrement clair avec les sites NRF-1 et Sp1 proximaux puisque la délétion de la région les contenant fait chuter l'activité luciférase de 62 % (clone 20C) à 5 % (clone 20D) tandis que la mutation des séquences NRF-1 et Sp1 entraîne respectivement une baisse de l'activité transcriptionnelle de 65 et 70 % (clones 20G et 20H).

L'analyse des résultats des expériences de délétions et de mutagenèse dirigée suggère, en ce qui concerne le site Sp1 distal, la présence d'autres éléments inhibiteurs de la transcription dans la partie amont du promoteur *NDUFS7*. En effet, l'augmentation de l'activité luciférase associée à la destruction ponctuelle de ce site inhibiteur (clone 20E) ne représente que la moitié de l'effet mesuré lors de la délétion de la région -1000 à -529 de la séquence étudiée (clone A/clone B).

Limites des études de promoteur et intérêt de l'analyse protéomique :

Les résultats obtenus montrent que la transcription des gènes *NDUFS7* et *NDUFS8* humains est régulée selon des schémas différents. L'un fait intervenir le facteur YY1, l'autre NRF-1. Le facteur Sp1 intervient dans les deux cas mais son action sur le promoteur du gène *NDUFS7* semble complexe puisque coexistent un site activateur et un site inhibiteur. Ces données rejoignent les observations qui avaient été faites par Grossman et al. (1998) au sujet des gènes nucléaires codant les sous-unités de la cytochrome c oxydase. En effet, à l'exception des isoformes musculaires régulées par des facteurs spécifiques, les promoteurs des gènes COX qui ont été étudiés sont tous contrôlés par un ou plusieurs des quatre facteurs de transcription associés à la phosphorylation oxydative : NRF-1, NRF-2, YY1 et Sp1. Cependant, chaque gène semble être régulé par une combinaison différente impliquant de un à quatre facteurs (voir Introduction, tableau IV). De plus, bien que chaque facteur régule l'expression de plusieurs gènes COX, aucun n'agit sur l'ensemble des promoteurs étudiés. Dans ces conditions, il est donc difficile de comprendre comment la transcription des différentes sous-unités de ce complexe enzymatique peut être régulée de manière cohérente. La recherche de sites de fixation potentiels pour les facteurs de transcription NRF-1, NRF-2, YY1 et Sp1 dans les séquences 5' de 29 gènes nucléaires codant des sous-unités du complexe I humain suggère l'existence du même type d'organisation (Annexe II). A titre d'exemple, aucune séquence consensus NRF-1 ou YY1 n'est trouvée dans les 1000 paires de bases en amont du gène codant la sous-unité 49 kDa, protéine qui participerait avec PSST à la structuration du centre Fe-S N2. Par contre, cette région contient plusieurs sites NRF-2 et Sp1 potentiels.

Une autre difficulté est de comprendre comment les facteurs de transcription YY1 et Sp1 sont intégrés dans les mécanismes de régulation du système de la phosphorylation oxydative. En effet, des schémas complexes impliquant des coactivateurs transcriptionnels et faisant le lien entre des stimuli extracellulaires et la biosynthèse de ce système ont été décrits pour les facteurs NRF-1 et NRF-2 (Scarpulla, 2002). Il existe des voies de régulation qui permettent de coordonner l'expression des gènes régulés par ces facteurs de transcription. Par contre, de telles données ne sont pas disponibles pour les gènes régulés par YY1 et Sp1, comme *NDUFS8*. Ces facteurs, appelés parfois facteurs de transcription généraux, contrôlent l'expression de très nombreux gènes et notamment de gènes domestiques. Une première question est donc de savoir

si les sites Sp1 ou YY1 présents dans les promoteurs des gènes associés à la phosphorylation oxydative permettent l'expression constitutive d'effecteurs de ce métabolisme ubiquitaire ou s'ils peuvent intervenir dans des régulations spécifiques? Deux exemples montrent que, au moins pour certains gènes, YY1 et sp1 peuvent agir en réponse à des signaux spécifiques. Cole et Gaston (1997) ont ainsi montré que le site YY1 présent dans le promoteur *Surf-1* est nécessaire et suffisant à l'activation de l'expression du gène en réponse à des facteurs de croissance. Sp1, d'autre part, permet l'activation de la transcription du cytochrome c dans le muscle squelettique en réponse à une activité contractile (Connor et al., 2001). La deuxième question posée est de savoir, dans ces conditions, quels sont les partenaires de YY1 et Sp1 et comment ils agissent? Ces facteurs régulent, en effet, la transcription par l'intermédiaire de cofacteurs et c'est la variété des protéines qu'ils peuvent recruter qui permettrait à YY1 et Sp1 d'exercer des effets adaptés au niveau des différents promoteurs qu'ils contrôlent. Cependant, aucun cofacteur qui permettrait d'intégrer YY1 ou Sp1 dans des voies de régulation spécifiques associées au métabolisme d'oxydation phosphorylante n'a encore été identifié.

Une autre limite inhérente aux analyses de promoteurs réside dans le fait que seul l'étape transcriptionnelle de l'expression du gène est explorée. De nombreux mécanismes de régulation spécifique pouvant intervenir à d'autres étapes de l'expression ne sont pas pris en compte : épissage alternatif, régulation de la traduction ou de la stabilité par des protéines fixant l'ARNm, différentes sortes de modifications post-traductionnelles... Deux exemples de régulation post-transcriptionnelle concernant des sous-unités du complexe I ont ainsi été décrits : la régulation de la traduction de la sous-unité 75 kDa en fonction de la concentration en fer par fixation d'une protéine dans la région 5' non traduite de l'ARNm (Lin et al., 2001) et la régulation post-traductionnelle de la sous-unité 18 kDa phosphorylée par une kinase AMPc-dépendante (Scacco et al., 2000).

L'ensemble de ces considérations a conduit à l'idée qu'une approche différente devait être utilisée afin de progresser dans la compréhension de la régulation de l'expression des sous-unités du complexe I mitochondrial. La deuxième étape de mon travail de thèse a donc été axée sur le développement d'une méthode de protéomique comparative, basée sur l'analyse du protéome mitochondrial par électrophorèse bidimensionnelle. Le principe de cette technique est de séparer des protéines, provenant de mitochondries isolées, successivement par isoélectrofocalisation puis par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (SDS-PAGE), permettant d'obtenir des cartes sur lesquelles plus d'un millier de spots protéiques est représenté. C'est donc une technique d'analyse globale des protéines qui permet

d'étudier simultanément l'expression d'un très grand nombre de gènes. Elle apparaît tout à fait adaptée à l'étude de l'expression des sous-unités du complexe I pour plusieurs raisons.

Premièrement, de nombreux travaux montrent qu'un moyen important de contrôle du système de la phosphorylation oxydative est la régulation de l'expression de ses constituants : voies de régulation impliquant les facteurs de transcription NRF-1 et NRF-2 et leurs coactivateurs (Scarpulla, 2002), régulation de l'expression du cytochrome c par Sp1 et CREB (Connor et al., 2001 ; Herzig et al., 2000), régulation de la traduction de la sous-unité 75 kDa du complexe I par le fer (Lin et al., 2001). Il est donc très probable que différentes voies de régulation impliquent des modifications de l'expression de sous-unités du complexe I.

Deuxièmement, une difficulté essentielle de l'étude de cette enzyme est sa complexité : 43 sous-unités recensées et codées par 36 gènes nucléaires et 7 gènes mitochondriaux. De plus, le rôle de la majorité de ces sous-unités est totalement inconnu. Il est très probable, puisque les 14 sous-unités conservées chez les bactéries permettraient d'expliquer l'essentiel du mécanisme enzymatique, qu'au moins une partie des autres protéines est impliquée dans des processus de régulation de l'assemblage ou du fonctionnement du complexe. Dans ce contexte, l'intérêt de l'étude protéomique est de pouvoir analyser simultanément, dans un même extrait cellulaire, le niveau d'expression de nombreuses protéines du complexe I. Il est donc possible de déterminer, sans a priori, quelles sont les sous-unités dont le taux varie en réponse à un stimulus donné et ainsi d'identifier la ou les cibles d'une voie de régulation spécifique.

Troisièmement, cette technique est basée sur l'étude des protéines, c'est-à-dire la dernière étape de l'expression d'un gène. Elle intègre donc tous les niveaux possibles de régulation de l'expression depuis la transcription jusqu'à la traduction. Elle permet, de plus, de détecter des modifications post-traductionnelles. En effet, celles-ci, en modifiant le pI de la protéine, entraînent un déplacement horizontal du spot correspondant sur le gel d'électrophorèse bidimensionnelle.

Quatrièmement, les cartes du protéome mitochondrial permettent de visualiser, en plus des sous-unités du complexe I, de très nombreuses autres protéines mitochondriales. Il est donc possible d'étudier des processus complexes impliquant des régulations coordonnées entre différentes protéines du complexe I mais aussi entre des sous-unités du complexe I et d'autres protéines mitochondriales appartenant au système d'oxydation phosphorylante, aux voies du métabolisme énergétique comme la β -oxydation et le cycle de Krebs ou aux systèmes de lutte contre le stress oxydant. L'intérêt de cette approche est souligné par les travaux sur les coactivateurs transcriptionnels qui intègrent dans les mêmes voies de régulation des gènes associés à

différents métabolismes mitochondriaux (Scarpulla, 2002).

L'objectif de l'étude du protéome mitochondrial est donc de pouvoir découvrir, parmi les nombreuses sous-unités du complexe I, celles qui peuvent être impliquées dans la réponse à un signal de régulation spécifique. D'autre part, la découverte d'une modification post-traductionnelle ou la mise en évidence d'autres protéines mitochondriales impliquées dans le processus de régulation étudié peut aider à la compréhension des mécanismes en jeu.

Préparation des cartes du protéome mitochondrial :

La première carte du protéome mitochondrial humain a été réalisée au laboratoire en utilisant un gradient de pH 4-8 (Rabilloud et al., 1998). Parmi les 46 protéines identifiées sur cette carte, 30 sont des protéines mitochondriales mais seulement deux appartiennent au complexe I : les sous-unités 23 kDa (NUIM) et 49 kDa (NUCM). D'autres protéines du système d'oxydation phosphorylante y sont également localisées : DHSA du complexe II, UCR1 et Rieske (UCRI) du complexe III, COX Va du complexe IV, ATPB et ATPD du complexe V. De plus, avant que le travail présenté ici ne soit engagé, cette carte avait été complétée par l'identification de 13 autres protéines mitochondriales dont 3 sous-unités du complexe I (NUAM, NUGM, NUHM) et 2 sous-unités de la cytochrome c oxydase (COXB, COXE).

Cependant, deux limitations sont associées aux conditions d'électrophorèse employées lors de ces travaux, empêchant la construction de cartes représentatives de l'ensemble du protéome mitochondrial. Premièrement, une proportion importante des protéines de la mitochondrie sont des protéines basiques qui ne peuvent pas être visualisées avec un gradient de pH classique 4-8. Deuxièmement, les protéines de très petit poids moléculaire (< 10 kDa) ne sont pas représentées. Mon travail a donc été axé sur la préparation de nouvelles cartes, d'une part, en utilisant un gradient de pH alcalin (pH 5,5 à pH 12) et, d'autre part, en employant, avec chaque type de gradient de pH, deux conditions de SDS-PAGE afin d'accroître la gamme des poids moléculaires représentés.

La source de mitochondries est le placenta humain. C'est un tissu relativement facile à se procurer et qui permet d'obtenir des mitochondries en quantité importante. En effet, les mitochondries ne représentant que 10 % du contenu cellulaire, le rendement d'extraction est faible. Il est de ce fait difficile de réaliser ce travail de construction de cartes du protéome

mitochondrial à partir de cellules en culture. Un tissu de choix est le cœur, utilisé lors de la préparation de mitochondries de bœuf, mais ce tissu est problématique à obtenir chez l'homme, ne serait-ce que pour des raisons éthiques.

Afin de vérifier l'intégrité des mitochondries isolées, des tests polarographiques ont été réalisés (données non présentées). Lors de la préparation de l'échantillon destiné à l'électrophorèse bidimensionnelle, la suspension de mitochondries est directement diluée dans une solution de lyse concentrée. Cette méthode permet une solubilisation plus efficace des protéines que lorsque les mitochondries sont culottées et reprises dans une solution de lyse non concentrée (Rabilloud et al., 1998).

Lors de la première étape d'isoélectrofocalisation, des gradients de pH immobilisés ont été utilisés du fait de leur reproductibilité intrinsèque et de leur capacité de chargement. Un autre intérêt de ce système réside dans le fait qu'il peut être appliqué à l'étude des protéines basiques (Görg et al, 1998). Afin d'étudier ces protéines, un gradient de pH 5,5-12 a été choisi plutôt qu'un gradient de pH très basique (8-12, 9-12) plus difficile à utiliser (Görg et al, 1997). Le gradient de pH 5,5-12 a été développé à partir du protocole publié pour la préparation du gradient pH 4-12 (Görg et al, 1998). Dans le cas de ces gradients basiques, le dépôt protéique est réalisé en coupelle au niveau de l'anode car ce système s'est révélé bien plus efficace que le dépôt par réhydratation du gel utilisé dans le cas d'un gradient 4-8 (Görg et al, 1999 ; Ohlmeier et al., 2000). Par contre, le temps de focalisation n'étant pas critique, un programme de migration standard sur 24 heures a été utilisé avec les différents gradients. Ce programme permet d'obtenir au total un voltage horaire d'environ 60 kV/h.

Au cours de la seconde dimension (SDS-PAGE), deux types de gels ont été utilisés en fonction du poids moléculaire des protéines que nous voulions visualiser. Pour les protéines d'une taille supérieure à 20 kDa, des gels à 10 % d'acrylamide ont été préparés dans du tampon Tris 0,15 M-HCl 0,1 M, permettant une bonne séparation des protéines de haut poids moléculaire. Afin de visualiser les protéines plus petites, les gels ont été préparés à 11 % d'acrylamide, avec une concentration de Tris plus élevée (0,2 M) entraînant un resserrement des protéines dans la zone des hauts poids moléculaires.

Les gels analytiques ont été colorés en utilisant une méthode au nitrate d'argent (Sinha et al., 2001) dans le cas des protéines acides et neutres (gradient 4-8) et une méthode à l'argent ammoniacal (Rabilloud et Charmont, 1999) pour les protéines alcalines (gradient 5,5-12). Il est à noter que certaines protéines basiques sont bien révélées par une coloration à l'argent ammoniacal précédée d'une fixation au formaldéhyde mais sont difficilement détectables par

d'autres méthodes. L'isoforme ANT2 (ADT2) du transporteur de nucléotides ADP/ATP en est un exemple. Les gels préparés en vue de l'identification de protéines par spectrométrie de masse ont été colorés avec un complexe ruthénium fluorescent préparé au laboratoire (Rabilloud et al., 2001). Cette méthode combine une bonne sensibilité et une faible interférence avec les techniques de spectrométrie de masse. Le découpage des spots est facilement réalisé sur une table à UV. De plus, le coût de ce réactif "maison" est beaucoup moins élevé que celui des sondes fluorescentes commerciales (Berggren et al., 2000 ; Malone et al., 2001). Une coloration au bleu de Coomassie colloïdal (Neuhoff et al., 1988) a été utilisée pour l'identification de la protéine ADT2. Cette technique est moins sensible que la détection fluorescente mais ADT2 n'est pas visible avec la coloration au ruthénium. Pour cette identification, 1,6 mg de protéines mitochondriales a été déposé et, même dans ces conditions, le spot d'ADT2 est difficile à détecter.

L'analyse avec le programme Melanie (Appel et al., 1997a ; Appel et al., 1997b) indique que 1500 spots protéiques sont résolus sur le gel 4-8/11 % (figure 19) tandis que 1250 le sont sur le gel 5,5-12/11 % (figure 21). Ces valeurs démontrent la qualité des gels préparés à la fois concernant le pouvoir résolutif associé aux conditions d'électrophorèse et concernant la sensibilité des colorations à l'argent. Il faut cependant tenir compte du fait que le nombre d'espèces protéiques est inférieur aux chiffres cités car plusieurs spots peuvent correspondre à la même protéine du fait de l'existence de modifications post-traductionnelles. Des fragments peuvent également être présents sur le gel en plus de la protéine non dégradée. D'autre part, ces données soulignent l'intérêt de travailler sur des mitochondries isolées. En effet, le nombre de protéines exprimées dans une cellule eucaryote est estimé entre 10 000 et 20 000 (Duncan et McConkey, 1982). Compte tenu, d'une part, de la grande gamme dynamique d'expression des protéines dans une cellule et, d'autre part, des limites de résolution et de capacité des gels d'électrophorèse bidimensionnelle, travailler sur cellule entière ne permet que la détection des protéines les plus fortement exprimées. Par contre, en se servant de la compartimentalisation des cellules eucaryotes, l'isolement des mitochondries permet de concentrer les protéines d'intérêt. Ainsi, la taille du protéome mitochondrial étant estimée à environ 1000 protéines, le nombre de spots présents sur les différents gels préparés permet d'espérer une bonne représentativité des protéines de cette organelle. Une telle approche a également été employée pour l'étude d'autres organelles comme les lysosomes (Journet et al., 2000), l'appareil de Golgi (Bell et al., 2001) ou les chloroplastes (Schubert et al., 2002).

Concernant la résolution des protéines sur les gels, l'utilisation de conditions adaptées aux

protéines de petit poids moléculaire lors la seconde dimension permet de descendre la limite de détection jusqu'à environ 6 kDa. Sur le gel préparé en utilisant un gradient de pH 4-8 et ces conditions de SDS-PAGE (figure 19), une nouvelle sous-unité du complexe I, NUFM, et une sous-unité de la cytochrome c oxydase, COXG, ont ainsi pu être identifiées. Cependant, le plus gros effort a été consacré au développement des cartes basiques (figures 20 et 21). Ce travail a conduit à la localisation de 11 nouvelles protéines du complexe I. D'autre part, 2 sous-unités du complexe III, 4 sous-unités de l'ATP synthase et le cytochrome, transporteur mobile d'électrons connectant les complexes III et IV, ont également été identifiés sur les cartes réalisées avec un gradient de pH 5,5-12. Sur ces gels, la limite de détection des protéines du côté basique se situe légèrement en dessous de pH 10. Plusieurs protéines mitochondriales identifiées ont un pI supérieur à 9,5, comme ADT2 (9,76), NUEM (9,70), N7BM (9,63) ou NB7M (9,63). Cependant, certaines protéines basiques ne sont pas résolues, comme des protéines des ribosomes mitochondriaux qui ont un pI compris entre 9 et 10 (pour des masses moléculaires de 20 à 45 kDa). Concernant la taille, à l'instar des gels 4-8, plusieurs protéines identifiées ont une masse moléculaire inférieure à 10 kDa : ATPE (7,8 kDa), NI9M (9,3 kDa), NUML (9,4 kDa).

La liste de l'ensemble des protéines mitochondriales identifiées sur les différents gels est présentée dans le tableau VII. Parmi ces 85 protéines mitochondriales, 17 sont des sous-unités du complexe I et 16 appartiennent aux autres complexes enzymatiques du système d'oxydation phosphorylante (tableau X). D'autres protéines identifiées sont indirectement associées au fonctionnement de ce système (tableau XI). C'est notamment le cas de l'isoforme ANT2 du translocateur ADP/ATP qui contrôle l'échange de ces nucléotides au niveau de la membrane mitochondriale interne. De même, un certain nombre de protéines sont des enzymes des voies du métabolisme énergétique qui approvisionnent la chaîne respiratoire en équivalents réducteurs, comme le cycle de Krebs ou la β -oxydation. Deux protéines associées à l'expression des sous-unités du système d'oxydation phosphorylante codées par le génome mitochondrial ont été localisées : le facteur SSB qui intervient lors de la réplication de l'ADN mitochondrial (voir Introduction chapitre 1.3.3.) et EFTU, un facteur de traduction mitochondrial qui participe à l'étape d'élongation. Plusieurs protéines impliquées dans l'import dans la mitochondrie des protéines codées par le génome nucléaire ont également été détectées. Enfin, 4 protéines interviennent dans la lutte contre le stress oxydant. Ces protéines sont intéressantes car la chaîne respiratoire est le principal site de production d'EORs dans la mitochondrie, en particulier au niveau du complexe I.

| | Sous-unités identifiées | Nombre total de sous-unités |
|--------------|-------------------------|-----------------------------|
| Complexe I | 17 | 43 |
| Complexe II | 1 | 4 |
| Complexe III | 4 | 11 |
| Complexe IV | 4 | 13 |
| Complexe V | 6 | 14 |
| Cytochrome c | 1 | 1 |

Tableau X : Liste des protéines du système de la phosphorylation oxydative identifiées sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle (figures 18, 19, 20 et 21).
Le nombre total de protéines dans chaque complexe est indiqué.

| Fonction métabolique | Nombre de protéines | Protéines |
|---|---------------------|--|
| Import et export ADP/ATP | 1 | ADT2 |
| Métabolisme énergétique | | |
| Complexe pyruvate déshydrogénase | 3 | DLDH ODPA OBPB |
| Cycle de Krebs | 7 | ACON DHSA DLDH FUMH IDHA MDHM ODO1 |
| beta-oxydation | 8 | ACDS ACDM ACDV D3D2 ECH1 ECHA ECHB ECHM |
| Dégradation des acides aminés | 7 | AATM DHE3 DLDH IVD OAT ODB2 PUT2 |
| Gluconéogenèse | 1 | PPCM |
| Navette glycérol phosphate | 1 | GPDM |
| Transfert d'électrons vers l'ubiquinone | 3 | EFTA ETFB ETFD |
| Créatine phosphate | 1 | KCRU |
| Import protéines | 4 | CH60 GR75 MPPA MTX2 |
| Expression ADN mitochondrial | 2 | SSB EFTU |
| Systèmes antioxydants | 4 | SODM PDX3 Q9NNW7 IDHP |

Tableau XI : Liste des protéines mitochondriales associées au système de la phosphorylation oxydative identifiées sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle (figures 18, 19, 20 et 21). Les protéines sont identifiées par leur nom dans la base de données Swiss-Prot.

Environ 25 % des protéines identifiées sur les cartes du protéome mitochondrial sont des contaminants. Ce problème est communément rencontré lorsque l'on travaille sur le protéome d'organelles isolées. Des essais de purification sur gradient de sucrose ont été réalisés lors de la préparation de la première carte du protéome mitochondrial (Rabilloud et al., 1998) mais l'amélioration de la pureté de ces préparations est faible. Par contre, le rendement d'extraction chute de manière importante (données non présentées). Un certain nombre de contaminants présents sur les cartes du protéome mitochondrial pourrait être impliqué dans l'interface mitochondrie/cytosol. C'est notamment le cas des protéines appartenant ou associées au cytosquelette (actine, ARP3, AR20, Cofiline, Ezrine) qui sont probablement liées à la membrane externe mitochondriale et participeraient ainsi au positionnement intracellulaire de l'organelle. Des protéines du réticulum endoplasmique sont également présentes comme CYPB, plusieurs disulfide isomérasas (PDA3, PDA6, PDI) ou des chaperonnes (ENPL, GR78). Un autre contaminant important est représenté par une protéine sécrétée d'origine placentaire, la choriomammotrophine (PLL). Cette contamination est probablement due au fait que les granules de sécrétion sont de grande taille avec une densité proche de celle de la mitochondrie. La choriomammotrophine est de fait absente des préparations de mitochondries réalisées à partir de cellules en culture. L'albumine bovine est un contaminant lié à la technique de préparation. Utilisée dans les premières étapes de l'extraction, elle est retrouvée sur les gels malgré plusieurs lavages dans un tampon dépourvu d'albumine. Enfin, il faut également noter qu'il peut être parfois difficile de déterminer si une protéine est ou non un contaminant car certaines protéines dépourvues d'un peptide transit peuvent être localisées à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la mitochondrie. C'est le cas par exemple de la glutathion réductase (Taniguchi et al., 1986).

Parmi les limites de l'analyse protéomique basée sur l'électrophorèse bidimensionnelle (Wilkins et al., 1998), un des obstacles majeurs est l'identification des protéines membranaires (Santoni et al., 2000). Cependant, plusieurs protéines localisées dans les membranes mitochondriales ont pu être mises en évidence lors de ce travail, notamment sur les cartes réalisées avec un gradient de pH 5,5-12. Ces protéines appartiennent à trois classes différentes. La première correspond aux protéines à feuillets β dont font partie les porines (POR1, POR2). Ces protéines sont facilement détectables sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle (Langen et al., 1999). La seconde catégorie est représentée par les protéines des complexes respiratoires. Dans ces assemblages multimériques, certaines sous-unités sont ancrées dans la membrane tandis que d'autres constituent une extension faisant saillie dans la matrice. Le complexe I et l'ATP synthase, constituée d'un domaine membranaire F0 et matriciel F1, sont de

bons exemples. Les sous-unités membranaires sont souvent de petite taille et très hydrophobes, ce qui les rend difficiles à analyser par électrophorèse bidimensionnelle. Deux protéines de la fraction F₀ de l'ATP synthase ont toutefois été identifiées sur les gels (ATPE et ATPN). Malgré tout, de nombreuses protéines de ce type ne sont pas encore caractérisées, comme les sous-unités ND du complexe I, codées par le génome mitochondrial, ou les autres sous-unités de la fraction F₀ de l'ATP synthase. La dernière catégorie est constituée par des protéines à hélices transmembranaires. Ces protéines, souvent basiques, sont parmi les plus difficiles à analyser avec notre système. Par exemple, l'échangeur glutamate/malate ou le transporteur phosphate qui sont des protéines mitochondriales de taille moyenne (environ 30 kDa) avec un pI aux alentours de 10, n'ont pas été détectés sur les gels. Deux protéines de ce type ont toutefois été identifiées. L'une est l'isoforme ANT2 du translocateur ADP/ATP (Annexe I). Cette isoforme est exprimée de manière prédominante dans les tissus capables de proliférer et de se régénérer (Doerner et al., 1997). L'autre est la sidéroxaline 3, un transporteur qui serait impliqué dans le métabolisme du fer (Fleming et al., 2001). Il faut cependant noter que le translocateur ADP/ATP (ADT2) est sous-représenté sur les gels puisque cette protéine constitue environ 10 % des protéines mitochondriales. Comme l'ont précédemment décrit Santoni et al. (2000), le rapport entre la taille de la protéine et le nombre de segments transmembranaires semble être le paramètre critique. Ainsi, la mitofiline (Q16891), une protéine de 100 kDa avec un seul segment transmembranaire prédit (Gieffers et al., 1997), est facilement résolue (figure 18 et 19).

Une autre difficulté est liée à l'identification de certaines protéines par spectrométrie de masse. Premièrement, les petites protéines (< 15-20 kDa) sont difficiles à identifier par spectrométrie MALDI-TOF car elles ne donnent souvent qu'un petit nombre de peptides. Ce problème concerne moins les protéines basiques car elles sont plus riches en lysine et en arginine que les protéines acides et sont donc plus faciles à identifier en MALDI-TOF. Même si dans certains cas une analyse complémentaire des peptides par spectrométrie de masse en tandem permet d'obtenir une réponse, cette donnée est importante car les mitochondries sont riches en protéines de faible masse moléculaire (< 10 kDa). C'est notamment le cas des complexes du système d'oxydation phosphorylante. Par exemple, 7 des 43 sous-unités de la NADH:ubiquinone oxydoréductase ont une masse inférieure à 10 kDa. Plusieurs petites protéines comme NUML, NI9M, COXE ou ATPE, ont toutefois peut être identifiées (tableau VII).

Une deuxième limitation de l'identification par spectrométrie de masse est liée au faible nombre de protéines mitochondriales décrites dans les bases de données. Ainsi, la recherche de protéines mitochondriales humaines dans Swiss-Prot ne fournit que 311 assignations. Ceci expliquerait le

fait que plusieurs protéines présentes sur nos gels ont donné de bons spectres de masse mais ne correspondent à aucune protéine recensée dans les banques de données. Dans d'autres cas, les protéines identifiées correspondent à des gènes récemment clonés pour lesquels aucune donnée n'est disponible tant sur le plan fonctionnel que concernant la localisation intracellulaire (tableau IX). Ce problème peut parfois être résolu car les protéines mitochondriales sont souvent bien conservées d'une espèce à l'autre. Cette conservation est illustrée par les résultats obtenus lors de l'analyse par spectrométrie MALDI-TOF de sous-unités de l'ATP synthase et de protéines du choc thermique : la première identification correspond à la bonne protéine mais des homologues d'autres espèces donnent également de très bons scores. Ces homologies permettent de réaliser des identifications interspécifiques à partir des profils de spectres de masse. Cela a déjà été décrit pour la sous-unité β de l'ATP synthase (O'Connell et Stults, 1997) et c'est aussi probablement le cas dans cette étude avec la première description de la sidéroxaline 3 humaine.

Enfin, bien que le travail soit réalisé sur des mitochondries isolées, il est clair que certaines protéines faiblement exprimées sont en dessous du seuil de détection de notre technique. Ce pourrait notamment être le cas des protéines des ribosomes mitochondriaux qui, en plus d'être très basiques, sont très peu abondantes (Koc et al., 2001). Afin de résoudre ce problème, il serait possible de travailler sur des sous-fractions mitochondriales (Lopez et al., 2000) ou d'utiliser des gradients de pH étroits (Wasinger et al., 2000 ; Tonella et al., 2001). Cependant, ces techniques sont plus lourdes à mettre en œuvre et ne semblent pas, pour le moment, indispensables dans la démarche analytique de ce travail. Dans un premier temps, le but n'est en effet pas de réaliser une identification exhaustive des protéines mitochondriales mais de disposer d'un outil souple permettant d'analyser simultanément l'expression du plus grand nombre possible de protéines.

Etude de l'expression des protéines mitochondriales en fonction de la concentration en fer :

Le but de cette étude est de déterminer si les cartes protéomiques que nous avons préparées peuvent être utilisées pour étudier l'expression des protéines mitochondriales et, en particulier, des sous-unités du complexe I. Le principe est de soumettre des cellules en culture à un stimulus susceptible de modifier l'expression de ces protéines, d'extraire les mitochondries, d'analyser les protéines mitochondriales par électrophorèse bidimensionnelle puis de comparer l'intensité des spots protéiques par rapport à une carte réalisée à partir de cellules témoins. Si des variations reproductibles sont mises en évidence, les spots protéiques correspondants sont découpés sur un gel préparatif coloré au ruthénium et les protéines identifiées par spectrométrie de masse.

Pour cette première série d'expériences, la décision d'étudier la réponse à des variations de la concentration du milieu en fer est liée à deux raisons principales. Premièrement, c'est une étude simple à réaliser du point de vue technique. Il suffit d'incuber les cellules en présence d'un agent chélateur du fer (déferoxamine) pour induire une carence ou en présence d'un complexe ferrique (hémine) pour enrichir le milieu. Une publication récente (Lin et al., 2001) sur la sous-unité 75 kDa (NUAM) du complexe I mitochondrial a servi de référence à ce travail, concernant notamment le choix des concentrations de déferoxamine et d'hémine. La deuxième raison de ce choix est liée au fait que 5 protéines du complexe I sont des sous-unités à centre Fe-S (voir Introduction, chapitre 2.4.3.) et que 3 d'entre elles sont identifiées sur les cartes réalisées avec le gradient 4-8 : 23 kDa (NUIM), 24 kDa (NUHM) et 75 kDa (NUAM). La sous-unité 49 kDa (NUCM) qui serait impliquée dans la formation du centre N₂ (Kashani-Poor et al., 2001 ; Kerscher et al., 2001) est également localisée sur ces gels. De plus, le fer participe à la structure d'autres protéines de la chaîne respiratoire comme les cytochromes ou la sous-unité Rieske (UCRI) du complexe III.

Les cellules en culture utilisées au cours de cette étude sont des cellules HeLa S3. L'intérêt de cette lignée humaine est qu'elle peut être cultivée en suspension. Il est donc possible de produire assez simplement de grandes quantités de cellules nécessaires à la purification des mitochondries. Dans le cadre de ce travail, les mitochondries ont été préparées à partir d'un litre de culture (environ 8×10^8 cellules). Le choix d'un temps d'incubation de 48 heures en présence de déferoxamine ou d'hémine s'appuie sur l'étude réalisée dans des cellules COS-7 par Lin et al. (2001) dans laquelle une diminution nette de l'expression de la sous-unité NUAM

est observée après 48 heures de culture dans un milieu contenant 100 μM de déferoxamine alors que l'effet est faible à 24 heures. De plus, des essais de viabilité menés sur les cellules HeLa S3 montrent que la mortalité cellulaire est importante à partir de 72 heures de culture en présence de 100 μM de déferoxamine (résultats non présentés).

Des gels correspondant aux différentes conditions d'incubation et d'électrophorèse bidimensionnelle utilisées sont présentés dans les figures 22 à 25. Chaque figure représente une série de gels réalisés simultanément à partir de mitochondries, correspondant aux trois conditions de culture, extraites simultanément. Ces gels sont analysés visuellement afin de déterminer les spots protéiques dont l'intensité varie en fonction des conditions de culture. Lorsqu'une seule série de gels est analysée, de nombreuses variations sont détectées. Par contre, seul un petit nombre de ces modifications est observé de manière reproductible sur plusieurs séries des gels ou avec des extraits mitochondriaux préparés de manière indépendante. Ces variations d'intensité reproductibles sont indiquées sur les figures 22 à 25. En fonction des spots, différentes évolutions sont observées : diminution (NUGM) ou augmentation (spot J) lors de la carence en fer et diminution (HCD2) ou augmentation (PDX3 oxydée) en présence d'un excès de fer.

L'identité de plusieurs de ces protéines peut être présumée par comparaison avec les cartes de référence. Il s'agit, sur les cartes 4-8, des sous-unités du complexe I NUAM, NUCM, NUGM, NUHM, NUIM et de la protéine antioxydante PDX3. Sur les cartes 5,5-12, ce sont les protéines NUEM (complexe I) et UCR6 (complexe III). Toutes ces identifications ont été ensuite confirmées par spectrométrie de masse. Dans la région de la protéine UCRI du complexe III, deux spots voisins évoluent de manière opposée en fonction de la concentration en fer. L'identification par spectrométrie de masse indique que l'un de ces spots est UCRI tandis que l'autre est la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de type II (HCD2). Ces résultats montrent qu'il est possible de réaliser à partir de mitochondries extraites de cellule en culture des gels comparables aux cartes de référence préparées avec des mitochondries de placenta.

Pour tous les autres spots protéiques dont l'intensité varie de façon reproductible, l'identification par spectrométrie de masse est en cours. La localisation du spot O (figure 25) pourrait correspondre à celle du cytochrome c (voir carte de référence présentée figure 21). Le fait que l'expression de cette protéine soit inhibée lors de la carence en fer est compatible avec cette identification puisque le cytochrome c est une protéine héminique. Malheureusement, l'analyse de ce spot en spectrométrie a pour l'instant échoué. Cet échec n'est cependant pas surprenant car il s'agit d'une protéine de petite taille et très basique. Pour les autres spots

indiqués sur les figures par des lettres, l'identification est également en cours. Pour la plupart de ces protéines, un spectre a néanmoins été obtenu mais aucune homologie n'a été trouvée dans les bases de données. Il pourrait donc s'agir de protéines non répertoriées. Ces échecs peuvent aussi être liés à un problème technique lors de la calibration du spectromètre de masse.

Concernant les protéines de la chaîne respiratoire identifiées, les résultats sont cohérents en ce qui concerne les sous-unités NUHM et NUIM du complexe I et la sous-unité UCRI du complexe III. Il est en effet logique que l'expression de ces protéines à centre Fe-S soit inhibée par la carence en fer. De même, bien qu'elle soit difficile à apprécier sur les gels (figures 22 et 23), la diminution de l'expression de NUCM en présence de déferoxamine peut s'expliquer par sa participation à la structuration du centre Fe-S N2 porté par la sous-unité 20 kDa (NUKM, non identifiée sur les cartes). La diminution concomitante d'autres sous-unités de ces complexes comme NUEM, NUGM ou UCR6 pourrait résulter de problèmes d'assemblage liés au déficit des sous-unités précédemment citées. Une situation comparable a été décrite chez un patient souffrant d'un déficit du complexe I lié à une anomalie non identifiée d'un gène nucléaire (Procaccio et al., 1999).

Le fait que l'expression de la sous-unité NUAM soit diminuée en présence d'hémine et que son taux reste stable dans un milieu carencé en fer est, par contre, surprenant. En effet, cette protéine contient 3 centres Fe-S. De plus, ces résultats sont en contradiction avec ceux de Lin et al. (2001) qui n'observent pas de modifications du taux de NUAM en présence d'hémine mais une inhibition de son expression lorsque la concentration en fer diminue. D'après cette étude, la diminution de l'expression associée à la carence en fer est provoquée par la fixation d'une protéine de type IRP dans la région 5' non traduite de l'ARNm, inhibant la traduction. Nous ne disposons pas, pour l'instant, de données permettant d'expliquer ces discordances. En effet, les concentrations de déferoxamine et d'hémine sont identiques dans les deux études. Une hypothèse serait l'utilisation de lignées cellulaires différentes : Lin et ses collaborateurs ont utilisé une lignée simienne COS-7 alors que nos expériences ont été réalisées avec des cellules humaines HeLa S3.

Une autre protéine identifiée est la peroxyrédoxine 3 (PDX3). Cette protéine antioxydante fait partie d'un système mitochondrial de dégradation du peroxyde d'hydrogène. Elle existe sous deux formes : une forme native et une forme modifiée liée à l'oxydation irréversible d'un résidu cystéine (Rabilloud et al., 2002a). L'expression de la protéine native et la production de la forme oxydée sont toutes les deux accrues en réponse à un stress oxydant. Les résultats obtenus sur les gels d'électrophorèse bidimensionnelle indiquent que le taux de la forme modifiée et, dans

une moindre mesure, celui de la forme native augmentent parallèlement à la hausse du taux de fer dans le milieu (voir les 3 gels des figures 22 et 23). Ce phénomène s'explique par le fait que l'augmentation du taux de fer dans la cellule s'accompagne d'une production accrue d'EORs, en particulier au niveau mitochondrial (Eaton et Qian, 2002).

L'analyse des gels réalisés avec le gradient 4-8 (figures 22 et 23), a également permis de mettre en évidence une diminution de l'expression de la 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase de type II ou ERAB (HCD2) en présence d'hémine. Cette enzyme mitochondriale participerait au métabolisme des androgènes (He et al., 2000). D'autre part, il a été montré qu'HCD2 interagit avec le peptide β -amyloïde intracellulaire dans les neurones des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Yan et al., 1997). HCD2 serait impliquée dans l'apoptose et le processus neurodégénératif induits par le peptide β -amyloïde mais le mécanisme en jeu reste inconnu. L'hypothèse d'un processus impliquant les quinones a été évoquée car ce peptide inhibe HCD2 avec comme conséquence une augmentation de la production de lipides peroxydés mais les résultats expérimentaux ne l'ont pas confirmée (Salim et al., 2000). Il est intéressant de noter que cette protéine a déjà été identifiée sur les cartes préparées à partir des mitochondries de placenta (figures 18 et 19) mais le spot correspondant a un pI nettement plus alcalin. La protéine dont le taux est augmenté avec la surcharge en fer correspond donc probablement à une forme modifiée. Un lien avec le stress oxydant pourrait être évoqué mais à l'heure actuelle aucune donnée ne permet d'expliquer le rapport entre HCD2 et la surcharge en fer et donc de déterminer la pertinence de cette observation.

Les résultats préliminaires obtenus au cours de ce travail sur la régulation des protéines du complexe I par le fer sont encourageants. Ils montrent tout d'abord que la technique d'analyse du protéome mitochondrial par électrophorèse bidimensionnelle peut être appliquée à des cellules en culture. Les profils protéiques obtenus sont reproductibles et comparables aux cartes de référence réalisées à partir des mitochondries de placenta. D'autre part, cette première étude sur le fer indique qu'il est possible de détecter des modifications d'expression de sous-unités du complexe I et, à l'exception de NUAM, tous ces changements sont cohérents. De plus, les variations observées sur des sous-unités du complexe III ou la protéine antioxydante PDX3 soulignent l'intérêt d'une technique d'analyse globale des protéines. Enfin, la mise en évidence d'une forme (probablement) modifiée d'HCD2 prouvera peut-être l'intérêt de cette approche dépourvue d'a priori.

Un travail important reste cependant à faire. Tout d'abord, bien que les données présentées soient reproductibles sur plusieurs séries de gels et avec des mitochondries provenant de deux

extractions indépendantes, il sera nécessaire de répéter ces expériences pour confirmer ces résultats. Dans cette optique, des études complémentaires devront être réalisées pour analyser individuellement chaque variation : par exemple, en Western-blot et/ou en quantifiant les ARN messagers par RT-PCR quantitative.

Il sera également intéressant de modifier le temps d'incubation en présence de déferoxamine ou d'hémine pour déterminer qu'elle est la cinétique des différentes variations d'expression observées. Dans le cas du complexe I, il serait intéressant de déterminer si la baisse des protéines Fe-S précède celle des autres sous-unités lors de la carence en fer. Des essais ont déjà été réalisés avec des mitochondries préparées après 24 heures d'incubation en présence de déferoxamine ou d'hémine mais aucune des modifications décrites à 48 heures n'a été observée. Enfin, la capacité d'analyse du système doit être affinée dans le but de détecter les variations d'expression des petites sous-unités du complexe I. L'observation minutieuse des gels déjà réalisés suggère que le taux de certaines de ces protéines diminue avec la carence en fer. Cependant, les spots sont peu intenses et il donc est difficile d'apprécier les variations d'expression. De plus, la reproductibilité des gels est moins bonne dans la zone des bas poids moléculaires rendant l'analyse plus difficile. Le recul est encore insuffisant pour savoir si ces sous-unités peuvent être prises en compte par cette méthode ou s'il sera nécessaire d'utiliser des techniques complémentaires, par exemple un marquage à la méthionine ^{35}S permettant de mesurer la néosynthèse protéique dans un intervalle de temps donné.

CONCLUSION

La NADH:ubiquinone oxydoréductase (complexe I) est le plus gros complexe enzymatique du système mitochondrial d'oxydation phosphorylante. Chez l'homme, cette enzyme est constituée d'au moins 43 sous-unités dont la fonction reste pour la plupart inconnue. De même, peu de données sont disponibles sur les mécanismes régulant l'expression de ces protéines. Cette question semble d'autant plus difficile à aborder que la synthèse du complexe I est sous la dépendance des génomes nucléaire et mitochondrial.

D'importants progrès ont pourtant été réalisés au cours des dernières années concernant la compréhension des mécanismes transcriptionnels qui régulent la biosynthèse du système d'oxydation phosphorylante. Une série d'études a permis de comprendre comment différents aspects de cette biosynthèse pouvaient être intégrés dans une même voie de régulation grâce à un réseau de facteurs de transcription (NRF-1, NRF-2) et de coactivateurs transcriptionnels (famille PGC-1). Ces travaux permettent d'expliquer, au moins en partie, comment l'expression des deux génomes peut être coordonnée. Enfin, ils permettent d'établir des liens directs entre des stimuli extracellulaires et l'expression des protéines de la phosphorylation oxydative. Cependant, l'absence de données sur la régulation transcriptionnelle des gènes codant les sous-unités du complexe I ne permettait pas de les intégrer dans ces schémas de régulation.

Cette thèse a donc débuté par l'étude des promoteurs de deux gènes codant pour des sous-unités du complexe I mitochondrial humain. Les résultats obtenus montrent que le gène *NDUFS8* codant pour la sous-unité 23 kDa (TYKY) est transcrit sous le contrôle des facteurs de transcription YY1 et Sp1. Le gène *NDUFS7* codant pour la sous-unité 20 kDa (PSST) est, quant à lui, régulé par NRF-1 et Sp1. Le gène *NDUFS7* peut donc être intégré dans les réseaux de régulation impliquant les cofacteurs de la famille PGC-1. Par contre, l'absence de données sur les cofacteurs interagissant avec YY1 et Sp1 au niveau des gènes du système de la phosphorylation oxydative ne permet pas d'associer le gène *NDUFS8* à de tels schémas de régulation. De même, la question concernant la manière dont la transcription de ces deux gènes peut être coordonnée lors de la synthèse du complexe I reste posée.

Pour avancer dans la compréhension des mécanismes régulant l'expression des sous-unités du complexe I, une méthode d'analyse basée sur l'utilisation de cartes d'électrophorèse bidimensionnelle du protéome mitochondrial humain a été développée. Le but est d'appréhender de manière globale et sans a priori l'expression des protéines de ce complexe : il s'agit de déterminer quelles sous-unités peuvent être impliquées dans la réponse à un stimulus déterminé. Cette approche offre également l'avantage de pouvoir étudier d'autres protéines mitochondriales susceptibles d'être impliquées dans les mêmes voies de régulation. De plus, la protéine étant

l'étape finale de l'expression d'un gène, l'analyse du protéome permet d'intégrer les différents niveaux de régulation possibles. Cet outil doit donc permettre de répondre aux questions suivantes : quelles sont les protéines dont l'expression est régulée? En réponse à quel stimulus? Quelle en est la conséquence? Le postulat de départ étant que les réponses à ces questions permettront d'orienter le travail de recherche et aideront le décryptage du ou des mécanisme(s) en cause.

La première partie de cette étude a consisté à réaliser des cartes d'électrophorèse bidimensionnelle représentatives du protéome mitochondrial humain. Ce travail a été réalisé avec des mitochondries extraites de placenta. Deux types de gradient de pH ont été utilisés lors de l'étape d'isoélectrofocalisation : l'un pour les protéines acides et neutres, l'autre pour les protéines basiques. D'autre part, un travail d'identification des protéines par spectrométrie de masse a été mené et, avec les résultats de précédents travaux, 85 protéines mitochondriales ont été localisées sur les cartes dont 17 sous-unités du complexe I. Dans la deuxième partie de l'étude, l'analyse du protéome mitochondrial par électrophorèse bidimensionnelle a été appliquée à la régulation de l'expression des protéines mitochondriales par le fer, et en particulier des sous-unités du complexe I. L'intérêt de ce travail est avant tout de déterminer la faisabilité et la reproductibilité de la méthode et les premiers résultats sont encourageants. Ils montrent que les cartes protéomiques préparées avec des mitochondries extraites de cellules en culture sont de bonne qualité. Ils indiquent également qu'il est possible de détecter des variations d'expression de sous-unités du complexe I et d'autres protéines mitochondriales. Sur le plan fondamental, ces données préliminaires ne nous permettent pas encore de tirer de conclusions. Il sera nécessaire de réaliser de nouvelles expériences afin de confirmer ces premières observations et d'analyser la cinétique des différentes variations détectées. Ces résultats devront également être validés par des techniques complémentaires, comme le Western-blot ou la RT-PCR quantitative.

D'un point de vue plus général, cette technique d'analyse du protéome mitochondrial offre différentes perspectives. Premièrement, elle peut être appliquée à l'étude d'autres stimuli susceptibles de réguler l'expression de protéines du complexe I : AMPc en traitant les cellules par la toxine cholérique (Scacco et al., 2000), hormones thyroïdiennes (Guerra et al., 1996), facteurs de croissance sériques (Herzig et al., 2000), stress oxydant (Rabilloud et al., 2002a)...

Une autre application envisageable concerne l'étude de pathologies altérant le métabolisme mitochondrial. Un travail a ainsi été réalisé dans notre laboratoire sur les conséquences de mutations de l'ADN mitochondrial touchant des gènes codant des ARNt (Rabilloud et al.,

2002b). Cette étude est basée sur l'utilisation de lignées cellulaires cybrides produites par fusion de cellules Rho 0 143B déplétées en ADN mitochondrial et de mitochondries de patients (King et Attardi, 1989). L'intérêt réside dans le fait que des lignées cybrides produites avec des mitochondries de différents patients ont toutes le même génome nucléaire. Il est donc possible d'étudier les effets de mutations de l'ADN mitochondrial indépendamment du contenu génétique nucléaire. L'exploration d'autres mutations de l'ADN mitochondrial faisant appel aux nouvelles cartes protéomiques développées durant cette thèse est en cours.

BIBLIOGRAPHIE

Ahlers PM, Garofano A, Kerscher SJ et Brandt U (2000a)
Application of the obligate aerobic yeast *Yarrowia lipolytica* as a eucaryotic model to analyse Leigh syndrome mutations in the complex I core subunits PSST and TYKY.
Biochim Biophys Acta. **1459** : 258-265.

Ahlers PM, Zwicker K, Kerscher S et Brandt U (2000b)
Function of conserved acidic residues in the PSST homologue of complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*.
J Biol Chem. **275** : 23577-23582.

Akiyama Y
"TFSEARCH: Searching Transcription Factor Binding Sites"
<http://www.rwcp.or.jp/papia/>

Albracht SP, Mariette A et de Jong P (1997)
Bovine-heart NADH:ubiquinone oxidoreductase is a monomer with 8 Fe-S clusters and 2 FMN groups.
Biochim Biophys Acta **1318** : 92-106.

Albracht SP et Hedderich R (2000)
Learning from hydrogenases: location of a proton pump and of a second FMN in bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).
FEBS Lett. **17** : 1-6.

Ammendola R, Mesuraca M, Russo T et Cimino F (1994)
The DNA-binding efficiency of Sp1 is affected by redox changes.
Eur. J. Biochem. **225** : 483-489.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R et Young IG (1981)
Sequence and organization of the human mitochondrial genome.
Nature **290** : 457-465.

Andersson U et Scarpulla RC (2001)
PGC-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells.
Mol Cell Biol. **21** : 3738-3749.

Appel RD, Vargas JR, Palagi PM, Walther D et Hochstrasser DF (1997a)
Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: II. Algorithms.
Electrophoresis **18** : 2735-2748.

Appel RD, Palagi PM, Walther D, Vargas JR, Sanchez JC, Ravier F, Pasquali C et Hochstrasser DF (1997b)
Melanie II--a third-generation software package for analysis of two-dimensional electrophoresis images: I. Features and user interface.
Electrophoresis **18** : 2724-2734.

Arai M, Imai H, Koumura T, Yoshida M, Emoto K, Umeda M, Chiba N et Nakagawa Y (1999)
Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells.
J Biol Chem. **274** : 4924-4933.

Au HC et Scheffler IE (1998)

Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene--both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required.

Eur J Biochem. **251** : 164-174.

Ausenda C et Chomyn A (1996)

Purification of mitochondrial DNA from human cell cultures and placenta.

Methods Enzymol. **264** : 122-128.

Basu A, Park K, Atchison ML, Carter RS et Avadhani NG (1993)

Identification of a transcriptional initiator element in the cytochrome c oxidase Vb promoter which binds to transcription factors NF-E1 (YY-1, d) and Sp1.

J. Biol. Chem. **268** : 4188-4196.

Basu A, Lenka N, Mullick J et Avadhani NG (1997)

Regulation of murine cytochrome oxidase Vb gene expression in different tissues and during myogenesis.

J. Biol. Chem. **272** : 5899-5908.

Beal MF (1998)

Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative diseases.

Biochim Biophys Acta **1366** : 211-23.

Becker TS, Burgess SM, Amsterdam AH, Allende ML et Hopkins N (1998)

not really finished is crucial for development of the zebrafish outer retina and encodes a transcription factor highly homologous to human Nuclear Respiratory Factor-1 and avian Initiation Binding Repressor.

Development **125** : 4369-4378.

Bell AW, Ward MA, Blackstock WP, Freeman HN, Choudhary JS, Lewis AP, Chotai D, Fazel A, Gushue JN, Paiement J, Palcy S, Chevet E, Lafreniere-Roula M, Solari R, Thomas DY, Rowley A et Bergeron JJ (2001)

Proteomics characterization of abundant Golgi membrane proteins.

J Biol Chem. **276** : 5152-5165.

Berggren K, Chernokalskaya E, Steinberg TH, Kemper C, Lopez MF, Diwu Z, Haugland RP et Patton WF (2000)

Background-free, high sensitivity staining of proteins in one- and two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using a luminescent ruthenium complex.

Electrophoresis **21** : 2509-2521.

Blackwood EM et Kadonaga JT (1998)

Going the distance: a current view of enhancer action.

Science **281** : 61-63.

Braidotti G, Borthwick IA et May BK (1993)

Identification of regulatory sequences in the gene for 5-aminolevulinate synthase from rat.

J Biol Chem. **268** : 1109-1117.

Brandt U (1997)

Proton-translocation by membrane-bound NADH:ubiquinone-oxidoreductase (complex I) through redox-gated ligand conduction.

Biochim. Biophys. Acta **1318** : 79-91.

Brandt U (1999)

Proton translocation in the respiratory chain involving ubiquinone--a hypothetical semiquinone switch mechanism for complex I.
Biofactors **9** : 95-101.

Breen GA, Vander Zee CA et Jordan EM (1996)

Nuclear factor YY1 activates the mammalian F0F1 ATP synthase alpha-subunit gene.
Gene Expr. **5** : 181-191.

Budde SM, van den Heuvel LP, Janssen AJ, Smeets RJ, Buskens CA, DeMeirleir L, Van Coster R, Baethmann M, Voit T, Trijbels JM et Smeitink JA (2000)

Combined enzymatic complex I and III deficiency associated with mutations in the nuclear encoded *NDUFS4* gene.
Biochem Biophys Res Commun. **275** : 63-68.

Cadenas E et Davies KJ (2000)

Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging.
Free Radic Biol Med. **29** : 222-230.

Carter RS, Bhat NK, Basu A et Avadhani NG (1992)

The basal promoter elements of murine cytochrome c oxidase subunit IV gene consist of tandemly duplicated ETS motifs that bind to GABP-related transcription factors.
J. Biol. Chem. **267** : 23418-23426.

Chau CA, Evans MJ et Scarpulla RC (1992)

Nuclear respiratory factor 1 activation sites in genes encoding the β -subunit of ATP synthase, eukaryotic initiation factor 2a, and tyrosine aminotransferase.
J. Biol. Chem. **267** : 6999-7006.

Chen S et Guillory RJ (1981)

Studies on the interaction of arylazido-beta-alanyl NAD⁺ with the mitochondrial NADH dehydrogenase.
J Biol Chem. **256** : 8318-8323.

Chen S et Guillory RJ (1984)

Identification of the NADH-NAD⁺ transhydrogenase peptide of the mitochondrial NADH-CoQ reductase (Complex I). A photodependent labeling study utilizing arylazido-beta-alanyl NAD⁺.
J Biol Chem. **259** : 5124-5131.

Chen S, Nagy PL et Zalkin H (1997)

Role of NRF-1 in bidirectional transcription of the GPAT-AIRC purine biosynthesis locus.
Nucleic Acids Res. **25** : 1809-1816.

Chevallet M, Dupuis A, Lunardi J, van Belzen R, Albracht SP et Issartel JP (1997)

The NuoI subunit of the *Rhodobacter capsulatus* respiratory complex I (equivalent to the bovine TYKY subunit) is required for proper assembly of the membraneous and peripheral domains of the enzyme.
Eur. J. Biochem. **250** : 451-458.

Chung AB, Stepien G, Haraguchi Y, Li K et Wallace DC (1992)

Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase beta subunit. Multiple factors interact with the OXBOX/REBOX promoter sequences.
J Biol Chem. **267** : 21154-21161.

Cole EG et Gaston K (1997)

A functional YY1 binding site is necessary and sufficient to activate *Surf-1* promoter activity in response to serum growth factors.
Nucleic Acids Res. **25** : 3705-3711.

Connor MK, Irrcher I et Hood DA (2001)

Contractile activity-induced transcriptional activation of cytochrome C involves Sp1 and is proportional to mitochondrial ATP synthesis in C2C12 muscle cells.
J Biol Chem. **276** : 15898-15904.

Dadhu C et Gedamu L (1988)

A procedure for the preparation of RNA-free plasmid DNA.
Biotechniques **6** : 20-21.

Deng PS, Hatefi Y et Chen S (1990)

N-arylazido-beta-alanyl-NAD⁺, a new NAD⁺ photoaffinity analogue. Synthesis and labeling of mitochondrial NADH dehydrogenase.
Biochemistry **29** : 1094-1098.

de Sury R, Martinez P, Procaccio V, Lunardi J et Issartel JP (1998)

Genomic structure of the human NDUFS8 gene coding for the iron-sulfur TYKY subunit of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase.
Gene **215** : 1-10.

Di Mauro S et Schon EA (2001)

Mitochondrial DNA mutations in human disease.
Am. J. Hum. Genet. **106** : 18-26.

Doerner A, Pauschinger M, Badorff A, Noutsias M, Giessen S, Schulze K, Bilger J, Rauch U et Schultheiss HP (1997)

Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans.
FEBS Lett. **414** : 258-262.

Duarte M, Finel M et Videira A (1996)

Primary structure of a ferredoxin-like iron-sulfur subunit of complex I M from *Neurospora crassa*.
Biochim. Biophys. Acta **1275** : 151-153.

Duarte M et Videira A (2000)

Respiratory chain complex I is essential for sexual development in neurospora and binding of iron sulfur clusters are required for enzyme assembly.
Genetics **156** : 607-615.

Duarte M, Populo H, Videira A, Friedrich T et Schulte U (2002)

Disruption of iron-sulphur cluster N2 from NADH:ubiquinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis.
Biochem J. **364** : 833-9.

Duncan R et McConkey EH (1982)

How many proteins are there in a typical mammalian cell ?
Clin Chem. **28** : 749-755.

Dupuis A (1992)

Identification of two genes of *Rhodobacter capsulatus* coding for proteins homologous to the ND1 and 23 kDa subunits of the mitochondrial Complex I.
FEBS Lett. **301** : 215-218.

- Dupuis A, Chevallet M, Darrouzet E, Duborjal H, Lunardi J et Issartel JP (1998)**
The complex I from *Rhodobacter capsulatus*.
Biochim. Biophys. Acta **1364** : 147-165.
- Dupuis A, Prieur I et Lunardi J (2001)**
Toward a characterization of the connecting module of complex I.
J Bioenerg Biomembr. **33** : 159-68.
- Dutton PL, Moser CC, Sled VD, Daldal F et Ohnishi T (1998)**
A reductant-induced oxidation mechanism for complex I.
Biochim Biophys Acta **1364** : 245-257.
- Eaton JW et Qian M (2002)**
Molecular bases of cellular iron toxicity(1)(2).
Free Radic Biol Med. **32** : 833-840.
- Evans MJ et Scarpulla RC (1989)**
Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter.
Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences.
J Biol Chem. **264** : 14361-14368.
- Evans MJ et Scarpulla RC (1990)**
NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells.
Genes Dev. **4** : 1023-1034.
- Fearnley IM, Carroll J, Shannon RJ, Runswick MJ, Walker JE et Hirst J (2001)**
GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).
J. Biol. Chem. **276** : 38345-38348.
- Fecke W, Sled VD, Ohnishi T et Weiss H (1994)**
Disruption of the gene encoding the NADH-binding subunit of NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Formation of a partially assembled enzyme without FMN and the iron-sulphur cluster N-3.
Eur. J. Biochem. **220** : 551-558.
- Fleming MD, Campagna DR, Haslett JN, Trenor CC III et Andrews NC (2001)**
A mutation in a mitochondrial transmembrane protein is responsible for the pleiotropic hematological and skeletal phenotype of flexed-tail (f/f) mice.
Genes Dev. **15** : 652-657.
- Finel M, Skehel JM, Albracht SP, Fearnley IM et Walker JE (1992)**
Resolution of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme.
Biochemistry **31** : 11425-11434.
- Finel M, Majander AS, Tyynela J, De Jong AM, Albracht SP et Wikstrom M (1994)**
Isolation and characterisation of subcomplexes of the mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).
Eur J Biochem. **226** : 237-242.
- Frattoni A, Faranda S, Bagnasco L, Patrosso C, Nulli P, Zucchi I et Vezzone P (1997)**
Identification of a new member (ZNF183) of the Ring finger gene family in Xq24-25.
Gene **192** : 291-298.

Friedrich T, Brors B, Hellwig P, Kintscher L, Rasmussen T, Scheide D, Schulte U, Mantele W et Weiss H (2000)

Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).

Biochim. Biophys. Acta **1459** : 305-309.

Galvagni F, Cartocci E et Oliviero S (1998)

The dystrophin promoter is negatively regulated by YY1 in undifferentiated muscle cells.

J. Biol. Chem. **273** : 33708-33713.

Gaston K et Fried M (1995)

CpG methylation has differential effects on the binding of YY1 and ETS proteins to the bi-directional promoter of the *Surf-1* and *Surf-2* genes.

Nucleic Acids Res. **23** : 901-909.

Genuario RR, Kelley DE et Perry RP (1993)

Comparative utilization of transcription factor GABP by the promoters of ribosomal protein genes *rpL30* and *rpL32*.

Gene Expr. **3** : 279-288.

Gieffers C, Koriath F, Heimann P, Ungermann C et Frey J (1997)

Mitofilin is a transmembrane protein of the inner mitochondrial membrane expressed as two isoforms.

Exp Cell Res. **232** : 395-399.

Giles RE, Blanc H, Cann RM et Wallace DC (1980)

Maternal inheritance of the human mitochondrial DNA.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA **83** : 9611-9615.

Gomez-Cuadrado A, Martin M, Noël M et A Ruiz-Carillo (1995)

Initiation binding receptor, a factor that binds to the transcription initiation site of the histone *h5* gene, is a glycosylated member of a family of cell growth regulators.

Mol. Cell. Biol. **15** : 6670-6685.

Gong Q, Brown LJ et MacDonald MJ (2000)

Functional analysis of two promoters for the human mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase gene.

J Biol Chem. **275** : 38012-38021.

Gopalakrishnan L et Scarpulla RC (1994)

Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression.

J Biol Chem. **269** : 105-113.

Görg A, Postel W, Weser J, Günther S, Strahler SR, Hanash SM et Somerlot L (1987)

Elimination of point streaking on silver stained two-dimensional gels by addition of iodoacetamide to the equilibration buffer.

Electrophoresis **8** : 122-124.

Görg A, Obermaier C, Boguth G, Csordas A, Diaz JJ et Madjar JJ (1997)

Very alkaline immobilized pH gradients for two-dimensional electrophoresis of ribosomal and nuclear proteins.

Electrophoresis **18** : 328-337.

Görg A, Boguth G, Obermaier C et Weiss W (1998)

Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient.

Electrophoresis **19** : 1516-1519.

Görg A, Obermaier C, Boguth G et Weiss W (1999)

Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis* **20** : 712-717.

Grigorieff N (1998)

Three-dimensional structure of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J. Mol. Biol.* **277** : 1033-1046.

Grossman LI, Seelan RS et Jaradat SA (1998)

Transcriptional regulation of mammalian cytochrome c oxidase genes. *Electrophoresis* **19** : 1254-1259.

Guerra C, Roncero C, Porras A, Fernandez M et Benito M (1996)

Triiodothyronine induces the transcription of the uncoupling protein gene and stabilizes its mRNA in fetal rat brown adipocyte primary cultures. *J Biol Chem.* **271** : 2076-2081.

Gugneja S, Virbasius JV et Scarpulla RC (1995)

Four structurally distinct, non-DNA-binding subunits of human nuclear respiratory factor 2 share a conserved transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol.* **15** : 102-111.

Gugneja S, Virbasius CM et Scarpulla RC (1996)

Nuclear respiratory factors 1 and 2 utilize similar glutamine-containing clusters of hydrophobic residues to activate transcription. *Mol Cell Biol.* **16** : 5708-5716.

Gugneja S et Scarpulla RC (1997)

Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J Biol Chem.* **272** : 18732-18739.

Hatefi Y (1985)

The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* **54** : 1015-1069.

He XY, Merz G, Yang YZ, Pullakart R, Mehta P, Schulz H et Yang SY (2000)

Function of human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase in androgen metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1484** : 267-277.

Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL et Kolchanov NA (1998)

Databases on Transcriptional Regulation: TRANSFAC, TRRD, and COMPEL. *Nucleic Acids Res.* **26** : 364-370.

Herzig RP, Scacco S et Scarpulla RC (2000)

Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J. Biol. Chem.* **275** : 13134-13141.

Herzig S, Long F, Jhala US, Hedrick S, Quinn R, Bauer A, Rudolph D, Schutz G, Yoon C, Puigserver P, Spiegelman B et Montminy M (2001)

CREB regulates hepatic gluconeogenesis through the coactivator PGC-1. *Nature* **413** : 179-183.

- Holt IJ, Lorimer HE et Jacobs HT (2000)**
Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA.
Cell **100** : 515-524.
- Huo L et Scarpulla RC (1999)**
Multiple 5'-untranslated exons in the nuclear respiratory factor 1 gene span 47 kb and contribute to transcript heterogeneity and translational efficiency.
Gene **233** : 213-224.
- Hyde-DeRuyscher RP, Jennings E et Shenk T (1995)**
DNA binding sites for the transcriptional activator/repressor YY1.
Nucleic Acids Res. **23** : 4457-4465.
- Hyslop SJ, Duncan AM, Pitkanen S et Robinson BH (1996)**
Assignment of the PSST subunit gene of human mitochondrial complex I to chromosome 19p13.
Genomics **37** : 375-380.
- Janssen R, Smeitink J, Smeets R et van Den Heuvel L (2002)**
CIA30 complex I assembly factor: a candidate for human complex I deficiency?
Hum Genet. **110** : 264-270.
- Jo SH, Son MK, Koh HJ, Lee SM, Song IH, Kim YO, Lee YS, Jeong KS, Kim WB, Park JW, Song BJ, Huh TL et Huhe TL (2001)**
Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase.
J Biol Chem. **276** : 16168-16176.
- Journet A, Chapel A, Kieffer S, Louwagie M, Luche S et Garin J (2000)**
Towards a human repertoire of monocytic lysosomal proteins.
Electrophoresis **21** : 3411-3419.
- Kashani-Poor N, Zwicker K, Kerscher S et Brandt U (2001)**
A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I.
J Biol Chem. **276** : 24082-24087.
- Kerscher S, Kashani-Poor N, Zwicker K, Zickermann V et Brandt U (2001)**
Exploring the catalytic core of complex I by *Yarrowia lipolytica* yeast genetics.
J Bioenerg Biomembr. **33** : 187-196.
- King MP et Attardi G (1989)**
Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation.
Science **246** : 500-503.
- Koc EC, Burkhart W, Blackburn K, Moyer MB, Schlatzer DM, Moseley A et Spremulli LL (2001)**
The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present.
J Biol Chem. **276** : 43958-43969.
- Küffner R, Rohr A, Schmiede A, Krull C et Schulte U (1998)**
Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I).
J Mol Biol. **283** : 409-417.

Langen H, Berndt P, Roder D, Cairns N, Lubec G et Fountoulakis M (1999)

Two-dimensional map of human brain proteins.
Electrophoresis **20** : 907-916.

Lee TC, Shi Y et Schwartz RJ (1992)

Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal α -actin transcription in embryonic myoblasts.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89** : 9814-9818.

Lee JS, Galvin KM et Shi Y (1993)

Evidence for physical interaction between the zinc-finger transcription factors YY1 and Sp1.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **90** : 6145-6149.

Lenaz G. (2001)

The mitochondrial production of reactive oxygen species: mechanism and implications in human pathology.
IUBMB Life **52** : 159-164.

Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, Genova ML, Giuliano G, Pich MM, Paolucci U, Castelli GP et Ventura B (2002)

Role of mitochondria in oxidative stress and aging.
Ann N Y Acad Sci. **959** : 199-213.

Lenka N, Basu A, Mullick J et Avadhani NG (1996)

The role of an E box binding basic helix loop helix protein in the cardiac muscle-specific expression of the rat cytochrome oxidase subunit VIII gene.
J Biol Chem. **271** : 30281-30289.

Li R, Hodny Z, Luciakova K et Nelson BD (1996a)

Expression of the human cytochrome c1 gene is controlled through multiple Sp1-binding sites and an initiator region.
Eur. J. Biochem. **241** : 649-656.

Li R, Hodny Z, Luciakova K, Barath P et Nelson BD (1996b)

Sp1 activates and inhibits transcription from separate elements in the proximal promoter of the human adenine nucleotide translocase 2 (*ANT2*) gene.
J Biol Chem. **271** : 18925-18930.

Li B, Holloszy JO et Semenkovich CF (1999)

Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinic synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells.
J Biol Chem. **274** : 17534-17540.

Lin E, Graziano JH et Fryer GA (2001)

The regulation of the 75 kDa subunit of mitochondrial complex I by iron.
J. Biol. Chem. **276** : 27685-27692.

Lin J, Puigserver P, Donovan J, Tarr P et Spiegelman BM (2002)

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor.
J Biol Chem. **277** : 1645-1648.

Loeffen J, Smeitink J, Triepels R, Smeets R, Schuelke M, Sengers R, Trijbels F, Hamel B, Mullaart R et van den Heuvel L (1998)

The first nuclear-encoded complex I mutation in a patient with Leigh syndrome.
Am. J. Hum. Genet. **63** : 1598-1608.

Lopez MF, Kristal BS, Chernokalskaya E, Lazarev A, Shestopalov AI, Bogdanova A et Robinson M (2000)

High-throughput profiling of the mitochondrial proteome using affinity fractionation and automation.

Electrophoresis **21** : 3427-3240.

Lowell BB et Spiegelman BM (2000)

Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis.

Nature **404** : 652-660.

Malone JP, Radabaugh MR, Leimgruber RM et Gerstenecker GS (2001)

Practical aspects of fluorescent staining for proteomic applications.

Electrophoresis **22** : 919-932.

Marie S, Race V, Nassogne MC, Vincent MF et Van den Berghe G (2002)

Mutation of a nuclear respiratory factor 2 binding site in the 5' untranslated region of the *ADSL* gene in three patients with adenylosuccinate lyase deficiency.

Am J Hum Genet. **71** : 14-21.

Martin ME, Chinenov Y, Yu M, Schmidt TK et Yang XY (1996)

Redox regulation of GA-binding protein-alpha DNA binding activity.

J Biol Chem. **271** : 25617-25623

McCulloch V, Seidel-Rogol BL et Shadel GS (2002)

A human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine.

Mol Cell Biol. **22** : 1116-1125.

Mitchell P (1961)

Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism.

Nature **191** : 144-148.

MitoPick: Complex I database.

Martinez P. Laboratoire de Bioénergétique Cellulaire et Pathologique, CEA Grenoble, F

www-dsv.cea.fr/thema/MitoPick/Default.html

Monsalve M, Wu Z, Adelmant G, Puigserver P, Fan M et Spiegelman BM (2000)

Direct coupling of transcription and mRNA processing through the thermogenic coactivator PGC-1.

Mol. Cell **6** : 307-316.

Montavi R (1999)

The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y.

Gene **239** : 15-27.

Myers SJ, Peters J, Huang Y, Comer MB, Barthel F et Dingledine R (1998)

Transcriptional regulation of the *GluR2* gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements.

J. Neurosci. **18** : 6723-6739.

Neuhoff V, Arold N, Taube D et Ehrhardt W (1988)

Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250.

Electrophoresis **9** : 255-262.

O'Connell KL et Stults JT (1997)

Identification of mouse liver proteins on two-dimensional electrophoresis gels by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of *in situ* enzymatic digests. *Electrophoresis* **18** : 349-359.

Ohlmeier S, Scharf C et Hecker M (2000)

Alkaline proteins of *Bacillus subtilis*: first steps towards a two-dimensional alkaline master gel. *Electrophoresis* **21** : 3701-3709.

Ohnishi T (1998)

Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1364** : 186-206.

Ohnishi T, Sled VD, Yano T, Yagi T, Burbaev DS et Vinogradov AD (1998)

Structure-function studies of iron-sulfur clusters and semiquinones in the NADH-Q oxidoreductase segment of the respiratory chain. *Biochim Biophys Acta* **1365** : 301-8.

Okun JG, Zickermann V et Brandt U (1999)

Properties of the common inhibitor-binding domain in mitochondrial NADH-dehydrogenase (complex I). *Biochem Soc Trans.* **27** : 596-601.

Papa S, Scacco S, Sardanelli AM, Vergari R, Papa F, Budde S, van den Heuvel L et Smeitink J (2001)

Mutation in the *NDUFS4* gene of complex I abolishes cAMP-dependent activation of the complex in a child with fatal neurological syndrome. *FEBS Lett.* **489** : 259-262.

Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F et Liuni S (2001)

Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene.* **276** : 73-81.

Peterson GC, Souza AE et Parsons M (1993)

Characterization of a *Trypanosoma brucei* nuclear gene encoding a protein homologous to a subunit of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Mol Biochem Parasitol.* **58** : 63-70.

Petruzzella V, Vergari R, Puzziferri I, Boffoli D, Lamantea E, Zeviani M et Papa S (2001)

A nonsense mutation in the *NDUFS4* gene encoding the 18 kDa (AQDQ) subunit of complex I abolishes assembly and activity of the complex in a patient with Leigh-like syndrome. *Hum Mol Genet.* **10** : 529-535.

Pfanner N et Geissler A (2001)

Versatility of the mitochondrial protein import machinery. *Nature Rev.* **2** : 339-349.

Pitkänen S et Robinson BH (1996)

Mitochondrial complex I deficiency leads to increased production of superoxide radicals and induction of superoxide dismutase. *J Clin Invest.* **98** : 345-351.

Procaccio V, Depetris D, Soularue P, Mattei MG, Lunardi J et Issartel JP (1997)

cDNA sequence and chromosomal localization of the *NDUFS8* human gene coding for the 23 kDa subunit of the mitochondrial complex I. *Biochim. Biophys. Acta* **1351** : 37-41.

Procaccio V, Mousson B, Beugnot R, Duborjal H, Feillet F, Putet G, Pignot-Paintrand I, Lombes A, De Coo R, Smeets H, Lunardi J et Issartel JP (1999)
Nuclear DNA origin of mitochondrial complex I deficiency in fatal infantile lactic acidosis evidenced by transnuclear complementation of cultured fibroblasts.
J Clin Invest. **104** : 83-92.

Procaccio V, Lescuyer P, Bourges I, Beugnot R., Duborjal H, Depetris D, Mousson M., Montfort MF, Smeets H, De Coo R et Issartel JP (2000)
Human *NDUFS3* gene coding for the 30-kDa subunit of mitochondrial complex I: genomic organization and expression.
Mamm Genome **11** : 808-810.

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M et Spiegelman BM (1998)
A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis.
Cell **92** : 829-839.

Puigserver P, Adelmant G, Wu Z, Fan M, Xu J, O'Malley B et Spiegelman BM (1999)
Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking.
Science **286** : 1368-1371.

Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E et Werner T (1995)
MatInd and MatInspector - New fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data.
Nucleic Acids Res. **23** : 4878-4884.

Rabilloud T, Valette C et Lawrence JJ (1994)
Sample application by in-gel rehydration improves the resolution of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension.
Electrophoresis **15** : 1552-1558.

Rabilloud T, Adessi C, Giraudel A et Lunardi J (1997)
Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.
Electrophoresis **18** : 307-316.

Rabilloud T, Kieffer S, Procaccio V, Louwagie M, Courchesne PL, Patterson SD, Martinez P, Garin J et Lunardi J (1998)
Two-dimensional electrophoresis of human placental mitochondria and protein identification by mass spectrometry: toward a human mitochondrial proteome.
Electrophoresis **19** :1006-1014.

Rabilloud T et Charmont S (1999)
in *Proteome Research: Two-dimensional gel electrophoresis and identification methods* (Rabilloud T.ed) Springer verlag, Heidelberg, pp107-126.

Rabilloud T, Strub JM, Luche S, van Dorselaer A et Lunardi J (2001)
A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II Tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels.
Proteomics **1** : 699-704.

Rabilloud T, Heller M, Gasnier F, Luche S, Rey C, Aebersold R, Benahmed M, Louisot P et Lunardi J (2002a)
Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for *in vivo* overoxidation of peroxiredoxins at their active site.
J Biol Chem. **277** : 19396-19401.

Rabilloud T, Strub JM, Carte N, Luche S, Van Dorselaer A, Lunardi J, Giege R et Florentz C (2002b)

Comparative proteomics as a new tool for exploring human mitochondrial tRNA disorders. *Biochemistry* **41** : 144-150.

Raha S et Robinson BH (2000)

Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci.* **25** : 502-508.

Raha S et Robinson BH (2001)

Mitochondria, oxygen free radicals, disease and apoptosis. *Am J. Med. Genet.* **106** : 62-70.

Rasmussen T, Scheide D, Brors B, Kintscher L, Weiss H et Friedrich T (2001)

Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry* **40** : 6124-6131.

Ricquier D et Bouillaud F (2000)

Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol.* **529** : 3-10.

Righetti PG (1990)

Immobilized pH Gradients: Theory and Methodology. Elsevier, Amsterdam 1990 pp. 66-85.

Rodriguez-Pena A, Escriva H, Handler AC et Vallejo CG (2002)

Thyroid hormone increases transcription of GA-binding protein/nuclear respiratory factor-2 alpha-subunit in rat liver. *FEBS Lett.* **514** : 309-314.

Salim S, Filling C, Martensson E et Oppermann UC (2000)

Lack of quinone reductase activity suggests that amyloid-beta peptide/ERAB induced lipid peroxidation is not directly related to production of reactive oxygen species by redoxcycling. *Toxicology* **144** : 163-168.

Santoni V, Molloy M et Rabilloud T (2000)

Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* **21** : 1054-1070.

Sazanov LA, Peak-Chew SY, Fearnley IM et Walker JE (2000)

Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry* **39** : 7229-7235.

Scacco S, Vergari R, Scarpulla RC, Technikova-Dobrova Z, Sardanelli A, Lambo R, Lorusso V et Papa S (2000)

cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18-kDa (IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures. *J. Biol. Chem.* **275** : 17518-17582.

Scarpulla RC (1997)

Nuclear control of respiratory chain expression in mammalian cells. *J. Bioenerg. Biomembr.* **29** : 109-119.

- Scarpulla RC** (2002)
Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis.
Biochim Biophys Acta **1576** : 1-14.
- Schaefer L, Engman H et Miller JB** (2000)
Coding sequence, chromosomal localization, and expression pattern of NRF1: the mouse homolog of *Drosophila erect wing*.
Mamm Genome **11** : 104-110.
- Schubert M, Petersson UA, Haas BJ, Funk C, Schroder WP et Kieselbach T** (2002)
Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*.
J Biol Chem. **277** : 8354-8365.
- Schuler F, Yano T, Di Bernardo S, Yagi T, Yankovskaya V, Singer TP et Casida JE** (1999)
NADH-quinone oxidoreductase: PSST subunit couples electron transfer from iron-sulfur cluster N2 to quinone.
Proc Natl Acad Sci U S A **96** : 4149-4153.
- Schuler F et Casida JE** (2001)
Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling.
Biochim Biophys Acta **1506** : 79-87.
- Seelan RS, Gopalakrishnan L, Scarpulla RC et Grossman LI** (1996)
Cytochrome c oxidase subunit VIIa liver isoform. Characterization and identification of promoter elements in the bovine gene.
J. Biol. Chem. **271** : 2112-2120.
- Seelan RS et Grossman LI** (1997)
Structural organization and promoter analysis of the bovine cytochrome c oxidase subunit VIIc gene.
J. Biol. Chem. **272** : 10175-10181.
- Seto E, Lewis B et Shenk T** (1993)
Interaction between transcription factors Sp1 and YY1.
Nature **365** : 462-464.
- Shadel GS et Clayton DA** (1997)
Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates.
Annu. Rev. Biochem. **66** : 409-35.
- Sinha P, Poland J, Schnolzer M et Rabilloud T** (2001)
A new silver staining apparatus and procedure for matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight analysis of proteins after two-dimensional electrophoresis.
Proteomics. **1** : 835-40.
- Skehel JM , Fearnley IM et Walker JE** (1998)
NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria: sequence of a novel 17.2 kDa subunit.
FEBS Lett. **438** : 301-305.
- Solecki D, Bernhardt G, Lipp M et Wimmer E** (2000)
Identification of a nuclear respiratory factor-1 binding site within the core promoter of the human polio virus receptor/CD155 gene.
J Biol Chem. **275** : 12453-12462.

- Sousa R, Barquera B, Duarte M, Finel M et Videira A (1999)**
Characterisation of the last Fe-S cluster-binding subunit of *Neurospora crassa* complex I.
Biochim Biophys Acta **1411** : 142-146.
- Suske G (1999)**
The Sp-family of transcription factors.
Gene **238** : 291-300.
- Taanman JW (1999)**
The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication.
Biochim. Biophys. Acta **1410** : 103-123.
- Takahashi Y, Kako K, Arai H, Ohishi T, Inada Y, Takehara A, Fukamizu A et Munekata E (2002)**
Characterization and identification of promoter elements in the mouse *COX17* gene.
Biochim Biophys Acta **1574** : 359-364.
- Taniguchi M, Hara T et Honda H (1986)**
Similarities between rat liver mitochondrial and cytosolic glutathione reductases and their apoenzyme accumulation in riboflavin deficiency.
Biochem. Int. **13** : 447-454.
- Tatton WG et Olanow CW (1999)**
Apoptosis in neurodegenerative diseases: the role of mitochondria.
Biochim Biophys Acta **1410** : 195-213.
- Thomas MJ et Seto E (1999)**
Unlocking the mechanisms of transcription factor YY1: are chromatin modifying enzymes the key ?
Gene **236** : 197-208.
- Tonella L, Hoogland C, Binz PA, Appel RD, Hochstrasser DF et Sanchez JC (2001)**
New perspectives in the *Escherichia coli* proteome investigation.
Proteomics **1** : 409-423.
- Triepels RH, van den Heuvel LP, Loeffen JL, Buskens CA, Smeets RJ, Rubio Gozalbo ME, Budde SM, Mariman EC, Wijburg FA, Barth PG, Trijbels JM et Smeitink JA (1999)**
Leigh syndrome associated with a mutation in the *NDUFS7* (PSST) nuclear encoded subunit of complex I.
Ann Neurol. **45** : 787-790.
- van den Heuvel L, Ruitenbeek W, Smeets R, Gelman-Kohan Z, Elpeleg O, Loeffen J, Trijbels F, Mariman E, de Bruijn D et Smeitink J (1998)**
Demonstration of a new pathogenic mutation in human complex I deficiency: a 5-bp duplication in the nuclear gene encoding the 18-kD (AQDQ) subunit.
Am J Hum Genet. **62** : 262-268.
- Vega RB, Huss JM et Kelly DP (2000)**
The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes.
Mol Cell Biol. **20** : 1868-1876.

Villena JA, Martin I, Vinas O, Cormand B, Iglesias R, Mampel T, Giralt M et Villarroya F (1994)

ETS transcription factors regulate the expression of the gene for the human mitochondrial ATP synthase beta-subunit.
J Biol Chem. **269** : 32649-32654.

Virbasius JV et Scarpulla RC (1991)

Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene.
Mol. Cell. Biol. **11** : 5631-5638.

Virbasius CA, Virbasius JV et Scarpulla RC (1993a)

NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators.
Genes Dev. **7** : 2431-4245.

Virbasius JV, Virbasius CA et Scarpulla RC (1993b)

Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters.
Genes Dev. **7** : 380-392.

Virbasius JV et Scarpulla RC (1994)

Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **91** : 1309-1313.

Vogel JL et Kristie TM (2000)

The novel coactivator C1 (HCF) coordinates multiprotein enhancer formation and mediates transcription activation by GABP.
EMBO J. **19** : 683-690.

Walker JE (1992)

The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chain.
Q. Rev. Biophys. **25** : 253-324.

Walker JE (1995)

Determination of the structures of respiratory enzyme complexes from mammalian mitochondria.
Biochim Biophys Acta **1271** : 221-227.

Walowitz JL, Bradley ME, Chen S et Chen T (1998)

Proteolytic regulation of the zinc finger transcription factor YY1, a repressor of muscle-restricted gene expression.
J. Biol. Chem. **273** : 6656-6661.

Wan B et Moreadith RW (1995)

Structural characterization and regulatory element analysis of the heart isoform of cytochrome c oxidase VIa.
J Biol Chem. **270** : 26433-26440.

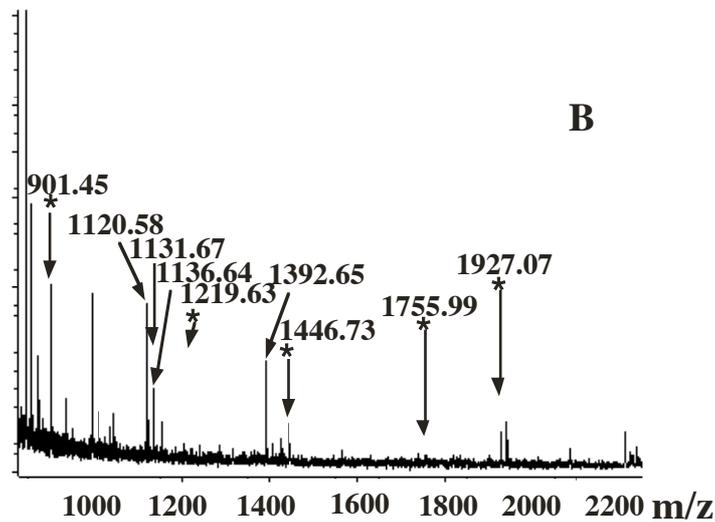
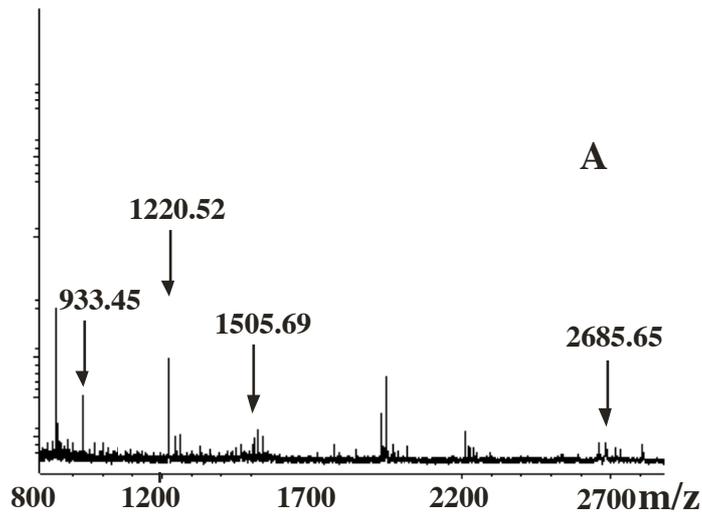
Wasinger VC, Pollack JD et Humphery-Smith I (2000)

The proteome of *Mycoplasma genitalium* Chaps-soluble component.
Eur J Biochem. **267** : 1571-1582.

- Wegner SA, Ehrenberg PK, Chang G, Dayhoff DE, Sleeker AL et Michael NL (1998)**
Genomic organization and functional characterization of the chemokine receptor CXCR4, a major entry co-receptor for human immunodeficiency virus type 1.
J Biol Chem. **273** : 4754-4760.
- Weidner U, Geier S, Ptock A, Friedrich T, Leif H et Weiss H (1993)**
The gene locus of the proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase in *Escherichia coli*: organization of the 14 genes and relationship between the derived proteins and subunits of the mitochondrial complex I.
J. Mol. Biol. **233** : 109-122.
- Wilkins MR, Gasteiger E, Sanchez JC, Bairoch A et Hochstrasser DF (1998)**
Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number.
Electrophoresis **19** : 1501-1505.
- Wong-Riley M, Guo A, Bachman NJ et Lomax MI (2000)**
Human *COX6A1* gene: promoter analysis, cDNA isolation and expression in the monkey brain.
Gene **247** : 63-75.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC et Spiegelman BM (1999)**
Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1.
Cell **98** : 115-124.
- Xu X, Matsuno-Yagi A et Yagi T (1992)**
Gene cluster of the energy-transducing NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*: characterization of four structural gene products.
Biochemistry **31** : 6925-6932.
- Yan SD, Fu J, Soto C, Chen X, Zhu H, Al-Mohanna F, Collison K, Zhu A, Stern E, Saido T, Tohyama M, Ogawa S, Roher A et Stern D (1997)**
An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease.
Nature **389** : 689-695.
- Yano T, Sled VD, Ohnishi T et Yagi T (1994a)**
Expression of the 25-kilodalton iron-sulfur subunit of the energy-transducing NADH-ubiquinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*.
Biochemistry **33** : 494-499.
- Yano T, Sled VD, Ohnishi T et Yagi T (1994b)**
Identification of amino acid residues associated with the [2Fe-2S] cluster of the 25 kDa (NQO2) subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*.
FEBS Lett. **354** : 160-164.
- Yano T, Yagi T, Sled VD et Ohnishi T (1995)**
Expression and characterization of the 66-kilodalton (NQO3) iron-sulfur subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase of *Paracoccus denitrificans*.
J Biol Chem. **270** : 18264-18270.

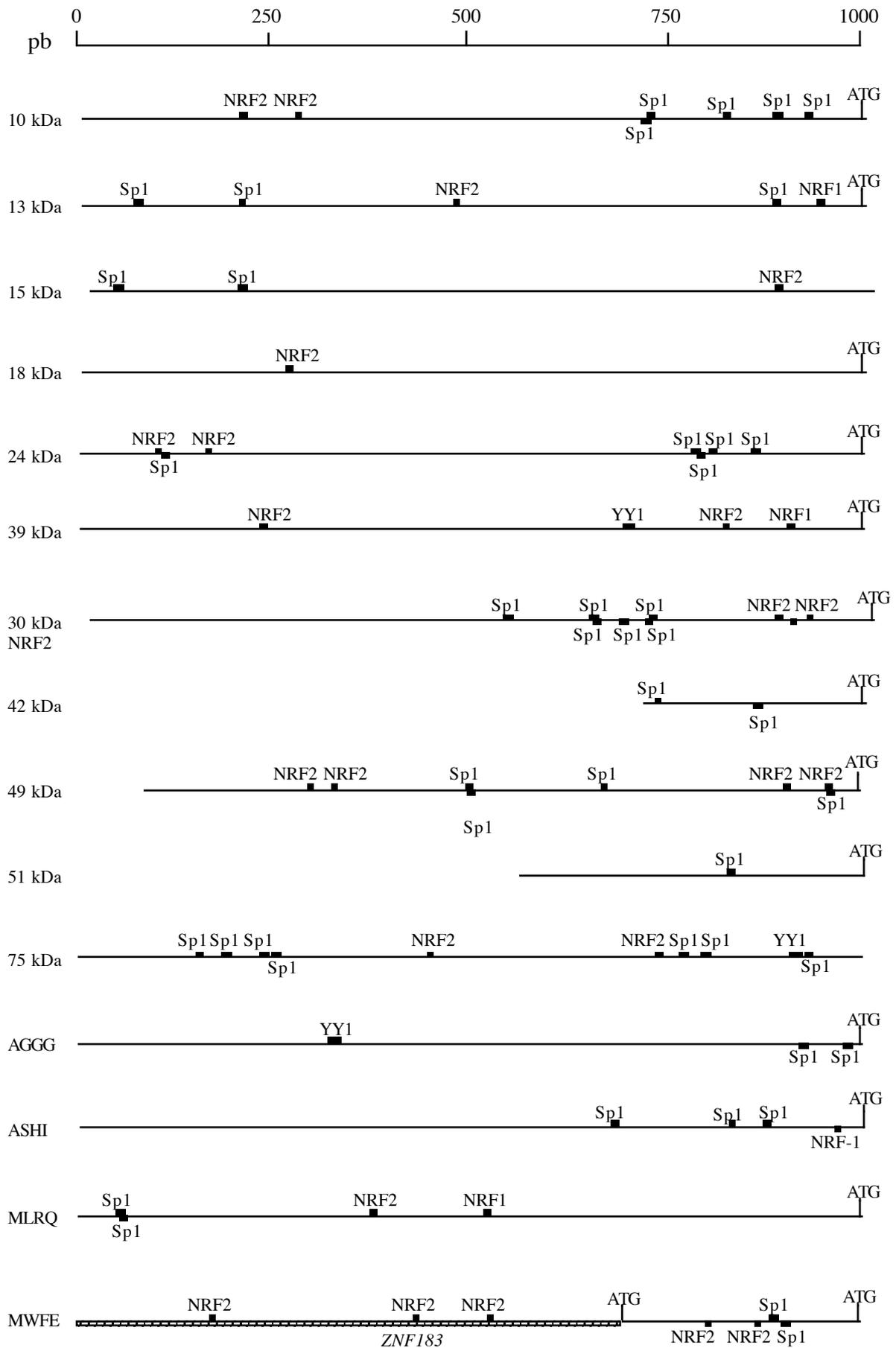
- Yano T, Magnitsky S, Sled VD, Ohnishi T et Yagi T (1999)**
Characterization of the putative 2x[4Fe-4S]-binding NQO9 subunit of the proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase (NDH-1) of *Paracoccus denitrificans*. Expression, reconstitution, and EPR characterization.
J Biol Chem. **274** : 28598-28605.
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB et Spiegelman BM (2001)**
Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1.
Nature **413** : 131-138.
- Yu M, Jaradat SA et Grossman LI (2002)**
Genomic organization and promoter regulation of human cytochrome c oxidase subunit VII heart/muscle isoform (COX7AH).
Biochim Biophys Acta **1574** : 345-353.
- Zaid A, Li R, Luciakova K, Barath P, Nery S et Nelson BD (1999)**
On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes.
J. Bioenerg. Biomembr. **31** : 129-135.
- Zhang C et Wong-Riley MT (2000)**
Depolarizing stimulation upregulates GA-binding protein in neurons: a transcription factor involved in the bigenomic expression of cytochrome oxidase subunits.
Eur J Neurosci. **12** : 1013-1023.

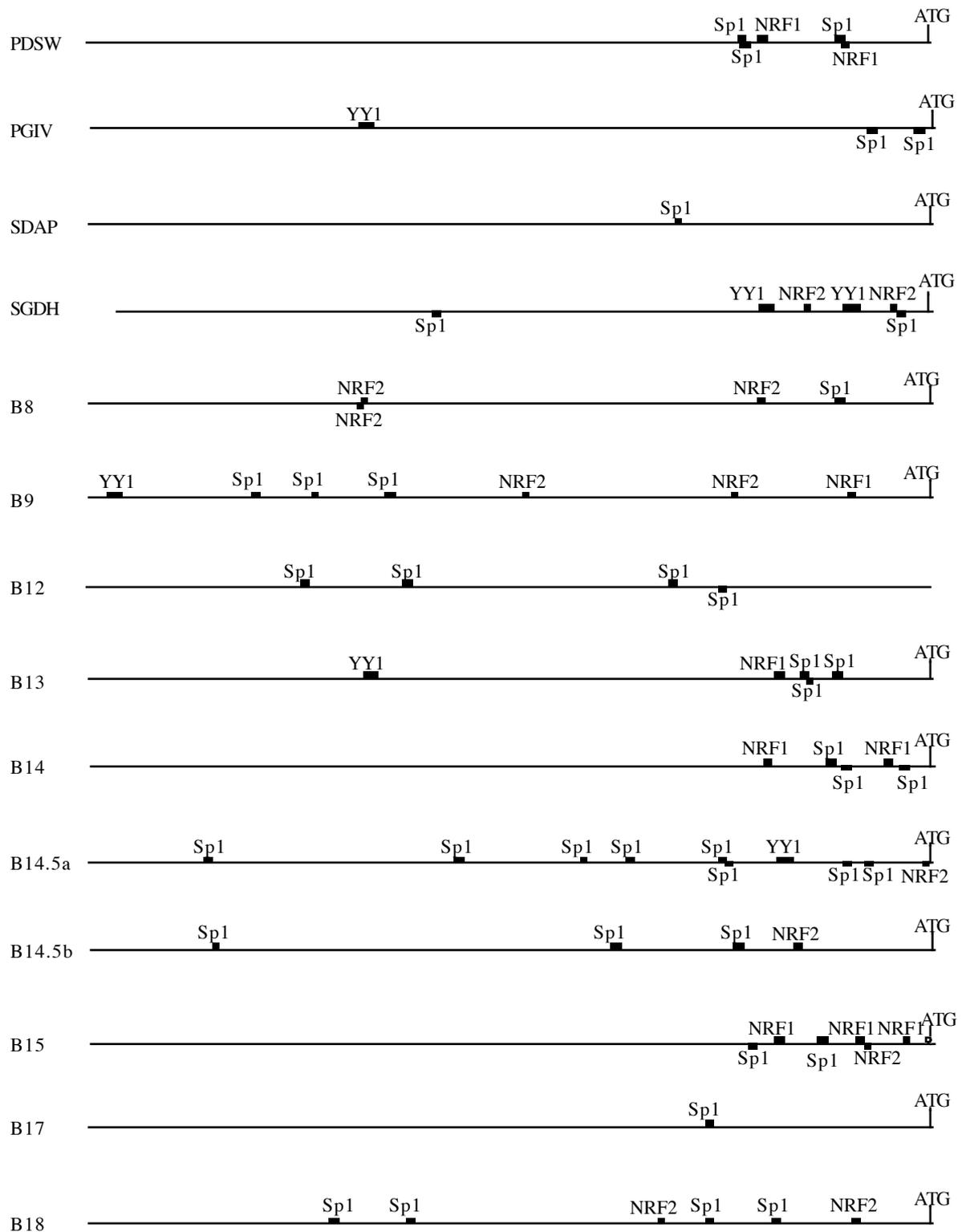
ANNEXES



Annexe I : Spectre de masse MALDI de la digestion trypsique de la sous-unité NUML (MLRQ) du complexe I et de l'isoforme ANT2 de l'échangeur ATP/ADP.

Les spectres de masse MALDI de deux protéines mitochondriales sont présentés. Les peptides utilisés pour l'identification sont indiqués par une flèche. (A) NUML est une petite protéine (< 10 kDa). (B) ANT2 est une protéine de la membrane interne contenant de multiples hélices transmembranaires. Les peptides marqués d'une étoile correspondent à des segments d'hélices transmembranaires : 1219,63 (189-199), 1446,74 (81-92), 1755,99 (281-296), 1927,09 (172-188).





Annexe II : Sites potentiels de fixation des facteurs de transcription NRF-1, NRF-2, YY1 et Sp1 présents dans les séquences 5' de 29 gènes nucléaires du complexe I mitochondrial humain. La recherche des sites a été réalisée avec les logiciels TFSEARCH et MatInspector (Akiyama ; Quandt et al., 1995 ; Heinemeyer et al., 1998). Les séquences génomiques utilisées sont disponibles dans MitoPick. Le nom de la sous-unité est indiqué à gauche. ATG : codon initiateur. Lorsque le codon ATG n'est pas indiqué, la séquence est limitée en aval par l'extrémité 3 de l'exon 1 non codant. La séquence codante du gène *ZNF183* (Frattini et al., 1997) est indiquée par un rectangle hachuré.

Résumé

La NADH:ubiquinone oxydoréductase (complexe I) est le plus gros complexe enzymatique du système mitochondrial d'oxydation phosphorylante (43 sous-unités chez l'homme). Très peu de données sont disponibles concernant les mécanismes régulant l'expression de ces protéines.

Cette étude a été initiée par l'étude des promoteurs de deux gènes du complexe I mitochondrial humain. Les résultats montrent que le gène *NDUFS8* qui code pour la sous-unité 23 kDa (TYKY) est transcrit sous le contrôle des facteurs de transcription YY1 et Sp1 tandis que le gène *NDUFS7* codant pour la sous-unité 20 kDa (PSST) est régulé par NRF-1 et Sp1.

Dans la deuxième partie de ce travail, une méthode d'analyse du protéome mitochondrial humain par électrophorèse bidimensionnelle a été développée. Le but est d'aborder de manière globale et sans a priori l'expression des protéines du complexe I : déterminer qui est régulé et comment en réponse à un stimulus déterminé?

Des cartes de référence ont été développées à partir de mitochondries extraites de placenta humain en utilisant deux types de gradient de pH : l'un est adapté aux protéines acides et neutres, l'autre aux protéines basiques. Sur ces cartes, 85 protéines mitochondriales ont été identifiées par spectrométrie de masse dont 17 sous-unités du complexe I. Cette technique d'analyse protéomique a ensuite été utilisée pour étudier la régulation de l'expression des protéines mitochondriales par le fer. Sur le plan technique, les premiers résultats sont encourageants : les gels d'électrophorèse bidimensionnelle préparés avec des mitochondries extraites de cellules en culture sont de bonne qualité et des variations reproductibles de l'expression de sous-unités du complexe I et d'autres protéines mitochondriales ont pu être détectées. Sur le plan fondamental, les données obtenues sont préliminaires. Il sera nécessaire de réaliser de nouvelles expériences pour confirmer les premières observations et analyser la cinétique des variations détectées.

Mots clés : Mitochondrie ; NADH:ubiquinone oxydoréductase ; complexe I humain ; régulation de l'expression ; transcription ; TYKY ; PSST ; NRF-1 ; YY1 ; Sp1 ; protéome

Study of the expression of the nuclear genes encoding human mitochondrial complex I subunits

NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is the largest enzymatic complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation system (43 human subunits). Few data are available concerning the regulation mechanisms controlling the expression of these proteins.

This thesis started with the study of the promoters of two human complex I genes. The results show that the transcription of *NDUFS8* gene encoding the 23 kDa (TYKY) subunit is under the control of the YY1 and Sp1 transcription factors, while the *NDUFS7* gene encoding the 20 kDa (PSST) subunit is regulated by NRF-1 and Sp1.

The second part of this study was oriented towards the development of an analytical method of the human mitochondrial proteome by two-dimensional electrophoresis. The aim is to approach the expression of the complex I proteins globally and without a priori : which subunits are regulated in response to an extracellular signal and how ?

Reference human proteome maps were built using mitochondria isolated from placenta in a system involving 2 pH gradients : one for acidic and neutral proteins, one for basic proteins. On those maps, 85 mitochondrial proteins have been identified using mass spectrometry techniques. Among them, 17 proteins are complex I subunits.

Proteomic analysis was then used to study regulation of mitochondrial proteins expression by iron. On a technical point of view, promising results were obtained : high quality 2D-gels were prepared using mitochondria isolated from culture cells and variations in the expression level of complex I and others mitochondrial proteins have been detected. On a biological point of view, preliminary data were obtained. New experiments have to be performed to confirm these results and to analyze the kinetics of the detected variations.