

Contribution aux exercices de prospective 2020-2030

Sciences Nucléaires et Vivant

La mitochondrie : un organe à la convergence des approches analytiques

Contributeurs

Laboratoire de Physique de Clermont, équipe Santé : G. Montarou, P. Vernet (IN2P3)

Centre d'Etudes Nucléaires de Bordeaux Gradignan, équipe IriBio : H. Seznec (IN2P3)

IBGC de Bordeaux, équipe Métabolisme Energétique Cellulaire : A. Devin (INSB)

MitoVasc d'Angers, équipe MitoLab: A. Chevrollier (INSB et INSERM)

Unité de Nutrition Humaine de Clermont-Ferrand, équipe Proteostasis : E. Lefai (INRA)

Etat de l'art :

Les cellules eucaryotes, humaines ou autres possèdent dans leur grande majorité un noyau contenant l'information génétique de l'organisme, son génome. Fortement étudié depuis des décennies, ce noyau n'est pas le seul organe cellulaire possédant un génome, en effet les mitochondries contiennent aussi leur propre ADN. Ces dernières contrôlent au sein de la cellule des fonctions clés : apport énergétique, balance survie-mort, production de métabolites essentiels, homéostasie ionique...

La combinaison de développements de méthodes et d'outils pour l'analyse structurale et fonctionnelle des mitochondries est un élément clé dans la connaissance de ces organites et dans la capacité à comprendre certaines pathologies. Selon les contextes cellulaires, et en fonction des besoins variables au cours du temps, les mitochondries présentent des caractéristiques très différentes [1]. La composition protéique et lipidique, la taille, l'organisation en réseau, la structure interne et externe, les capacités métaboliques et oxydatives sont des variables dynamiques qui peuvent être propres à chaque tissu, et évoluer dans le temps pour s'adapter à la physiologie tissulaire et de l'organisme en entier. Cette dynamique mitochondriale contrôle en grande partie la fonctionnalité d'un tissu ou d'un organe [2]. Elle repose sur des processus équilibrés de fissions et fusions des mitochondries et par remodelage des membranes internes. La fragmentation du réseau mitochondrial suite à une hyper fission et une baisse d'intégrité des membranes externe et interne mitochondriales sont des étapes critiques du développement de certaines pathologies dont les cancers [3]. La chronologie des événements et les mécanismes impliqués restent à préciser.

La microscopie constitue une opportunité unique pour imager des protéines d'intérêt spécifiques de la façon la moins invasive possible sur des cellules vivantes. Par contre, l'approche optique fluorescente classique présente une limitation dans la résolution (250 nm) ne permettant pas d'analyser la dynamique et l'organisation protéique fine au sein d'organites comme la mitochondrie.

Les approches de super-résolution permettent de dépasser ces limitations spatiales (Prix Nobel de Chimie 2014) [4]. Parmi ces techniques, les approches STORM (microscopie de reconstitution optique stochastique) apportent une résolution (+/- 20 nm) capable d'imager des complexes protéiques au niveau des membranes mitochondriales. De plus, elles permettent de suivre la dynamique protéique à l'intérieur de cellules vivantes avec une résolution temporelle de l'ordre de la milliseconde grâce au suivi par particule unique [5]. Enfin, il est maintenant possible de reconstituer la trajectoire de molécules uniques autorisant ainsi la quantification de leur comportement et de leurs propriétés de diffusion [6].

Les approches analytiques utilisées jusqu'à présent permettent en combinant la microscopie à super-résolution et la modélisation de générer des outils et des images de très haute qualité à la fois du réseau mitochondrial et de ses structures (crêtes, nucléoïdes) [7], mais aussi d'aborder la structuration d'éléments dynamiques intervenant dans la gestion de dommages plus distants comme les cassures double-brins de l'ADN nucléaire [8].

Objectifs :

Cette contribution couvre plusieurs aspects :

- Intégration des approches analytiques structure-fonction au niveau mitochondrial
- Génération de données biologiques multiples pour le développement de modèles réalistes des phénomènes biologiques, biochimiques voire chimiques au sein de la mitochondrie
- Acquisition de données et développement de modèles permettant un apport de connaissances pour d'autres structures cellulaires : noyau, réticulum endoplasmique, peroxyosomes...

Trois grands axes apparaissent prioritaires dans ces approches :

- Analyses métaboliques (Espèces Réactives de l'Oxygène ROS, métabolites,...) dans des conditions physiopathologiques données
- Dynamique mitochondriale, imagerie subcellulaire et tissulaire
- Analyse chimique par microfaisceaux d'ions et imagerie corrélative

Le volet biologique et biochimique sera abordé entre autres par l'étude des quinones, éléments de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elles jouent un rôle clé dans le processus de transfert d'électrons puisque l'ensemble des déshydrogénases en amont de la chaîne respiratoire convergent sur ces transporteurs d'électrons. L'état redox des quinones dépend des capacités de réoxydation de la chaîne respiratoire en fonction des substrats à disposition. Ainsi, l'état redox des quinones dans des conditions physio/physiopathologiques pourrait se révéler un excellent marqueur de l'état redox cellulaire et du stress auquel sont soumises les cellules (ROS...). La mesure de l'état redox des quinones couplée à celle de la respiration cellulaire et à l'analyse des différents paramètres prolifération/fermentation constitue des observables indispensables à la modélisation de processus biologiques. Elle est actuellement en cours à travers l'acquisition d'équipement spécifique pour la mesure de l'état redox des quinones. D'autre part, cette mesure sera couplée à la mesure des ROS cellulaires.

La dynamique mitochondriale avec le suivi de la localisation des protéines sur les membranes externe ou interne, le long du réseau mitochondrial reste à faire. Acquérir ce type de données dans des modèles tumoraux nécessite le développement de nouveaux outils informatiques, moléculaires (diminution de la taille des tags fluorescents) et aussi de nouveaux systèmes optiques pour permettre l'acquisition sur plusieurs plans et permettre l'acquisition intra-tissulaire et optimiser les vitesses d'acquisition pour accroître le débit d'analyse. Cette approche sera associée à de l'imagerie chimique permettant de suivre des flux ioniques (ex. Ca^{2+}) en lien avec la modification du réseau mitochondrial. Cette micro-analyse corrélative constitue un défi important permis jusqu'à présent par des approches parallèles en microscopie confocale sur cellules vivantes, mais qui peut maintenant être associée à de la microscopie en super-résolution sur cellules vivantes. En parallèle à ces analyses, des approches sur l'ADN mitochondrial seront mises en œuvre afin de suivre le comportement de ce génome et ses altérations tout au long du processus et pouvoir le corréliser aux altérations ou modifications des étapes de fusion / fission mitochondriales.

Au-delà de l'exploration de la diversité mitochondriale présente dans les modèles biologiques conventionnels utilisés en laboratoire (levure, drosophile, souris, homme), les outils et méthodologies développées devront aussi aborder l'intégration de la population mitochondriale dans son environnement cellulaire et de façon dynamique pour s'adapter en permanence aux variations des besoins tissulaires.

Enfin, ces outils pourront également être utilisées pour l'exploration de modèles biologiques et/ou des conditions non standards. Il existe en effet dans la nature des conditions environnementales très particulières auxquelles sont confrontées les espèces vivantes. Ces espèces exposées à des conditions différentes des standards de laboratoire possèdent donc des aptitudes métaboliques et physiologiques spécifiques, et leurs mitochondries sont déjà connues pour présenter des capacités très particulières [9].

Parmi les conditions non standards, on peut citer une pression atmosphérique et /ou une concentration en oxygène réduite (haute altitude), une température (haute ou basse) impactant les activités enzymatiques, des situations de demandes énergétiques très élevées ou très basses, ou encore des expositions à des environnements défavorables comme l'exposition aux rayonnements ionisants que ce soit pour le domaine médical et la radiothérapie, ou pour la radioprotection. Avec leur spécificité et notamment leur génome propre (ADNmt), les mitochondries dépendent des systèmes de protection et de réparation cellulaire qui doivent donc intervenir au sein même de cet organe. L'exploration de la structure et de la fonction mitochondriale dans ces situations doit donc permettre de mieux caractériser à la fois les mécanismes de résistance à l'exposition, mais également les mécanismes de réparation qui se mettent en place.

Explorer comment ces modèles non conventionnels ont mis en place des stratégies fonctionnelles autour de la mitochondrie et de son activité est donc un challenge majeur pour les années à venir.

Pour accéder à la relation structure-fonction mitochondriale en lien avec la tumorigenèse voire avec les traitements comme la radiothérapie, ce programme met en jeu la combinaison d'expertises en biochimie, imagerie par super-résolution, imagerie chimique associées à l'utilisation de modèles cellulaires de fusion et fission mitochondriale, l'analyse des ROS et des phosphorylations oxydatives.

Par cette réflexion collective et sa mise en œuvre expérimentale, des données uniques et des outils puissants seront générés. Ils permettront d'alimenter de nombreuses voies de recherche (ex. irradiations et effets cellulaires, systèmes de réparation cellulaires) en fournissant des observables et des modèles intégratifs. Cette contribution vise à fédérer autour des compétences de l'IN2P3 dans les domaines de la modélisation, de l'imagerie chimique, de l'analyse d'images et du traitement de données, différents laboratoires français sur une thématique unique qui est l'analyse de la mitochondrie.

Références

1. Collins TJ et al. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J.*, 21:1616-1627.
2. Chan DC. (2019). Mitochondrial Dynamics and Its Involvement in Disease. *Annu Rev Pathol.* doi: 10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032711
3. Renault TT and Chipuk JE. (2014) Death upon a kiss: mitochondrial outer membrane composition and organelle communication govern sensitivity to BAK/BAX-dependent apoptosis. *Chem. Biol.* 21,114–123.
4. Betzig E et al. (2006). Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science.* 313:1642-1645.
5. Jungmann R et al. (2014). Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nat Methods.* 11:313-8. doi: 10.1038/nmeth.2835.
6. Levet F et al. (2019). A tessellation-based colocalization analysis approach for single-molecule localization microscopy. *Nat Commun.* 10:2379. doi: 10.1038/s41467-019-10007-4

7. Ježek P and Dlasková A. (2019). Dynamic of mitochondrial network, cristae, and mitochondrial nucleoids in pancreatic β -cells. *Mitochondrion*. pii: S1567-7249(19)30022-4. doi: 10.1016/j.mito.2019.06.007.
8. Sisario D et al. (2018). Nanostructure of DNA repair foci revealed by superresolution microscopy. *FASEB J.*, 12:fj201701435. doi: 10.1096/fj.201701435.
9. Dugbartey GJ et al. (2017). Renal Mitochondrial Response to Low Temperature in Non-Hibernating and Hibernating Species. *Antioxid Redox Signal.*, 27:599-617. doi: 10.1089/ars.2016.6705.