



10 novembre 2014

Mitochondries

Je vais reprendre la fin du cours de la semaine dernière en repartant brièvement de Demontis *et al.*, *Cell Reports* 7 : 1481-1494, 2014. Vous vous en souvenez. Il s'agit du vieillissement musculaire de la Drosophile et de l'introduction du nucléole, une structure nucléaire importante dans la biogenèse des ribosomes, donc dans la biosynthèse des protéines. Nous avons insisté sur le fait que des actions directement sur le muscle ont des effets de ralentissement du vieillissement d'autres tissus et prolongent la vie de la Drosophile.

J'avais introduit le facteur de transcription Mnt chez la Drosophile (de la famille helix-loop-helix), homologue du facteur MNT/MAD qui, chez les humains, réprime l'expression de plusieurs gènes de la biogenèse des ribosomes et de l'anabolisme (lié à la synthèse protéique). La protéine est présente dans le noyau des cellules de nombreux tissus, dont le muscle et les mouches mutantes pour Mnt ont une durée de vie réduite. Dans ce travail, les auteurs ont utilisé un driver Mhc-Gal4 pour exprimer Mnt dans les muscles squelettiques exclusivement. Cette surexpression, sans effet sur la nutrition ou la masse corporelle et musculaire, prolonge la vie des mouches et améliore leur capacité à grimper le long d'une paroi à un âge avancé. Une analyse transcriptome par μ array montre que les gènes réprimés par la surexpression de Mnt incluent des protéines ribosomales et des composants du nucléole. Cela suggère que le nucléole joue un rôle important dans la longévité liée à la surexpression de Mnt. J'attire votre attention, une fois encore, sur le fait que le gène n'est surexprimé que dans les muscles squelettiques mais que c'est l'animal entier dont la survie est prolongée, pas seulement celle de ses muscles.

C'est là un point essentiel qui réintroduit l'idée que les communications entre tissus jouent un rôle important dans le vieillissement. C'est sur cette base que les auteurs ont mesuré la taille du nucléole

(grâce à un marqueur – la fibrillarin) non seulement dans le tissu musculaire, mais aussi dans le tissu adipeux. La **DIA VI.2** démontre une baisse de la taille des nucléoles dans le tissu adipeux consécutive à la surexpression de Mnt dans le muscle. On constate que cette baisse se fait « naturellement » chez les mouches de 5 semaines. Il fallait donc identifier le ou les facteurs sécrétés par les muscles et responsables de cette activité systémique. Cela a été mené à l'aide d'un crible RNAi dirigé contre plusieurs cytokines et facteurs de croissance rassemblés sous le terme générique de myokines, parce qu'ils sont sécrétés par les muscles et adressés à d'autres tissus, chez l'humain. Ce qui est suivi est la survie (des mâles) et leur activité « d'escalade » des parois de verre des tubes dans lesquels les mouches sont élevées. Parmi ces myokines, une des plus actives est la myoglianin, de la famille TGF- β , un facteur sécrété par les cellules gliales et les cellules musculaires de la mouche et dont les orthologues humains sont GDF8 et GDF11.

Pour confirmer un rôle de la myoglianin dans le phénotype, les auteurs ont établi que ce gène était sous le contrôle de Mnt (**DIA VI.3**) puisque son expression diminue chez le mutant Mnt $^{-/-}$ (en haut à gauche) et augmente quand on surexprime Mnt (en haut à gauche et en bas à gauche avec un rapporteur luciférase du gène Mnt). Dans la même **DIA VI.3** (en haut à droite), on peut voir que les effets positifs de Mnt sur la survie et la dextérité sont abolis par un RNAi (2 RNAi différents en fait) dirigés contre la myoglianin, mais pas par des RNAi dirigés contre le gène *white* (control). La surexpression directe de myoglianin dans les muscles squelettiques (**DIA V.3 en bas à droite**) a les mêmes effets sur la survie et la dextérité. La **DIA VI.4** reprend ce résultat avec des contrôles supplémentaires mais surtout démontre un effet sur les ARN ribosomaux à la fois dans le tissu musculaire (où le gène est exprimé) mais aussi dans la tête et l'abdomen où il ne l'est pas et introduit les contrôles RNAi contre les gènes *white* et le gène myoglianin. On peut suivre ce qui se passe chez la mouche à travers l'expression des rRNA. Les inhibitions musculaire et non musculaire ont peu



d'effet chez les jeunes et un fort effet chez les vieux (en tout cas pour un des RNAi, d'où l'utilité d'en tester plusieurs. Ces effets se traduisent au niveau de la taille des nucléoles, y compris ceux du tissu adipeux (**DIA VI.5**). Même si ces expériences ne concernent que les mouches, on peut rappeler ici que, chez les mammifères, la myostatine et GDF11 sont présents dans la circulation et agissent sur tous les tissus

En conclusion de cette étude, on peut dire que Mnt a une action autonome sur le tissu musculaire, action qui passe par une réduction de l'activité du ribosome. Elle aussi, via la régulation de myokines, dont la myoglianin, a un effet systémique qui réduit aussi les niveaux de rRNA (via p38 MAPK, pour ceux que ces détails intéresseraient). Cette question nucléolaire est intéressante. Le nucléole est un régulateur positif crucial de l'anabolisme et son activité est réduite dans nombre de modèles qui augmentent la durée de vie non sans écho du côté de la restriction calorique et de la voie mTORC1 (la rapamycine si vous vous en souvenez). Ce rôle des ARN ribosomiaux dans le vieillissement va m'amener à vous présenter un autre papier sur le même thème par Larson *et al.*, *PLoS Genetics*, 8 : 110, 2012 et à faire le lien avec l'hétérochromatine dont je vous rappelle qu'elle constitue la part réprimée de la chromatine.

Dans ce papier les auteurs rappellent que le vieillissement des organismes s'accompagne de l'accumulation de défauts de l'ADN. Le mécanisme sous-jacent reste encore un peu obscur mais la théorie des radicaux libres est une des hypothèses principales. D'autres modèles existent – pas forcément en opposition – qui impliquent la sénescence programmée, la perte d'hétérochromatine, le raccourcissement des télomères, l'instabilité du génome, les apports nutritionnels (trop ou trop peu, qualité...), etc. Le modèle perte d'hétérochromatine proposé dès 1997 par Villeponteau (*Experimental gerontology* 32 : 383-394) est associé à une expression illégitime de gènes liés au vieillissement. Mais les modifications de l'hétérochromatine ne sont pas uniformes avec d'un côté la for-

mation de « foci » d'hétérochromatine associés au vieillissement (SAHF pour *Senescence associated Hétérochromatin Foci*) et de l'autre une perte globalisée d'hétérochromatine.

L'hétérochromatine est essentielle, cela a été démontré chez la Drosophile, pour la stabilité des séquences répétées (par exemple, mais pas seulement les éléments transposables, complets ou non) et de gènes codant pour l'ARN ribosomal. La perte d'hétérochromatine induit une déstructuration du nucléole et la formation de DNA circulaire extrachromosomal (ECC) avec des recombinaisons illégitimes au niveau du locus des ARN ribosomiaux. Ces données soutiennent l'idée d'un lien entre la formation de l'hétérochromatine et la longévité. Pour comprendre le rôle de l'hétérochromatine dans le vieillissement animal, les auteurs ont manipulé génétiquement chez la mouche les niveaux de HP1, un régulateur essentiel de la formation de l'hétérochromatine (j'y viens), et de la signalisation JAK/STAT (j'y viens aussi). Leurs résultats suggèrent que l'hétérochromatine empêche un vieillissement prématuré et supprime la recombinaison illégitime au niveau du locus rDNA et la synthèse non nécessaire de rRNA.

La première expérience a consisté à modifier les niveaux de HP1. Je le rappelle, HP1 est une protéine de la chromatine associée aux complexes répresseurs et donc importante dans la structuration de l'hétérochromatine. Réduire HP1 de moitié comme dans *Su(var)2055* qui est un mutant supprimeur de variégation (je suppose) diminue la durée de vie alors qu'un gain de fonction modéré (trop de HP1 provoque des anomalies du développement) de HP1 l'augmente (**DIA VI.6**). Dans cette même **DIA VI.6** est représentée une vision hyper simplifiée de la voie JAK/STAT où l'on constate que la kinase JAK (Janus kinase), fixée sur un récepteur et phosphorylée par le signal transduit par ce récepteur, se complexe avec STAT et phosphoryle STAT qui est adressée au noyau (homodimères ou hétérodimères) et active la transcription. Il y a plusieurs JAK et STAT. Ce passage par JAK/STAT est lié



au fait que cette voie est impliquée dans la formation de l'hétérochromatine. En fait, il y a deux voies, une canonique qui régule l'expression des gènes de façon directe et une non-canonique dans laquelle STAT non phosphorylée est essentielle à la formation de l'hétérochromatine et à la stabilité du génome. La **DIA VI.6** (B), montre que l'action de JAK/STAT sur la chromatine joue aussi sur la longévité (je n'entre pas dans les détails de la signification des différentes mutations qui permettent de séparer une action canonique d'une action non canonique). Pour en revenir à HP1, la même **DIA VI.6** montre – par-delà la longévité – le rôle de HP1 dans le comportement moteur et l'intégrité des muscles.

La question alors se pose du rôle de l'hétérochromatine dans la longévité. On peut, à juste titre, inférer de ce qui précède que l'hétérochromatine diminue, ce qui est d'ailleurs observé – on s'en souvient peut-être – dans les cas de *progeria* (mutation de la Lamin A). La **DIA VI.7** illustre la modification du marquage HP1 au niveau des *chromocenters* (régions denses en hétérochromatine et marqué par H3K9me3) au cours du vieillissement (entérocytes de l'épithélium intestinal). HP1 est recruté par association à H3K9me2/3 et il est clair (voir en B) que le niveau de H3K9me2 diminue avec l'âge (pas celui de HP1). L'expérience suivante consiste en une immunoprécipitation de la chromatine avec un anti-HP1 et l'identification de *1360* (élément transposable enrichi dans l'hétérochromatine) mais pas celle de *rp49* (gène contrôle d'une protéine ribosomale qui n'est pas encodée dans l'hétérochromatine). Les résultats parlent d'eux-mêmes pour indiquer qu'avec l'âge, à moins d'être surexprimé, HP1 se détache de l'hétérochromatine (elle est exprimée mais ne descend plus *1360*). Cette perte d'hétérochromatine est associée à une augmentation de gènes encodés dans cette structure. La mouche *DX1* a le gène *LacZ* associé au locus *white* normalement réprimé. La **DIA VI.7** démontre que l'expression de β -Gal augmente avec l'âge (en D et E).

La suite concerne la stabilité du nucléole, structure dont nous venons de constater l'importance. La

figure A de la **DIA VI.8** montre des marquages de la fibrillarine (un marqueur nucléolaire) dans différentes conditions altérant ou solidifiant, l'hétérochromatine. Il est clair, dans ces données quantifiées, que la fragmentation des nucléoles augmente dans les conditions diminuant l'hétérochromatine et diminue encore plus dans les conditions qui augmentent le niveau de structuration de l'hétérochromatine (hs-HP1). Cette perte d'hétérochromatine s'accompagne d'une dérégulation des séquences répétées de l'ARN ribosomal et de la formation de DNA circulaire extra-chromosomal (ECC), comme on peut la voir dans la partie B. Je rappelle ici que, chez la levure, cette anomalie s'accompagne d'un vieillissement, à mettre en relation avec le vieillissement prématuré des mouches.

Finalement, les auteurs se sont intéressés aux modifications transcriptionnelles liées à l'altération de la structure nucléolaire. Une grande partie des gènes ribosomaux sont normalement silencieux. On peut suivre cette répression par celle d'une classe de transposons, les éléments R2 insérés dans la région 28S du précurseur de l'ARN ribosomal. La **DIA VI.9** illustre cette perte de répression de la transcription dans le mutant suppresseur de variéga-tion (perte de l'hétérochromatine) et l'effet inverse dans le cas de la surexpression de HP1 (gain de l'hétérochromatine). Une augmentation de l'ARN ribosomal s'accompagne d'une augmentation de la synthèse des protéines qui peut se traduire par une modification de la taille et du poids des organismes. La partie droite de cette **DIA VI.9** illustre l'augmentation de taille et de poids qui accompagne la perte d'hétérochromatine et le vieillissement accéléré de l'animal.

Nous allons maintenant passer à un autre aspect de la longévité qui tourne plus directement autour des fonctions et des morphologies mitochondriales. Nous partons de la revue de Nunnari et Suomalainen (*Cell*, 148 : 1145-1159, 2012) qui ouvre en nous rappelant que les mitochondries ont pour origine l'internalisation d'une alpha-protéobactérie par une cellule eucaryote. Il y a d'autres versions,



mais cela a peu d'importance ici, l'essentiel étant que nous soyons conscients qu'il s'agit bien d'un processus de symbiose qui s'est perpétué depuis son « invention ». Les mitochondries ont une membrane externe (OM) et une membrane interne (IM) séparées par l'espace inter-membranaire (IMS). Le génome mitochondrial est circulaire et a été réduit au cours de l'évolution par transfert nucléaire des gènes mitochondriaux. Chez les mammifères, la transmission du génome mitochondrial est presque exclusivement maternelle. Les mitochondries (chez les mammifères) contiennent environ 1 500 protéines dont 13 seulement sont codées par le génome mitochondrial. Les protéines mitochondriales sont donc, pour l'essentiel, importées par la mitochondrie et distribuées dans ses différents compartiments.

Les maladies mitochondriales sont très nombreuses et hétérogènes et liées à des mutations (quand elles sont génétiques) qui peuvent toucher le génome nucléaire ou le génome mitochondrial. Parmi ces maladies, nombre sont « communes » au sens de banales, et parmi elles les maladies neuro-dégénératives, les cardiomyopathies, les syndrômes métaboliques, les cancers et, puisque c'est, on le dit, une maladie, l'obésité. Ces maladies peuvent toucher n'importe quel organe ou système, et se manifester à tout âge. Elles sont parfois héréditaires d'origine génétique ou maternelle quand le génome touché est mitochondrial, puisque le stock mitochondrial est, nous l'avons vu, d'origine maternelle. À ce jour, ce sont encore des maladies incurables, même si des traitements peuvent en améliorer les symptômes. Ces maladies mitochondriales sont très hétérogènes et peuvent avoir des manifestations spécifiques de certains tissus. Par exemple, des défauts du complexe I, dont nous avons souvent parlé, peuvent conduire à des atrophies du nerf optique ou des encéphalopathies de l'enfant.

Les mutations nucléaires les plus communes associées à des pathologies touchent la DNA-polymérase gamma et se traduisent par des désordres hépatiques et cérébraux qui apparaissent

très tôt, par des épilepsies juvéniles. Parfois les conséquences sont plus tardives comme pour certaines ataxies neuropathiques. Un autre exemple d'hétérogénéité est fourni par un groupe de pathologies lié à des mutations d'acyl-tRNA synthétases mitochondriales qui permettent le transfert d'un acide aminé sur un ARN de transfert au cours de la biosynthèse des protéines par la mitochondrie elle-même. La variabilité extrême des phénotypes pathologiques est aussi explicable par le fait que les cellules contiennent des mitochondries saines et des mitochondries malades (hétéroplasmie) et que le symptôme est alors dépendant du rapport entre les deux populations, comme de leur distribution entre tissus, entre cellules, voire au sein d'une même cellule.

Je vais illustrer ce lien entre mutations mitochondriales et pathologies en m'appuyant sur l'article de Reeve *et al.* (*J. Neurosci.* 32 : 10790-10801, 2013) et la maladie de Parkinson. Les neurones de la substance noire qui dégénèrent dans cette pathologie sont extrêmement sensibles aux dysfonctions mitochondriales. Cette assertion repose sur le fait que plusieurs des gènes mutés dans les formes familiales de la maladie ont un rôle en rapport avec les fonctions mitochondriales. C'est le cas de Pink1 (PARK6), parkin (PARK2), DJ-1 (PARK7) et même de l'alpha-synucléine (PARK1) qui semble endommager directement les mitochondries. De nombreuses études ont par ailleurs démontré qu'une diminution de l'activité du complexe I mitochondrial (**DIA VI.10**) dans les neurones dopaminergiques de la SN (après exposition à des toxines ou drogues comme le MPTP ou la Roténone) induit des syndromes de type Parkinson.

Les mutations de l'ADN mitochondrial causent – elles aussi – un certain nombre d'états pathologiques rassemblés sous le terme de « désordres mitochondriaux » avec des manifestations cliniques sur une fraction importante des populations humaines (1/5000). Les maladies neurologiques incluent des ataxies, des épilepsies, et des démences. Les mutations mitochondriales peuvent toucher le génome



mitochondrial et être ponctuelles ou constituées de délétions plus ou moins larges. Elles peuvent dériver de mutations de gènes mitochondriaux encodés dans le noyau, comme des mutations de la polymérase gamma (POLG). De fait, certains cas de Parkinsons sont associés à des mutations de POLG. Cela est dû au fait que les mitochondries se divisent considérablement et que nombre des mutations se produisent au cours de ces divisions. Évidemment, on ne peut exclure une action directe des ROS (générés par les mitochondries), surtout sur un ADN qui n'est pas protégé par des histones. Dans l'article que nous allons discuter les auteurs ont recherché des défauts mitochondriaux dans la SN de patients présentant des mutations ponctuelles et des délétions dans l'ADN mitochondrial. Dans leur introduction, ils rappellent que ces mutations peuvent être présentes dès le plus jeune âge (en particulier les délétions) ou s'accumuler avec le temps du fait de mutations de POLG. Ce qui permet de comparer les deux étiologies (mutations héritées ou accumulées). Pour comprendre le sens de cette étude, il faut bien voir que le point de départ n'est pas une maladie de Parkinson mais des mutations mitochondriales et que le but est de considérer les effets de ces mutations sur les neurones de la SN.

Tous les cas et tous les contrôles de cette étude ont été marqués avec des anticorps contre l'alpha-synucléine, cette protéine qui, chez les malades, s'accumule au sein des corps de Lewy. Aucune marque (ni dans les corps de Lewy, ni dans des formes pré agrégées) n'a été observée chez les cas contrôlés. La **DIA VI.11** présente les 10 cas étudiés avec des mutations ponctuelles ou des délétions de l'ADN mitochondrial (en haut) et des mutations dans POLG et la **DIA VI.12**, les cas contrôlés (en bas). Ce marquage est aussi absent dans deux cas de mutations ponctuelles et dans un cas de délétion mitochondriale importante (malgré la dysfonction mitochondriale). Il est retrouvé dans deux cas de mutation POLG (POLG3 et POLG4) (**DIA VI.12 en haut**) même si POLG4 montre une perte de neurones limitée, pas supérieure à celle normalement observée à cet âge (79 ans).

Les auteurs ont alors étudié le niveaux de 5 protéines mitochondriales chez les 10 patients et chez 8 témoins. Les protéines choisies sont deux sous-unités du complexe I (CI19 et CI20), une sous unité du complexe IV (COXI) une sous unité du complexe II (CII70) et la porin et une protéine de la membrane externe de la mitochondrie dans le but d'évaluer la densité en mitochondries. La porin et CII70 ne montrent pas de différence entre contrôles et patients (**DIA VI.13** pour porin). Les contrôles montrent une baisse de CI19 et CI20 dans 6 à 7 % des neurones. Chez les patients, une baisse a été trouvée pour MERRF2 et pour tous les cas de mutation POLG4. Le plus haut niveau de déficience pour les protéines du complexe I a été trouvé pour la délétion avec 44 % et 31 % pour CI19 et CI20 respectivement (**DIA VI.14**, avec des exemples de marquage et les quantifications pour les 2 protéines et tous les cas étudiés). Pour COXI (**DIA VI.15**), les résultats sont encore hétérogènes avec une faible diminution dans les contrôles (entre 1,1 et 8 % des neurones montrant une baisse) mais des pertes plus élevées chez certains patients (23 % pour MERRF2, des niveaux autour de 15 % pour les POLG) mais pas tous puisque les deux patients avec une délétion dans mtDNA ont des pertes de 0,9 et 2,7 %. Ces données corrélerent avec l'activité du complexe qui peut-être mesurée et qui est présentée en bas de la **DIA VI.15**.

Cela a amené les auteurs à affiner leur étude et, dans un premier temps, à chercher une corrélation entre les mutations du mtDNA et les désordres mitochondriaux. En accord avec la littérature, ils observent que des délétions du mtDNA dans des neurones contrôles (25 % des neurones environ). Les délétions dans les patients POLG et dans ceux présentant des délétion du mtDNA atteignent les niveaux plus élevés de 58 et 69 %, respectivement (**DIA VI.16**). Les mutations ponctuelles ont aussi été identifiées par séquençage et leur pourcentage par neurone (n'oublions pas l'hétérogénéité des mitochondries ou hétéroplasmie) a été analysé chez plusieurs patients MELAS et MERRF (**DIA VI.16**). Finalement, et nous nous approchons là de la



question du Parkinson, l'article s'intéresse à la survie des neurones mélanisés dont environ 90 % sont des neurones dopaminergiques. La première chose à constater est l'hétérogénéité des contrôles (100 % étant la moyenne des contrôles) qui reflète en partie un effet de l'âge de chacun d'entre eux puisque nous perdons 4,7 % de nos neurones dopaminergiques par décennie. Pour les porteurs de mutations mitochondriales on note que si tout va bien pour MELAS2 et POLG4 (en dépit de leur grand âge de 59 et 79 ans), d'autres ont une forte perte neuronale, même quand ils sont plutôt jeunes (POLG2 à 24 ans). Ces pertes sont à rapprocher des symptômes. C'est une approche difficile puisque, selon les auteurs, les symptômes parkinsoniens (perte des neurones mDA) peuvent être masqués par d'autres symptômes comme une ataxie (trouble de la coordination des mouvements musculaires) ou une encéphalopathie. Dans cette étude POLG3 a des symptômes parkinsoniens clairs, symptômes dont il semble qu'ils touchent fréquemment des patients dont POLG est mutée.

Il semble donc que, si la survie des neurones dopaminergique est affectée par des mutations mitochondriales, il existe une grande hétérogénéité parmi les individus étudiés (le nombre est petit il faut le remarquer) et que la perte neuronale est plus fréquente chez les porteurs d'une mutation dans POLG. Une explication proposée par les auteurs est que les neurones exposés à la mutation très tôt (délétion ou mutation ponctuelle de mtDNA) pourraient s'adapter par un passage précoce en mode glycolyse cytoplasmique avec formation de 2 ATP et 2 pyruvate par mole de glucose) contrairement à ceux chez qui la maladie s'installe progressivement à la suite d'une mutation de POLG et à l'accumulation des erreurs. À suivre.

Avant d'aller plus loin, je reviens à la revue de Nunnari et Suomalainen (*Cell* 148 : 1145-1159, 2012) pour m'attarder sur les multiples rôles des mitochondries. Le mieux connu est évidemment la production d'ATP au cours de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) (**DIA VI.17**). Le premier

complexe, le plus grand aussi en de protéines est le complexe I. Il s'agit d'une pompe à protons très sophistiquée composée de 45 sous-unités. Le gradient de protons générés par les complexes I à IV est libéré (voyez la flèche en sens inverse) par l'ATP synthase du complexe V dont la fonction est la phosphorylation de l'ADP et sa transformation en ATP. Les complexes I et III génèrent des ROS qui, on le sait, provoquent des dommages dans la cellule et sont associés à certains processus dégénératifs. Par exemple, la neuropathie héréditaire de Leber est provoquée par une mutation dans un composé du complexe I. Mais, comme je l'ai rappelé le 3 octobre, les ROS mitochondriaux ont aussi une fonction dans la signalisation contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire et permettent l'adaptation physiologique à certaines situations, par exemple l'hypoxie (**DIA VI.18**). Pour élargir encore notre spectre, rappelons que les mitochondries constituent la source principale de NADH et contribuent à la synthèse des pyrimidines et des lipides, y compris la β -oxydation des acides gras et la synthèse de l'Acétyl-CoA nécessaire à nombre d'acétylations. Sans y revenir, nombre des métabolites mitochondriaux régulent l'activité d'enzymes importantes, par exemple des enzymes qui modifient des protéines de la chromatine (dont les histones), avec des effets épigénétiques importants (**DIA VI.19**). Finalement, on ne peut certainement pas oublier l'homéostasie calcique et le rôle des mitochondries dans la distribution spatio-temporelle du calcium, y compris du calcium qui est régulé au niveau de la membrane plasmique ou du RE (capture ou libération). Dans les neurones, on sait bien que le calcium est un élément clef de la transmission synaptique (fusion des vésicules par exemple). Toujours pour s'en tenir au système nerveux, l'ATP synthétisé localement intervient dans la synthèse du GABA et du glutamate, la dynamique du cytosquelette et celle des vésicules. Sans oublier la sécrétion d'ATP et son activité de neuromédiateur purinergique. La **DIA VI.20** vous rappelle certains éléments de cette voie avec une libération d'ATP et la formation d'ADP ou d'Adénosine, molécules qui signalent via une interaction avec des récepteurs spécifiques.



Le rôle central de la mitochondrie dans le métabolisme fait qu'une demande accrue d'ATP se traduit par une augmentation de la masse mitochondriale et de l'O₂PHOS. C'est ce qui se passe après un effort physique ou une augmentation de la vascularisation. Le métabolisme mitochondrial est donc à la fois à l'origine des signaux nutritifs et leur cible. Deux composés moléculaires fondamentaux dans la mesure du statut métabolique sont la kinase activée par l'AMP (AMPK) et SIRT1, une déacétylase NAD⁺ dépendante (on s'en souvient). AMPK est activée par une augmentation du rapport AMP/ATP et une augmentation des concentrations d'ADP qui accompagnent une restriction calorique ou une augmentation de la dépense énergétique. La **DIA VI.21** (ne regardez que la partie gauche) illustre le point important de la relation entre mitochondrie et noyau. Il est particulièrement intéressant de constater que la baisse des nutriments, augmente à la fois la formation de NAD⁺ et le rapport AMP/ATP du fait de la mobilisation de l'énergie. Cela a des conséquences sur l'activation de SIRT1 et, si vous vous en souvenez, la transcription via PGC1-alpha de gènes important pour la biogénèse des mitochondries. Pour ce qui est de la relation mitochondries/noyaux, il est de toute façon évident qu'une synchronisation est nécessaire puisque la plupart des gènes mitochondriaux sont encodés dans le génome nucléaire.

Je m'appuierai encore sur cette revue pour introduire quelques points sur lesquels nous risquons de revenir. Un premier point est que la forme des mitochondries est reliée à leurs fonctions, dans les conditions normales et dans les conditions pathologiques. Je passe sur la structure des membranes mitochondriales, même si elle a un intérêt évident pour la fonction physiologique et le processus massif d'import d'éléments fabriqués dans le cytoplasme, à commencer par les quelques 1 600 protéines encodées par le génome nucléaire. Je vais plutôt me pencher sur la question de la localisation des mitochondries et du rapport entre cette localisation, leur activité et leur fission ou fusion. La **DIA VI.22** donne une idée de ces divers processus. Chez

les métazoaires, la motilité des mitochondries est régulée par Miro, une petite protéine qui hydrolyse le GTP et lie la mitochondrie aux protéides motrices (de la famille des kinésines) associées au microtubules. Sa sensibilité au calcium a pour résultat de stopper la migration des mitochondries et à les concentrer dans des domaines riches en calcium, point particulièrement important dans le domaine des neurosciences, puisque la transmission synaptique demande à la fois de l'ATP fourni par les mitochondries et du calcium pour réguler la migration et la fusion des vésicules (**DIA VI.22**).

Un aspect important de la physiologie mitochondriale est son aspect dynamique au niveau même de la morphologie de cette organelle. Le point le plus frappant est la capacité de division mais aussi de fusion des mitochondries. Ces deux phénomènes de division et fusion sont régulés par des protéines qui hydrolysent le GTP et appartiennent à la famille des Dynamin, dont le rôle dans la morphologie des membranes a été bien décrite. La division est régulée par DRP1 (*Dynamin-Related Protein 1*) et la fusion par MNF1/2 et OPA1 (**DIA VI.22**). Toutes ces protéines sont évidemment soumises à une régulation fine et intégrées dans des voies de transduction du signal (dont la transmission synaptique). Pour insister sur le système nerveux, il est évident que la localisation des mitochondries et leur activité locale dans les terminaisons nerveuses, comme dans la région sous-synaptique associée à leur capacité de produire de l'ATP et de libérer du calcium en même temps qu'elles sont sensibles au niveau de calcium, font de ces organelles des objets fondamentaux de la physiologie cérébrale, donc de la pathologie.

De fait, la perte de fonction de la fusion ou de la division des mitochondries conduit à des dysfonctionnements graves de la physiologie mitochondriale. Un rôle de la fusion mitochondriale est l'échange du contenu de la membrane interne et de la matrice, DNA inclus. La fusion représente donc une possibilité de « tamponner », au moins partiellement, des défauts de structure (mutation)



ou des stress transitoires, par exemple une exposition aux UV, une privation de nourriture, un traitement à certaines drogues (la cycloheximide). Elle peut conduire à la formation d'une organelle d'une taille considérable, qui favorise la survie cellulaire. À l'opposé la division des mitochondries les maintient à une taille normale compatible, en particulier, avec leur transport le long du cytosquelette d'actine et de tubuline. De ce fait, des cellules très polarisées comme les neurones sont très sensibles à la perte de la division mitochondriale qui peut asphyxier les terminaisons nerveuses dès lors que les mitochondries n'ont plus la capacité de se déplacer. À l'inverse, bloquer la fusion conduit à une diminution de la fonction OXPHOS avec production de ROS, à la perte d'ADN mitochondrial et des défauts de migration des mitochondries et de division cellulaire (**DIA VI.22**). Au niveau des organismes, des mutations dans les gènes encodant les protéines qui régulent ces processus sont à l'origine de plusieurs maladies, dont – dans le cas de la mutations touchant MFN2 et OPA1 (fusion) – des maladies neurodégénératives (Charcot Marie Tooth 2A et *Dominant Optic Atrophy*).

À ce niveau nous pouvons discuter l'article tout récent (octobre 2014) de Berthet et collègues (*J. Neurosci.* 34 : 14304-14317, 2014) sur le rapport entre la taille des mitochondries et leur transport avec les conséquences possibles au niveau des neurones dopaminergiques de la substance noire, que je n'ai plus besoin d'introduire. Ce travail commence par la remarque que de nombreux gènes des parkinson familiaux (PINK, Parkin – **DIA VI.22** – mais aussi DJ-1 et LRRK2), régulent la fission et la fusion des mitochondries et que certaines formes de la maladie pourraient donc être associées à la dynamique de la morphologie des mitochondries autant qu'à leur fonctionnement intrinsèque. Mais, comme le soulignent les auteurs, il faut regarder dans les neurones mDA et, plus précisément, dans leurs axones puisque cette maladie est marquée par une dégénérescence rétrograde et que les axones se désagrègent avant que le corps cellulaire ne meure.

La plupart des mécanismes de fission impliquent, nous l'avons vu, une protéine proche de la dynamine (DRP-1). Il s'agit d'une GTPase recrutée au site de fission au niveau de la membrane mitochondriale externe. La question posée est donc de comprendre si la fission des mitochondries modifie leur compartimentalisation et leur activité au niveau des axones. À cette fin, des souris porteuses d'un gène DRP1 floxé ont été croisées avec des souris DAT-Cre, ce qui permet une délétion du gène uniquement dans les neurones DA qui expriment le transporteur de la DA, essentiellement les neurones de la substance noire. Les souris Drp1KO-DATcre grandissent normalement jusqu'à P21 puis grandissent moins rapidement (50 % du poids des souris normales à 2 mois) (**DIA VI.23**). On constate sur cette même DIA que les souris ont une survie diminuée (sauf si on leur fournit de la DOPA) et un comportement moteur anormal mesuré par leur activité locomotrice et le nombre de leur relèvement. À 3 mois, la DOPA, précurseur de la DA, améliore la situation, pas chez les wt ou Het, pour cause d'habituation.

Ces résultats suggéraient une atteinte des systèmes DA ce qui fut vérifié par un marquage contre la TH, l'enzyme qui transforme la tyrosine en L-DOPA (précurseur de la DA) et est spécifiquement exprimé dans les neurones DA. La **DIA VI.24** illustre la perte de l'innervation DA dans le *Caudate Putamen* dès P14 et son maintien relatif dans le *nucleus accumbens* et le tubercule olfactif à 2,5 mois. Sans entrer dans trop de détails, la perte de l'innervation est rapide et très amplifiée dans le *Caudate Putamen* (avec une absence totale de DA à 2 mois), avec une préservation relative des régions limbiques. Ce qui suggère une atteinte préférentielle des neurones de la substance noire et la préservation relative de ceux de la VTA (**DIA VI.24**), phénotype qui rappelle celui observé dans la maladie de Parkinson. Les quantifications des innervations et des neurones survivants sont indiquées dans la même **DIA VI.24** (il se pourrait que DAT soit moins exprimée dans les neurones de la VTA).

Je passe sur les expériences démontrant qu'il ne s'agit pas d'un défaut de développement mais bien



d'une dégénérescence spécifique des neurones de la SNpc (même effet si Cre est exprimé chez l'adulte à l'aide d'un AAV) pour m'avancer sur la question mitochondriale. Les auteurs ont analysé les extrémités terminales, là où la dégénérescence est initiée (dégénérescence rétrograde). Ils ont à cette fin utilisé un protocole subtil qui consiste à introduire avec un virus (AAV) un gène qui exprime une forme de la GFP adressée spécifiquement aux mitochondries (mitoGFP) mais dont l'expression dépend de la recombinaison Cre exprimée dans les neurones mDA. La même astuce permet d'exprimer une mCherry-synaptophysin (rouge) qui, comme son nom l'indique est un marqueur synaptique. Le résultat de cette expérience est que le pourcentage de boutons synaptiques qui ont des mitochondries passe de 60 à 10 % chez DRP1-KO (**DIA VI.25**), les mitochondries étant légèrement plus allongées chez le mutant. Le MFB (*Median Forebrain Bundle*) est plus proximal (plus près de corps cellulaires) et néanmoins appauvri en mitochondries. Curieusement, les pertes sont identiques dans le *nucleus accumbens* et la *Caudate Putamen*. Ce qui est évidemment intéressant et pose la question de la fonctionnalité de ces terminaisons.

Une telle diminution peut avoir deux explications au moins. La première est une perte globale du nombre de mitochondries dans la cellule, la seconde, un défaut de transport. En fait, en dépit de la taille importante des mitochondries la masse totale semble réduite chez le mutant (marquage des mitochondries grâce à mitoGFP et des immunos contre plusieurs protéines comme Tom20, la pyruvate déshydrogénase et Cox1) (**DIA VI.26**). Indépendamment de cet effet global, la baisse mitochondriale est plus importante dans les axones que dans les corps cellulaires. On pourrait supposer que c'est la taille des mitochondries qui bloque leur migration de façon stérique. C'est peut-être le cas même si le diamètre des mitochondries dans l'axone semble peu affecté chez les neurones hippocampique avec mutation induite par expression de Cret (**DIA VI.27, en A**) mais ce que l'on constate surtout (même DIA VI.27) est une baisse du nombre de mito en

mouvement ainsi que de la vélocité de celles qui bougent encore. Chez le mutant, les mitochondries, qui bougent ne sont pas plus courtes que celles qui ne bougent pas, ce qui suggère que la taille n'est pas essentielle (quid du diamètre ?). Un point intéressant est le mouvement désordonné des mitochondries (*uncoordinated*) et leur propension à faire marche arrière. Enfin, un traitement au calcium diminue la migration chez les sauvages mais est sans effet sur le mouvement désordonné des mitochondries mutantes.

Pour conclure, les terminaisons des neurones DA DRP1KO sont appauvries en mitochondries du fait d'une mauvaise migration, probablement pas due au diamètre des mitochondries (à voir !) mais à leur mouvement désordonné. Ce résultat et ceux de la littérature suggèrent que déréguler la fission et la fusion des mitochondries (dans les deux sens) peut avoir des effets pathologiques. Ces effets seront d'autant plus marqués que les neurones sont exigeants sur le plan métabolique. C'est l'argument avancé par les auteurs pour expliquer la moindre sensibilité des neurones de la VTA à la perte des mitochondries axonales. Mais il se pourrait que les choses soient plus compliquées.