



Université de Strasbourg  
**FACULTÉ DE PHARMACIE**

N° d'ordre: \_\_\_\_\_

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

—

**APPROCHE THERAPEUTIQUE INNOVANTE : LE TRANSFERT DE  
MITOCHONDRIE**

Présenté par Alice ONESANU

Soutenu le 21/05/24 devant le jury constitué de

Pr LEHMANN Maxime, professeur de biologie cellulaire, Président et Directeur de thèse

Dr ETIENNE-SELLOUM Nelly, docteur en pharmacie, autre membre du jury

Dr WOLF Claire, docteur en pharmacie, autre membre du jury

Approuvé par le Doyen et  
par le Président de l'Université de Strasbourg



**Doyen**  
**Directeurs adjoints**

Esther KELLNBERGER  
Julien GODET  
Béatrice HEURTAULT  
Emile SIKK  
Léo FERREIRA-MOURAUX  
Rachel MOUEZY

**Directeur adjoint étudiant**  
**Responsable administrative**

**LISTE DU PERSONNEL ENSEIGNANT**

**Professeurs :**

Philippe BOUCHER  
Nathalie BOULANGER  
Line EDUREL  
Rascal DIEB  
SOU ENHAIHAI  
Valérie GEOFFROY  
Philippe GEORGEJ  
Béatrice HEURTAULT  
Esther KELLNBERGER  
Maxime LEHMANN  
Eric MARCHON  
Rachel MATZ-WESTPHAL  
Franck NEGERLIN  
Yves MELX  
Jean-Yves PABET  
Françoise PONS  
Valérie SCHNEIDER  
Giuliana TOTI  
Thierry VANDAMME  
Catherine VONCHRON  
Rascal MEHLÉ

Physiologie  
Parasitologie  
Chimie thérapeutique  
Biophysique  
Chimie analytique  
Microbiologie  
Bactériologie, virologie  
Pharmacie galénique  
Bio-informatique  
Biologie cellulaire  
Chimie analytique  
Pharmacologie  
Droit et économie pharm.  
Physique et Biophysique  
Droit économie pharm.  
Toxicologie  
Pharmacologie  
Pharmacologie  
Biogénétique  
Pharmacognosie  
Pharmacie galénique

**Professeurs-praticiens hospitaliers**

Julien GODET  
Jean-Marc LESSINGES  
Bruno MICHEL  
Isabelle SOLLAS-SMAJEL  
Geneviève UDEAU-SÉQUIER

Biostatistiques - science des données  
Biochimie  
Pharm. clinique santé publique  
Immunologie  
Pharmacovigilance

**Enseignants contractuels**

Alexandra CHAMPERT  
Matthew FORBES  
Philippe GAJAS  
Philippe NANOJ

Pharmacie d'officine  
Pharmacie d'officine  
Droit et économie pharm.  
ingénierie pharmaceutique

**Maîtres de Conférences :**

Nicolas ANTON  
Farouk SATOUL  
Martine BESAÏNTZÉ  
Elza BOMBARDIA  
Aurélien BOURDENOIX  
Emmanuel SOUTANT  
Véronique BRUDAN  
Anne CASSET  
Thierry CHAUCNERU  
Manuela CHEPE  
Guillaume CONZATTI  
Marcello DE GIROGI  
Serge DUMONT  
Isabelle HAAN-ABENHOFF  
Cécile JACQUEMARD  
Julie KARPENKO  
Nathalie MUEDEHÖFFER  
Sergiu ORTEZ AGUIRRE  
Sylvie FESBOCEZ  
Romain PERTUSCH  
Frédéric PRZYBYLLA  
Patricia RASSAN  
Éliane REAL  
Andreas REISCH  
Ludwine REFFAULT-VALOIS  
Carole RONZAN  
Emile SIKK  
Vanuta SOUMBOU  
Maria-Victoria STANESCU  
Jérôme TERRAND  
Nassera TOUNSI  
Aurélien URBAN  
Bruno VAN OVERBEEK  
Marie ZEROU

Pharmacie biogénétique  
Biochimie  
Chimie analytique  
Biophysique  
Pharmacochimie  
Virologie et Microbiologie  
Physiologie et physiopath.  
Toxicologie  
Pharmacologie  
Pharmacie biogénétique  
Pharmacie galénique  
Pharmacochimie  
Biologie cellulaire  
Matières médicales  
Chémoinformatique  
Pharmacochimie  
Pharmacologie  
Pharmacognosie  
Parasitologie  
Chimie en flux  
Biostatistiques  
Microbiologie  
Biochimie  
Biophysique  
Analyse de médicament  
Toxicologie  
Pharmacologie  
Pharmacognosie  
Chimie thérapeutique  
Physiopathologie  
Chimie physique  
Pharmacognosie  
Physiologie  
Chémoinformatique

**Maîtres de conférences - praticiens hospitaliers**

Julie BRUNET  
Nelly ÉTIENNE-SELLOUM  
Vincent SIC

Parasitologie  
Pharmacologie- pharm. clinique  
Immunologie

**Assistants hospitaliers universitaires**

Abdelmalek BENDJAMA  
Hassine BETIT  
Damien BETA

Production de médicaments anticancéreux  
Pharmacochimie  
Biochimie

# SERMENT DE GALIEN

JE JURE,

en présence des Maîtres de la Faculté,  
des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens  
et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit  
dans les préceptes de mon art et de  
leur témoigner ma reconnaissance en  
restant fidèle à leur enseignement ;

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique,  
ma profession avec conscience et de respecter non  
seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles  
de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;

De ne dévoiler à personne les secrets  
qui m'auront été confiés et dont j'aurai eu  
connaissance dans la pratique de mon art.

Si j'observe scrupuleusement ce serment,  
que je sois moi-même honoré  
et estimé de mes confrères  
et de mes patients.

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le **Pr Lehmann Maxime** d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse et de m'avoir accompagné, rassuré et conseillé durant cette épopée qu'a été l'écriture de cette thèse.

Je remercie également **Dr Etienne-Selloum Nelly** et **Dr Wolf Claire** pour leur réactivité, et pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Merci à **Christine** d'avoir proposé de bon cœur de relire ce mémoire pour en extirper les dernières fautes !

Merci à mes amies et consœurs **Elodie, Emeline, Laetitia, Marie-Ange, Büsra** et **Pauline**, pour leur aide et leur soutien. Ces études auraient été bien fades et difficiles sans vous !

Très grands mercis également à **ma famille** et **mes amis**, pour les opportunités que vous m'avez présentées, pour avoir cru en moi et pour avoir su trouver les mots pour me redonner le moral ou me changer les idées.

Un énorme merci à **Jean**, mon conjoint depuis le début de ces études depuis plus de 8 ans maintenant ! Merci pour ton soutien émotionnel indéfectible, d'avoir été là pour les bons et surtout les mauvais moments. Tu as su rendre mon parcours bien plus doux et drôle, je t'aime. Merci aussi à **ta famille**, qui est comme la mienne à présent. Merci pour leur aide, leur gentillesse et leur empathie.

Merci aussi à celles et ceux que je n'ai pas cité, mais qui m'ont aidé au cours de ma vie ou de mes différentes expériences scolaires et professionnelles.

Enfin, merci **Maman** et **Papa**. Merci pour votre présence, votre amour, ainsi que pour tout ce que vous avez pu m'apprendre et m'offrir. Sans vous je n'en serais pas là aujourd'hui. J'ai énormément de chance d'être votre fille et de vous avoir auprès de moi. Je vous aime.

## Table des matières

I.	Introduction : l'importance des mitochondries .....	1
a.	Qu'est-ce qu'une mitochondrie ? .....	1
b.	Zoom sur les fonctions des mitochondries .....	3
i.	Respiration cellulaire et production d'ATP.....	3
ii.	Programmation de la mort cellulaire et de son homéostasie calcique.....	4
iii.	Autres fonctions.....	5
c.	Conséquences des dysfonctions mitochondriales .....	6
II.	Le transfert de mitochondries .....	8
a.	Des observations de transfert d'organites entre cellules eucaryotes. ....	8
i.	Observations du transfert de mitochondries durant la réparation tissulaire .....	8
ii.	Observations de transfert de mitochondries dans des organoïdes de tumeurs type glioblastome 10	
iii.	Observation de transfert de mitochondries des astrocytes aux neurones .....	12
b.	Les possibles mécanismes de transferts et captation .....	16
i.	Nanotubes.....	16
ii.	Endocytose .....	17
c.	Isolation des mitochondries pour les études cliniques .....	18
III.	Exemple de champs d'applications possibles pour la transplantation mitochondriale, présentation d'études <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....	20
a.	Ischémies cardiaques .....	20
i.	Etudes <i>in vivo</i> . ....	21
ii.	Etude clinique.....	24
b.	Troubles et lésions neurologiques .....	25
i.	Etudes sur le système nerveux périphérique. ....	26
ii.	Etude sur le système nerveux central. ....	30
c.	Protection pulmonaire .....	32
i.	Transfert de cellules souches dans un contexte de lésion inflammatoire.....	32
ii.	Transfert de mitochondries isolées dans un contexte d'ischémie reperfusion. ....	34
d.	Amélioration du potentiel des cellules souches pour la cicatrisation osseuse .....	36
e.	Oncologie .....	39
i.	Effet des Mt sur le métabolisme et l'apoptose des cellules tumorales.....	39
ii.	Effets des Mt sur la résistance des cellules tumorales aux traitements thérapeutiques.....	41
iii.	Effets des Mt sur les effets secondaires des traitements anti-cancéreux .....	43
IV.	Conclusion et perspectives .....	46
V.	Bibliographie :.....	48

## Liste des abréviations :

Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A

Acyl-CoA : acyl coenzyme A

ADNmt : ADN mitochondrial

ADP : adénosine diphosphate

Apaf-1 : facteur d'activation de la peptidase apoptotique 1

ATP : adénosine diphosphate

AVC : accident vasculaire cérébral

BBB : Basso, Beattie and Bresnahan

$\beta$ -GAL : bêta-galactosidase

BMSC : cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse

BSA : albumine de sérum bovin

C : cytoplasme

$Ca^{2+}$  : calcium

CL50 : concentration létale 50, dose entraînant la mort de 50% d'une population examinée

CSM : cellule souche mésenchymateuse

CO<sub>2</sub> : dioxyde de carbone

Cyt c : cytochrome c

Cx43 : connexine 43

e<sup>-</sup> : électron

ECMO : oxygénation par membrane extracorporelle

EI : espace intermembranaire

H<sup>+</sup> : proton

H&E : hématoxyline et éosine

H<sub>2</sub>O : eau

IP3 : récepteurs de l'inositol triphosphate

LIR : lésion d'ischémie-reperfusion

LME : lésions de la moelle épinière

LPA : lésions pulmonaires aiguës

LPS : lipopolysaccharides

MCU : uniporteur de calcium mitochondrial

ME : membrane externe

MI : membrane interne

MMt : matrice mitochondriale

Mt : mitochondrie

NAD<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénée

O<sub>2</sub> : oxygène

PTP : pores de transition de perméabilité

Q : coenzyme Q10

RE : réticulum endoplasmique

ROS : espèces réactives de l'oxygène

siARN : ARN interférent

SOD1 : superoxydes dismutases 1

SOD2 : superoxydes dismutases 2

VDAC : canal anionique voltage dépendant

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

## Liste des figures :

Figure 1 : Structure générale d'une mitochondrie .....	2
Figure 2 : Illustrations des principaux moyens de production d'énergie par les mitochondries. ....	2
Figure 3 : Schéma simplifié des évènements qui impliquent la mitochondrie (Mt) dans l'apoptose. ....	5
Figure 4 : Le transfert de Mt compétentes depuis les plaquettes vers les cellules souches stimule l'efficacité de la cicatrisation et l'angiogenèse. ....	9
Figure 5 : Constatation du transfert de mitochondries via nanotubes dans une coculture directe entre cellules souches de glioblastome. ....	11
Figure 6 : Le transfert de Mt extracellulaires fonctionnelles via un milieu conditionné dérivé des astrocytes se fait de manière dépendante de la signalisation CD38-cADPR-calcium et augmente <i>in vitro</i> les taux d'ATP et la viabilité cellulaire lors de conditions de privation. ....	13
Figure 7 : Suite à une ischémie le transfert de Mt d'astrocytes vers les neurones <i>in vivo</i> se fait de manière dépendante de la signalisation CD38-cADPR-calcium et améliore la survie cellulaire, alors que l'arrêt du transfert cause une aggravation des résultats neurologiques. ....	15
Figure 8 : Schéma des mécanismes de transfert mitochondrial. ....	17
Figure 9 : Schéma pour l'isolement des mitochondries par dissociation tissulaire et filtration différentielle. ....	19
Figure 10 : Schéma de l'aire à risque et du tissu sauvé par rapport à la zone réelle de l'infarctus du myocarde.....	20
Figure 11 : Le transfert autologue de Mt chez des lapins ayant subi une ischémie régionale permet d'améliorer l'état de leurs lésions et leurs fonctions cardiaques. ....	22
Figure 12 : Le transfert autologues de Mt permet aux porcs victimes d'infarctus d'améliorer les indices de performance cardiaque et de réduire la taille de l'infarctus. ....	23
Figure 13 : La transplantation autologue de Mt chez des patients pédiatriques ayant subi un choc cardiogénique chez suite à une lésion d'ischémie-reperfusion associée à une séparation réussie de l'ECMO et à une augmentation de la tension ventriculaire. ....	25
Figure 14 : Les BMSC peuvent transférer des Mt aux motoneurones (privés O <sub>2</sub> /glucose, 8 h), ces dernières améliorent leur profil bioénergétique et favorisent leur survie. ....	26
Figure 15 : La transplantation de Mt ou BMSC a permis une meilleure guérison des rats ayant subi une LME. ....	27

Figure 16 : Le transfert homologue de Mt permet aux rats ayant subi une LME de mieux récupérer leurs facultés sensorielles et motrices en atténuant les dommages neuronaux. ....	29
Figure 17 : Les Mt transférées à la rétine sont absorbées par les cellules et améliore sa réparation lorsqu'elle est lésée. ....	31
Figure 18 : Le transfert de Mt via des BMSC instillées en intra-trachéales ou par voie nasale améliore l'activité et protège les cellules pulmonaires de souris suite à des lésions pulmonaires aiguës. ....	33
Figure 19 : L'instillation de Mt par voie vasculaire ou aérosol améliore les capacités pulmonaires et préserve les cellules à la suite d'une lésion d'ischémie-reperfusion. ....	35
Figure 20 : Le transfert de Mt aux BMSC permet d'améliorer leurs capacités proliférative, migratoire et de différenciation ostéogénique <i>in vitro</i> . ....	37
Figure 21 : Les BMSC ayant reçu des Mt compétentes ont eu un effet thérapeutique amélioré <i>in vivo</i> grâce à des modifications métaboliques. ....	38
Figure 22 : Une transplantation de Mt d'astrocytes humains sains dans des cellules de gliome humain rétablit la respiration aérobie et améliore la radiosensibilité. ....	40
Figure 23 : La transplantation de Mt saines régule l'activité antitumorale, la chimiorésistance et la dynamique mitochondriale dans le cancer du sein <i>in vitro</i> .....	42
Figure 24 : L'administration nasale de Mt inverse les déficits cognitifs et la dégradation neuronale induits par la chimiothérapie au cisplatine.....	45

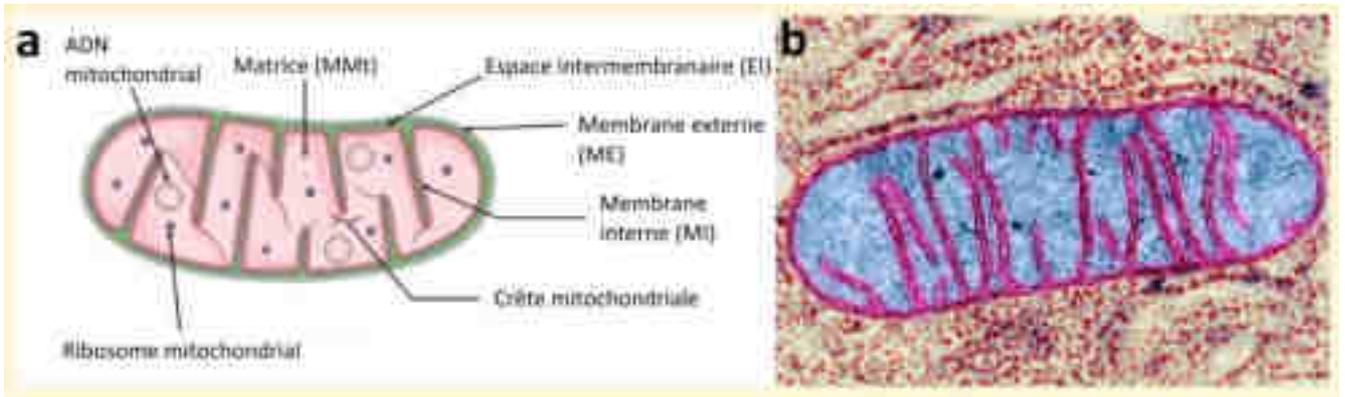
# I. Introduction : l'importance des mitochondries

## a. Qu'est-ce qu'une mitochondrie ?

Les mitochondries (Mt) sont des organites, autrement dit des éléments différenciés d'une cellule qui assurent des fonctions déterminées (1). Dynamiques, elles peuvent adapter leur activité et leur devenir en modifiant leur morphologie, leur nombre et leur taille via des processus de fission, de fusion et de multiplication (2). Leur subdivision ou fission survient lors des divisions cellulaires et de la fragmentation apoptotique, alors que leur fusion sert à leur réparation et au maintien des fonctions métaboliques (2). Les Mt possèdent leur propre ADN mitochondrial (ADNmt) au sein de sa matrice (MMt). Cet ADNmt est circulaire, hérité de la mère, possède 37 gènes (en comparaison l'ADN génomique humain en a plus de 10 000) et encode 13 protéines critiques pour la respiration cellulaire (3). Les Mt sont également bi-membranaires (3). Leurs deux membranes, membrane externe (ME) et membrane interne (MI), sont séparées par un espace intermembranaire (EI) et présentent des fonctions distinctes (Figure 1). L'hypothèse la plus probable veut que ces membranes et leur ADN soient un héritage de leur ancêtre commun, une alphaprotéobactérie internalisée par une cellule plus ancienne encore que le premier ancêtre commun des eucaryotes. Cette internalisation a mené vers une endosymbiose, une association maintenue dans le temps et réciproquement profitable aux deux partis (4,5). A présent, les mitochondries ne pourraient plus survivre en dehors d'une cellule car elles ne peuvent produire grâce à leur génome que 13 des 1500 protéines dont elles ont besoin, les autres protéines étant encodées par l'ADN nucléaire. Les Mt sont ainsi dépendantes du noyau et d'autres organites cellulaires pour leur constitution (4).

De la même façon, les Mt sont essentielles au bon fonctionnement de nos cellules. Leur servant notamment de « centrales énergétiques », elles sont présentes en plus ou moins grand nombre dans toutes les cellules de l'organisme. Les cellules à forte activité, telle que les cellules musculaires, hépatiques, rénales, ou les neurones contiennent bien plus de Mt que des cellules ayant besoin de moins d'énergie (3,4,6). Cette énergie est stockée sous la forme de l'Adénosine TriPhosphate (ATP), une molécule possédant une liaison phosphate en position gamma dite à haute énergie (Figure 2a). Cette molécule peut ensuite entrer en jeu dans beaucoup d'autres mécanismes afin de transmettre l'énergie libérée par l'hydrolyse de la liaison pyrophosphate (7).

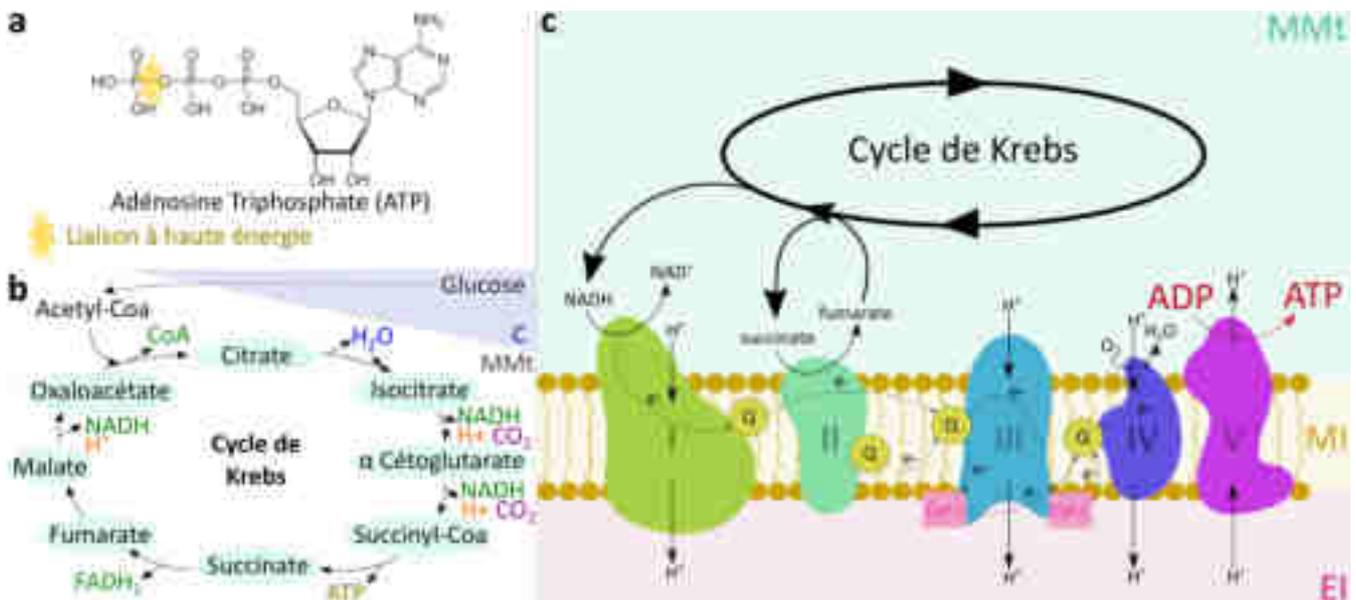
Cependant les Mt ne peuvent plus être limitées à leur rôle de producteur énergétique. Beaucoup d'autres fonctions leurs sont à présent attribuées, concernant aussi bien la mort cellulaire programmée, que la gestion métabolique au cœur de la cellule (4,6).



**Figure 1 : Structure générale d'une mitochondrie.**

**a.** Schéma des structures principales d'une mitochondrie. De l'extérieur vers l'intérieur : la membrane externe (ME), l'espace intermembranaire (EI), la membrane interne (MI), la matrice mitochondriale (MMt). Au sein de la matrice se trouvent l'ADN mitochondrial et les ribosomes mitochondriaux. La membrane interne présente des replis allant vers la matrice, ce sont les crêtes mitochondriales (8).

**b.** Photo colorisée d'une mitochondrie (Mt) prise en microscopie électronique à transmission. La matrice est en bleu, les structures membranaires en rose (9).



**Figure 2 : Illustrations des principaux moyens de production d'énergie par les mitochondries.**

**a.** Adénosine triphosphate (ATP), molécule permettant de stocker l'énergie en vue de son utilisation. En jaune, la liaison à haute énergie entre l'adénosine diphosphate et un phosphate, facilement transférable vers une structure demandant de l'énergie pour être active (7,10).

**b.** Schéma montrant les différents produits du cycle de Krebs. Pour des raisons de simplification, une partie des substrats et les enzymes ne sont pas représentés ici. Le cytoplasme (C) possède un fond bleu et la matrice mitochondriale (MMt) un fond blanc. Les métabolites principaux participant au cycle sont entourés de turquoise, l'eau (H<sub>2</sub>O) en bleu, le dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>) en violet, les protons (H<sup>+</sup>) en orange, les coenzymes en vert, et liaison à haute énergie en jaune (6,11).

**c.** Schéma de la chaîne respiratoire dans la membrane interne mitochondriale (MI) et du cheminement des électrons (e<sup>-</sup>) en son sein. On peut y voir la collaboration avec le cycle de Krebs qui fournit la coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénée (NADH) et le succinate pour ensuite utiliser le fumarate. Le complexe I permet la déshydrogénation de NADH en NAD<sup>+</sup> et le passage de H<sup>+</sup> vers l'espace intermembranaire (EI), le complexe II permet l'oxydation du succinate en fumarate. Les e<sup>-</sup> fournis par ces réactions sont transférés à l'aide de coenzyme Q10 (Q) vers les autres complexes. Le complexe III permet le transport d'H<sup>+</sup> en continuant le transfert d'e<sup>-</sup> avec Q et les hémoprotéines cytochromes c (Cyt c). Le complexe IV continue le transfert d'H<sup>+</sup>, et termine le cheminement d'e<sup>-</sup> en convertissant de l'oxygène (O<sub>2</sub>) en H<sub>2</sub>O. Le complexe V plus couramment nommé ATP synthase achève la chaîne respiratoire par la production d'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et grâce au flux d'H<sup>+</sup> généré par la différence de concentration entre EI et la MMt (6,11–13).

## b. Zoom sur les fonctions des mitochondries

### i. Respiration cellulaire et production d'ATP

Le rôle le plus connu des Mt est celui consistant à fournir de l'énergie à nos cellules (6). Afin d'aborder cette fonction essentielle, il faut revenir sur les composants les plus importants intervenant dans les différents processus qui apportent de l'énergie. Nous avons déjà vu la molécule d'ATP (Figure 2a) permettant le stockage d'énergie, mais des molécules telles que l'O<sub>2</sub>, l'H<sub>2</sub>O et le CO<sub>2</sub> sont également consommées et/ou produites au cours des différentes réactions. Deux principaux moyens permettent d'assurer la production d'énergie au sein des Mt, la voie métabolique du cycle de Krebs (Figure 2b) et la cascade d'oxydo-réduction effectuées par la chaîne respiratoire (Figure 2c) (6,14).

Le cycle de Krebs est un ensemble de réactions qui permet la production d'énergie et de nombreux précurseurs métaboliques (14). Suite à la glycolyse ayant lieu dans le cytoplasme, le glucose est transformé en deux acides pyruviques pouvant être transportés dans la Mt par le transporteur appelé pyruvate translocase. De là, le pyruvate est décarboxylé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) qui pourra entrer en jeu dans le cycle de Krebs. Il se déroule dans la MMt, et est constitué par une chaîne de réactions cycliques démarrant et se terminant par l'utilisation de l'acétyl-CoA. Une molécule H<sub>2</sub>O et un oxaloacétate se combinent à l'acétyl-CoA avec l'aide de l'enzyme citrate synthétase pour donner une coenzyme A et du citrate. Par déshydratation puis réhydratation catalysée par l'enzyme aconitase, le citrate est isomérisé en isocitrate (une molécule avec une composition identique, mais avec une conformation différente). Une enzyme type déshydrogénase permet à l'isocitrate de s'oxyder ensuite en contact de la coenzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NAD<sup>+</sup>) puis de se décarboxyler (perte de CO<sub>2</sub>) pour donner la nicotinamide adénine dinucléotide hydrogénée (NADH), un proton (H<sup>+</sup>) et l'alpha-cétoglutarate. Cette dernière subit la même suite de réaction pour donner du NADH, un H<sup>+</sup> et la succinyl-CoA. L'enzyme succinyl-CoA synthétase permet une phosphorylation oxydative d'un adénosine diphosphate (ADP) en ATP, créant au passage du succinate. Une déshydrogénase permet alors une oxydation du succinate au fumarate, qui s'hydrate ensuite en malate à l'aide de l'enzyme fumarase. Le cycle est terminé par le malate oxydé par une déshydrogénase et la coenzyme NAD<sup>+</sup> pour redonner l'oxaloacétate, une NADH et un H<sup>+</sup> (Figure 2b).

L'autre moyen principal utilisé par les Mt pour produire de l'ATP est la chaîne respiratoire (12,13). Il s'agit d'une suite de réactions réalisées par un ensemble d'enzymes membranaires (appelées complexes) et de transporteurs d'électrons/protons localisés au niveau des crêtes mitochondriales. Il y a cinq complexes : la NADH déshydrogénase (I), la succinate déshydrogénase (II) intervenant pour oxyder le succinate en fumarate dans le cycle de Krebs, la cytochrome c réductase (III), la cytochrome c oxydase (IV), et l'ATP synthase (V) (Figure 2c). La chaîne débute par la déprotonation de NADH en NAD<sup>+</sup> par le complexe I et l'oxydation de succinate en fumarate par le complexe II. Les électrons

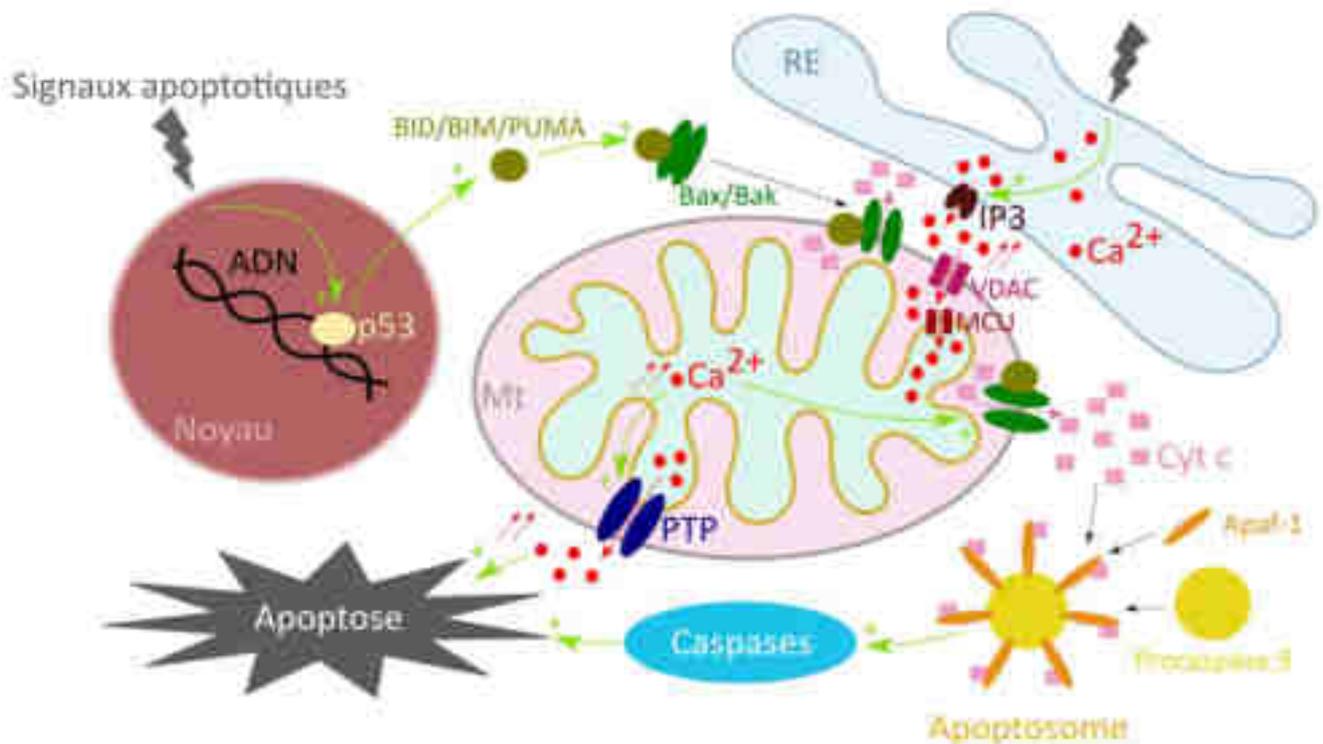
riches en énergie résultants des réactions sont transportés via les coenzymes Q10 (Q) et les cytochromes C (Cyt C) entre les complexes I, II, III et IV. Les H<sup>+</sup> produits par l'ensemble des réactions d'oxydoréduction sont transportés dans l'EI via les complexes I, III et IV grâce à l'énergie fournie par ces électrons. Ces derniers sont ensuite utilisés par le complexe IV pour réduire l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O. L'accumulation de H<sup>+</sup> dans l'EI donne lieu à une différence de concentration entre EI et MMT. Cette différence permet la phosphorylation d'ADP en ATP via l'énergie fournie par le flux d'H<sup>+</sup> vers la MMT au travers du complexe V (Figure 2c).

## ii. Programmation de la mort cellulaire et de son homéostasie calcique

Un autre rôle capital de la Mt est sa participation dans l'homéostasie calcique et la mort cellulaire programmée aussi appelée apoptose (15–17). L'apoptose revêt une importance tout au long du développement d'un organisme pluricellulaire, permettant à ce dernier de se débarrasser de cellules inutiles ou défectueuses en limitant les dégâts que peuvent entraîner les autres types de mort cellulaire (inflammations, libérations de déchets, radicaux libres, etc...) (17). Deux cascades de signalisations principales mènent à l'apoptose : la voie extrinsèque déclenchée par des signaux apoptotiques extérieurs à la cellule, et la voie intrinsèque déclenchée par des signaux intracellulaires comme le stress oxydatif entre autre (17). Les Mt ont un rôle principalement dans la voie intrinsèque. Dans cette voie, les signaux apoptotiques activent le facteur de transcription p53 (17) (Figure 3). Ce dernier favorise la production de protéines pro-apoptotiques telles que BID, BIM ou PUMA, qui à leur tour activent les oligomères Bax et Bak. Ces oligomères activés forment des pores dans la Mt laissant s'échapper les Cyt c de l'EI vers le cytosol. Les cytochromes C forment avec le facteur d'activation de la peptidase apoptotique 1 (Apaf-1) et la procaspase 9 une structure appelée apoptosome, où la procaspase 9 est activée en caspase 9. Cet événement va déclencher d'autres caspases qui mèneront la cellule à entrer en apoptose.

Le calcium (Ca<sup>2+</sup>) régule de nombreuses fonctions cellulaires. Sa concentration intracellulaire régule la fonction de nombreuses protéines, enzymes, transporteurs et de ce fait, va réguler le métabolisme cellulaire et mitochondrial. Les Mt peuvent collaborer avec le réticulum endoplasmique (RE) qui est l'autre principal organite de stockage de Ca<sup>2+</sup> pour contrôler le flux de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> (16). Le RE peut relarguer du Ca<sup>2+</sup> via ses récepteurs à l'inositol triphosphates (IP3), et les Mt peuvent en capter via deux canaux : l'uniporteur de Ca<sup>2+</sup> mitochondrial (MCU) sur la MI, et le canal anionique voltage dépendant (VDAC) sur la ME. Une captation régulée de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> au sein de l'EI et de la MMT donnera lieu à une production énergétique augmentée à son tour, le Ca<sup>2+</sup> à concentration physiologique servant à la régulation positive du fonctionnement de nombreuses enzymes, notamment celles jouant un rôle dans le cycle de Krebs comme la pyruvate, l'isocitrate ou l'α-cétoglutarate déshydrogénase (3). Mais si des signaux apoptotiques interviennent, ils induiront une libération massive de Ca<sup>2+</sup> par le RE via ses récepteurs IP3 (Figure 3). Les Mt seront alors surchargées en Ca<sup>2+</sup>, provoquant l'ouverture de leurs

pores de transition de perméabilité (PTP) qui laisseront sortir massivement le  $\text{Ca}^{2+}$  que les Mt contenaient ainsi que d'autres molécules proapoptotiques comme les cytochromes C. Cet afflux important de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytosol mène à une accélération des processus apoptotiques.



**Figure 3 : Schéma simplifié des événements qui impliquent la mitochondrie (Mt) dans l'apoptose.**

Les signaux apoptotiques peuvent interagir avec des structures nucléaires (gauche) ou du réticulum endoplasmique (droite) ; L'activation du facteur de transcription p53 induit la production des protéines pro-apoptotiques comme BID, BIM ou PUMA qui activent les oligomères Bax et Bak. Suite à leur activation, Bax/Bak forment des pores sur la membrane externe de la Mt, laissant sortir les cytochromes c (Cyt c). Les Cyt c peuvent former, avec les facteurs d'activation de la peptidase apoptotique 1 (Apaf-1) et la procaspase 9, un apoptosome. La procaspase 9 s'y auto-active en caspase 9, activant à son tour d'autres caspases, qui elles-mêmes activent diverses cibles menant à l'apoptose. Des signaux apoptotiques causent également un relargage massif de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans le cytoplasme par le réticulum endoplasmique (RE) à l'aide de ses récepteurs de l'inositol triphosphates (IP3). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est capté par la Mt via l'uniporteur de calcium mitochondrial (MCU) et le canal anionique voltage dépendant (VDAC), causant une surcharge calcique. Cette surcharge a pour effet de potentialiser la sortie des Cyt c mais également l'ouverture des pores de transition de perméabilité (PTP) laissant sortir le  $\text{Ca}^{2+}$  massivement à l'image du RE. L'excès de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique stimule alors les processus apoptotiques (15–17).

### iii. Autres fonctions

D'autres fonctions moins connues mais tout aussi importantes incombent aux Mt.

La  $\beta$ -oxydation, voie de dégradation des acides gras, se déroule au sein de la MMt, et la gestion des lipides des cellules est en partie gérée par les Mt (6,18,19). Les acides gras sont une source non négligeable de stockage d'énergie. Lors de leur catabolisme, ils peuvent fournir plus d'énergie que le glucose en raison d'une structure plus condensée et un rendement énergétique par molécule de carbone plus élevé (6) (14). La  $\beta$ -oxydation permet la production d'acétyl-Coa, utilisé dans le cycle de Krebs, mais aussi la production d'autres coenzymes telles que NADH et le FADH<sub>2</sub> qui participent au fonctionnement de la chaîne respiratoire (19). Pour ce faire, les acides gras et coenzymes A des

cellules sont d'abord assemblés dans le cytoplasme en acyl coenzyme A (acyl-CoA, un acide gras lié à une coenzyme A) par l'acyl-Coa synthétase. Grâce à l'acide aminé appelé carnitine, ils sont transportés d'abord dans l'EI via la carnitine acyl-transférerase, puis dans la MMT à l'aide de la carnitine translocase. Une fois dans la MMT, l'acyl-Coa est engagé dans la  $\beta$ -oxydation afin d'être dégradé. Au sein d'une même cellule, une partie majoritaire des Mt réalise cette  $\beta$ -oxydation, alors qu'une autre partie participe au contraire à la synthèse lipidique (18). Les Mt peuvent en effet fournir du citrate avec le cycle de Krebs, citrate qui sera utilisé en vue de la synthèse de malonyl-Coa puis d'acide gras. Cette synthèse, pourtant antagoniste à la  $\beta$ -oxydation, peut alors être réalisée en même temps selon les besoins de la cellule.

Les Mt sont aussi le lieu de la dégradation de la glutamine, l'acide aminé le plus présent du sang humain, et des acides aminés ramifiés (6). Ils sont dégradés pour que leurs atomes soient réutilisés dans la synthèse d'autres métabolites ou molécules. Le catabolisme des acides aminés ramifiés a notamment une grande importance lorsque l'organisme est soumis jeûne et que les autres ressources sont insuffisantes pour son activité.

Les Mt participent également aux fonctions non négligeables que sont la gestion de la balance redox et des déchets. Les différents processus métaboliques des Mt leur permettent de maintenir l'environnement oxydant cytosolique (ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  à 700) et l'environnement plus réducteur mitochondrial (ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  à 7-8) (6,20). Le métabolisme mitochondrial et cellulaire génère ce qui est considéré comme des déchets cellulaires, des sous-produits métaboliques comme les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), l'ammoniac ou le lactate par exemple. Ces sous-produits sont hautement réactifs et toxiques à haute concentration. Les Mt possèdent des enzymes pouvant assimiler ces produits ou atténuer leur toxicité.

D'une manière générale la machinerie mitochondriale de par ses nombreuses implications métaboliques peut être vu comme un outil de régulation majeur pour les cellules. Ses produits et ses substrats peuvent signer une accélération métabolique de la cellule tout comme sa mort (20).

### c. Conséquences des dysfonctions mitochondriales

Les Mt possèdent ainsi de nombreux rôles, ce qui fait que lors d'un dysfonctionnement, les problèmes qui en résultent peuvent être tout aussi multiples. Les dysfonctionnements mitochondriaux interviendraient dans nombre de pathologies.

Les troubles mitochondriaux tout d'abord peuvent être d'origine génétique, avec une prévalence de 1/5000 (21). Leurs causes sont héréditaires ou acquises et peuvent toucher l'ADN nucléaire ou mitochondrial, rendant complexe leur étude et l'étude de potentielles solutions. Leurs symptômes sont extrêmement variés au vu du nombre d'implications métaboliques des Mt. Les

malades peuvent être asymptomatiques en deçà d'une exposition à un facteur de risque ou d'une certaine charge mutationnelle, mais peuvent aussi présenter des atteintes multisystémiques présentes d'emblées ou d'apparition progressive. Les possibles manifestations sont hétérogènes et impliquent le plus souvent (mais pas exclusivement) les organes à forte demande énergétique. Les symptômes peuvent inclure : dysfonctions oculaires, perte d'audition, atteintes cardiaques, déficience cognitive, démence, acidose lactique, ischémie, épilepsie myoclonique progressive, encéphalopathie, convulsions, insuffisances respiratoires, ataxie, neuropathie, dysfonctions digestives, hypoglycémies, malformations, myopathies, pancytopénies, insuffisance rénale/surrénale, dysfonctions thyroïdiennes, problèmes cutanés (21–24). Les pronostics vitaux sont le plus souvent engagés et les traitements difficiles à trouver du fait de la multitude de causes et symptômes possibles.

D'autres maladies acquises mettraient en cause un dysfonctionnement mitochondrial (22). Parmi ces maladies on trouve : le diabète de type 2 (25), la maladie d'Alzheimer (26), les troubles bipolaires (27), la schizophrénie (28), les troubles anxieux, la dépression (29), la maladie de Parkinson (30), les maladies cardiovasculaires (31), la sarcopénie, la fatigue chronique, la fibromyalgie, le syndrome des ovaires polykystiques (32), ou encore les cancers (33). Ces maladies peuvent avoir comme causes mitochondriales une dysfonction dans la production d'énergie (ex : un manque d'énergie cellulaire face aux réponses au stress dans l'anxiété et la dépression), un manquement dans la dynamique des morphologies mitochondriales (ex : un déséquilibre entre fusion et fission mitochondriales menant à des problèmes cardiovasculaires), une défaillance dans le processus d'apoptose (ex : des cellules insensibles à l'apoptose dans les cancers), ou encore une anomalie dans la chaîne respiratoire (ex : complexe I défaillant dans la maladie de Parkinson).

Les Mt pourraient aussi avoir un rôle dans le processus de vieillissement cellulaire (34). Plusieurs théories existent ; la plus ancienne étant celle de l'accumulation des ROS dans les Mt, et donc une accumulation des dommages qu'ils occasionnent au cours du temps. Plus récemment d'autres théories se sont ajoutées à celle de l'accumulation de ROS, notamment celle impliquant l'expansion clonale des Mt au fil des divisions cellulaires. En effet au cours de la duplication de l'ADNmt, des erreurs de réplication s'accumulent et causent les déficiences vues plus haut et les symptômes associés.

Au vu de l'importance d'un bon fonctionnement des Mt pour la santé de notre organisme, des recherches se sont tournées vers des moyens pour redonner des fonctions mitochondriales saines aux cellules ayant des Mt dysfonctionnelles. La transplantation de Mt saines vers des tissus défectueux serait une solution globale qui s'avère prometteuse.

## II. Le transfert de mitochondries

### a. Des observations de transfert d'organites entre cellules eucaryotes

Les transferts de Mt ont été constatés dans plusieurs contextes physio-pathologiques et auprès de types cellulaires et situations très variées. Les modalités et conséquences de ces transferts de Mt sont très dépendantes du contexte où ils ont été observés, nous allons en voir quelques exemples.

#### i. Observations du transfert de mitochondries durant la réparation tissulaire

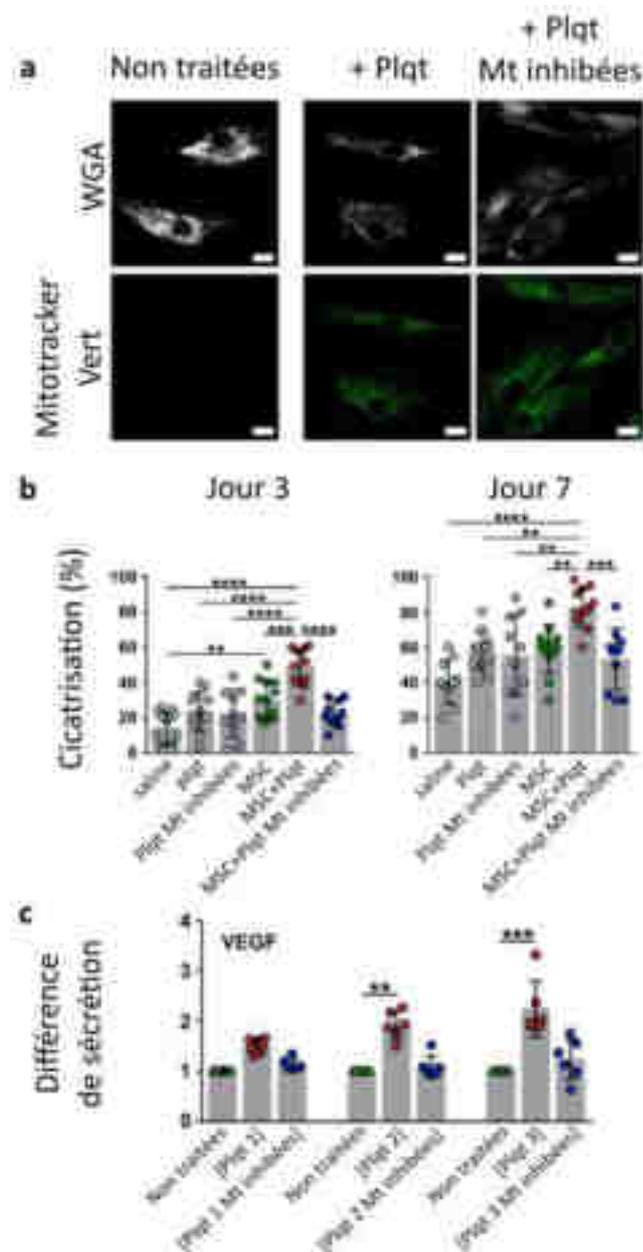
La cicatrisation est le processus qui se réalise lors de la réparation de tissus lésés (35). Lors de ce processus les plaquettes ou thrombocytes interviennent principalement lors de l'hémostase et de l'inflammation, elles permettent d'arrêter rapidement les saignements. Les plaquettes sont anucléées mais conservent leurs organites, dont les Mt.

Les cellules souches sont des cellules peu ou non différenciées avec un potentiel prolifératif important capable d'agir lors de la réparation tissulaire via un renouvellement tissulaire. Des tissus tels que le cerveau ou le cœur donnent lieu à des cicatrisations difficiles, notamment à la suite d'ischémies, en raison de la faible capacité régénérative de leurs cellules. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) font partie des cellules souches pluripotentes présentes dans la moelle osseuse et pouvant se différencier en tissu conjonctif ou musculaire (36). De nombreuses études se sont déjà penchées sur la transplantation de CSM dans des tissus lésés afin d'améliorer leur cicatrisation et certaines d'entre elles ont fait une observation intéressante. L'apport de plasma riche en plaquettes améliore les capacités prolifératives et les autres propriétés des CSM.

Une partie du mécanisme derrière cette potentialisation des effets des CSM a été récemment découverte dans une étude de 2021 de Jennyfer Levoux et ses collègues effectuée sur des souris à qui ils ont transplanté des CSM et plaquettes humaines (35). Les plaquettes transfèrent leurs Mt vers les CSM, ce qui induit chez elles des changements métaboliques et amène à cette potentialisation. Les chercheurs ont bien constaté ce transfert de Mt saines en les marquant au Mitotracker vert (sonde fluorescente pouvant pénétrer les cellules vivantes pour marquer les Mt viables) et en les visualisant par microscopie confocale (Figure 4a). Ils ont pu quantifier ce transfert avec la cytométrie en flux.

Par la suite, ils ont vérifié que les effets observés étaient bien dus au transfert de Mt. Pour ce faire ils ont notamment réalisé les expériences avec des plaquettes aux Mt saines, ou avec des plaquettes aux Mt possédants une chaîne respiratoire non fonctionnelle car préalablement traitées à la roténone et à l'antimycine A (inhibant de la respiration mitochondriale). Si l'effet observé est présent dans les deux groupes, c'est qu'il n'était pas dû au transfert, mais à d'autres propriétés des plaquettes. Les auteurs observent que le transfert de Mt depuis les plaquettes stimule les capacités de cicatrisation et l'angiogenèse. Le taux de fermeture de la plaie déterminé aux jours 3 et 7 après la blessure était

significativement plus élevé chez les animaux traités avec des CSM et des plaquettes par rapport aux cohortes d'animaux ayant reçu une solution saline, des plaquettes seules, ou des CSM seules (Figure 4b). En revanche les plaquettes aux Mt traitées n'ont pas réussi à stimuler l'activité de cicatrisation des CSM, ce sont bien les Mt saines qui amènent cet effet. Pour ce qui est de l'évaluation des effets angiogéniques, les paramètres relevés sont le taux de transcription des gènes de facteurs de croissance dont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), mais aussi le nombre de cellules endothéliales. Aux jours 1 et 3 après la blessure, la transcription de facteurs et le nombre de cellules se sont avérés plus importants dans les plaies greffées avec des CSM et des plaquettes aux Mt non traitées, par rapport aux CSM seules et aux CSM avec les plaquettes aux Mt traitées (Figure 4c). D'autres effets comme une prolifération améliorée ou un effet cryoprotecteur ont été observés indépendamment du transfert de Mt. Ces effets seraient probablement dus aux autres propriétés des plaquettes elles même et leurs effets paracrines.



**Figure 4 : Le transfert de Mt compétentes depuis les plaquettes vers les cellules souches stimule l'efficacité de la cicatrisation et l'angiogenèse (35).**

**a.** Microscopie confocale, échelle blanche 20mm. Cellule souche mésenchymateuse (CSM) humaines 24h après l'incubation avec des plaquettes (Plqt) humaines intactes ou des Plqt humaines exposées à la roténone et à l'antimycine A (inhibant de la respiration mitochondriale). Les membranes cellulaires des CSM sont marquées au WGA, les Mt sont marquées au Mitotracker vert. Les Mt ont bien été transférées des Plqt aux CSM, qu'elles aient été inhibées ou non.

**b.** Pourcentage de cicatrisation des plaies en fonction des conditions aux jours 3 et 7 suivant la blessure. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, and \*\*\*\*p < 0.0001.

**c.** Différence de sécrétion du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) entre les CSM incubées 24h avec des Plqt (inhibées ou non) et les CSM seules. Plusieurs concentrations de Plqt ont été utilisées : [Plqt 1]  $2 \times 10^7$ , [Plqt 2]  $4 \times 10^7$  ou [Plqt 3]  $8 \times 10^7$  platelets/mL.

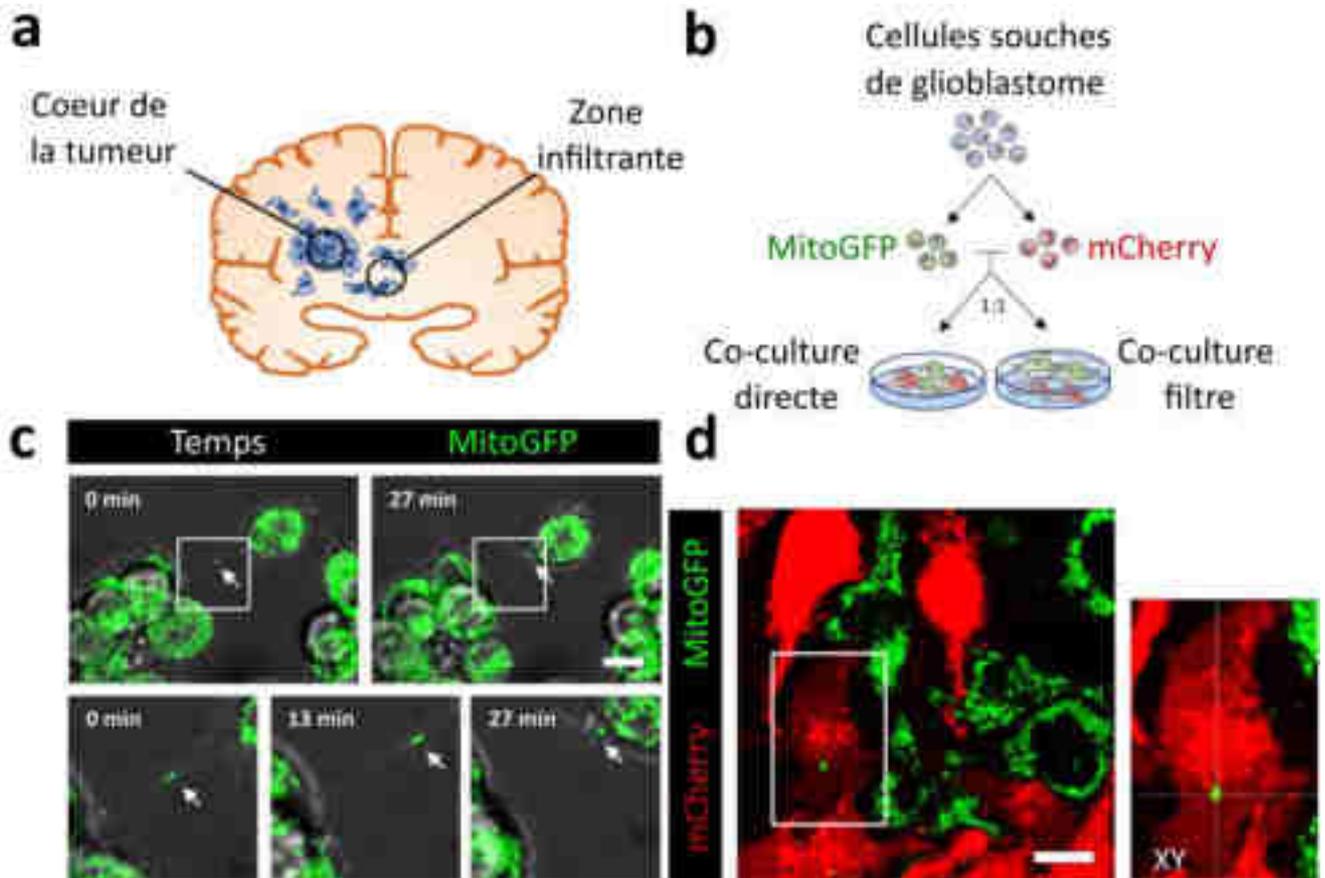
d'après Levoux J et al.

A la suite de cette étude, il a été confirmé qu'un transfert de Mt avait lieu entre CSM et plaquettes, mais aussi que ces Mt lorsqu'elles sont fonctionnelles participent à la potentialisation d'effets positifs des CSM sur la cicatrisation de plaies. Ceci suggère l'importance de vérifier la qualité des Mt lors de transplantations de plaquettes.

ii. Observations de transfert de mitochondries dans des organoïdes de tumeurs type glioblastome

Le glioblastome est le cancer du cerveau le plus fréquent et le plus agressif, causé par une prolifération anormale des astrocytes (37). Il est le sujet de nombreuses études, il représente un défi puisque pour le moment aucune stratégie thérapeutique résolutive ne fonctionne sur ce type de cancer. Sa résistance aux traitements pourrait notamment être due à son hétérogénéité moléculaire intratumorale, la présence de cellules souches de glioblastome, et à l'apparition fréquente de communications intercellulaires complexes. Parmi elles se trouve une communication particulière sous forme de connections par des extensions membraneuses, les nanotubes. Ces communications sont compliquées à étudier en raison de leur fragilité et du contexte tridimensionnel du réseau, mais il a été suggéré que les plus grands de ces nanotubes pouvaient permettre le transfert d'organites dont les Mt.

Une étude de 2021 de Giulia Pinto et ses collègues ont mis en évidence plus en détail ces connexions par nanotubes afin d'étudier leur présence en culture et potentiellement leurs fonctionnalités (37). Pour ce faire, ils ont réalisé des cultures à partir de cellules souches de glioblastomes provenant de zones tumorales infiltrantes (Figure 5a). Le choix a été porté sur ce type cellulaire car il est soupçonné d'être l'une des raisons majeures des rechutes après traitement anticancéreux dans le cas des glioblastomes. Le premier type de culture, plus simple à étudier, est une culture classique en deux dimensions. La seconde est une coculture à partir de cellules qui expriment le marqueur de MMT MitoGFP rendant les Mt vertes fluorescentes (cellules donneuses) et de cellules qui expriment la protéine mCherry colorant le cytosol en rouge fluorescent (cellules receveuses) (Figure 5b). La troisième est une co-culture des donneuses et receveuses en trois dimensions, culture aussi appelée organoïde ou tumoroïde (organoïde de tumeur). Les organoïdes sont des modèles qui copient avec plus d'exactitude l'architecture en trois dimensions et par conséquent le fonctionnement d'un organe (38). Pour ces trois modèles de culture, deux tissus sources ont été utilisés, l'un provenant d'une zone à l'activité métabolique plus élevée et l'autre d'une zone moins active. Cette décision visait à apprécier l'impact de l'hétérogénéité cellulaire de la tumeur sur les structures qui seront créés par les cellules, leur activité et leurs réponses aux traitements. Les cultures en deux dimensions ont été étudiées puis fixées au bout de 6h. Les cocultures étaient fixées aux jours 2 et 5 et les tumoroïdes aux jours 6, 9, 13, 16, 20 et 23.



d'après Pinto G et al.

**Figure 5 : Constataion du transfert de mitochondries via nanotubes dans une coculture directe entre cellules souches de glioblastome (37).**

- a. Schéma d'une tumeur cérébrale, avec le cœur de la tumeur et les cellules des zones infiltrantes.
- b. Schéma des types de cocultures réalisées dans l'étude. La moitié des cellules souches de glioblastome ont vu leur Mt marquées avec la MitoGFP verte, l'autre moitié exprimant la mCherry rouge. Les deux types de cellules ont été mises en coculture directe ou indirecte (filtre empêchant un contact physique entre elles).
- c. Images d'une Mt marquée au MitoGFP vert allant d'une cellule donneuse vers une receveuse via une structure type nanotube pendant 27 min. Vidéos acquises avec un microscope à disque rotatif, échelle blanche 10µm.
- d. Image d'une Mt marquée au MitoGFP vert dans une cellule receveuse marquée à la mCherry rouge après cinq jours. Les cellules ont été fixées puis visualisée via microscopie confocale avec un objectif de 63x, échelle blanche 10µm.

Toutes les cultures ont pu donner lieu à la formation des structures type nanotubes connectant les cellules entre-elles. Pour la culture en deux dimensions, les connexions ont pu être visualisées à l'aide de marqueur fluorescent en imagerie directe puis après fixation (Figure 5c et 5d). Les cellules connectées ont pu y être quantifiées, atteignant les 10% pour la culture au métabolisme le moins actif et jusque 15% pour la plus active. La quantification des connexions était cependant trop complexe à réaliser sur les tumoroïdes pour les raisons évoquées plus tôt. La cytométrie en flux sur les cocultures a confirmé le passage de Mt via les nanotubes. Entre 1 et 3% des cellules receveuses ont perçu des Mt de la part des donneuses. Le taux de transfert dépend de la densité des nanotubes (donc de l'activité métabolique du tissu source) et augmente avec le temps. Lorsque les cellules étaient séparées par un filtre empêchant les contacts physiques entre donneuses et receveuses, le transfert de Mt ne se faisait pas. Ceci confirme que le transfert s'effectue via un contact direct entre cellules, comme des nanotubes dans ce cas précis. Les taux de prolifération étaient sensiblement les mêmes indépendamment des

sources ou des transferts de Mt, laissant à penser que ces facteurs n'impactent pas la prolifération. Les tumoroïdes ont présenté des nanotubes avec une hétérogénéité cellulaire et des structures bien plus proches des modèles *in vivo*. Tout comme pour la coculture en deux dimensions, le pourcentage de cellules receveuses percevant des Mt dépend du nombre de connexion et du temps, atteignant entre 3% et 8% de transfert après 23 jours.

Au final cette étude a réussi à montrer que les cellules souches de glioblastomes pouvaient créer des réseaux intercellulaires complexes permettant le transfert de Mt. L'effet de ces transferts sur les cellules est encore à étudier. On peut cependant noter que comme pour l'étude du transfert de Mt entre plaquettes et CSM, le transfert de Mt ne semble pas influencer la prolifération cellulaire.

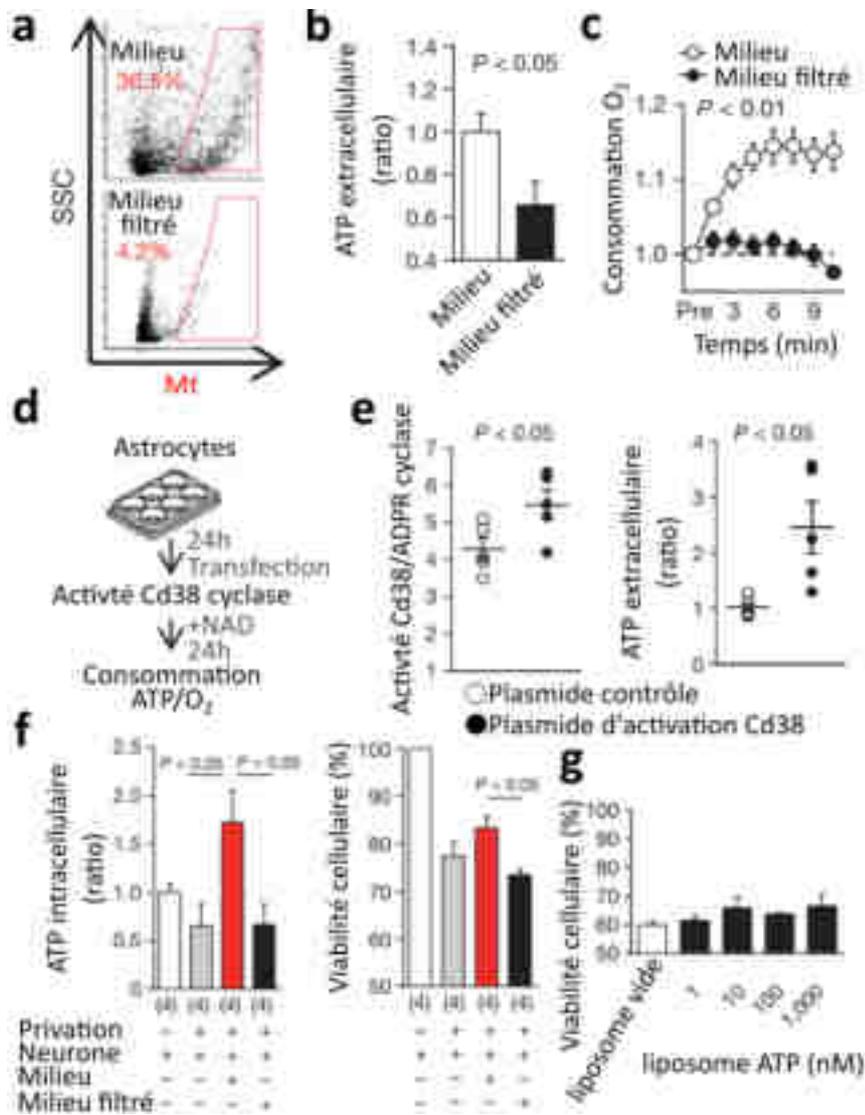
### iii. Observation de transfert de mitochondries des astrocytes aux neurones

Les neurones sont les cellules capables de recevoir, traiter puis transmettre les informations perçues ou envoyées par le cerveau (39). Leur activité importante les rend énergivores et donc très sensibles à l'ischémie cérébrale (3,40). Les astrocytes sont quant à eux les cellules protectrices des neurones impliquées dans de nombreux processus comme le développement neurologique, le métabolisme cérébral, la protection contre des événements tel que l'ischémie, le stress oxydatif et l'excitotoxicité (41). Un mécanisme de transfert des Mt non fonctionnelles depuis les neurones vers les astrocytes est déjà connu, impliquant que les astrocytes aident également les neurones dans le recyclage d'éléments qui sont obsolètes (42).

En 2016, Kazuhide Hayakawa et ses collègues publient des données montrant que les astrocytes peuvent produire des particules extracellulaires contenant des Mt extracellulaires fonctionnelles pour soutenir des neurones en difficulté, notamment après un accident vasculaire cérébral (AVC) (41). Le premier objectif était de voir si les particules extracellulaires dans les milieux des astrocytes contenaient des Mt fonctionnelles. La microscopie électronique a confirmé leur présence dans des particules extracellulaires provenant de milieu conditionné d'astrocytes corticaux de rat. Des expériences de marquage par le traceur fluorescence Mitotracker TM suggèrent que les Mt sont bien fonctionnelles. Afin de vérifier ce point, ils ont effectué une filtration des milieux extracellulaires étudiés à travers des filtres de 0,2 µm pour enlever les particules et les Mt qui ont une taille pouvant aller de 0,5 à 1 µm (Figure 6a). Cette action a été suivie d'une réduction des mesures de l'ATP mitochondrial et de la consommation d'oxygène dans le milieu, indiquant que les Mt étaient fonctionnelles (Figure 6b et c).

Par la suite la signalisation  $\text{NAD}^+$ -CD38-cADPR- $\text{Ca}^{2+}$  a été identifiée comme mécanisme candidat sur la base d'évènements observés impliquant la régulation calcique. La CD38 est une glycoprotéine catalysant la cyclisation de la  $\text{NAD}^+$  en cADPR capable d'induire une mobilisation calcique promouvant l'endocytose des Mt. Pour valider cette hypothèse, l'activité de la glycoprotéine

CD38 astrocytaire a été régulée à la hausse en introduisant un plasmide d'activation (Figure 6d) ou en stimulant la voie à l'aide de cADPR. L'augmentation de l'activité de la glycoprotéine CD38 dans les astrocytes aboutit à une augmentation significative des paramètres fonctionnels des Mt dans le milieu de manière dépendante au  $Ca^{2+}$ , validant cette signalisation comme mécanisme de transfert (Figure 6e).



d'après Hayakawa K et al.

Afin d'étudier l'effet de la présence des Mt extracellulaires sur les neurones voisins, notamment en condition de privation, les chercheurs ont utilisé des neurones corticaux de rat soumis à une privation d'oxygène et de glucose, soit dans un milieu astrocytaire contenant des Mt, l'autre dans un milieu dépourvu de Mt. Après 18h de privation ils ont mesuré la viabilité cellulaire et les niveaux d'ATP intracellulaire, qui étaient significativement améliorés par la présence des Mt (Figure 6f). Pour être sûr que l'effet n'était pas dû qu'à l'ATP, ils ont également comparé ces résultats à ceux obtenus avec des apports en ATP uniquement. Ces apports ont été délivrés par des liposomes remplis d'ATP et ont bien confirmé que l'ATP seul n'avait pas d'effet protecteur (Figure 6g). La présence de Mt astrocytaires marquées dans les neurones a également été observée par microscopie confocale. Ces

**Figure 6 :** Le transfert de Mt extracellulaires fonctionnelles via un milieu conditionné dérivé des astrocytes se fait de manière dépendante de la signalisation CD38-cADPR-calcium et augmente *in vitro* les taux d'ATP et la viabilité cellulaire lors de conditions de privation (41).

**a.** La cytométrie en flux des milieux conditionnés dérivés des astrocytes corticaux de rats aux Mt marquées au Mitotracker rouge montre que le filtre 0,2 $\mu$ m réussi à épuiser les niveaux de Mt extracellulaires.

**b.** et **c.** Les Mt extracellulaires sont actives car l'ATP extracellulaire et la consommation d'oxygène, sont diminués suite à la filtration à 0,2 $\mu$ m enlevant les Mt des milieux.

**d.** Schéma du protocole testant l'activation de CD38 médiée par CRISPR/Cas9.

**e.** Le plasmide d'activation permet bien l'augmentation de l'ATP extracellulaire, validant la voie de signalisation.

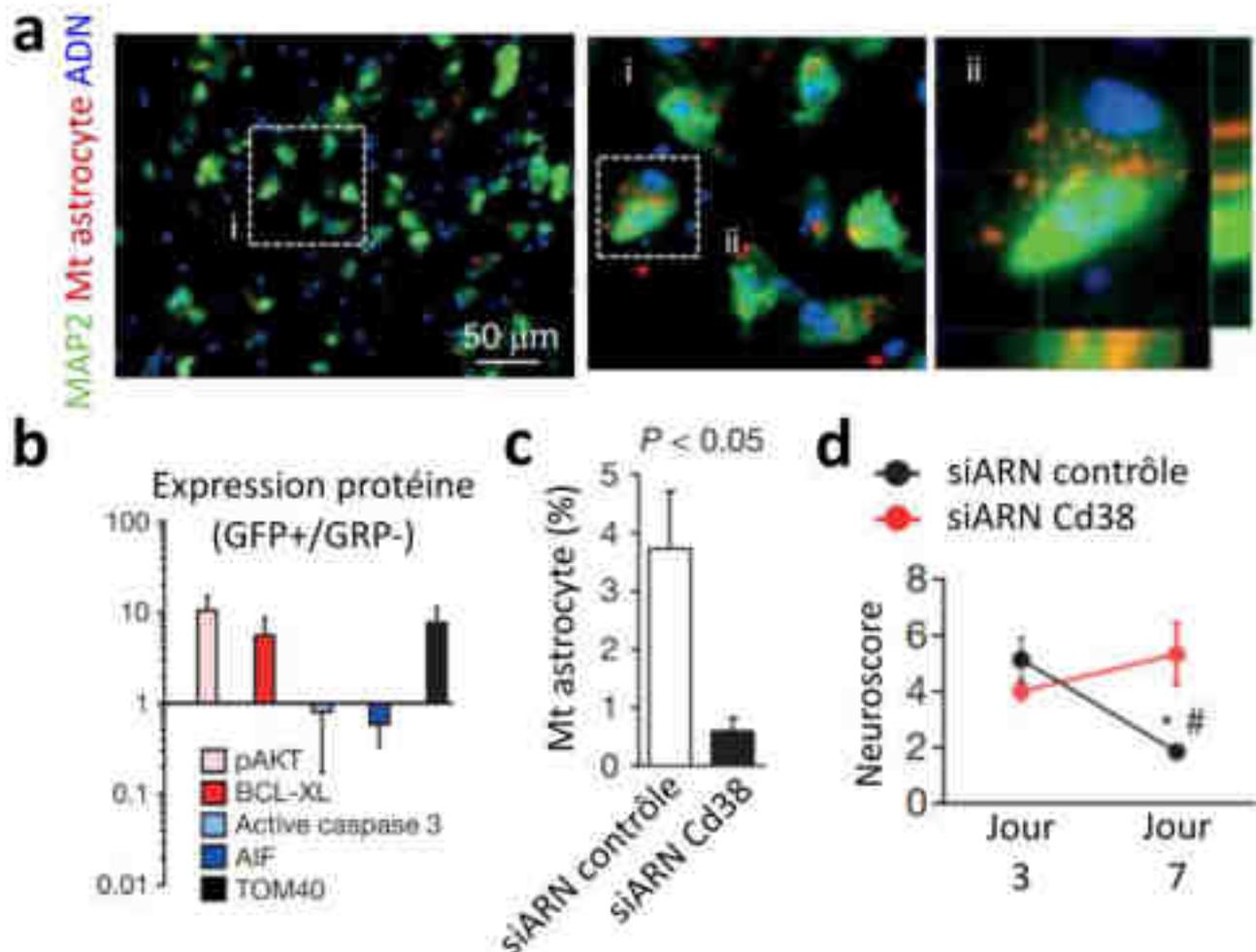
**f.** Les milieux dérivés des astrocytes non filtrés peuvent restaurer les niveaux d'ATP et la viabilité cellulaire des neurones endommagés.

**g.** L'apport d'ATP (concentration entre 1 et 100nM) seul via liposome ne suffit pas à améliorer la viabilité cellulaire des neurones de manière significative suite à l'inanition et l'hypoxie.

études laissent donc penser que l'ensemble des propriétés des mitochondries astrocytaires participe aux bénéfices observés sur les neurones.

Le dernier objectif était de savoir si le mécanisme et le bénéfice agissait lors de situations pathologiques *in vivo*. Des expériences sur des souris déficientes en CD38 ont montré qu'elles se remettaient moins bien suite à des lésions cérébrales et qu'elles étaient plus sujettes aux dysfonctionnements comportementaux par rapport à des souris normales. Combiné aux résultats cellulaires précédant, le tout semble compatible avec l'hypothèse selon laquelle la signalisation CD38 peut aider les astrocytes à transférer des Mt vers les neurones afin de promouvoir leur survie après des lésions. Un modèle murin d'ischémie cérébrale focale et des cultures primaires d'astrocytes corticaux de souris marquées avec le Mitotracker rouge ont été utilisés pour vérifier l'hypothèse *in vivo*. Les particules mitochondriales extracellulaires ont été collectées du milieu d'astrocytes puis injectées dans la zone péri-infarctus des souris précédemment soumises à un AVC. Après 24h l'immunomarquage a suggéré que les Mt astrocytaires étaient bien dans les neurones (Figure 7a). Cette information validée, les chercheurs ont ensuite utilisé des souris transgéniques possédant des astrocytes fluorescents verts. Là encore 24h après l'AVC, des signaux de particules mitochondriales fluorescentes sont apparus dans les neurones adjacents. Ces derniers ont montré une augmentation générale des signaux liés à la survie cellulaire (Figure 7b). La suite des recherches s'est concentrée sur des expériences de perte de fonction de la voie NAD<sup>+</sup>-CD38-cADPR-calcium pour la valider *in vivo*. Des ARN interférents, contrôle ou ciblant le mRNA de CD38 ont été injectés aux modèles murins cinq jours après leur AVC. Deux jours post injection, l'expression de CD38 a été régulée à la baisse pour les astrocytes. Les autres types cellulaires exprimant CD38 n'ont pas été affectés. Le liquide céphalo-rachidien a ensuite été prélevé afin de quantifier les particules mitochondriales par cytométrie de flux. La fluorescence a permis de constater un nombre de particules et une consommation d'oxygène réduits par rapport au contrôle. Parallèlement, le nombre de Mt neuronaux a aussi significativement diminué, impliquant qu'interférer avec l'expression de CD38 peut supprimer le transfert de Mt des astrocytes vers les neurones (Figure 7c). Les autres conséquences relevées sur les modèles murins sont une réduction de facteurs de la neuroplasticité et une aggravation des résultats neurologiques (Figure 7d).

L'ensemble de ces études sont favorables à l'hypothèse que les astrocytes peuvent libérer des vésicules contenant des Mt fonctionnelles dans le milieu extracellulaire. Ces Mt seraient ensuite transférées aux neurones adjacents pour permettre une meilleure récupération à la suite de lésions ou d'un AVC.



d'après Hayakawa K et al.

**Figure 7 :** Suite à une ischémie le transfert de Mt d'astrocytes vers les neurones *in vivo* se fait de manière dépendante de la signalisation CD38-cADPR-calcium et améliore la survie cellulaire, alors que l'arrêt du transfert cause une aggravation des résultats neurologiques (41).

- a.** Trois jours après 60min d'ischémie transitoire locale dans le cortex cérébral, des particules mitochondriales astrocytaires (particules comptant des Mt libres ou encapsulées dans des fragment d'astrocyte, Mitotracker rouge) y ont été perfusées. 24h après la perfusion, les Mt sont à l'intérieur des neurones péri-infarctus. Image Z-stack après immunomarquage.
- b.** Les neurones ayant reçu les Mt astrocytaires ont vu leurs protéines liées à la survie cellulaire (phosphorylée-AKT, BCL-XL) et une protéine mitochondriale (TOM40) augmenter, sans augmentation des protéines liées à l'apoptose (caspase 3, AIF). Mesure obtenue par Western blot.
- c.** Au jour sept après l'ischémie, le nombre de Mt astrocytaires marquées dans le liquide céphalo rachidien est réduit si le CD38 astrocytaire est supprimé par siARN (n = 6 souris par groupes).
- d.** Les résultats neurologiques ici mesurés via les scores de gravité neurologique (neuroscore) sont aggravés (augmentés) lorsque la signalisation Cd38 est supprimée. \*#  $P < 0,05$  par rapport au jours 3 et 7 respectivement.

Les trois exemples précédents se déroulent dans des situations et avec des mécanismes très variés. Les articles y traitaient surtout du déclenchement, du contexte et/ou des potentielles conséquences du transfert de Mt. Mais un autre point important à élucider est le mécanisme permettant aux cellules receveuses de capter les Mt.

## b. Les possibles mécanismes de transferts et captation

Différentes méthodes de transfert ont pu être constatées dans les études portant sur ce sujet. Les mécanismes de ces transferts sont encore en cours d'études et débattus, ils semblent différer selon le contexte et le type cellulaire. Les transferts pourraient avoir lieu par transmission directe intercellulaire et/ou en passant par l'environnement extracellulaire. Deux méthodes de transfert sont privilégiées pour le moment, de par la fréquence d'observation de ces phénomènes.

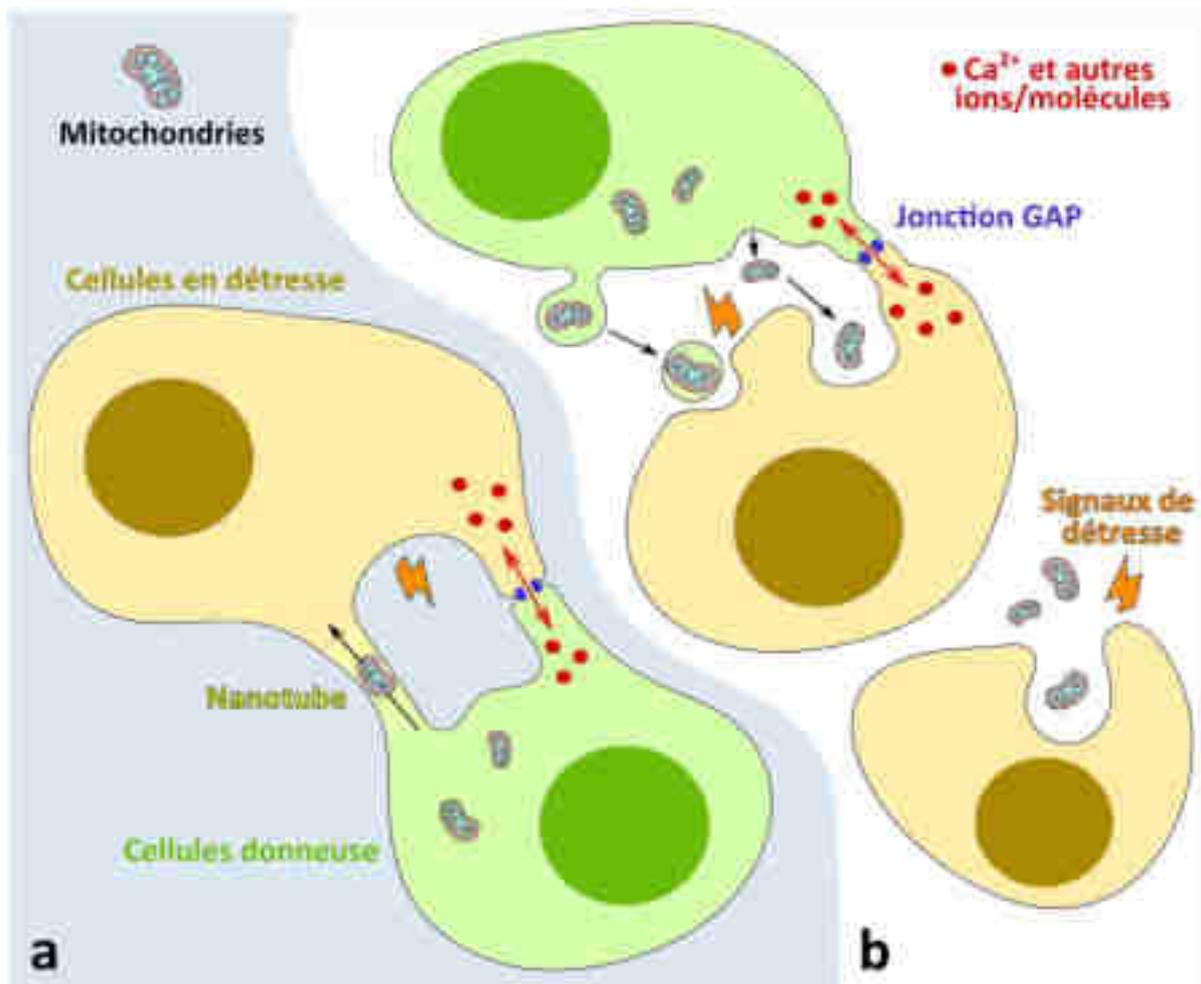
### i. Nanotubes

Comme vu plus haut (cf 2.a.ii.) , les nanotubes sont des structures récemment découvertes qui pourraient jouer un rôle important dans le transfert direct intercellulaire (37,43–45) (Figure 8a). Il s'agit de petites structures formant des tunnels créant une continuité cytoplasmique entre au moins deux cellules. Ces tunnels sont capables d'échanger des contenus allant d'ions à des vésicules voir des organites entiers comme des Mt. Ils peuvent atteindre 900nm d'épaisseur et être plus longs que les cellules dont ils sont originaires. Très fragiles et compliqués à étudier, leur composition s'est révélée très diversifiée. Ils peuvent être simples ou constitués d'un faisceau de plusieurs structures tubulaires. Ces tubes sont parcourus d'éléments du cytosquelette, le squelette de la cellule composé de microfilaments d'actines, de filaments intermédiaires et de microtubules (46,47). Le cytosquelette sert à structurer et modifier la forme de la cellule, et il permet différents transits intracellulaires. Il a plus souvent été rapporté que les nanotubes contiennent des microfilaments d'actines parallèles ou tressés les uns par rapport aux autres (37,48,49). Mais les plus grands nanotubes pourraient aussi contenir des microtubules (49). Les échanges se feraient le long du cytosquelette, dans le cas de l'actine à l'aide du moteur moléculaire qu'est la myosine (44).

Pour ce qui est de la formation des nanotubes, il a été suggéré qu'une formation de protubérances partent d'une ou des deux cellules avant de se rejoindre. Une autre possibilité est que les cellules soient d'abord en contact puis forment un nanotube en s'éloignant l'une de l'autre (49). Dans tous les cas, les signaux pouvant déclencher ces formations pourraient être multiples et seraient des signaux de détresse principalement dus au stress cellulaire, à la privation et/ou aux dommages cellulaire/mitochondriaux (37,45,49). La transmission de ces signaux peut être facilité par la formation de jonctions GAP entre extensions cellulaires (37,45) (Figure 8a). Les jonctions GAP ne laissent passer que les ions et petites molécules hydrophiles par des canaux de 2nm (50). Ces canaux sont formés des connexines, comme la connexine 43 (Cx43) qui est la plus étudiée et qui peut être mutée pour vérifier l'implication des jonctions GAP dans ces processus. Les jonctions GAP servent généralement au couplage électrique et métabolique d'un ensemble de cellules. Dans le cas du transfert de Mt ces jonctions serviraient faciliter la communication cellulaire afin d'enclencher le transfert. Cette hypothèse est cohérente avec diverses études qui ont constaté des transferts de Mt fortement

diminués lorsque la Cx43 est non fonctionnelle, et augmenté lors de l'utilisation d'activateur des jonctions GAP (49,51,52).

De plus la communication via jonctions GAP ne faciliterait pas seulement le transfert de Mt par les nanotubes, mais aussi le transfert indirect (52).



**Figure 8 : Schéma des mécanismes de transfert mitochondrial (37,45,53).**

**a.** Transfert direct par connexion via nanotube, facilité par la communication cellulaire via jonction GAP.

**b.** Transfert indirect de Mt seules ou intravasculaires via endocytose, facilité ou non par jonction GAP.

ii. Endocytose

Que des nanotubes ou jonctions GAP soient présents ou non, le transfert de Mt peut également se faire de manière indirecte par la formation de vésicule contenant des Mt ou par l'expulsion de Mt seules (45) (Figure 8b). Là encore le mécanisme précis permettant de déclencher le transfert par formation de vésicule ou extrusion n'est pas connu, mais il serait aussi la conséquence des signaux de détresse des cellules environnantes. Ces vésicules et Mt sont ensuite captées par les cellules receveuses, notamment par endocytose (transport d'un élément extérieur vers l'intérieur de la cellule par invagination de la membrane cytoplasmique) (54) (Figure 8b).

Les mécanismes possibles derrière l'engagement de ces endocytoses ne sont pas tous connus. L'un de ceux mis en évidence et vu plus haut (cf 2.a.iii) est celui de l'endocytose enclenchée par

signalisation NAD<sup>+</sup>-CD38-cADPR-Ca<sup>2+</sup> qui s'active lorsque les cellules sont privées d'oxygène et glucose (41,54). Cette situation est susceptible d'arriver aux cellules des zones d'ischémie ou aux cellules tumorales victimes de l'effet Warburg qui surconsomment le glucose au détriment de l'oxygène. La glycolyse ralentit et par conséquent la conversion de NAD<sup>+</sup> en NADH diminue, amenant à une accumulation de NAD<sup>+</sup>. Cette accumulation va amener une conversion augmentée de NAD<sup>+</sup> en cADPR par la CD38. La cADPR va enclencher une mobilisation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire. Ce Ca<sup>2+</sup> libéré à proximité de la membrane promeut alors une endocytose dépendante de l'actine.

Après avoir été endocytée les Mt vont alors échapper au système de dégradation endolysosomal par un mécanisme encore inconnu. Elles rejoignent et fusionnent efficacement avec le réseau de Mt endogène (55). A noter que les Mt ne semblent pas enclencher de réactions immunitaires aiguës ou chroniques, même lors de transfert de Mt provenant d'espèces différentes (55). Ainsi les Mt sans vésicules pouvant aussi être endocytées, il est possible d'effectuer un transfert de Mt isolées sans transplantation de cellules donneuses entières.

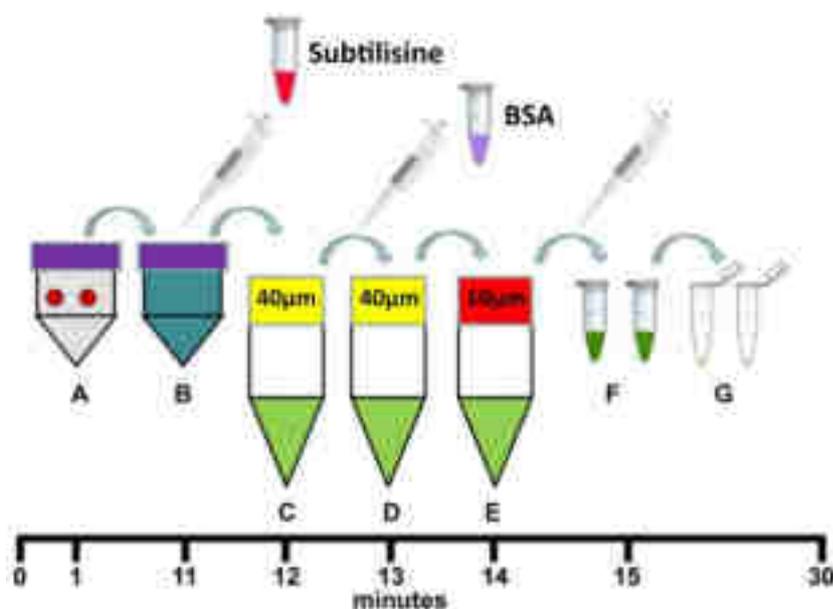
### c. Isolation des mitochondries pour les études cliniques

Lors des différentes études nécessitant des Mt seules, ces dernières doivent être isolées au préalable du tissu donneur (56). Les tissus utilisés sont en général des tissus aux cellules riches en Mt sur lesquels des biopsies non dommageables sont réalisables, comme par exemple les tissus musculaires ou hépatiques (3). Plusieurs types de dons sont possibles : autologue pour un don où donneur et receveur sont les mêmes individus, homologue pour un don provenant d'un autre individu de la même espèce, et hétérologue pour un don provenant d'un individu d'une autre espèce. Dans le cas d'études cliniques, il est préférable d'effectuer un don autologue pour limiter au maximum les risques immunitaires, à partir de tissu musculaire dont le prélèvement est le moins invasif. Il faut que le transfert de Mt puisse se faire le plus rapidement possible, que les Mt soient viables et pures, mais aussi que la taille des biopsies soit réduite.

Pour ce qui est de l'isolation de Mt bien préservées, elle peut être effectuée depuis 1948 (56). La première technique utilisée est celle de la centrifugation différentielle. Son principe est basé sur la différence de taille et de vitesse de sédimentation entre les organites. Elle consiste à séparer les Mt des débris tissulaires et noyaux par une centrifugation à faible vitesse, puis séparer les Mt des autres organites par une centrifugation à grande vitesse. Cette technique a un rendement de 0,5 mg de protéine mitochondriale pour 100 mg de tissu musculaire, mais est trop lente pour une utilisation clinique (entre une et deux heures). Une autre technique est celle de l'ultracentrifugation, mais elle ne serait pas non plus utilisée en clinique à cause de sa lenteur (deux heures), son faible rendement, et la perte d'intégrité mitochondriale trop importante. Elle n'est utilisée que pour obtenir les mitochondries les plus pures possible. Récemment deux techniques ont fait leur apparition. La séparation magnétique

mitochondriale qui permet d'isoler les Mt à l'aide d'un champ magnétique après les avoir marquées d'un anticorps fixé à une microbille métallique. Les Mt sont récupérées en quatre-vingt-dix minutes avec une haute pureté et un haut rendement. Mais la technique la plus intéressante est celle de l'isolement et de purification rapides des Mt (56,57). L'échantillon est placé dans une solution contenant une enzyme protéolytique pour dissocier le tissu (Figure 9). L'homogénat résultant est ensuite passé dans plusieurs filtres puis centrifugé afin de récupérer les Mt. Cette méthode ne prend plus que trente minutes et possède un rendement très important avec des Mt viables et pures. Elle est donc privilégiée pour l'exécution clinique d'un transfert de Mt.

Les techniques sont réalisées à basse température afin de conserver les Mt et ralentir leur activité (57,58). Suite à leur isolation elles sont mises dans la solution véhicule puis doivent être de préférence transplantées le plus rapidement possible, sans congélation intermédiaire pour ne pas altérer leurs fonctionnalités (59).



D'après Preble J M et al.

**Figure 9 : Schéma pour l'isolement des mitochondries par dissociation tissulaire et filtration différentielle (57).**

- a. Transférer deux biopsies dans un tube de dissociation contenant 5ml de tampon d'homogénéisation, homogénéiser les échantillons en utilisant le programme d'homogénéisation de 1 min du dissociateur de tissus.
- b. Ajouter 250µl de Subtilisine A à l'homogénat dans le tube de dissociation et incuber sur glace 10min.
- c. Filtrer l'homogénat au travers d'un filtre à mailles de 40µm mouillé dans un tube à centrifuger sur de la glace, puis ajouter 250µl de solution mère d'Albumine de sérum bovin (BSA) au filtrat.
- d. Filtrer le filtrat à travers un nouveau filtre à mailles de 40µm mouillé dans un tube à centrifuger sur glace.
- e. Filtrer le filtrat à travers un nouveau filtre à mailles de 10µm mouillé dans un tube à centrifuger sur glace.
- f. Transférer le filtrat dans des microtubes et centrifuger à 9 000 x g pendant 10min à 4°C.
- g. Retirer le surnageant, remettre en suspension et combiner les culots de Mt dans 1ml de tampon de respiration.

### III. Exemple de champs d'applications possibles pour la transplantation mitochondriale, présentation d'études *in vitro* et *in vivo*

#### a. Ischémies cardiaques

Le cœur, qui est l'organe qui permet au sang de circuler dans notre corps, bat en continu. En conséquence il nécessite un apport constant d'oxygène afin de maintenir son activité importante. Lors d'épisodes d'ischémie cardiaque, les cardiomyocytes voient leur état décliner très rapidement à cause du manque d'oxygène. Les Mt se voient endommagées, et toutes leurs fonctions sont perturbées. Ces fonctions, parmi lesquelles on retrouve notamment la respiration cellulaire et la production d'énergie, sont essentielles à la survie cellulaire mais aussi à la guérison du tissu cardiaque. Ce qui implique qu'une fois endommagées, les conséquences de ces perturbations mitochondriales perdurent même après reperfusion. L'ischémie provoque sur le tissu une zone dite « d'aire à risque » pouvant résulter à un tissu abimé (infarctus) qui, soit occupera toute l'aire affectée, soit seulement une partie, auquel cas on qualifie la zone soignée de tissu sauvé (Figure 10) (55,56,60–62).



**Figure 10 : Schéma de l'aire à risque et du tissu sauvé par rapport à la zone réelle de l'infarctus du myocarde (63).**

L'aire à risque (en gris) est une aire estimant la zone maximale du myocarde (en rouge) pouvant être endommagée à la suite d'un infarctus (en jaune). La taille de l'aire à risque dépend notamment de la zone, des conditions de perfusion et de la durée de l'infarctus. Le tissu sauvé (en bleu) résulte de la différence entre cette aire et la taille réelle de l'infarctus après coup.

Actuellement, les produits pharmaceutiques ou substrats pouvant être délivrés sont limités en termes de cardioprotection ou de rétablissement des fonctions mitochondriales. Des études se sont donc penchées sur la question de savoir si la transplantation de Mt pouvait amener une solution plus efficace à ce problème (55,60–62).

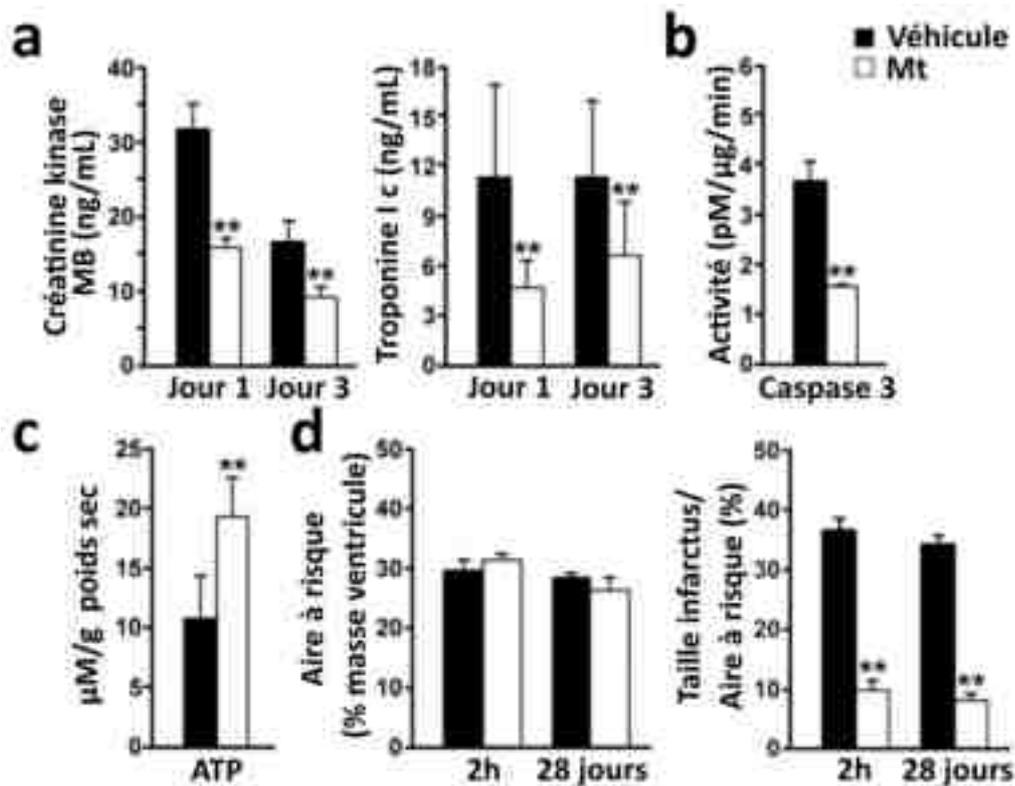
Les études réalisées jusqu'à maintenant le sont surtout en préclinique sur des populations de rats, souris, lapins ou porcs (55,61,62). Les études sur le porc s'expliquent par les similitudes du cœur de porc avec le cœur humain, ce qui en fait un modèle plus pertinent pour le passage à des études en clinique. Pour le moment seules deux études cliniques ont été réalisées par le même groupe sur une population pédiatrique (55,64).

i. Etudes *in vivo*.

L'une des premières études précliniques avec des résultats probants sur ce sujet est celle de 2012 d'Akihiro Masuzawa et ses collègues (61). Réalisée sur 54 lapins blancs de Nouvelle-Zélande, cette étude a testé le transfert autologue de Mt isolées de tissu musculaire pectoral ou de solvant seul. Les Mt ont été marquées. L'ischémie cardiaque régionale était provoquée par la scarification de l'artère descendante antérieure gauche pendant 30 minutes. Au bout de 29 min, les injections de Mt ou solvant étaient réalisées dans l'aire à risque. Les lapins étaient ensuite laissés en convalescence 2 heures ou 28 jours. De nombreux paramètres et marqueurs ont été monitorés durant cette expérience.

La détection de Mt via fluorescence était évidente dès 2 heures post-transplantation. Comme il a résulté des épisodes d'arythmies des précédentes expériences incluant la transplantation de myoblastes, ce paramètre a été surveillé. Ici, les battements du cœur n'étaient pas perturbés après les injections de Mt ou solvant, que ce soit avant, quelques minutes après, ou 28 jours après les injections. Le transfert de Mt ne semble donc pas pro arythmique. Aux jours 1 et 3 suivants le transfert, les biomarqueurs de l'ischémie ont d'avantage diminués pour les groupes ayant reçu des Mt que pour ceux injectés avec le solvant (Figure 11a). Au jour 28 les marqueurs de l'apoptose, comme l'activité de la caspase-3, étaient aussi significativement plus bas dans le groupe ayant reçu les Mt (Figure 11b). A contrario les Mt ont amené une consommation accrue d'oxygène (score d'enrichissement de la respiration cellulaire de 3,48), de la synthèse d'ATP (Figure 11c) et ont induit la production de cytokines impliquées dans des voies de signalisation cellulaire importantes pour la préservation de l'énergie myocardique, la viabilité cellulaire et la fonction cardiaque (score d'enrichissement de la génération de métabolites précurseurs et d'énergie de 3,59). Pour ce même groupe, comparé au groupe n'ayant reçu que le solvant, la taille de l'infarctus était bien plus faible après la convalescence (Figure 11d). Enfin, les mesures de l'électrocardiogramme ont montré que le cœur ayant reçu les Mt retrouve des contractions normales dans les 10 min suivant la reperfusion, alors que l'autre groupe montre une hypokinésie persistant jusqu'au 28<sup>e</sup> jour.

Cette étude présente des résultats cohérents par rapports aux 5 autres études précliniques aux objectifs similaires réalisées entre 2016 et 2020 et présentées dans une revue de 2021 de Kei Hayashida et ses collègues (55). Toutes ces études ont pu démontrer des effets bénéfiques du transfert de Mt.



D'après Masuzawa A. et al.

**Figure 11 : Le transfert autologue de Mt chez des lapins ayant subi une ischémie régionale permet d'améliorer l'état de leurs lésions et leurs fonctions cardiaques (61).**

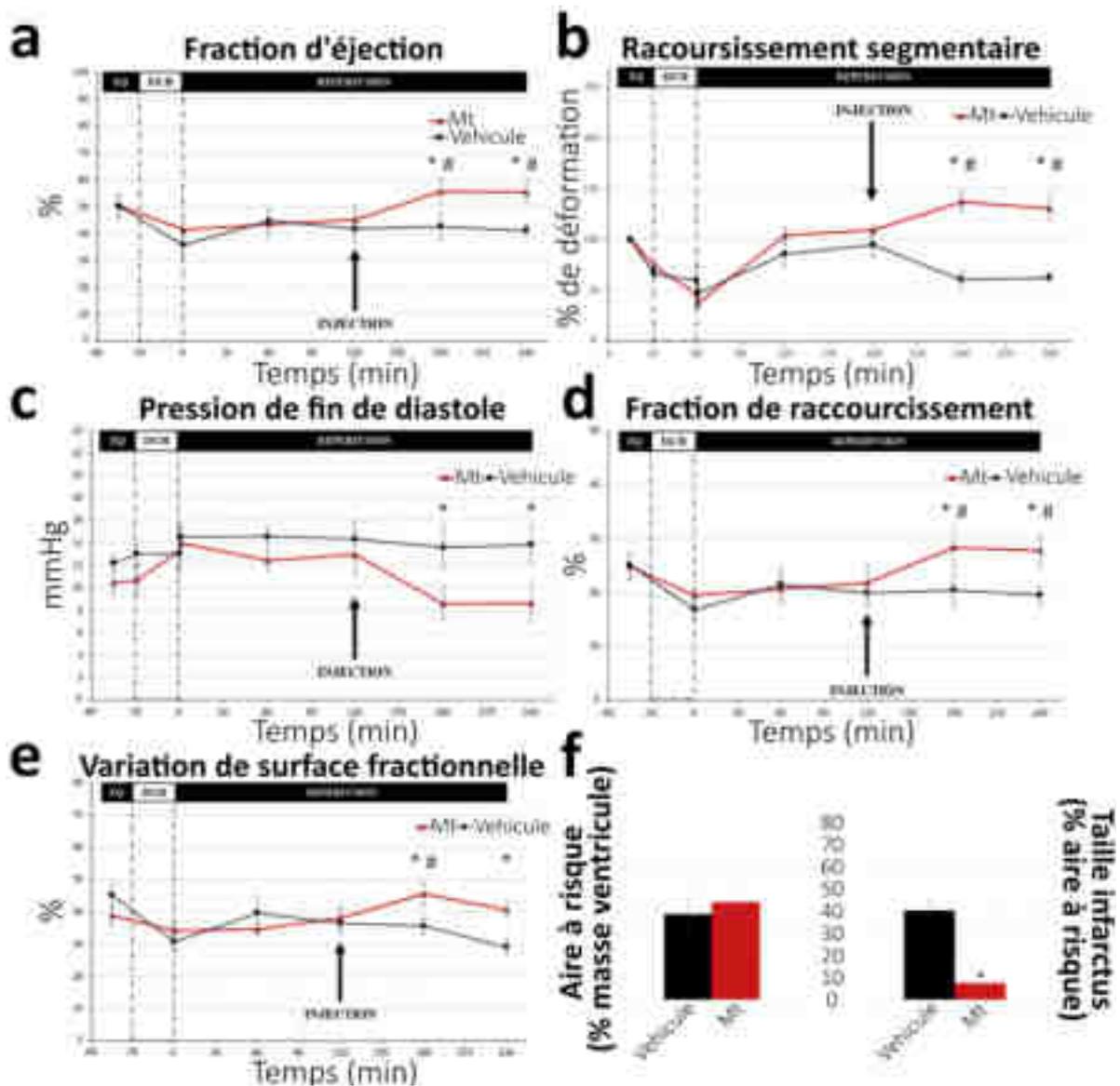
a. Aux jours 1 et 3 après l'ischémie, les marqueurs de l'ischémie cardiaque créatine kinase et troponine I cardiaque ont été mesurés dans les sérums des cœurs ayant reçu du véhicule seul (noir) ou des Mt (blanc). Les marqueurs ont été significativement diminués suite au transfert de Mt comparé au groupe véhicule. \*\* P < 0,05

b. Au jour 28 de la récupération, l'activité de la caspase 3 marqueur de l'activité de l'apoptose a été mesurée dans des cœurs ayant reçu du véhicule seul (noir) ou des Mt (blanc). Ce marqueur a été significativement diminué suite au transfert de Mt comparé au groupe véhicule. \*\* P < 0,05

c. Au jour 21 de la récupération, le contenu en ATP des tissus a été mesuré dans la zone à risque des cœurs ayant reçu du véhicule seul (noir) ou des Mt (blanc). La production d'ATP a été significativement augmenté suite au transfert de Mt comparé au groupe véhicule. \*\* P < 0,05

d. Après 2h et 28 jours de récupération et de par une coloration TTC dans les cœurs ayant reçu du véhicule seul (noir) ou des Mt (blanc), l'aire à risque et la taille de l'infarctus ont été déterminées. Bien que l'aire à risque ne présente pas de différences notables entre les groupes, la taille de l'infarctus du myocarde en fonction de la zone à risque a été significativement réduit suite au transfert de Mt comparé au groupe véhicule. \*\* P < 0,05

Une autre étude de cette revue et qui présente un objectif intéressant est celle de 2020 de David Blitzer et ses collègues (62). Au vu de la persistance des effets des ischémies cardiaques et du délai observé entre l'arrivée de cette ischémie chez un patient et l'intervention d'une équipe médicale, l'objectif de cette étude visait à savoir si le transfert de Mt pouvait avoir des effets bénéfiques malgré une administration retardée. Seize porcs ont été soumis à 30 minutes d'ischémie, avant d'être reperfusé 120 minutes. Après cela des Mt autologues isolées de tissu musculaire pectoral ou du solvant seul ont été administrés en bolus antérograde à l'ostium de la coronaire gauche de porcs choisis aléatoirement, avant de bénéficier de 120 minutes supplémentaires de reperfusion.



D'après Blitzer D et al.

**Figure 12 : Le transfert autologues de Mt permet aux porcs victimes d'infarctus d'améliorer les indices de performance cardiaque et de réduire la taille de l'infarctus (62).**

**a.** Moyenne des mesures échocardiographiques de la fraction d'éjection du ventricule gauche dans la zone à risque avant l'ischémie, après 30min, puis toutes les 60min pendant la reperfusion. Une augmentation significative a été observée après l'administration intra coronaire de Mt par rapport au groupe n'ayant reçu que le véhicule. \*P < 0,05 Mt vs véhicule, # P < 0,05 temps désigné vs temps de l'injection

**b.** Moyenne des mesures du raccourcissement segmentaire ventriculaire dans la zone à risque d'ischémie. Une augmentation significative de la capacité de déformation a été observée après l'administration intra coronaire de Mt par rapport au groupe n'ayant reçu que le véhicule. \*P < 0,05 Mt vs véhicule, # P < 0,05 temps désigné vs temps de l'injection

**c.** Moyenne des mesures de la pression ventriculaire gauche en fin de diastole. Une diminution significative a été observée dans le groupe n'ayant pas reçu que le véhicule, mais les performances se sont vues maintenues après l'injection de Mt. \*P < 0,05 mitochondries vs véhicule

**d.** Moyenne des mesures échocardiographiques du raccourcissement fractionnaire ventriculaire gauche. Une augmentation significative a été observée après l'administration intra coronaire de Mt par rapport au groupe n'ayant reçu que le véhicule. \*P < 0,05 Mt vs véhicule, # P < 0,05 temps désigné vs temps de l'injection

**e.** Moyenne des mesures du changement de surface fractionnaire du ventricule gauche. Une augmentation significative a été observée après l'administration intra coronaire de Mt par rapport au groupe n'ayant reçu que le véhicule. \*P < 0,05 Mt vs véhicule, # P < 0,05 temps désigné vs temps de l'injection

**f.** Moyenne des mesures de l'aire à risque et de la taille de l'infarctus du myocarde ventriculaire gauche. La taille de l'infarctus était significativement réduite après l'administration intra coronaire de Mt par rapport au groupe n'ayant reçu que le véhicule. \*P < 0,05 Mt vs véhicule

Les fonctions cardiaques ont été évaluées sur les deux groupes de porcs avant l'injection afin de valider qu'il n'y ait aucune différence significative entre eux. Les analyses des échocardiographies ont montré que comparé au groupe recevant le solvant, celui ayant reçu le Mt présente des améliorations significatives des indices de performance cardiaque que sont la fraction d'éjection du ventricule gauche, le raccourcissement segmentaire, la pression de fin de diastole du ventricule gauche, la fraction de raccourcissement et la variation de la surface fractionnelle du ventricule gauche (Figure 12a, b, c, d, et e). Les chercheurs ont également fait l'observation d'une augmentation du débit sanguin coronaire dans l'artère descendante antérieure gauche lors des 15 premières minutes après l'administration de Mt comparé au groupe solvant. Cependant le débit revient à la normale après 15 min. Enfin bien que les aires à risque étaient similaires dans les deux groupes, la taille de l'infarctus final a significativement été réduit dans le cœur ayant reçu les Mt (Figure 12f).

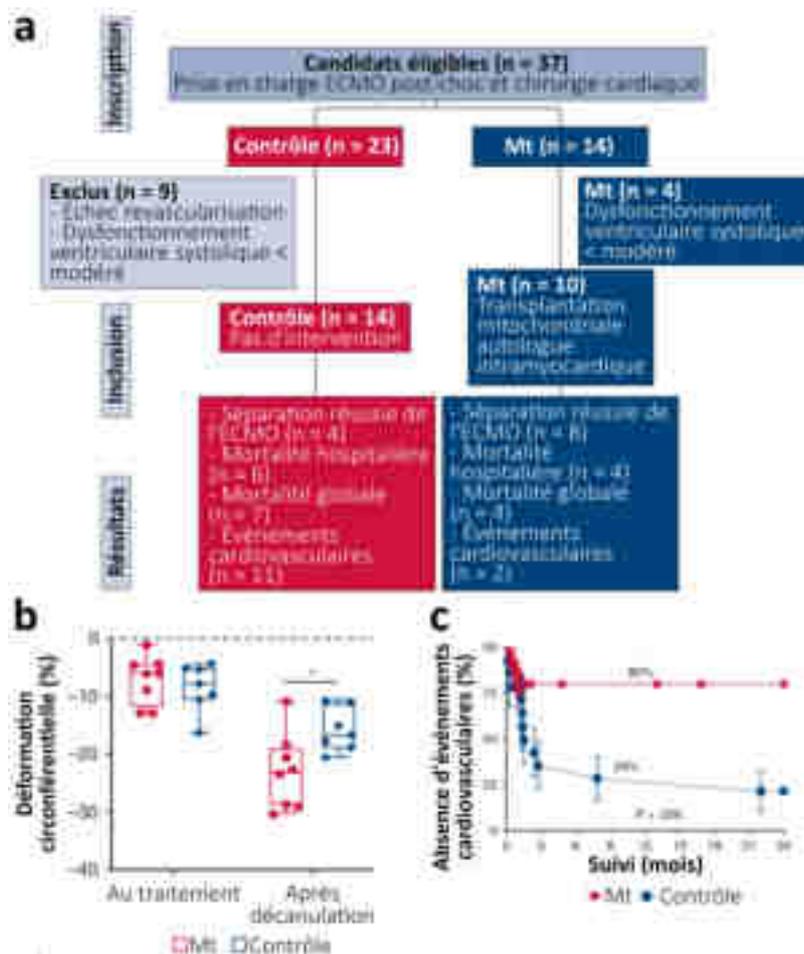
Ces résultats semblent ainsi indiquer qu'une administration même retardée de Mt pourrait avoir des effets bénéfiques conséquents à la suite d'une ischémie cardiaque.

## ii. Etude clinique.

L'étude sur une population humaine pédiatrique de 2021 de Alvisé Guariento et ses collègues, a également présenté des résultats encourageants (64). Cette étude rétrospective monocentrique pilote fut réalisée sur 24 patients pédiatriques nécessitant une oxygénation par membrane extracorporelle (ECMO) post-cardiotomie pour un choc cardiogénique après une lésion d'ischémie-reperfusion durant une période s'étalant de 2002 à 2018.

10 patients ont reçu une injection directe intra myocardique de Mt autologues isolées du muscle droit de l'abdomen suite à la revascularisation, 14 ont uniquement reçu la revascularisation (Figure 13a). 7 jours après la revascularisation, les groupes n'ont montré aucune différence au niveau des marqueurs de l'inflammation, inflammation qui pourrait nuire aux Mt ou aux patients. Par la suite les chercheurs ont observé le nombre de séparation réussie de l'ECMO, qui est définie par l'absence de retour à l'ECMO dans la semaine. Dans le groupe ayant reçu les Mt, la séparation réussie a été possible pour 8 patients contre seulement 4 dans le groupe témoin (Figure 13a). Un autre paramètre mesuré juste après la séparation de l'ECMO est la tension ventriculaire, définie comme le mouvement de compression des fibres exprimées par une valeur numérique négative (une valeur numériquement plus faible représentant un raccourcissement plus important). La compression s'est vue significativement améliorée dans le groupe ayant reçu les Mt (Figure 13b). Le nombre de jours après lesquels ont été observé une amélioration de la dysfonction ventriculaire de sévère à moins que modérée était aussi amélioré par le transfert de Mt, passant de 9 jours à 2 jours. Enfin les évènements cardiovasculaires (mortalité liée à une insuffisance cardiaque, nécessité d'une transplantation et/ou d'un dispositif

d'assistance ventriculaire) au cours de la même hospitalisation, survenaient bien moins dans le groupe ayant reçu les Mt (Figure 13c).



**Figure 13 : La transplantation autologue de Mt chez des patients pédiatriques ayant subi un choc cardiogénique chez suite à une lésion d'ischémie-reperfusion associée à une séparation réussie de l'ECMO et à une augmentation de la tension ventriculaire (64).**

**a.** Organigramme des essais avec les critères d'inclusion et les critères d'exclusion. P = 0,03

**b.** Diagrammes illustrant la différence entre les mesures de déformation ventriculaire circonférentielle au moment du traitement ou de la décanulation des patients qui ont reçu une revascularisation seule ou avec en plus un transfert de Mt autologues intramyocardique directe. La déformation/compression est plus importante dans le groupe Mt. \* P < 0,01

**c.** Pourcentage de patients sans événements cardiovasculaires entre 0 et 24 mois post opératoires pour des patients qui ont reçu une revascularisation seule ou avec un transfert de Mt en intramyocardique. Le groupe Mt a subi moins d'événements. \* P < 0,03

D'après Guariento A et al.

L'ensemble de ces études sur le transfert de Mt lors d'une ischémie cardiaque présente un début encourageant. On a pu y observer des améliorations des fonctions myocardiques, une meilleure survie cellulaire avec des tailles d'infarctus réduites, des fonctions mitochondriales augmentées et une amélioration à court terme du flux sanguin. Les injections n'ont entraîné ni perturbations des fonctions cardiaques, ni réponses immunitaires ou inflammatoires.

## b. Troubles et lésions neurologiques

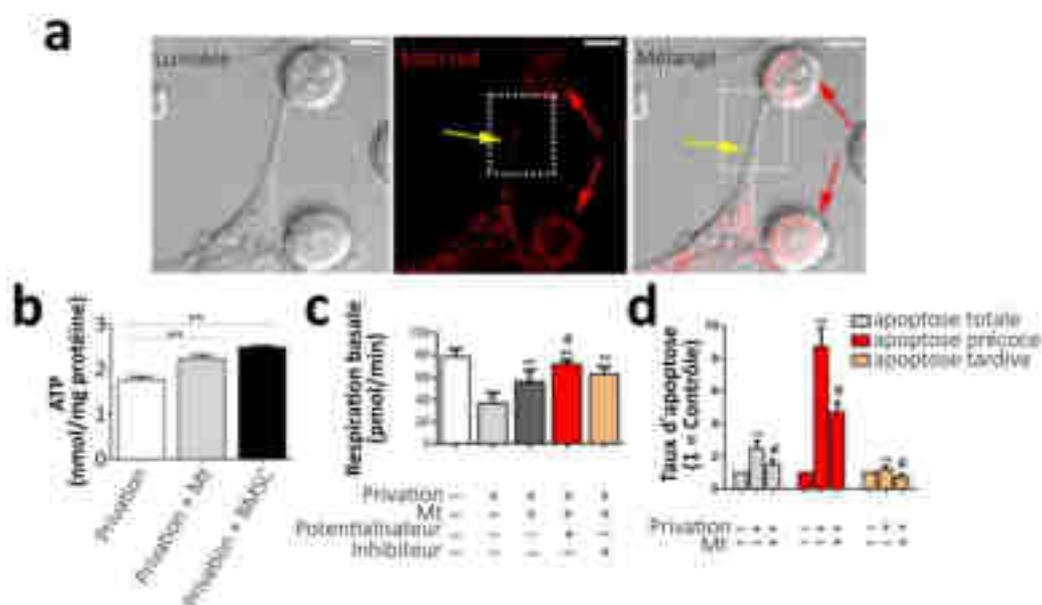
Comme indiqué précédemment (cf II.a.iii.), les neurones requièrent énormément d'énergie et d'oxygène (39,40). Ils sont très sensibles vis-à-vis des dysfonctions mitochondriales pouvant survenir dans un large panel de situations traumatiques, physiologiques ou pathologiques.

Des études traitant du transfert de Mt se sont donc penchées sur son utilisation pour améliorer la récupération lors de troubles ou lésions neurologiques variés.

i. Etudes sur le système nerveux périphérique.

La première étude abordée ici est une étude de 2018 de Heyangzi Li et ses collègues (51). Leurs objectifs étaient d'élucider l'efficacité et les mécanismes du transfert de Mt isolées et du transfert depuis des cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse (BMSC) transplantées vers les neurones moteurs chez des rats souffrants de lésions de la moelle épinière (LME). Les LME peuvent mener à des paralysies difficilement réversibles, d'où l'intérêt de la recherche pour une solution thérapeutique. L'étude présente des expériences faites *in vitro* et *in vivo*.

Des BMSC isolés de rats mâles aux Mt rouges ont été cocultivées avec des motoneurones ou des neurones corticaux primaires affaiblis ou non par privation d'oxygène et de glucose. Les cocultures pouvaient être réalisées pour permettre des contacts directs ou indirects, et présenter ou non un potentialisateur (acide rétinoïde) ou inhibiteur (Acide 18β glycyrrhétinique) de jonction GAP. Les observations par microscopie confocale ont bien confirmé que le transfert de Mt était possible dès 30 min (Figure 14a). L'internalisation était suivie d'une amélioration des profils bioénergétiques des cellules (Figure 14b, c et d). Cette internalisation était plus importante dans des conditions où le contact direct était possible et où la formation de jonction GAP était favorisée (Figure 14c).



D'après Heyangzi L et al.

**Figure 14 :** Les BMSC peuvent transférer des Mt aux motoneurones (privés O<sub>2</sub>/glucose, 8 h), ces dernières améliorent leur profil bioénergétique et favorisent leur survie (51).

a. Les motoneurones ont été co-cultivés avec des BMSC et photographiés au microscope optique. Les Mt sont transférées via la structure de type nanotube. Echelle blanche 10μm.

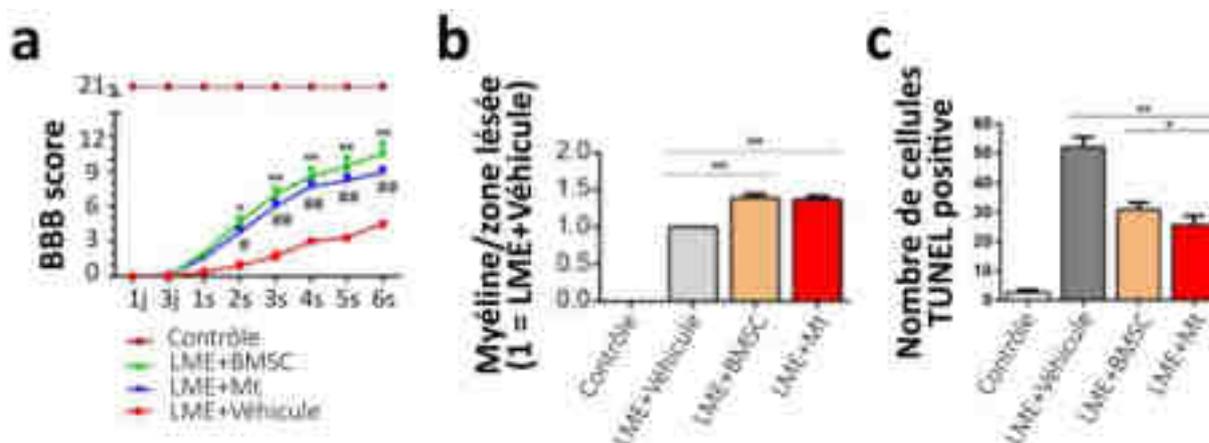
b. Les motoneurones ont été co-incubés avec des Mt, avec des BMSC ou le véhicule pendant 24 h. Les groupes Mt et les BMSC ont montré une augmentation significative de l'ATP. \*\*P < 0,01

c. Les motoneurones ont été co-incubés avec des Mt pendant 24 h. Une amélioration significative de la respiration basale a été observée dans ce groupe, favorisée par le potentialisateur (acide rétinoïde) de jonction GAP mais non inhibée par l'inhibiteur (Acide 18β glycyrrhétinique). \*\* P < 0,01 par rapport au groupe avec les motoneurones seuls, # P < 0,05, par rapport au groupe privation + Mt

d. Les motoneurones ont été co-incubés avec Mt pendant 24 h. Le taux d'apoptose des neurones était réduit dans le groupe Mt.\*\* P < 0,01 par rapport au groupe contrôle , # P < 0,05 par rapport au groupe privation seule

Pour ce qui est de l'étude *in vivo*, les chercheurs ont utilisé soixante-trois rats mâles divisés en 4 groupes (groupe contrôle, groupe LME véhicule, groupe traitement par BMSC et groupe traitement par Mt). Pour créer une LME, les rats anesthésiés ont tous été opérés pour subir une laminectomie. Tous les groupes, excepté le groupe contrôle, ont ensuite vu un poids de 10g lâché d'une hauteur de 50mm sur leur moelle épinière exposée, et laissé 20s pour produire une contusion modérée amenant à une paralysie partielle. Les BMSC ou Mt ont été injectées dans la moelle juste après la lésion, tandis que le même volume de PBS a été injecté dans le groupe contrôle et dans le groupe SCI véhicule. L'échelle de Basso Beattie et Bresnahan (BBB ; score à 21 points maximum basé sur l'évaluation des mouvements articulaires, placement des pattes, soutien du poids et coordination des membres) fut utilisée pour évaluer la récupération des facultés locomotrices à trois et six semaines. Passé ces tests, les souris ont été sacrifiées pour étudier plus en détail les paramètres histologiques et sécrétoires.

Dans les deux groupes avec un apport de BMSC ou Mt, les scores BBB des rats n'étaient pas significativement différents entre eux (score à six semaines BMSC  $9,3 \pm 0,80$  et Mt  $9,8 \pm 0,90$ ) mais significativement améliorés comparés au groupe véhicule (score à six semaines  $5,5 \pm 0,50$ ) (Figure 15a). D'une manière générale les moelles traitées avec BMSC ou Mt ont vu leurs gaines de myélines (membrane essentielle aux transmissions nerveuses agissant comme une gaine) récupérer plus rapidement, ont réalisé une cicatrisation gliale plus importante, et ont subi moins d'apoptose (Figure 15b et c).



D'après Heyangzi L et al.

**Figure 15 : La transplantation de Mt ou BMSC a permis une meilleure guérison des rats ayant subi une LME (51).**

a. Evaluation de la récupération des fonctions locomotrices (score BBB maximum = 21 = contrôle) 6 semaines après une LME. Les scores BBB ont été significativement augmentés dans les groupes BMSC et Mt par rapport au groupe véhicule. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , #  $P < 0,05$ , ##  $P < 0,01$  par rapport au groupe LME + véhicule

b. Analyse des zones de myélines lésées après Coloration H&E, coloration LFB, coloration Masson et coloration immunocytochimique de la moelle épinière 6 semaines après une LME. Le rapport de myéline/zone lésée est augmenté de manière significative après le transfert de Mt ou BMSC. \*\*  $P < 0,01$

c. Statistiques du nombre de cellules positives à la coloration TUNEL (marqueur apoptotique) de la moelle épinière 6 semaines après une LME. Les cellules en apoptose sont significativement diminuées à la suite du transfert de Mt ou BMSC. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$

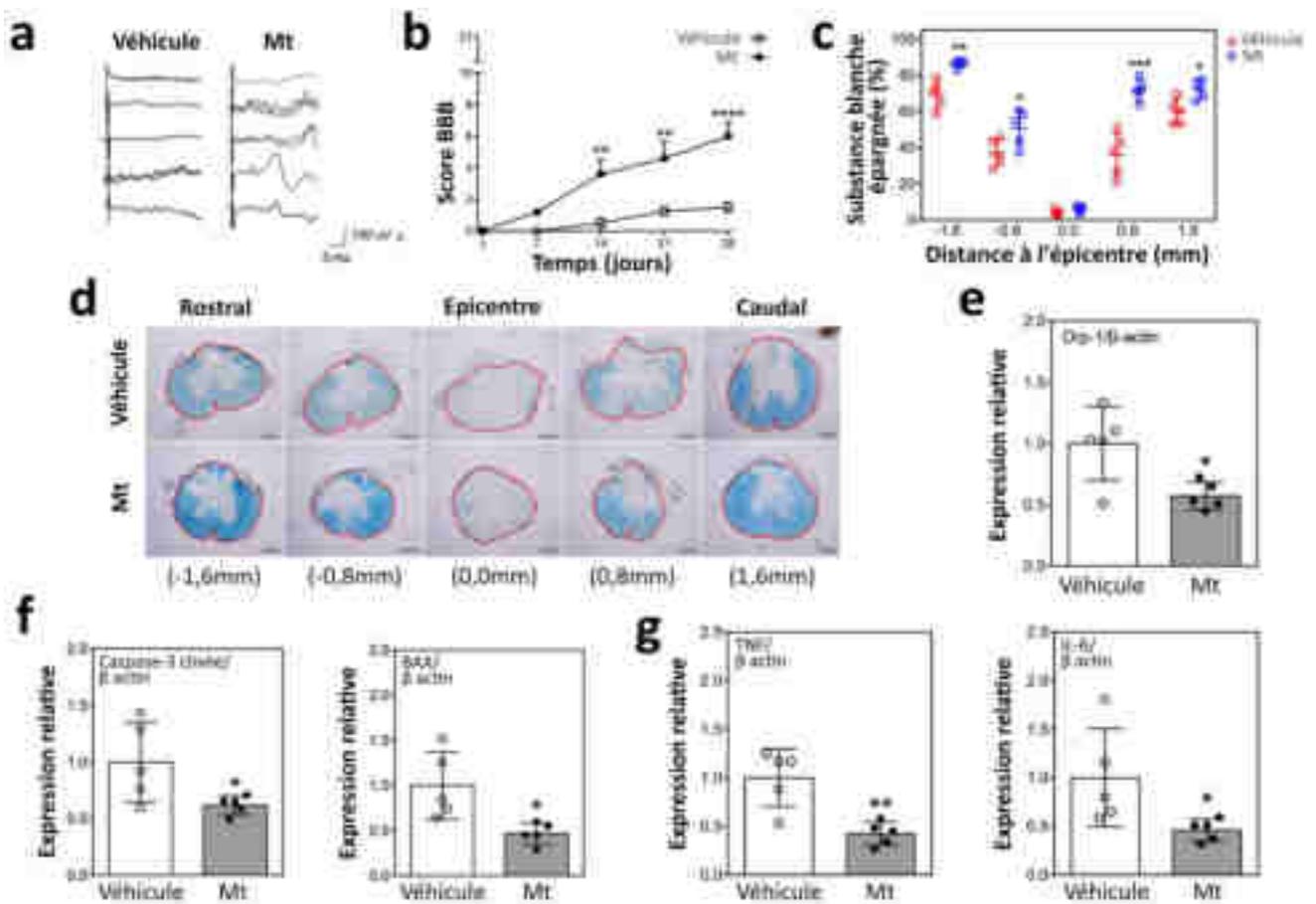
Cette étude a confirmé l'intérêt du transfert de Mt dans le cadre de récupération suite à une LME, et que le mécanisme de cette intégration est soutenu par la possibilité de former des jonctions GAP.

Les résultats d'une autre étude de 2022 de Ming-Wei Lin et ses collègues vont également en ce sens (65). L'étude avait aussi pour but d'évaluer sur les rats l'efficacité du transfert de Mt pour récupérer d'une LME, mais se concentrait sur une étude *in vivo* et le transfert de Mt isolées.

Cinquante-six rats ont été utilisés pour réaliser l'étude : six rats donneurs de Mt, quarante rats pour les expériences motrices/sensorielles, dix rats pour étudier dans le temps la distribution et la viabilité des Mt transplantées (sacrifiés aux jours un, trois, sept, dix, quatorze et vingt-huit), et les rats restants ont servi à étudier les paramètres histologiques et sécrétoires. Exceptés les rats donneurs, tous ont été divisés aléatoirement en quatre groupes et subis une laminectomie au jour un. Suite à la procédure le premier groupe a vu ses rats recevoir du véhicule sans avoir subi de LME, le second a reçu une injection de Mt, le troisième a subi une LME et reçu du véhicule, le quatrième a subi une LME et s'est vu injecter des Mt. Les Mt utilisées ont été isolées des muscles du soléaire des rats donneurs sains, puis colorées au Mitotracker rouge. Les LME étaient provoquées de manière similaire à l'étude de Heyangzi Li, avec pour différence l'utilisation d'un clip d'anévrisme pour réaliser la compression. Les chercheurs ont utilisé l'échelle BBB chaque semaine pour voir l'évolution de la fonction locomotrice des membres postérieurs. Ils ont évalué les fonctions sensorielles par potentiels évoqués somatosensoriels au jour vingt-huit via le nerf tibial dont la réactivité est mesurée par une électrode.

Suites aux expériences, des Mt transplantées viables étaient toujours détectables dans la moelle épinière jusqu'au jour vingt-huit. Avec une paralysie complète des membres postérieurs (BBB = 0) pour les deux groupes LME au jour un, les rats bénéficiant d'une transplantation de Mt ont mieux récupéré. Les analyses somatosensorielles ont révélé une absence de réactivité dans le groupe véhicule, alors que les cinq rats du groupe LME Mt percevaient l'impulsion (Figure 16a). Pour ce qui est du test BBB, les rats Mt ont montré une meilleure récupération continue de leurs fonctions locomotrices dès le quatorzième jour (score Mt  $3,60 \pm 2,07$  vs. véhicule  $0,50 \pm 0,58$ ) jusqu'au vingt-huitième jour (score Mt  $6,00 \pm 2,00$  vs. véhicule  $1,50 \pm 0,58$ ) (Figure 16b). Au niveau histologique, ils ont observé, suite aux injections de Mt, une diminution de la sévérité de la démyélinisation, des protéines liées à la fission/à l'apoptose, et des molécules et cytokines pro-inflammatoires (Figure 16c, d, e, f et g).

L'ensemble de ces résultats confirme donc les bienfaits du transfert de Mt également observés dans l'étude précédente.



D'après Ming-Wei L et al.

**Figure 16 : Le transfert homologue de Mt permet aux rats ayant subi une LME de mieux récupérer leurs facultés sensorielles et motrices en atténuant les dommages neuronaux (65).**

**a.** Micrographies des traces somatosensorielles chez les rats 28 jours post LME à l'aide d'impulsions de 2ms appliquées au nerf tibial et dont la réactivité est mesurée par une électrode dans le ligament interépineux C2-C3. Le groupe Mt a vu sa sensibilité aux stimuli augmenter par rapport au groupe véhicule.

**b.** Evolution des score BBB tous les 7 jours pendant 28 jours. Les scores ont été significativement plus améliorés pour le groupe Mt par rapport au groupe véhicule. \*\* P < 0,01, \*\*\*\* P < 0,0001

**c.** Pourcentage de zones positives au bleu de luxol (teinte la myéline) à différentes distances de l'épicentre de la lésion au 28<sup>e</sup> jour. A 1,6 et 0,8mm, la substance blanche a mieux été préservée dans le groupe Mt par rapport au groupe véhicule. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001

**d.** Micrographies de la coloration de la barrière hématoencéphalique sur des coupes transversales préparées à partir de moelles épinières lésées de rats. Les contours rouges indiquent les zones analysées. La teinte au bleu de luxol est plus prononcée dans le groupe ayant reçu les Mt de part et d'autre de l'épicentre. Echelle noire 100µm.

**e.** Expression relative de Drp1 (marqueur de la fission mitochondriale) dans les groupes LME au jour 1 post lésion. L'expression de Drp1 est significativement diminuée dans le groupe Mt par rapport au groupe véhicule. \* P < 0,05

**f.** Expression relative de la caspase-3 clivée et de BAX (marqueurs de l'apoptose) dans les groupes LME au jour 1 post lésion. Ces échantillons révèlent que l'expression des deux marqueurs est significativement diminuée dans le groupe ayant reçu les Mt par rapport au groupe véhicule. \* P < 0,05

**g.** Expression relative du TNF et de l'IL-6 (cytokines pro-inflammatoires) dans les groupes LME au jour 1 post lésion. L'expression des deux cytokines est significativement diminuée dans le groupe ayant reçu les Mt par rapport au groupe véhicule. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01

ii. Etude sur le système nerveux central.

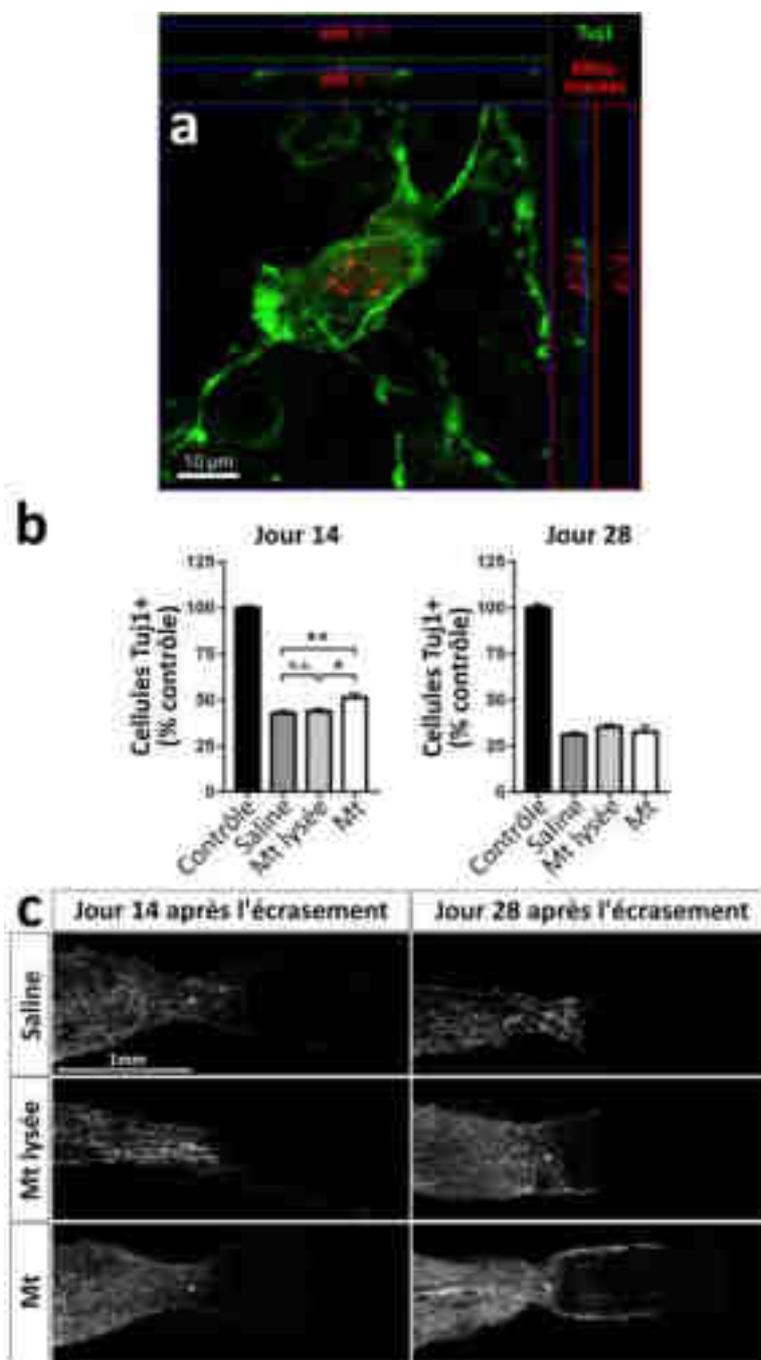
Les effets du transfert de Mt étant encourageants sur les neurones périphériques, une zone du système nerveux central qui pourrait en bénéficier serait la rétine. Elle est sujette à des maladies dégénératives qui peuvent engendrer des dommages mitochondriaux ou être causées par des dysfonctions mitochondriales. C'est pourquoi l'étude de 2020 de Gabriel Nascimento-dos-Santos et ses collègues a cherché à savoir si le transfert de Mt dans la rétine conférait un effet neuroprotecteur (66).

Pour ce faire, l'expérience a été conduite pendant vingt-huit jours *in vivo* sur des rats dont le nerf optique a été écrasé à 1mm du globe oculaire avec des pinces pendant 15s. Les Mt ont été isolées à partir de foies de rats donneurs, marquées en rouge, puis une injection intravitréenne est performée. Les rats furent séparés en trois groupes, un dont les rats ont reçu les Mt, un groupe contrôle où ils ont reçu une solution saline et un recevant des Mt préalablement lysées. Une rétine contrôle intouchée a également été utilisée pour comparer les résultats.

Les résultats ont montré que dès le premier jour post-opératoire les Mt actives sont détectables dans les cellules de la rétine, améliorent le métabolisme oxydatif et l'activité électrophysiologique de la rétine, sans augmenter les dommages oxydatifs (Figure 17a). L'hypothèse la plus probable est que dans un premier temps les Mt actives préviennent l'augmentation métabolique induite par l'écrasement du nerf, puis permettent après le troisième jour une capacité respiratoire plus efficace. Au jour quatorze le groupe Mt a un nombre de cellules ganglionnaires rétiniennes (immunomarquées à la protéine Tuj1) plus important par rapport aux autres groupes (Figure 17b). Il n'y avait cependant plus de différence au vingt-huitième jour, ce qui suggère un effet neuroprotecteur à court terme dépendant de l'activité des Mt. L'utilisation du marqueur d'axone CTB-555 a montré qu'en-deçà de quatorze jours la quantité d'axone au-delà de la lésion était plus grande pour le groupe Mt lysées, mais qu'à vingt-huit jours le groupe Mt montrait une quantité d'axones significativement supérieure (Figure 17c). Ceci suggère que les effets sur l'extension des axones à moyen terme dépendent des mitochondries actives, alors que le contenu des mitochondries peut avoir un effet à court terme.

Cette étude nous indique donc que l'injection intravitréenne de Mt peut être absorbée par les cellules de la rétine et y persister vingt-huit jours, peut affecter l'état bioénergétique des tissus et les réponses électrorétinographiques à plus ou moins long terme, et présenter un effet neuroprotecteur. Les effets sont dépendants de l'intégrité des Mt, et sachant que l'effet pourrait aussi être dose dépendant, il a été suggéré d'augmenter la quantité de Mt injectées lors des études qui suivront.

**Figure 17 : Les Mt transférées à la rétine sont absorbées par les cellules et améliore sa réparation lorsqu'elle est lésée (66).**



D'après Nascimento-dos-Santos G et al.

Ces études *in vivo* dans différents tissus nerveux ont montré le potentiel des transferts de Mt dans le rétablissement de lésions nerveuses communes mais actuellement difficiles à gérer. Les expériences ont permis d'aider le métabolisme, l'intégrité et la récupération d'activité des tissus injuriés. Les cellules étaient moins sujettes à l'apoptose, et les tissus voyaient une diminution des molécules et protéines pouvant causer inflammation et dommages oxydatifs.

### c. Protection pulmonaire

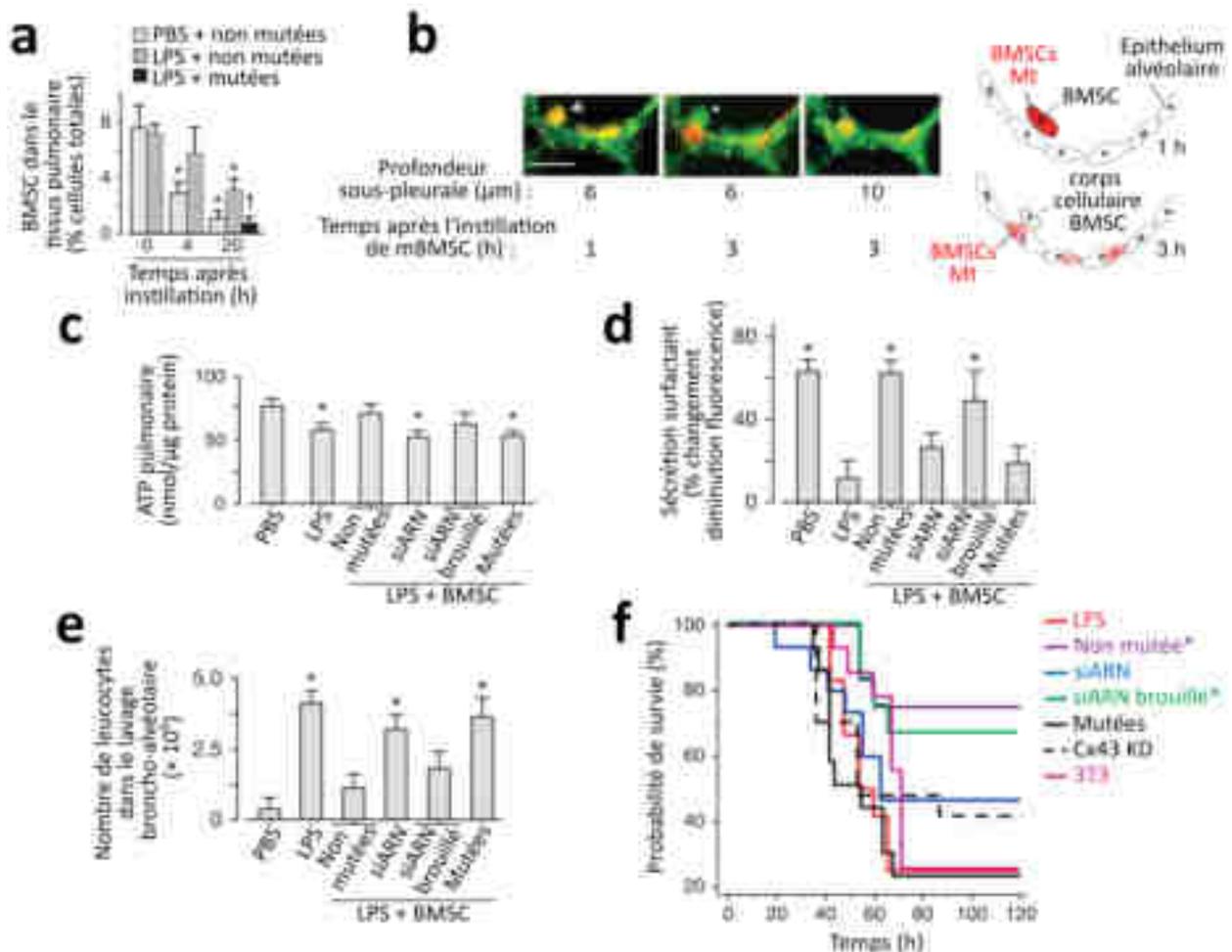
Les poumons sont des organes extrêmement vascularisés servant aux échanges gazeux, ils sont en perpétuel contact avec l'environnement extérieur via l'air qui y est aspiré. Par conséquent les poumons peuvent être sujets à des risques vasculaires, mais aussi à de nombreuses agressions extérieures menant à des inflammations excessives (52,67). Ces lésions pulmonaires aiguës (LPA) peuvent survenir dans diverses circonstances telles que des contaminations environnementales, des chirurgies ou des ventilations mécaniques. Elles peuvent induire des dommages cellulaires et mitochondriaux menaçant le pronostic des patients, elles représentent donc un défi thérapeutique important.

Deux études ont pu vérifier l'impact du transfert de Mt au niveau pulmonaire dans deux contextes et via deux méthodes de transplantation de Mt différents.

#### i. Transfert de cellules souches dans un contexte de lésion inflammatoire.

La première étude est celle de 2012 de Mohammad Naimul Islam et ses collègues (52). Elle avait pour but de déterminer le rôle thérapeutique du transfert de Mt via des BMSC aux cellules pulmonaires lors de LPA. Un précédent article avait mis en évidence que l'administration exogène de BMSC est protectrice dans les modèles murins de lésions des systèmes organiques, mais le mécanisme n'était pas clair. En raison du fait que les LPA sont à l'origine d'altérations de la bioénergétique mitochondriale des poumons, l'une des théories évoquées voulait qu'un transfert de Mt soit impliqué dans le mécanisme protecteur. Plus précisément, il était suspecté que le transfert se fasse à l'aide de jonctions GAP impliquant la protéine Cx43 commune aux cellules étudiées ici. L'évènement a effectivement été observé en culture *in vitro*, et cette étude de 2012 avait pour objectif de vérifier si un effet thérapeutique similaire était possible dans des poumons entiers.

Pour cela ils ont provoqué à des souris une LPA par administration intranasale de lipopolysaccharides (LPS), des endotoxines bactériennes pro-inflammatoires. Le contrôle pour l'expérience consistait en l'instillation de solution tampon PBS. Les BMSC provenant de fémurs ou tibias de souris ont été mises en culture et transfectées avec des plasmides codant pour mutCx43 (protéine non fonctionnelle) ou des Mt rouges. Elles ont aussi été incubées avec le colorant hydrosoluble Calcein red marquant leur cytosol par de la fluorescence rouge (Calcein red traverse la membrane cytoplasmique de la cellule, puis ne peut plus sortir une fois entré et activé). 4h après la LPA, certains des poumons sont collectés, mis sous perfusion et les chercheurs y ont fait des instillations intra-trachéales de BMSC. D'autres souris vivantes se voient instiller ces BMSC par voie intranasale après les 4h, leurs poumons seront récoltés à l'heure 24. Les observations en microscopie à deux photons ont permis de constater la position des BMSC dans les alvéoles et leur migration dans l'épithélium pulmonaire.



D'après Mohammad Naimul Islam et al.

**Figure 18 : Le transfert de Mt via des BMSC instillées en intra-trachéales ou par voie nasale améliore l'activité et protège les cellules pulmonaires de souris suite à des lésions pulmonaires aiguës (52).**

**a.** Quantification des BMSC pulmonaires par cytométrie de flux. Les poumons se sont vus administrés du PBS (neutre) ou du LPS (endotoxine). Les BMSC instillées par voie nasale peuvent avoir une protéine Cx43 ou mutCx43 non fonctionnelle. Les poumons lésés retiennent d'avantage les BMSC Cx43, par rapport aux poumons non lésés et aux BMSC mutCx43. \* P < 0,05 par rapport à 0 h, † P < 0,05 par rapport au groupe à sa gauche

**b.** Images montrant une BMSC (flèche) située à côté de l'épithélium alvéolaire (vert) 4-8 h après l'instillation de LPS. L'illustration à droite présente les données d'imagerie à 1 et 3h. Les Mt (rouges) sont transférées de la BMSC (\*) vers les cellules pulmonaires. Echelle blanche 5µm.

**c.** Détermination de la quantité d'ATP dans les homogénats pulmonaires après l'instillation de PBS, LPS seul ou de LPS suivi d'une instillation soit de BMSC Cx43, mutCx43, traités par un siARN rendant les Mt non fonctionnelles ou un siARN brouillé non fonctionnel. Les BMSC aux jonctions GAP et Mt fonctionnelles permettent de rétablir les niveaux d'ATP pulmonaires. \*P < 0,05 par rapport aux poumons PBS

**d.** Détermination de la sécrétion de surfactant après l'instillation de PBS, LPS seul ou de LPS suivi d'une instillation soit de BMSC Cx43, mutCx43, traités par un siARN rendant les Mt non fonctionnelles ou un siARN brouillé non fonctionnel. Seules les BMSC aux jonctions GAP et Mt fonctionnelles permettent de rétablir une sécrétion de surfactant dans la norme. \*P < 0,05 par rapport aux poumons LPS

**e.** Nombre de leucocyte dans le lavage broncho-alvéolaire après l'instillation de PBS, LPS seul ou de LPS suivi d'une instillation soit de BMSC Cx43, mutCx43, traités par un siARN rendant les Mt non fonctionnelles ou un siARN brouillé non fonctionnel. Seules les BMSC aux jonctions GAP et Mt fonctionnelles permettent d'obtenir une réduction de la leucocytose après instillation de LPS. \*P < 0,05 par rapport aux poumons PBS

**f.** Survie des souris après instillation de LPS suivie d'instillation soit de BMSC Cx43, mutCx43, traités par un siARN rendant les Mt non fonctionnelles ou un siARN brouillé non fonctionnel., ou de BMSC dont au gène de Cx43 knockdown (Cx43 KD, inactivée). Des cellules 3T3 ont été utilisées comme contrôle supplémentaire (ne forment pas de jonctions GAP ici). \* P < 0,05 par rapport aux poumons LPS

Les poumons LPS montraient une migration plus lente des cellules, ainsi un échange de contenu cytoplasmique entre les cellules pulmonaires et BMSC (Figure 18a et b). Cette rétention et cet échange ne sont en revanche pas observés ni dans les poumons PBS, ni pour les BMSC exprimant la protéine mutCx43. Ces résultats confirment des connexions directes de type GAP entre cellules dans les poumons inflammés. En plus de ces connexions, des formations de microvésicules et nanotubes ont également pu être constatées lorsque Cx43 était fonctionnelle, impliquant que la connexion GAP est nécessaire pour enclencher ces formations. Les Mt ont été repérées dans ces formations et dans les cellules pulmonaires. Suite à ces transferts de Mt, les niveaux d'ATP ont augmenté dans les poumons LPS recevant les BMSC non mutées contrairement à ceux n'en recevant pas. Cette augmentation est constatable peu importe la voie d'instillation des BMSC (intratrachéale ou intranasale), et a amené les niveaux d'ATP à un niveau similaire à celui trouvé dans le poumon sain. Il a également été vérifié l'implication des Mt pour cet effet, en effectuant l'expérience avec des BMSC aux complexes III inhibés par knockdown médié par ARN interférent (siARN) de l'une de ses protéines. Les Mt inhibées n'étaient pas délétères pour la survie des BMSC, mais suffisaient à engendrer une différence notable des niveaux d'ATP pulmonaires (Figure 18c). Pour évaluer l'amélioration fonctionnelle des poumons, la sécrétion de surfactant par des alvéoles intactes a été quantifiée. En effet lors d'une brève expansion pulmonaire, une sécrétion de surfactant survient en réponse à la stimulation mécanique. Or suite à l'exposition aux LPS la réponse sécrétoire n'est plus présente. Elle est cependant bel et bien rétablie dans les poumons LPS recevant des BMSC non altérées par des Mt inhibées ou mutCx43 (Figure 18d). En plus de ces paramètres, d'autres, tels que la réduction de marqueurs de l'inflammation et une augmentation de la survie de souris gardées en observation pendant 120h ont été remarqués (Figure 18e et f).

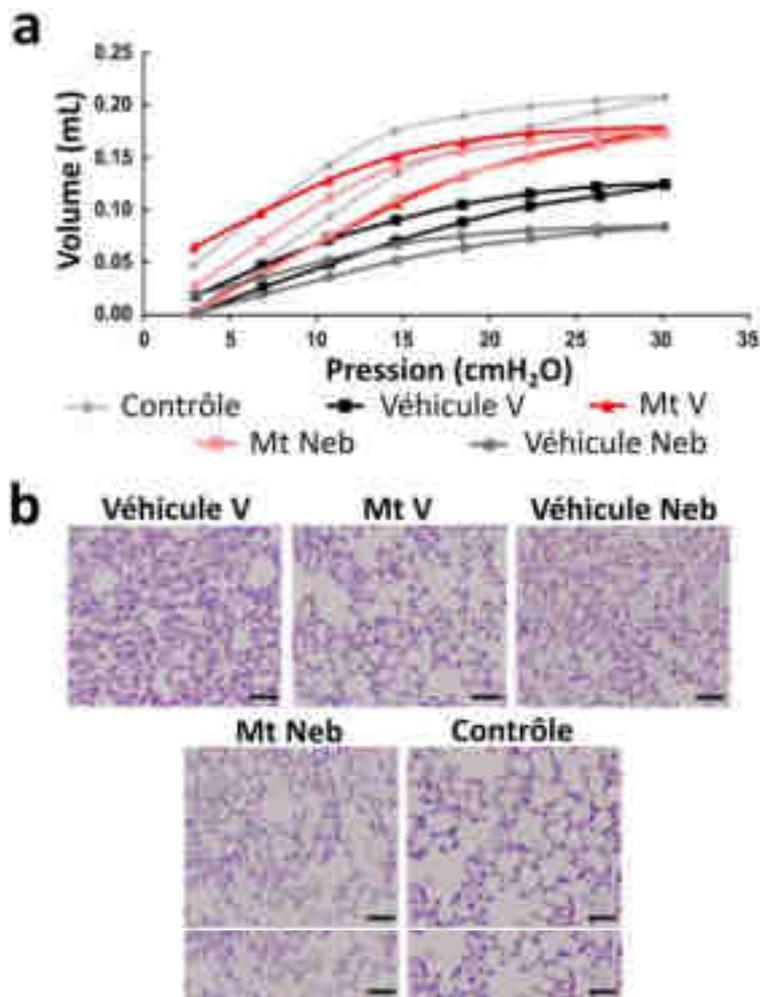
Toutes ces observations participent à montrer les bienfaits thérapeutiques du transfert de Mt initié par les BMSC dans ce cas précis de LPA.

ii. Transfert de mitochondries isolées dans un contexte d'ischémie reperfusion.

Un autre type de LPA est la lésion d'ischémie-reperfusion (LIR), l'une des LPA les plus communes (67). Les LIR sont un type d'ischémies survenant lors de greffes et pouvant donner des dommages mitochondriaux importants qui réduisent la durée de vie des greffons. Une étude de 2019 menée par Kamila Moskowitsova et ses collègues avait pour but de voir si le transfert de Mt pourrait s'avérer efficace pour améliorer les pronostics de souris victimes de ces ischémies.

Afin de simuler une LIR pulmonaire les chercheurs ont réalisé une ischémie transitoire par clampage du hile pulmonaire gauche pendant 2h sur vingt-cinq souris. Ces souris ont été réparties au hasard en deux groupes : vasculaire (véhicule seul ou Mt injectées dans l'artère pulmonaire gauche) et nébulisation (véhicule seul ou Mt instillées par voie aérienne en aérosol). Un groupe contrôle composé

de cinq autres souris a également subi la thoracotomie et la ventilation mécanique pendant 2h sans clampage, afin de comparer les résultats sans le biais de l'impact de l'opération seule. Après les 2h, des Mt extraites de muscles gastrocnémiens de six autres souris ont été injectées ou instillées aux deux premiers groupes. S'en est suivi pour les souris un temps de récupération de 24h, à la suite desquelles les mesures ont été réalisées.



**Figure 19 : L'instillation de Mt par voie vasculaire ou aérosol améliore les capacités pulmonaires et préserve les cellules à la suite d'une lésion d'ischémie-reperfusion (67).**

**a.** Boucles pression-volume représentatives. Les groupes Véhicule V (administration vasculaire) et Véhicule Neb (administration aérosol) avaient une capacité de volume pulmonaire plus faible malgré des pressions plus élevées par rapport aux groupes Mt V, Mt Neb et contrôle.

**b.** Lésion du tissu pulmonaire à 24 heures de reperfusion après 2 heures d'ischémie. Des coupes représentatives de tissus pulmonaires à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E) sont représentées. Une meilleure préservation du tissu pulmonaire a été observée dans les poumons des souris recevant Mt V et Mt Neb par rapport aux souris recevant uniquement le véhicule. Les poumons Mt V et Mt Neb ont montré une diminution de l'infiltration des cellules inflammatoires et de la congestion interstitielle avec une diminution de la destruction de l'architecture pulmonaire. Echelle noire : 40  $\mu$ m.

D'après Mohammad Naimul Islam et al.

Les premiers paramètres évalués ont été les paramètres mécaniques des poumons. Après 24h toutes les souris ont été opérées afin d'exposer le poumon gauche pour les évaluer. Pour le groupe à l'administration vasculaire, les poumons ayant reçu les Mt ne présentaient plus de différences significatives avec le groupe contrôle n'ayant pas subi d'ischémie ; contrairement au groupe n'ayant reçu que le véhicule où l'on observe une diminution de la compliance dynamique (-3,84 L/cmH<sub>2</sub>O), une augmentation de la résistance (+1,82 cmH<sub>2</sub>O), de l'amortissement tissulaire (+10,74 cmH<sub>2</sub>O/mL), de l'élastance (+72,9 cmH<sub>2</sub>O/mL), et de la pression inspiratoire maximale (+3,34 cmH<sub>2</sub>O). Quant au groupe ayant reçu l'administration par aérosol, là encore il n'y avait pas de différences significatives entre le groupe Mt et le contrôle, excepté pour la pression inspiratoire maximum qui s'est vu augmentée comme pour le groupe véhicule. Les boucles pression-volume ont montré des capacités

plus faibles chez les groupes véhicules par rapport aux autres (Figure 19a). Du point de vue des performances mécaniques les Mt injectées semblent donc légèrement plus efficaces que les nébulisées, mais les deux groupes permettent des améliorations significatives. Suite à ces tests mécaniques les poumons gauches ont subi un lavage broncho-alvéolaire qui n'a montré aucune différence entre les groupes. Enfin, les poumons gauches ont été prélevés et disséqués en trois parties. La section supérieure des poumons a servi à évaluer l'œdème tissulaire, mais là encore aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes. Afin d'évaluer les dégâts tissulaires, la coupe basale a été observée par microscopie électronique à transmission et la coupe médiane a été fixée puis a subi de multiples colorations. Comparés aux groupes véhicules les groupes ayant reçu les Mt ont montré des signes inflammatoires diminués et une architecture pulmonaire préservée (Figure 19b). Bien que le nombre de cellules apoptotiques ait été augmenté dans tous les groupes comparés au contrôle, les transferts de Mt ont tout de même diminué ce nombre par rapport aux groupes véhicules.

Au final l'étude a démontré *in vivo* l'efficacité et viabilité du transfert de Mt dans le cadre d'une rémission suite à une ischémie.

Ces deux études montrent ainsi l'efficacité du transfert de Mt sur les critères fonctionnels, mécaniques et inflammatoires des poumons dans le cadre de LPA, aussi bien par injection directe que par instillation via les voies aériennes. Le transfert était bénéfique de cellule à cellule et avec des Mt seules. Les actes n'entraînaient ni réactions immunitaires délétères ni troubles fonctionnels durant la durée de ces observations.

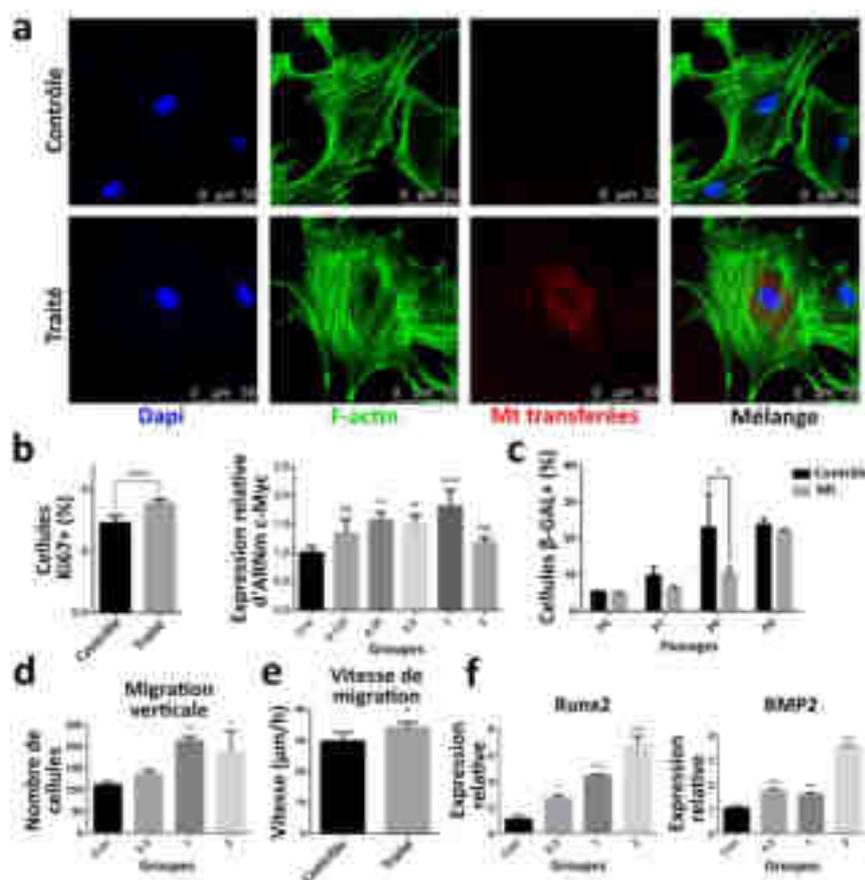
#### d. Amélioration du potentiel des cellules souches pour la cicatrisation osseuse

Les tissus osseux sont à la fois des tissus structurels et protecteurs, sa structure complexe et solide allonge le temps de sa cicatrisation par rapport aux tissus mous. Selon l'emplacement d'une lésion osseuse, l'intégrité des organes qu'ils protègent ou qui se trouvent à proximité peut être engagée. Les BMSC sont facilement isolables et cultivables, connues pour pouvoir effectuer une différenciation en ostéoblastes et améliorer la cicatrisation osseuse (68,69).

De nombreuses recherches ont été menées afin d'améliorer le potentiel de ces cellules une fois transplantées au patient. Dans l'étude de 2020 de Yusi Guo et ses collègues, les chercheurs se sont inspirés de précédentes observations et ont tenté d'améliorer les fonctions et effets thérapeutiques des BMSC en transférant des Mt dans les cellules pré-transplantées *in vitro*.

La première étape a été d'isoler les BMSC et les mettre en culture. A partir de ces cultures, certaines cellules (donneuses) ont été récupérées pour en extraire et marquer les Mt fonctionnelles. Elles ont ensuite été transférées dans les BMSC (receveuses) du même lot à différents dosages. La culture contrôle n'a reçu que du milieu sans Mt. Après un immunomarquage des receveuses, la

présence des Mt transférées dans les cellules a été confirmée (Figure 20a). Différents paramètres ont été étudiés *in vitro* afin de définir les avantages fournis par ce transfert. En partant de la même confluence cellulaire, les groupes ayant reçu les Mt ont atteint un plateau plus tôt que le groupe contrôle. Ce potentiel augmenté a également été confirmé par le suivi de l'expression de la protéine Ki-67 et des niveaux d'expression augmenté de l'ARNm marqueur c-Myc (indicateurs de la prolifération) (Figure 20b). Les niveaux de bêta-galactosidase ( $\beta$ -GAL), marqueur du vieillissement cellulaire, ont révélé une sénescence moins importante chez les groupes ayant reçu des Mt (Figure 20c). Les capacités de migration des cultures recevant les Mt se sont avérées plus importantes (Figure 20d et e). Pour ce qui est du potentiel ostéogénique (effet final attendu des BMSC), le transfert de Mt l'a augmenté comme en témoigne les colorations et tests d'activité de la phosphatase alcaline (enzyme intervenant dans la formation osseuse). Ce paramètre a également pu être confirmé par l'analyse des niveaux d'expression des ARNm des protéines Runx2 et BMP2 (essentielle à l'ostéogénèse) qui ont montré une tendance à la hausse (Figure 20f).



**Figure 20 : Le transfert de Mt aux BMSC permet d'améliorer leurs capacités proliférative, migratoire et de différenciation ostéogénique *in vitro* (69).**

a. Coloration confocale par immunofluorescence des noyaux avec DAPI et de la F-actine avec phalloïdine marquée FITC 24h après le transfert des Mt dans le groupe traité. Les Mt ont été absorbées par les BMSC.

b. Cellules Ki67-positives et niveau d'expression de l'ARNm de c-Myc (marqueurs prolifération) en fonction du ratio cellules donneuses/cellules receveuses (con = 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2). Le transfert de Mt a renforcé la capacité de prolifération pour les ratios 0,25, 0,5 et 1. \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$

c. Cellules  $\beta$ -GAL positives (marqueur sénescence) du 6ème au 9ème passage. Le transfert de Mt ralentit l'augmentation de la  $\beta$ -GAL. \* $P \leq 0,05$

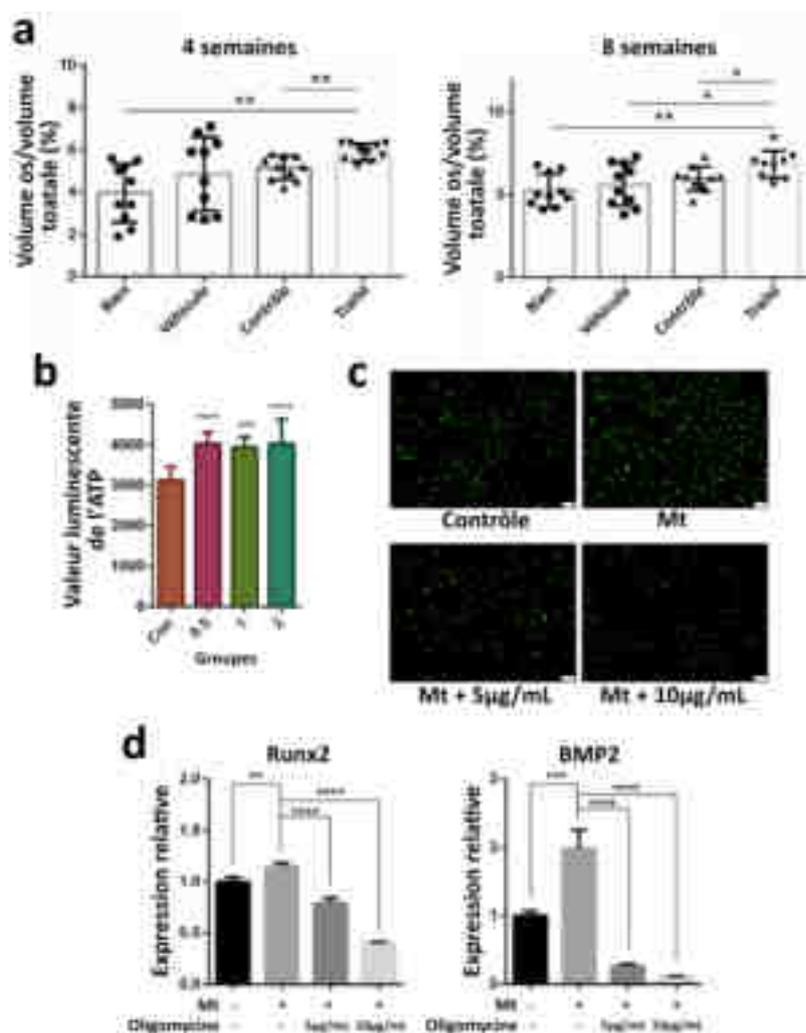
D'après Guo Y et al.

d. Evaluation de l'effet du transfert de Mt sur la migration verticale en fonction du ratio cellules donneuses/cellules receveuses (con = 0, 0,125, 0,25, 0,5, 1, 2). La migration verticale s'est vue significativement augmentée à l'utilisation des ratios 1 et 2. \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$  par rapport au contrôle

e. Vitesse de migration de cellules individuelles. La vitesse de migration s'est vue significativement augmentée par le transfert de Mt. \*  $P < 0,05$  par rapport au contrôle

f. Niveaux d'expression de l'ARNm de Runx2 et de BMP2 (marqueurs ostéogénèses) dans les BMSC après 7 jours en fonction du ratio cellules donneuses/cellules receveuses (con = 0, 0,5, 1, 2). Le transfert de Mt a augmenté l'expression des ARNm. \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$  par rapport au contrôle

Par la suite les chercheurs ont débuté les expériences *in vivo* sur 40 rats dont chaque côté de l'os pariétal a été percé d'un trou. Les rats ont été divisés en quatre groupes : un groupe ne recevant rien, un recevant le véhicule seul dans les blessures, un recevant des BMSC contrôles, un recevant des BMSC avec des Mt supplémentaires. A 4 ou 8 semaines les crânes ont été observés au micro scanner. Des coupes du tissu, suivies de coloration de Masson ont été réalisées, révélant qu'une plus grande quantité d'os nouveau se formait dans la zone du défaut osseux des groupes traités aux BMSC Mt par rapport aux autres groupes (Figure 21a). Les chercheurs ont aussi évalué *in vitro* si ces résultats seraient corrélés à une respiration cellulaire et une production d'ATP améliorée. Des augmentations des mesures des flux d'oxygène et de la production d'ATP semblent aller en ce sens (Figure 21b). Pour voir si ces paramètres peuvent être liés aux améliorations fonctionnelles des cellules, la production d'ATP a été inhibée par différentes concentrations d'oligomycine (inhibiteur de l'ATPase). L'oligomycine a pu annuler de manière dose-dépendante l'augmentation de la prolifération, de la migration, mais aussi l'augmentation des ARNm Runx2/BMP2 (Figure 21c et d). Ceci démontre que les potentiels proliférateurs, migratoires et ostéogéniques sont corrélés aux métabolismes aérobie.



**Figure 21 : Les BMSC ayant reçu des Mt compétentes ont eu un effet thérapeutique amélioré *in vivo* grâce à des modifications métaboliques (69).**

**a.** Analyse du volume osseux de l'os nouvellement formé sur des rats à 4 puis 8 semaines post lésion. Quatre groupes : rien reçu, reçu du véhicule, reçu des BMSC contrôle, reçu des BMSC Mt. Le transfert de Mt a amélioré l'effet des BMSC de manière significative. \* P < 0,05, \*\* P < 0,01

**b.** Mesure de la production d'ATP par le test de détection lumineuse ATPlite. Le transfert de Mt a significativement augmenté la production d'ATP. \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001

**c.** Effets de l'oligomycine (inhibiteur de l'ATPase) sur la production d'ATP des BMSC, production visualisable par fluorescence. L'ajout de l'oligomycine diminue de manière dose dépendante la quantité d'ATP produite et annule l'effet des Mt.

**d.** Niveaux d'expression de l'ARNm de Runx2 et de BMP2 après 4 jours d'induction ostéogénique en fonction de l'ajout ou non de Mt à différentes concentrations d'oligomycine. L'augmentation des niveaux d'expression des deux ARNm qu'apportent les Mt est annulée par l'oligomycine. \*\* P < 0,01, \*\*\* P < 0,001, \*\*\*\* P < 0,0001

D'après Guo Y et al.

Cette étude a donc permis de constater *in vitro* et *in vivo* l'amélioration du potentiel des BMSC que peut prodiguer le transfert de Mt dans le cadre de la réparation osseuse, que ce soit du point de vue prolifératif, migratoire et de la différenciation ostéogénique. De plus cette potentialisation semble aller de pair avec l'augmentation du métabolisme aérobie prodigué par les Mt.

#### e. Oncologie

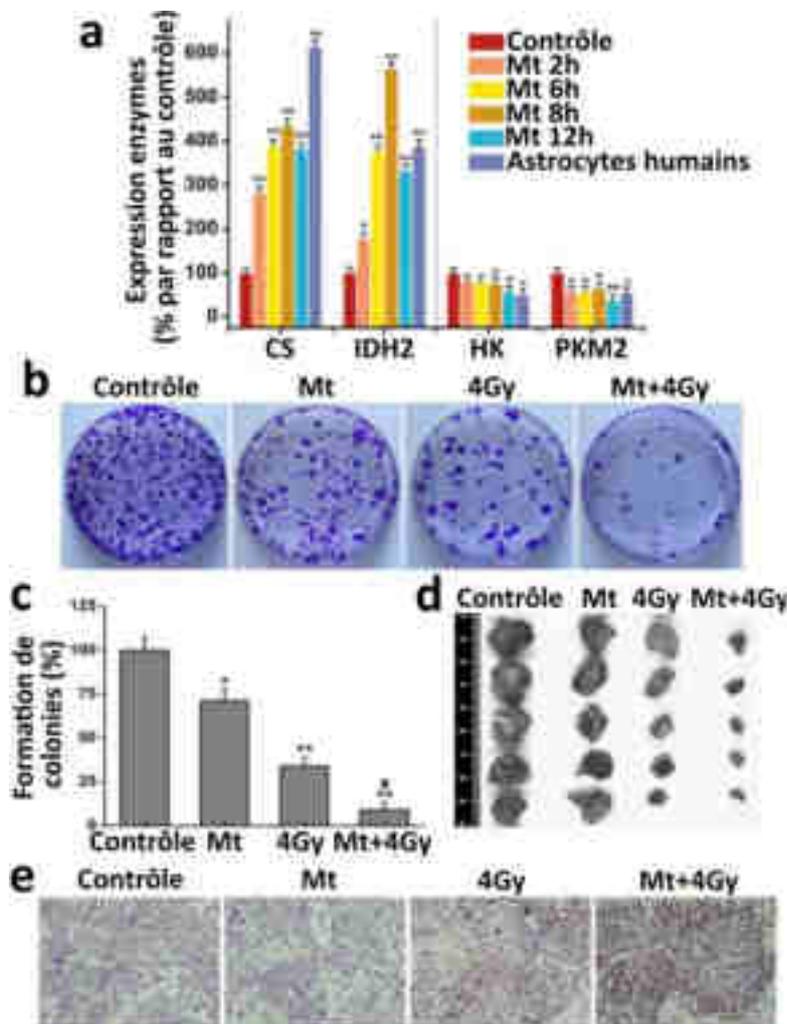
Comme vu plus haut (cf II.a.ii.) les cellules cancéreuses peuvent être sujettes à une hétérogénéité moléculaire due notamment à des mutations qui causent des reprogrammations de leurs métabolismes (37,54). Les cellules voient alors leur capacité proliférative exacerbée, échappent à l'apoptose et deviennent résistantes aux traitements, radiothérapies, chimiothérapies ou thérapies ciblées. Un autre changement métabolique fréquemment observé au sein des tumeurs est l'effet Warburg, où l'on peut observer des cellules produisant leur énergie via un plus fort taux de glycolyse producteur d'acide lactique plutôt qu'avec la voie aérobie mitochondriale (et ce même si de l'oxygène est disponible). Cet effet serait en partie lié à des dysfonctions des Mt. Cependant le rôle précis des Mt est difficile à évaluer en raison des microenvironnements complexes des tumeurs (37,70). Un autre point à relever est que certains traitements anti-cancéreux altéreraient les fonctions mitochondriales des cellules saines environnantes, ce qui amèneraient à une partie des effets indésirables des chimiothérapies (71).

C'est pourquoi des études *in vitro* et *in vivo* ont été menées sur l'intérêt du transfert de Mt en parallèle des traitement anti-cancéreux, que ce soit pour en améliorer les effets et/ou prévenir d'éventuels effets indésirables.

##### i. Effet des Mt sur le métabolisme et l'apoptose des cellules tumorales

Chao Sun et ses collègues ont en 2019 réalisé une étude sur le potentiel du transfert de Mt dans les cellules de gliomes afin d'améliorer la réponse aux traitements (54).

Les Mt viables utilisées pour le transfert ont été isolées à partir d'astrocytes humains, marqués, puis mises en co-incubation avec des cellules de gliome humain précédemment privées de glucose pendant 2h. Cette privation stimule le mécanisme d'endocytose médié par la voie de signalisation NAD<sup>+</sup>-CD38-cADPR-Ca<sup>2+</sup>, voie vue plus tôt (cf II.a.iii. et II.b.ii.) déjà soupçonnée et validée par l'équipe comme étant un mécanisme pour l'internalisation des Mt. Suite à la co-incubation les cultures ont été étudiées pendant 12h. L'expression de gènes et enzymes clés dans la glycolyse et le cycle de Krebs ont été mesurés. Il en ressort que le transfert de Mt aux cellules de gliomes augmente l'expression des enzymes qui participent au cycle de Krebs (Figure 22a). Inversement, la glycolyse est inhibée par le transfert de Mt (Figure 22a). Ainsi les résultats suggèrent que le transfert de Mt a permis d'atténuer l'effet Warburg des cellules de gliome en changeant leur voie métabolique principale de la glycolyse à la phosphorylation oxydative.



**Figure 22 : Une transplantation de Mt d'astrocytes humains sains dans des cellules de gliome humain rétablit la respiration aérobie et améliore la radiosensibilité (54).**

**a.** Mesure des niveaux d'expression des enzymes critiques limitant la vitesse du cycle de Krebs (citrate synthase CS et l'isocitrate déshydrogénase 2 IDH2) et de la glycolyse (hexokinase HK et pyruvate kinase 2 PKM2). Le ratio des échantillons du contrôle est considéré comme étant de 100 %. Suite au transfert de Mt les ratios montrent une augmentation de l'expression de CS et IDH2 et une diminution de HK et PKM2. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$

**b.** Photo des colonies montrant les effets de la transplantation de Mt et/ou de l'irradiation sur le potentiel clonogénique des cellules de gliome humain. L'ajout de Mt améliore la sensibilité aux radiations.

**c.** Analyse statistique de la formation de colonies. L'ajout de Mt améliore la sensibilité aux radiations. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , #  $p < 0,05$  par rapport au groupe 4 Gy sans Mt

**d.** Tumeurs humaines xéno greffées aux souris excisées et pesées. Les tumeurs ayant le plus diminuées sont celles traitées aux Mt et 4Gy.

**e.** L'apoptose dans les tumeurs xéno greffées a été mesurée par coloration TUNEL (marron : TUNEL positives). Les tumeurs avec le plus d'apoptose sont celles traitées aux Mt et 4Gy.

D'après Sun C et al.

Dans la suite de l'étude, ce sont les effets de la radiothérapie qui ont été évalués *in vitro* puis *in vivo*. A 48h post irradiation, l'étude *in vitro* a révélé une augmentation des taux de cyt C et caspase 9 dans le cytosol, traduisant une voie apoptotique mitochondriale rétablie, et donc une radiosensibilité augmentée dans les cellules de gliomes ayant bénéficié d'un transfert de Mt (taux d'apoptose 63,0% contre 26,6%) (Figure 22b). La formation de colonies dans les cultures était réduite de 24,8% par rapport à celles seulement irradiées (Figure 22c). Pour l'expérience *in vivo*, les cellules ont été xéno greffées en sous-cutané sur des souris. 13 jours après la greffe, les tumeurs se sont vues injecter des Mt dont les distributions intra-tumorale et intracellulaire ont été vérifiées à 6 et 12h post-injection. Les groupes concernés ont ensuite été irradiés 12h post injection, puis toutes les tumeurs ont été prélevées à quinze jours après l'irradiation. L'injection de Mt a augmenté l'apoptose (avec ou sans radiothérapie) et réduit la masse tumorale (Figure 22d et e).

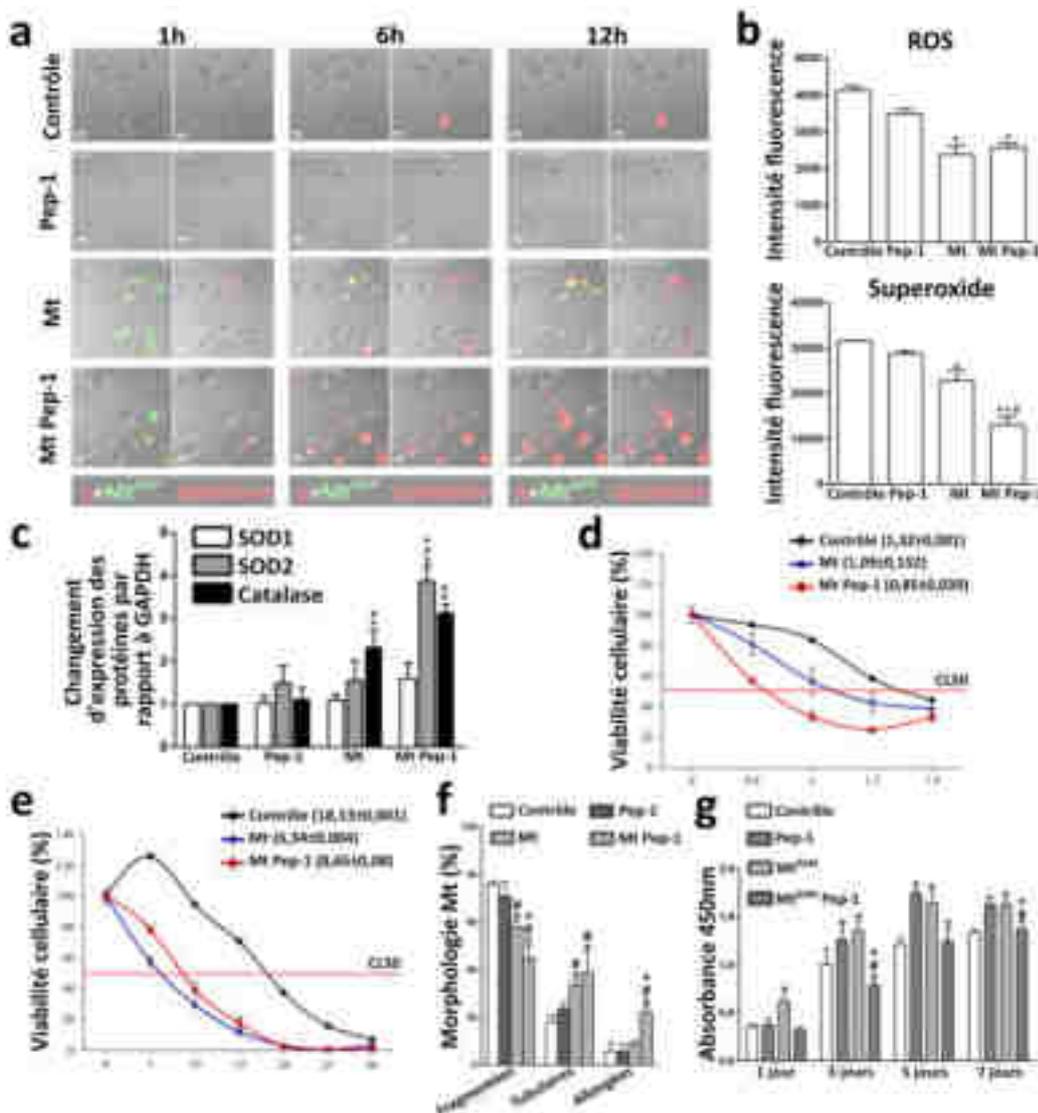
Ces expériences ont donc permis de constater que le transfert de Mt peut réactiver la voie apoptotique mitochondriale qui inhibent les proliférations malignes et augmentent la radiosensibilité des cellules cancéreuses.

ii. Effets des Mt sur la résistance des cellules tumorales aux traitements thérapeutiques

Toujours en 2019, Jui-Chih Chang et son équipe ont étudié *in vitro* la possibilité de réguler l'activité anti-tumorale et sensibilisatrice du transfert de Mt modifiées ou non dans des cellules d'adénocarcinome mammaire humain (70).

La modification effectuée concerne l'ajout du peptide Pep-1 aux Mt pour faciliter leur absorption dans les cellules receveuses, ce peptide ayant déjà fait ses preuves dans de précédentes expérimentation de l'équipe (72,73). Après avoir isolé des Mt précédemment marquées, certaines ont été conjuguées au peptide Pep-1. Les Mt et Mt Pep-1 vertes ont ensuite été incubées en présence de cellules tumorales marquées en rouge. L'analyse par microscopie confocale a révélé que la proportion de Mt Pep-1 internalisée était légèrement plus importante que celle des Mt simples (Mt ayant tendance à adhérer à la membrane). Pendant les premières 24h, un suivi en temps réel de l'apoptose cellulaire a été effectué grâce à un balayage toutes les 10 min via microscopie confocale des cellules mises en contact avec un colorant nucléaire imperméable aux cellules vivantes. 12h après leur ajout, le pouvoir d'induction apoptotique des Mt Pep-1 s'est révélé plus important ( $94 \pm 3,1\%$ ) que celui des Mt simples ( $82,3 \pm 4,2\%$ ) (Figure 23a). Les cellules ayant internalisées les Mt Pep-1 ont montré une augmentation de la translocation nucléaire du facteur pro-apoptotique, une croissance cellulaire réduite et une réduction de la production de ROS (Figure 23b) associé à une forte augmentation du taux d'enzymes antioxydantes (Figure 23c). Les chercheurs ont ensuite évalué l'impact des Mt sur la sensibilité à deux anti-cancéreux communs, la doxorubicine et le paclitaxel. Le transfert de Mt ou Mt Pep-1 a pu baisser la concentration en  $\mu\text{M}$  létale pour 50 % des cellules (CL50) des deux molécules (Figure 23d, 23e). Les paramètres mitochondriaux tendaient vers une diminution de la fission pour les deux traitements, avec des hyperfusions des Mt dans le groupe Mt Pep-1 et un équilibre fusion/fission dans le groupe Mt (Figure 23f). L'expérimentation a ensuite été refaite en remplaçant les Mt transférées saines par des Mt mutées A8344G dont la chaîne respiratoire est dysfonctionnelles (74). Les analyses ont montré que Pep-1, les Mt et Mt Pep-1 entraînaient des modifications métaboliques différentes, les Mt<sup>8344</sup> et Pep-1 seul entraînant une augmentation de la demande d'énergie provenant de la glycolyse, alors que les Mt<sup>8344</sup> Pep-1 altèrent de la respiration mitochondriale sans augmenter la glycolyse. Cette différence s'observe aussi par le fait que la prolifération cellulaire cancéreuse observée avec les Mt<sup>8344</sup> ou Pep-1 a été augmentée, mais pas avec Mt-Pep1 (Figure 23g). L'étude a ainsi montré que l'ajout de Pep-1 aux Mt améliore leur internalisation et peut modifier leur mécanisme d'action.

Dans l'ensemble l'étude confirme que la transplantation de Mt facilitée ou non permet aux cellules cancéreuses de réactiver un mécanisme d'apoptose et de diminuer leur résistance aux traitements.



D'après Chang J C et al.

**Figure 23 : La transplantation de Mt saines régule l'activité antitumorale, la chimiorésistance et la dynamique mitochondriale dans le cancer du sein *in vitro* (70).**

**a.** Suivi continu de 12h par microscopie confocale de l'apoptose à l'aide d'un milieu contenant de l'iodure de propidium (colorant nucléaire rouge perméable aux cellules en apoptose) dans les cellules avec  $Mt^{GFP}$  ou  $P-Mt^{GFP}$ . Le transfert de Mt et Mt Pep-1 a permis une réactivation de l'apoptose.

**b.** Analyse par sondes fluorescentes de la génération des ROS totaux et superoxydes après 3 jours de traitement au cisplatine. Les groupes Mt et Mt Pep-1 ont vu baisser leurs ROS de manière significative. \*  $P < 0,05$ , #  $P < 0,05$  par rapport à Pep-1, +  $P < 0,05$  entre Mt et Mt Pep-1

**c.** Analyse des enzymes antioxydantes, les superoxydes dismutases 1 ou 2 (SOD1 et SOD2) et la catalase après 3 jours de traitement au cisplatine. Le groupe Mt a vu augmenter la catalase de manière significative, le groupe Mt Pep-1 la SOD2 et la catalase. \*  $P < 0,05$ , #  $P < 0,05$  par rapport au groupe Pep-1, +  $P < 0,05$  entre les groupes Mt et Mt Pep-1

**d.** Test de viabilité cellulaire pour surveiller la CL50 de la doxorubicine dans les cellules après 3 jours de traitement avec Mt ou Mt Pep-1. Les Mt ou Mt Pep-1 transférées ont augmenté la sensibilité à la doxorubicine.

**e.** Test de viabilité cellulaire utilisé pour surveiller la CL50 du paclitaxel dans les cellules après 3 jours de traitement avec Mt ou Mt Pep-1. Les Mt ou Mt Pep-1 transférées ont augmenté la sensibilité au paclitaxel.

**f.** La morphologie des Mt des cellules cancéreuses a été quantifiée à l'aide d'un système de classification automatique. Le transfert de Mt ou Mt Pep-1 augmente la fusion (tubulaires/allongées) et diminue la fission (fragmentées). \*  $P < 0,05$ , #  $P < 0,05$  par rapport au groupe Pep-1, +  $P < 0,05$  entre les groupes Mt et Mt Pep-1

**g.** Test de prolifération en fonction du temps et des transferts de Pep-1,  $Mt^{8344}$  ou  $Mt^{8344}$  Pep-1. Pep-1 seul et  $Mt^{8344}$  augmentent la prolifération des cellules cancéreuses, mais pas  $Mt^{8344}$  Pep-1 qui l'a diminuée au jour 3. \*  $P < 0,05$ , #  $P < 0,05$  par rapport au groupe Pep-1, +  $P < 0,05$  entre les groupes Mt et Mt Pep-1

### iii. Effets des Mt sur les effets secondaires des traitements anti-cancéreux

Un autre enjeu important en dehors des problèmes de résistance aux traitements, est celui des effets secondaires pouvant persister après les traitements anti-cancéreux. Suite à leurs observations indiquant que le traitement au cisplatine endommage les Mt neuronales et a un impact négatif sur les fonctions cérébrales, Jenolyn F. Alexander et ses collègues ont mené une étude en 2021 visant à voir si l'administration nasale de Mt pourrait inverser ces effets indésirables (71,75).

Des souris ont d'abord été traitées au cisplatine ou avec le véhicule (contrôle) chaque jour pendant 5 jours, puis laissées au repos 5 jours, avant d'être retraitées pendant 5 jours. Des Mt humaines rendues fluorescentes ont été administrées par voie nasale dans chaque narine après la dernière dose de traitement. Les cerveaux et méninges d'une partie des souris ont été récoltés à 30 min, 3h et 18h pour retracer le chemin emprunté par les Mt via microscopie confocale et immunofluorescence. Dès 30 min les Mt ont été détectées dans toutes les méninges avec une forte concentration près de l'aire olfactive et dans les ventricules cérébraux, internalisée par des cellules immunitaires utilisant l'endocytose comme des macrophages. Après 3h, les Mt ont migré d'avantage, notamment sur le flux migratoire rostral (route empruntée par les neurones nouvellement générés dans cette zone), l'hippocampe, et été internalisées par des astrocytes. Quelques Mt étaient encore détectables à 18h. 14 jours après l'instillation des Mt, les souris ont été soumises à des tests pour mesurer l'état de leurs fonctions cognitives :

- Test de boîte à puzzle pour mesurer leurs fonctions exécutives. Il consiste en une épreuve avec des niveaux de difficultés augmentant graduellement, où la souris est mise dans un compartiment lumineux relié par un tunnel à compartiment un sombre (plus apprécié par les souris). Au niveau facile le tunnel est ouvert, la difficulté intermédiaire présente un obstacle sur le sol du tunnel, et le tunnel difficile possède un couvercle de la même couleur que lui, bloquant son entrée. Les souris ont réalisé les épreuves en 11 essais répartis sur 4 jours, et ont été évaluées sur le temps qu'elles mettent pour arriver au compartiment final.

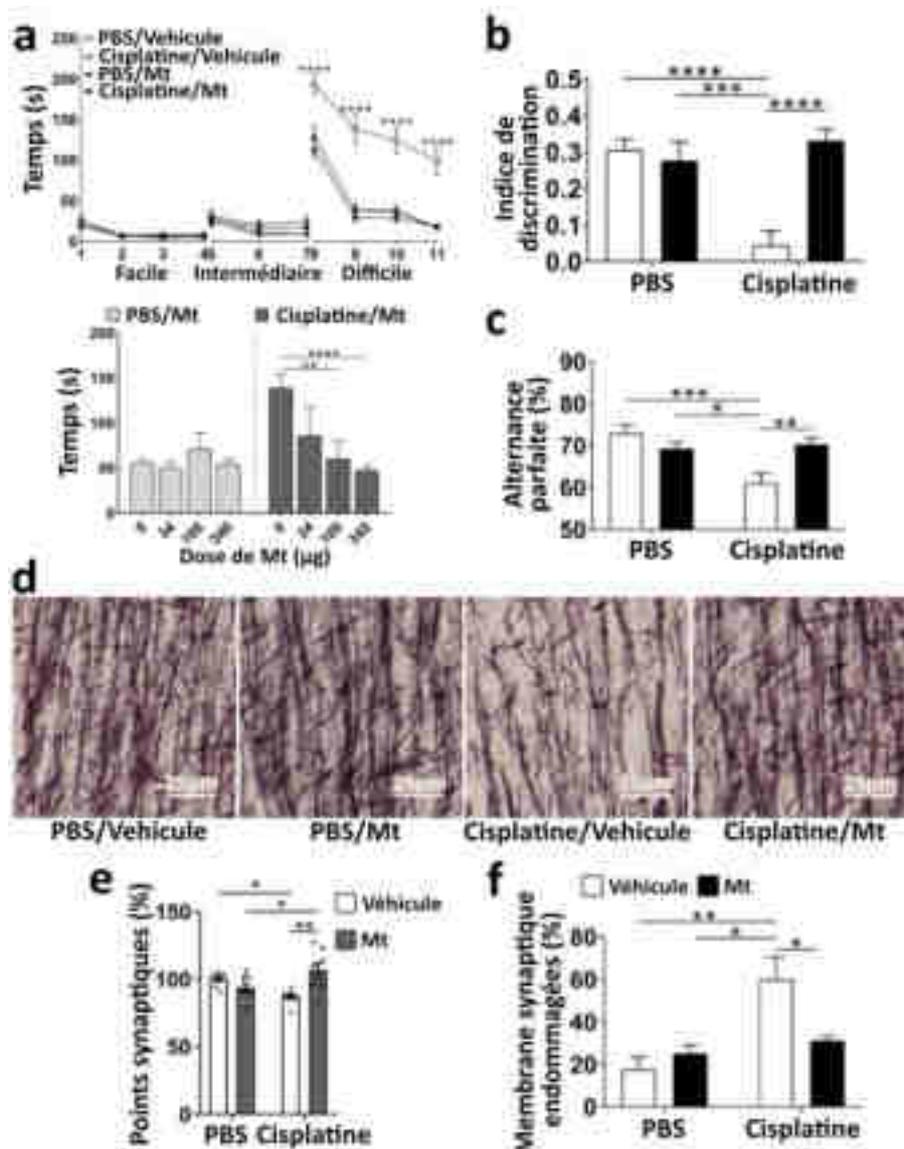
- Test de la reconnaissance de nouveaux objets pour évaluer la mémoire de travail. Des souris sont d'abord familiarisées à un environnement et deux objets identiques pendant 5 min, laissées dans leur cage 30 min, puis remises en présence d'un objet familier et d'un objet nouveau à un endroit différent 5 min. Les paramètres observés pour ce test sont le temps passé sur le nouvel objet par rapport au temps que la souris passe sur celui qu'elle est sensée connaître ( $[T \text{ Nouveau} - T \text{ Familier}] / [T \text{ Nouveau} + T \text{ Familier}]$ ) et le nombre d'interactions avec les objets.

- Test du labyrinthe en Y pour évaluer la mémoire spatiale. La souris est mise au hasard dans un des trois bras identiques du labyrinthe pour mesurer le nombre d'entrée dans les bras et le pourcentage d'alternances parfaites lors de l'exploration des bras par la souris pendant 5 min.

Le test de boîte à puzzle a révélé les effets délétères du cisplatine lors de l'accomplissement du niveau difficile, où les souris traitées n'arrivaient pas à passer le couvercle contrairement aux souris contrôles. Les souris cisplatine/Mt ont montré des performances similaires aux souris contrôles de façon doses dépendantes (Figure 24a). Les souris traitées ont également montré une préférence moindre pour un objet nouveau par rapport aux souris contrôle. Là encore les souris s'étant vu instiller les Mt ont gardé des capacités similaires au contrôle (Figure 24b). Lors de l'exploration du labyrinthe en Y les souris traitées au cisplatine avaient un pourcentage d'alternance diminué par rapport aux souris contrôle, montrant qu'elles oubliaient plus souvent d'où elles venaient et revenaient sur leur pas. Cette dégradation était là aussi réversible par l'administration de Mt (Figure 24c).

Les souris ont été sacrifiées à la suite de ces tests, afin de réaliser les observations histologiques et moléculaires. Les observations ont confirmé la dégradation de la myéline suite au traitement au cisplatine. L'instillation de Mt est parvenue à inverser ces dommages structurels (Figure 24d). A l'aide d'un marqueur pré-synaptique synaptophysine (76), les chercheurs ont pu mettre en évidence les effets délétères du cisplatine sur l'hippocampe, une structure cérébrale essentielle dans la cognition, la mémoire et le repérage. Mais là encore, cette perte d'intégrité de l'activité synaptique dans l'hippocampe a été inversée par les Mt (Figure 24e). La visualisation des synapses au microscope électronique à transmission chez les souris traitées au cisplatine montre une dégradation de l'état de leur membrane et leurs Mt (gonflement, enroulement de la membrane, désorganisation protéinique), anomalies résolues par le transfert de Mt et cela, partout dans le cerveau des souris (Figure 24f). L'analyse transcriptomique par séquençage d'ARN sain a montré que sur les 16000 gènes codants identifiés 14784 gènes étaient stables et 1813 étaient exprimés de manière différentielle (sur- ou sous-régulation) dans les souris traitées au cisplatine par rapport aux souris contrôle. Le transfert de Mt aux souris traitées au cisplatine a permis d'inverser ce changement d'expression pour 676 de ces gènes. Les gènes dont l'expression a été rétablie par les Mt favorisent la protection neuronale ou la gestion du stress cellulaire. Ainsi l'administration intranasale de Mt aux souris traitées au cisplatine permet bien de diminuer les effets secondaires du traitement, ce changement étant perceptible à différents niveaux que ce soit comportemental, histologique ou moléculaire.

Ces trois études permettent de se rendre compte de l'utilité que pourrait remplir le transfert de Mt dans le domaine de l'oncologie, où l'impasse thérapeutique et les effets indésirables des traitements posent de sérieuses problématiques. Le transfert peut augmenter l'efficacité aussi bien de la radiothérapie que des molécules anti-cancéreuses en réactivant des voies de mort cellulaire détériorées chez les cellules cancéreuses. Il peut également prévenir les dommages de traitement agressif dans les cas où des dommages sur les Mt sont connus comme en étant la cause. De plus l'action des Mt administrées semble même pouvoir avoir des effets sur l'expression des gènes.



D'après Alexander J F et al.

**Figure 24 : L'administration nasale de Mt inverse les déficits cognitifs et la dégradation neuronale induits par la chimiothérapie au cisplatine (71).**

**a.** Mesure du temps nécessaire pour entrer dans la chambre noire pour le test de la boîte à puzzle, suivi d'une évaluation au niveau difficile du rétablissement de la fonction exécutive à 34, 100 et 340 $\mu$ g de Mt. Les souris cisplatine ont été lentes ou n'ont pas réussi à finir les essais difficiles. Les souris cisplatine/Mt ont obtenu de bons résultats. Les effets dans les essais difficiles sont dose dépendants. \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$

**b.** Les mouvements des souris et le temps passé avec chaque objet ont été suivis pour le test de la reconnaissance de nouveaux objets. L'indice de discrimination a été calculé comme suit :  $(T \text{ Nouveau} - T \text{ Familier}) / (T \text{ Nouveau} + T \text{ Familier})$ . Les souris cisplatine n'ont pratiquement pas montré de préférence pour le nouvel objet, alors que les souris cisplatine/Mt ont eu des performances comparables aux souris saines. \*\*\*  $P \leq 0,001$ , \*\*\*\*  $P \leq 0,0001$

**c.** L'alternance parfaite a été calculée à partir de leur entrée séquentielle dans tous les bras avant de revisiter un bras pour le test du labyrinthe en Y. Les souris cisplatine ont montré une diminution des alternances parfaites, tandis que l'administration de Mt a inversé cette déficience. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$ , \*\*\*  $P \leq 0,001$

**d.** Images représentant la zone colorée au Black Gold II+ (en 20x), illustre l'organisation de la myéline. Les images révèlent une complexité de l'arborescence de la myéline diminuée par le traitement cisplatine, diminution qui n'a plus lieu après le transfert de Mt.

**e.** Pourcentage des ponctuations synaptiques claires avec synaptophysine. Les souris cisplatine présentent une réduction de ce pourcentage, mais l'administration nasale de Mt a inversé cette perte. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$

**f.** Pourcentage de membrane synaptique endommagée. Les synaptosomes de souris traitées au cisplatine ont révélé un pourcentage élevé de membrane synaptique endommagée, ce qui n'est pas le cas dans le groupe recevant les Mt. \*  $P \leq 0,05$ , \*\*  $P \leq 0,01$

## IV. Conclusion et perspectives

Le transfert de Mt est un phénomène pouvant survenir naturellement dans des conditions variées de détresse cellulaire. Il a pu être observé notamment lors de phénomènes de cicatrisation, d'ischémie ou de cancérisation (35,37,41). L'utilisation de transplantation de Mt isolées ou via des cellules est un sujet d'étude récent qui a su montrer un grand nombre de possibilités d'utilisations préventives et thérapeutiques. Un transfert de Mt retardé ou non améliore le pronostic des patients victimes d'ischémie en réduisant la taille de l'infarctus et améliorant les fonctions myocardiques sans induire de perturbations cardiaques (55,64). Lors d'un transfert pour des affections neuronales, les Mt induisaient un effet neuroprotecteur et amélioraient la récupération des performances préalablement affectées (51,65,66). Le transfert de Mt par injection ou instillation chez les souris victimes de LPA permet d'améliorer la survie des individus, leurs fonctions pulmonaires et aide à préserver l'architecture pulmonaire (52,67). Un apport de Mt supplémentaires aux cellules souches avant leur transplantation procure une amélioration de leur potentiel prolifératif, migratoire, et dans le cadre d'une réparation osseuse améliore leur capacité de différenciation ostéogénique (52,69). En cancérologie les applications du transfert de Mt sont variées. Il peut aussi bien être utilisé pour rétablir une sensibilité aux traitements en réactivant les voies apoptotiques des cellules résistantes, mais aussi réduire la gravité des effets secondaires aux traitements (54,70,71). Les études n'ont pas révélé de réponses immunitaires aiguës ou chroniques, et ce même lors de transplantations hétérologues. Dans l'ensemble les paramètres inflammatoires et mitochondriaux se trouvaient améliorés suite aux transferts, tout comme la survie cellulaire. Des administrations locales et systémiques ont pu être utilisées avec succès selon l'accessibilité de la zone à atteindre. La voie nasale semble même être une voie possible facilitant l'accès au système nerveux central (71).

Beaucoup d'incertitudes concernant les mécanismes et voies métaboliques précises doivent encore être élucidées, notamment sur les signaux pouvant déclencher le transfert et l'internalisation des Mt. Des études supplémentaires pour étudier la modification d'expression des gènes ayant lieu suite aux transferts pourraient également nous en apprendre plus sur leur mode d'action des transferts. La pertinence de l'ajout de peptides aidant à l'amélioration de l'internalisation des Mt doit aussi être étudiée plus en détail (70). En effet, les voies métaboliques modifiées et l'expression génique des cellules ayant reçu ces Mt semblent différer de celles affectées par les Mt sans peptides. Pour autant les deux types de Mt ont montré une efficacité vis-à-vis d'une activité anti-tumorale. Il serait également intéressant d'étudier la possibilité d'une action extracellulaire des Mt transférées. D'autres paramètres seraient à préciser avant de passer à des études cliniques, comme le dosage et la voie d'administration optimale en fonction de la cible concernée.

Malgré ces incertitudes la transplantation mitochondriale présente un avenir prometteur et pourrait aussi présenter un espoir pour des patients atteints de maladies au cours desquelles les Mt sont affectées. Des études sur la maladie de Parkinson, le glaucome, les encéphalopathies et les myopathies sont en cours ou ont été suggérées (30,66,77–79).

## V. Bibliographie :

1. Larousse É. Définitions : organite, organelle - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 7 déc 2022]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/organite/56429>
2. Mitochondrial fusion and fission: The fine-tune balance for cellular homeostasis. [cité 14 mai 2023]; Disponible sur: <https://faseb.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1096/fj.202100067R>
3. Genome.gov [Internet]. [cité 4 déc 2022]. Mitochondria. Disponible sur: <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Mitochondria>
4. Nunnari J, Suomalainen A. Mitochondria: In Sickness and in Health. *Cell*. 16 mars 2012;148(6):1145-59.
5. Roger AJ, Muñoz-Gómez SA, Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Curr Biol*. 6 nov 2017;27(21):R1177-92.
6. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. juill 2018;20(7):745-54.
7. Nirody JA, Budin I, Rangamani P. ATP synthase: Evolution, energetics, and membrane interactions. *J Gen Physiol*. 23 sept 2020;152(11):e201912475.
8. Andrieux P, Chevillard C, Cunha-Neto E, Nunes JPS. Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *Int J Mol Sci*. janv 2021;22(21):11338.
9. LIBRARY CP. Science Photo Library. [cité 17 juill 2023]. Mitochondrion, TEM - Stock Image - G465/0069. Disponible sur: <https://www.sciencephoto.com/media/215002/view/mitochondrion-tem>
10. American Chemical Society [Internet]. [cité 21 août 2023]. Adenosine triphosphate. Disponible sur: <https://www.acs.org/molecule-of-the-week/archive/a/adenosine-triphosphate.html>
11. Martínez-Reyes I, Chandel NS. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nat Commun*. 3 janv 2020;11(1):102.
12. Guan S, Zhao L, Peng R. Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes: From Structure to Function. *Int J Mol Sci*. janv 2022;23(22):13880.
13. Guo R, Gu J, Zong S, Wu M, Yang M. Structure and mechanism of mitochondrial electron transport chain. *Biomed J*. 1 févr 2018;41(1):9-20.
14. Judge A, Dodd MS. Metabolism. *Essays Biochem*. 24 août 2020;64(4):607-47.
15. Seol SYJ & DW, \*. The role of mitochondria in apoptosis. *BMB Rep*. 31 janv 2008;41(1):011-22.
16. Rossi A, Pizzo P, Filadi R. Calcium, mitochondria and cell metabolism: A functional triangle in bioenergetics. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 1 juill 2019;1866(7):1068-78.
17. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol*. mai 2021;18(5):1106-21.
18. Benador IY, Veliova M, Liesa M, Shirihai OS. Mitochondria Bound to Lipid Droplets: Where Mitochondrial Dynamics Regulate Lipid Storage and Utilization. *Cell Metab*. 2 avr 2019;29(4):827-35.

19. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *Eur J Biochem.* 2004;271(3):462-9.
20. Chakrabarty RP, Chandel NS. Mitochondria as Signaling Organelles Control Mammalian Stem Cell Fate. *Cell Stem Cell.* 4 mars 2021;28(3):394-408.
21. Ng YS, Turnbull DM. Mitochondrial disease: genetics and management. *J Neurol.* 1 janv 2016;263(1):179-91.
22. Know L. Les mitochondries au coeur de la médecine du futur. *dangles.* 2019. 302 p.
23. Zeviani M, Di Donato S. Mitochondrial disorders. *Brain.* 1 oct 2004;127(10):2153-72.
24. Sreedhar A, Aguilera-Aguirre L, Singh KK. Mitochondria in skin health, aging, and disease. *Cell Death Dis.* 9 juin 2020;11(6):1-14.
25. Wada J, Nakatsuka A. Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial Dysfunction in Diabetes. *Acta Med Okayama.* 2016;70(3).
26. Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis.* 62(3):1403-16.
27. Kato T. Neurobiological basis of bipolar disorder: Mitochondrial dysfunction hypothesis and beyond. *Schizophr Res.* 1 sept 2017;187:62-6.
28. Xu H, Yang F. The interplay of dopamine metabolism abnormalities and mitochondrial defects in the pathogenesis of schizophrenia. *Transl Psychiatry.* 7 nov 2022;12(1):1-13.
29. Bansal Y, Kuhad A. Mitochondrial Dysfunction in Depression. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(6):610-8.
30. Bose A, Beal MF. Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2016;139(S1):216-31.
31. Vásquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, Parra V, Hill JA, Rothermel BA, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease. *J Physiol.* 2016;594(3):509-25.
32. Dabravolski SA, Nikiforov NG, Eid AH, Nedosugova LV, Starodubova AV, Popkova TV, et al. Mitochondrial Dysfunction and Chronic Inflammation in Polycystic Ovary Syndrome. *Int J Mol Sci.* janv 2021;22(8):3923.
33. Luo Y, Ma J, Lu W. The Significance of Mitochondrial Dysfunction in Cancer. *Int J Mol Sci.* janv 2020;21(16):5598.
34. Bratic A, Larsson NG. The role of mitochondria in aging. *J Clin Invest.* 1 mars 2013;123(3):951-7.
35. Levoux J, Prola A, Lafuste P, Gervais M, Chevallier N, Koumaiha Z, et al. Platelets Facilitate the Wound-Healing Capability of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer and Metabolic Reprogramming. *Cell Metab.* 2 févr 2021;33(2):283-299.e9.
36. Péault B. La cellule souche mésenchymateuse, une cellule souche en quête d'identité. *médecine/sciences.* 1 mars 2011;27(3):227-8.

37. Pinto G, Saenz-de-Santa-Maria I, Chastagner P, Perthame E, Delmas C, Toulas C, et al. Patient-derived glioblastoma stem cells transfer mitochondria through tunneling nanotubes in tumor organoids. *Biochem J*. 8 janv 2021;478(1):21-39.
38. Perréard M, Florent R, Thorel L, Vincent A, Weiswald LB, Poulain L. Les organoïdes dérivés de tumeurs (ou tumoroides), des outils de choix pour la médecine de précision en oncologie. *médecine/sciences*. 1 nov 2022;38(11):888-95.
39. Définition neurone [Internet]. [cité 17 oct 2023]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Dictionnaire/N/neurone#:~:text=Cellule%20nerveuse.,entrent%20et%20sortent%20du%20cerveau>.
40. CEA. CEA/Institut de biologie François Jacob. CEA; 2021 [cité 17 oct 2023]. La coopération métabolique astrocytes-neurones façonne l'activité cérébrale. Disponible sur: <https://www.cea.fr/drf/francoisjacob/Pages/Actualites/Actus-scientifiques/2021/cooperation-metabolique-astrocytes-neurones-activite-cerveau.aspx>
41. Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*. juill 2016;535(7613):551-5.
42. Davis C ha O, Kim KY, Bushong EA, Mills EA, Boassa D, Shih T, et al. Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci*. juill 2014;111(26):9633-8.
43. Institut Pasteur [Internet]. 2019 [cité 10 avr 2024]. Lorsque la structure des « tunneling nanotubes » (TNT) remet en question le concept même de cellule. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/journal-recherche/actualites/lorsque-structure-tunneling-nanotubes-tnt-remet-question-concept-meme-cellule>
44. Sartori-Rupp A, Cordero Cervantes D, Pepe A, Gousset K, Delage E, Corroyer-Dulmont S, et al. Correlative cryo-electron microscopy reveals the structure of TNTs in neuronal cells. *Nat Commun*. 21 janv 2019;10(1):342.
45. Torralba D, Baixauli F, Sánchez-Madrid F. Mitochondria Know No Boundaries: Mechanisms and Functions of Intercellular Mitochondrial Transfer. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2016 [cité 3 août 2023];4. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2016.00107>
46. Definition of cytoskeleton - NCI Dictionary of Cancer Terms - NCI [Internet]. 2011 [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/cytoskeleton>
47. Microtubules, Filaments | Learn Science at Scitable [Internet]. [cité 17 avr 2024]. Disponible sur: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/microtubules-and-filaments-14052932/>
48. Vallabhaneni KC, Haller H, Dumler I. Vascular Smooth Muscle Cells Initiate Proliferation of Mesenchymal Stem Cells by Mitochondrial Transfer via Tunneling Nanotubes. *Stem Cells Dev*. 20 nov 2012;21(17):3104-13.
49. Zampieri LX, Silva-Almeida C, Rondeau JD, Sonveaux P. Mitochondrial Transfer in Cancer: A Comprehensive Review. *Int J Mol Sci*. janv 2021;22(6):3245.
50. Goodenough DA, Paul DL. Gap Junctions. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. juill 2009;1(1):a002576.

51. Li H, Wang C, He T, Zhao T, Chen Y ying, Shen Y liang, et al. Mitochondrial Transfer from Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells to Motor Neurons in Spinal Cord Injury Rats via Gap Junction. *Theranostics*. 17 mars 2019;9(7):2017-35.
52. Islam MN, Das SR, Emin MT, Wei M, Sun L, Westphalen K, et al. Mitochondrial transfer from bone-marrow-derived stromal cells to pulmonary alveoli protects against acute lung injury. *Nat Med*. mai 2012;18(5):759-65.
53. Liu D, Gao Y, Liu J, Huang Y, Yin J, Feng Y, et al. Intercellular mitochondrial transfer as a means of tissue revitalization. *Signal Transduct Target Ther*. 16 févr 2021;6(1):1-18.
54. Sun C, Liu X, Wang B, Wang Z, Liu Y, Di C, et al. Endocytosis-mediated mitochondrial transplantation: Transferring normal human astrocytic mitochondria into glioma cells rescues aerobic respiration and enhances radiosensitivity. *Theranostics*. 26 mai 2019;9(12):3595-607.
55. Hayashida K, Takegawa R, Shoaib M, Aoki T, Choudhary RC, Kuschner CE, et al. Mitochondrial transplantation therapy for ischemia reperfusion injury: a systematic review of animal and human studies. *J Transl Med*. 17 mai 2021;19(1):214.
56. Liu Q, Liu M, Yang T, Wang X, Cheng P, Zhou H. What can we do to optimize mitochondrial transplantation therapy for myocardial ischemia–reperfusion injury? *Mitochondrion*. 1 sept 2023;72:72-83.
57. Preble JM, Pacak CA, Kondo H, MacKay AA, Cowan DB, McCully JD. Rapid isolation and purification of mitochondria for transplantation by tissue dissociation and differential filtration. *J Vis Exp JoVE*. 6 sept 2014;(91):e51682.
58. Liao PC, Bergamini C, Fato R, Pon LA, Pallotti F. Isolation of mitochondria from cells and tissues. *Methods Cell Biol*. 2020;155:3-31.
59. Hayashida K, Takegawa R, Endo Y, Yin T, Choudhary RC, Aoki T, et al. Exogenous mitochondrial transplantation improves survival and neurological outcomes after resuscitation from cardiac arrest. *BMC Med*. 16 mars 2023;21(1):56.
60. Xia D, Liu Y, Wu P, Wei D. Current Advances of Mitochondrial Dysfunction and Cardiovascular Disease and Promising Therapeutic Strategies. *Am J Pathol*. 1 oct 2023;193(10):1485-500.
61. Masuzawa A, Black KM, Pacak CA, Ericsson M, Barnett RJ, Drumm C, et al. Transplantation of autologously derived mitochondria protects the heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol-Heart Circ Physiol*. avr 2013;304(7):H966-82.
62. Blitzer D, Guariento A, Doulamis IP, Shin B, Moskowitsova K, Barbieri GR, et al. Delayed Transplantation of Autologous Mitochondria for Cardioprotection in a Porcine Model. *Ann Thorac Surg*. 1 mars 2020;109(3):711-9.
63. Arai AE. Magnetic Resonance Imaging for Area at Risk, Myocardial Infarction, and Myocardial Salvage. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. sept 2011;16(3-4):313-20.
64. Guariento A, Piekarski BL, Doulamis IP, Blitzer D, Ferraro AM, Harrild DM, et al. Autologous mitochondrial transplantation for cardiogenic shock in pediatric patients following ischemia-reperfusion injury. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1 sept 2021;162(3):992-1001.
65. Lin MW, Fang SY, Hsu JYC, Huang CY, Lee PH, Huang CC, et al. Mitochondrial Transplantation Attenuates Neural Damage and Improves Locomotor Function After Traumatic

Spinal Cord Injury in Rats. *Front Neurosci* [Internet]. 2022 [cité 18 nov 2022];16. Disponible sur: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnins.2022.800883>

66. Nascimento-dos-Santos G, de-Souza-Ferreira E, Lani R, Faria CC, Araújo VG, Teixeira-Pinheiro LC, et al. Neuroprotection from optic nerve injury and modulation of oxidative metabolism by transplantation of active mitochondria to the retina. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis*. 1 mai 2020;1866(5):165686.
67. Moskowitsova K, Orfany A, Liu K, Ramirez-Barbieri G, Thedsanamoorthy JK, Yao R, et al. Mitochondrial transplantation enhances murine lung viability and recovery after ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol*. janv 2020;318(1):L78-88.
68. Patel DM, Shah J, Srivastava AS. Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells in Regenerative Medicine. *Stem Cells Int*. 19 mars 2013;2013:e496218.
69. Guo Y, Chi X, Wang Y, Heng BC, Wei Y, Zhang X, et al. Mitochondria transfer enhances proliferation, migration, and osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cell and promotes bone defect healing. *Stem Cell Res Ther*. 25 juin 2020;11(1):245.
70. Chang JC, Chang HS, Wu YC, Cheng WL, Lin TT, Chang HJ, et al. Mitochondrial transplantation regulates antitumour activity, chemoresistance and mitochondrial dynamics in breast cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 23 janv 2019;38(1):30.
71. Alexander JF, Sua AV, Arroyo LD, Ray PR, Wangzhou A, Heiß-Lückemann L, et al. Nasal administration of mitochondria reverses chemotherapy-induced cognitive deficits. *Theranostics*. 1 janv 2021;11(7):3109-30.
72. Chang JC, Liu KH, Li YC, Kou SJ, Wei YH, Chuang CS, et al. Functional Recovery of Human Cells Harboring the Mitochondrial DNA Mutation MERRF A8344G via Peptide-Mediated Mitochondrial Delivery. *Neurosignals*. 21 sept 2012;21(3-4):160-73.
73. Chang JC, Hoel F, Liu KH, Wei YH, Cheng FC, Kuo SJ, et al. Peptide-mediated delivery of donor mitochondria improves mitochondrial function and cell viability in human cybrid cells with the MELAS A3243G mutation. *Sci Rep*. 6 sept 2017;7(1):10710.
74. Larsson NG, Tulinius MH, Holme E, Oldfors A. Pathogenetic aspects of the A8344G mutation of mitochondrial DNA associated with MERRF syndrome and multiple symmetric lipomas. *Muscle Nerve Suppl*. 1995;3:S102-106.
75. Chiu GS, Maj MA, Rizvi S, Dantzer R, Vichaya EG, Laumet G, et al. Pifithrin- $\mu$  Prevents Cisplatin-Induced Chemobrain by Preserving Neuronal Mitochondrial Function. *Cancer Res*. 31 janv 2017;77(3):742-52.
76. Inserm [Internet]. [cité 12 mars 2024]. Atrophie de l'hippocampe : un marqueur prédictif de la maladie d'Alzheimer à utiliser avec précaution · Inserm, La science pour la santé. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/actualite/atrophie-de-lhippocampe-un-marqueur-predictif-de-la-maladie-dalzheimer-a-utiliser-avec-precaution/>
77. Liu K, Zhou Z, Pan M, Zhang L. Stem cell-derived mitochondria transplantation: A promising therapy for mitochondrial encephalomyopathy. *CNS Neurosci Ther*. 3 févr 2021;27(7):733-42.
78. Nascimento-Dos-Santos G, de-Souza-Ferreira E, Linden R, Galina A, Petrs-Silva H. Mitotherapy: Unraveling a Promising Treatment for Disorders of the Central Nervous System and Other Systemic Conditions. *Cells*. 20 juill 2021;10(7):1827.

79. Gonzalez Chapa JA, Barguil Macêdo M, Naddaf E, Saketkoo LA, Lood C, International Myositis Health and Research Collaborative Alliance (MIHRA) Mitochondria Scientific Working Group. Mitochondrial transfer and implications for muscle function in idiopathic inflammatory myopathies. *Clin Exp Rheumatol.* févr 2024;42(2):394-402.

## **TITRE**

### **APPROCHE THERAPEUTIQUE INNOVANTE : LE TRANSFERT DE MITOCHONDRIE**

Les mitochondries sont des organites responsables de multiples rôles métaboliques essentiels, comme la respiration cellulaire ou l'apoptose. Leur dysfonctionnement peut mener à de nombreux manques pour les cellules qui les contiennent. Récemment les chercheurs ont observé que certaines cellules ont la capacité de transmettre leurs mitochondries compétentes aux cellules en détresse. Des études ont été menées afin d'en étudier les processus et bénéfices, tous n'ont pas encore été découverts. Les mitochondries semblent pouvoir être transmises via divers mécanismes comme des nanotubes, des vésicules, par exocytose et endocytose. Parmi les bénéfices observés, on peut noter le rétablissement de voies métaboliques préalablement perturbées, l'augmentation de la survie des cellules saines, l'apoptose des cellules lésées nuisibles, l'amélioration des paramètres inflammatoires. De plus la transplantation de mitochondries isolées ne provoque pas de réactions immunitaires notables. Le transfert de mitochondries présente ainsi un espoir pour de nombreuses affections, notamment lors d'ischémies et lésions cardiaques, pulmonaires et neuronales. Il pourrait aussi améliorer les capacités des cellules souches, et diminuer la résistance aux traitements anti-cancéreux ainsi que leurs effets secondaires.

## **TITLE**

### **INNOVATIVE THERAPEUTIC APPROACH: MITOCHONDRIAL TRANSFER**

Mitochondria are organelles responsible for multiple essential metabolic roles, such as cellular respiration and apoptosis. Their dysfunction can lead to numerous deficiencies in the cells containing them. Recently, researchers have observed that certain cells have the ability to transfer their competent mitochondria to cells in distress. Studies have been carried out to investigate the processes and benefits, not all of which have yet been discovered. Mitochondria seem to be able to be transmitted via various mechanisms such as nanotubes, vesicles, exocytosis and endocytosis. Among the benefits observed are the restoration of previously disrupted metabolic pathways, increased survival of healthy cells, apoptosis of harmful cells and improved inflammatory parameters. Moreover, transplantation of isolated mitochondria does not provoke any noticeable immune reactions. Mitochondrial transfer thus offers hope for a wide range of conditions, including ischemia and damage to the heart, lungs and neurons. It could also improve stem cell capacity, and reduce resistance to anti-cancer treatments and their side effects.