



THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Recherche des mécanismes impliqués dans la fragmentation mitochondriale induite par un stress sublétal du réticulum endoplasmique

Dording, Claire

Award date:
2015

Awarding institution:
Universite de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**RECHERCHE DES MÉCANISMES IMPLIQUÉS DANS LA FRAGMENTATION
MITOCHONDRIALE INDUITE PAR UN STRESS SUBLÉTAL DU RÉTICULUM
ENDOPLASMIQUE**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Claire DORDING

Aout 2015

Université de Namur
FACULTE DES SCIENCES
Secrétariat du Département de Biologie
Rue de Bruxelles 61 - 5000 NAMUR
Téléphone: + 32(0)81.72.44.18 - Téléfax: + 32(0)81.72.44.20
E-mail: joelle.jonet@unamur.be - <http://www.unamur.be>

Recherche des mécanismes impliqués dans la fragmentation mitochondriale induite par un stress sublétal du réticulum endoplasmique

DORDING Claire

Résumé

Il est connu depuis longtemps que le réseau mitochondrial est constamment soumis à des événements de fusion et de fission qui sont extrêmement importants pour assurer la mobilité, la morphologie et les fonctions des mitochondries dans les cellules eucaryotes. Dans les cellules de mammifères, la fusion mitochondriale est principalement régulée par 3 GTPases (Mfn1, Mfn2 et Opa1) tandis que la fission mitochondriale fait intervenir Drp1 cytosolique et hFis1, Mff, MiD49 et MiD51 qui sont des petites protéines localisées à la membrane externe des mitochondries et qui servent de protéines de recrutement pour Drp1. Des recherches préliminaires à ce travail menées au laboratoire URBC-NARILIS sur des cellules HepG2 ont montré qu'un stress sublétal du réticulum endoplasmique, déclenché par la bréfeldine A, induit une fragmentation du réseau mitochondrial associée à une augmentation de l'expression de hFis1. En se basant sur ces résultats, les objectifs de ce mémoire étaient de tenter de caractériser les mécanismes impliqués dans la fission mitochondriale et l'induction de l'expression de hFis1 dans des conditions de stress sublétal du RE.

Dans un premier temps nous avons tenté de développer un nouveau modèle *in vitro* de stress sublétal du RE en exposant les cellules au glutamate, afin d'étudier la régulation transcriptionnelle de hFis1. N'ayant pas réussi à atteindre cet objectif, nous avons tenté de rechercher les mécanismes moléculaires susceptibles d'être responsables de la fragmentation mitochondriale dans les cellules HepG2 en réponse à un stress du RE initié par la bréfeldine A : 1) en analysant l'expression d'autres facteurs protéiques impliqués dans la fission mitochondriale (Mff, MiD49 et MiD51) dans des fractions mitochondriales (M) obtenues par centrifugations, 2) en dosant la concentration en cholestérol dans ces fractions et 3) en analysant le rôle éventuel de la c-Jun N-terminal kinase dans les changements morphologiques des mitochondries observés lors d'un stress sublétal du RE.

Sur base des résultats obtenus, nous montrons que l'inhibition de la kinase dans les cellules HepG2 incubées en présence de bréfeldine A minimise l'effet du stress du RE sur la fragmentation mitochondriale bien que les mécanismes moléculaires reliant l'activation de la kinase à la fragmentation de l'organe restent à identifier.

Mémoire de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Aout 2015

Promoteur et Co-promoteur : T. Arnould et P. Renard

Remerciements

Arrivée au terme de ce mémoire, je tiens à remercier les nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à son élaboration.

Je souhaite tout d'abord à remercier Martine Raes ainsi que tous les seniors de m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire.

Je tiens ensuite à exprimer un grand merci à mon promoteur, Thierry Arnould et à ma co-promotrice, Patricia Renard, pour leur disponibilité, leur encadrement, leurs encouragements, leurs conseils et critiques qui m'ont guidé tout au long du travail au laboratoire ainsi qu'au cours de la rédaction de ce manuscrit.

Je souhaite aussi remercier vivement Kayleen Vannuvel, ma tutrice, pour sa présence, son aide quotidienne, ses réponses à mes nombreuses questions, l'apprentissage des techniques et son soutien pendant les périodes de stress. Je sais que ce n'était pas facile de m'encadrer quand on se trouve dans la dernière ligne droite de sa thèse, mais merci à toi Kayleen d'avoir gardé ta bonne humeur au quotidien et de m'avoir encouragé à poursuivre mon travail lors des périodes difficiles.

Je tiens aussi à remercier les membres de l'équipe Dyso pour leurs remarques constructives lors des réunions, leur aide pour l'apprentissage de certaines techniques et leur soutien. Merci aussi au personnel technique de l'URBC, Antoine, Maude, Viviane, Martine, Guy, Marc pour leurs conseils, leur disponibilité, leur encadrement, leurs réponses à mes nombreuses questions et tout simplement pour leur immense gentillesse tout au long de ce mémoire.

Je remercie également Isabelle Hamer et Virginie Tevel pour leur aide en dernière minute dans la mise au point du protocole de fractionnement subcellulaire et leur soutien moral.

Je tiens aussi à remercier mes cinq « co-mémorants » pour cette année passée en leur compagnie gaie et chaleureuse, pour tous les bons moments que j'ai passé avec eux, les épisodes de folie générale (les sardines ☺) mais aussi pour leur soutien amical pendant les périodes plus difficiles (oui, oui on ne s'est pas toujours « gratté la rate ») . Un grand merci aussi aux autres copains de BBMC pour leur amitié et leurs encouragements.

Enfin je tiens particulièrement à remercier ma famille pour son soutien quotidien et ses encouragements innombrables tout au long de cette dernière année. Merci d'avoir toujours cru en moi, même quand moi-même, j'avais de grands doutes.

Liste des abréviations

23 kDa / RPL13A	Ribosomal protein L13A
ACTH	adrenocorticotrop hormone
AMPA	α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
ANT	Adenine nucleotid translocator
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor-1
AR	aspect ratio
Arf	ADP-ribosylation factor
ArfGAP	GTPase activating protein for Arf1
ARNO	ARF nucleotide-binding site opener
ASK1	apoptosis signal regulating kinase 1
ASR	activité spécifique relative
ATF4,5,6	activating transcription factor 4,5,6
ATGL	adipose triglyceride lipase
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer
Bap31	B-Cell Receptor-Associated Protein 31
Bax	Bcl-2 associated X protein
Bcl2	B-cell lymphoma 2
Bcl-XL	B cell lymphoma extra large
BFA	bréfeldine A
Bid	BH3 interacting-domain death agonist
BIG1,2	Bad In Glucose 1,2
Bim	bcl-2 interacting mediator of cell death
BiP /Grp78	binding immunoglobulin protein /glucose-regulated protein of 78 kDa
BSA	Bovine Serum Albumin
bZIP	basic leucine zipper
C/EBP	cAMP response element-binding transcription factor
CaM	calmodulin
CC1et CC2	coiled-coil region 1 and 2
CD95/Fas	cluster of differentiation 95
CGN	cis-Golgi network
CGS	chromogranins
CHOP-10/GADD153	transcription factor C/EBP homologous protein-10/ growth arrest and DNA damage-inducible 153
CMV	Cytomegalovirus
CNX	calnexine
(GRP170/ORP150)	
COP I et II	Coat protein complex I and II
CRE	cAMP-response element
CRT	calréticuline
Ct	cycle threshold
CTD	C-terminal domain
CYP11A1	cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
CYPD	cyclophiline D
DAG	diacylglycérol
DBD	DNA binding domain
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMSO	dimethyl sulfoxyde
DNA Poly	mitochondrial DNA polymerase γ

DR5	death receptor 5
DRE	DNA recognition element
Drp1	dynamamin-related protein 1
DTT	dithiotreitol
EDEM 1, 2	ER degradation enhancing α -mannosidase like protein 1,2
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EFA6	Exchange factor for Arf6
eIF2 α	eukaryotic translation initiation factor 2 α
ERAD	ER-associated degradation
ERES	ER exit sites, sites de sortie du RE
ERGIC	ER-Golgi intermediate compartment
ERMES	ER-mitochondria encounter complex
Ero1	ER oxidoreductin 1
ERp44, 57	endoplasmic reticulum protein 44,57
ETC	Electron Transport Chain
FA-CoA	Fatty-Acyl-Coenzyme A
FBX8	F-box protein 8
Fis1	mitochondrial fission 1
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FSH	follicule stimulating hormone
FTs	facteurs de transcription
GADD34	growth arrest and DNA damage-inducible 34
GAP	GTPase-activating protein
GBF1	Golgi-specific brefeldin A-resistance guanine nucleotide exchange factor 1
GD3	disialoganglioside 3
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GPxs	glutathion peroxidases
Grp75	glucose-regulated protein of 75 kDa
Grp94	glucose -regulated protein of 94 kDa, endoplasmine
GSH	glutathion
GTFs	general transcription factors
HATs	histone acétyltransférases
HCX	antiporteurs H ⁺ /Ca ²⁺
HDACs	histone déacétylases
HMG-CoA	3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HRP	Horseradish peroxydase
Hsp70	heat shock protein d'environ 70 kDa
HTH	helix-turn-helix
INF2	inverted formin 2
IP ₃ R	récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate
IRE1	inositol requiring kinase 1
IRES	internal ribosome entry sites
JIK	c-Jun-N-terminal inhibitory kinase
JNK	c-jun NH2-terminal kinase
LB	Leeman's Broth
LDH	Lactate dehydrogenase
LDL	low density lipoproteins
LDs	lipid droplets
LH	luteinizing hormone

MAMs	mitochondria-associated membranes
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein
MCU	mitochondrial calcium uniporter
Mdm10, 12, 34	Mitochondrial Distribution and Morphology 10, 12, 34
MEF2	myocyte enhancer factor 2
Mff	mitochondrial fission factor
Mfn1,2	mitofusin 1,2
miARNs	microARNs
MiD49/ MIEF2	mitochondrial dynamics protein of 49 kDa/ mitochondrial elongation factor 2
MiD51/ MIEF1	mitochondrial dynamics protein of 51 kDa/ mitochondrial elongation factor 1
MKK3,4	mitogen-activated protein kinase kinase 3,4
MLN64	metastatic lymph node protein 64
MME	membrane mitochondriale externe
MMI	membrane mitochondriale interne
Mmm1	Maintenance of Mitochondrial Morphology 1
MnSOD/SOD2	manganese superoxide dismutase
MPT	Mitochondrial permeability transition
MRP	mitochondrial RNA processing endoribonuclease
mtDNA	ADN mitochondrial
mTERF	mitochondrial transcription termination factor
NCLX	antiporteurs Na ⁺ /Ca ²⁺ /Li ⁺
NCX	échangeur Na ⁺ /Ca ²⁺
NMDAR	N-methyl-D-aspartate receptor
nNOS	neurone nitric oxide synthase
NOXA	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
NPC1,2	Niemann-Pick disease type C1,2 protein
Opa1	Optic atrophy 1
OST	oligosaccharyltransferase
p38MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase
PACS2	Phosphofurin Acidic Cluster Sorting Protein 2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PC	phosphatidylcholine
PDI	proteins disulfure isomerase
PERK	double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase
PIC	Pre-initiation complex
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PKA-R1 α	protein kinase A regulatory subunit I alpha
PKR	protein kinase-RNA regulated
PMCA	plasma membrane Ca ²⁺ -ATPase
PP2A	protein phosphatase 2A
PRR	pattern recognition receptor
PTP	permeability transition pore
Rbp	RNA B polymerase subunit
RIDD	regulated IRE1-dependent decay
RLU	Relative Light Units
RYRs	ryanodin receptors
S1P	secreted site 1 protease

S2P	site 2 protease
Sab/ SH3BP5	SH3 domain- binding protein 5
SDS	sodium dodecyl sulfate
SE	sterol ester
SEAP	Secreted embryonic alkaline phosphatase
SERCA 1-3	pompes Ca^{2+} /ATPases sarco-endoplasmiques 1-3
Sig1R	sigma-1 receptor
Smac/Diablo	second mitochondria-derived activator of caspases/direct <u>IAP</u> binding protein with low pI
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor receptors
SOD1	Superoxide dismutase 1
STAR	steroidogenesis acute regulatory protein
TAD	domaine de transactivation
TAG	triacylglycérols
TATA box	boîte TATA
TFAM	mitochondrial transcription factor A
TFB2	mitochondrial transcription factor B2
TFBS	transcription factor binding sites
TG	triglycerides
TGN	trans-Golgi network
TIM	translocase of the inner mitochondrial membrane
TLC	translocon
TOM	translocase of the outer membrane
TPR	tetratricopeptide repeat-like motif
TRAF2	tumor necrosis factor receptor-associated factor 2
TRPs	transient receptor potential channels
TSPO	Translocator protein/mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor
TSS	transcription start site
UPR	Unfolded Protein Response
VDAC	voltage-dependent channel
VOCC	Ca^{2+} -voltage-dependent channels
VSV	vesicular stomatitis virus
XBP1	X box-binding protein-1

Table des matières

Introduction.....	1
Partie I : Le réticulum endoplasmique	1
I.1. Structure et fonctions à l'état physiologique.....	1
I.1.1. Rôle du RE dans le métabolisme lipidique	1
I.1.2. Rôle du RE dans l'homéostasie calcique	1
I.1.3. Rôle du RE dans la N-glycosylation des protéines.....	2
I.1.4. Rôle du RE dans la synthèse et le repliement de protéines	2
I.2. Le stress du RE et la réponse UPR	3
I.2.1. Les différentes voies de signalisation de la voie UPR.....	4
I.2.2. Les causes et origines d'un stress du RE.....	5
I.2.2.A. Les causes physiologiques et pathologiques d'un stress du RE	5
I.2.2.B. Les inducteurs chimiques responsables du stress du RE	6
I.2.3. L'apoptose: une conséquence ultime du stress RE	8
Partie II: Les interactions du RE avec d'autres organites	10
II.1. Le trafic intracellulaire des protéines.....	10
II.2. Les interactions avec le réseau mitochondrial.....	10
II.2.1. L'ancrage entre les deux organites.....	10
II.2.2. Importance fonctionnelle de cette interaction physique entre le RE et les mitochondries	11
Partie III : Les mitochondries	12
III.1. Généralités sur la fonction mitochondriale.....	12
III.2. La dynamique mitochondriale.....	14
III.2.1. La fusion mitochondriale	15
III.2.2. La fission mitochondriale	15
Partie IV : Le cholestérol.....	17
IV.1. Généralités	17
IV.2. Le cholestérol et les mitochondries	17
Partie V : La régulation transcriptionnelle dans les cellules eucaryotes	19
V.1. La machinerie basale de transcription et la transcription.....	19
V.2. La régulation transcriptionnelle	19
V.2.1. Les éléments cis-régulateurs.....	19
V.2.2. Les éléments trans-régulateurs.....	20
V.2.3. Les facteurs épigénétiques.....	20

Objectifs et modèle cellulaire	22
Matériel et méthodes.....	24
II.1 Culture et stimulation cellulaires:	23
II.2. Analyse de la morphologie mitochondriale par la sonde MitoTracker green et la microscopie confocale.	24
II.2.1. Principe:.....	24
II.2.2. Méthode.....	24
II.3. Test de cytotoxicité : mesure de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH)	25
II.3.1. Principe:.....	25
II.3.2. Méthode:.....	25
II.4. Western Blot:.....	26
II.4.1. Principe:.....	26
II.4.2. Obtention et dosage de protéines :	26
II.4.3. Séparation des protéines sur gel par électrophorèse	26
II.4.4. Transfert et blocage	26
II.4.5. Marquage des protéines avec les anticorps.....	27
II.4.6. Mesure de l'intensité des signaux de fluorescence correspondant aux différentes protéines d'intérêt sur la membrane	27
II.5. Extraction d'ARN total, reverse transcription et PCR en temps réel.....	27
II.5.1. Principe :.....	27
II.5.2. Extraction des ARNs	28
II.5.3.Reverse Transcription des ARNm en ADNc :.....	28
II.5.4. PCR quantitative en temps réel.....	28
II.6. Transfection transitoire et mesure de l'activation du promoteur de hFis1 à l'aide d'un gène rapporteur	29
II.6.1. Principe.....	29
II.6.2. Transfection transitoire des cellules HepG2	29
II.6.3. Dosage de l'activité de la « Gaussia luciférase » et de la « SEAP »	30
II.7. Construction du plasmide pGL4.10-Fis1prom	30
II.7.1. Principe (voir Figure 3)	30
II.7.2. Restriction	31
II.7.3. Séparation des produits de restriction sur gel d'agarose 0,7 %.....	31
II.7.4. Purification des bandes excisées du gel (clean-up) par le kit Wizard SV gel et PCR clean-up system	31
II.7.5. Ligation.....	31

II.7.6. Transformation de bactéries DH10B (<i>E.coli</i>) par la méthode du choc thermique	32
II.7.7. PCR sur colonies	32
II.7.8. Mini-culture et Mini-préparation	32
II.7.9. Maxi-culture et Maxi-préparation.....	33
II.8. Dosage des activités luciférases de Firefly et de Renilla	33
II.8.1. Principe.....	33
II.8.2. Méthode.....	34
II.9. Préparation d'une fraction cellulaire enrichie en mitochondries par centrifugations différentielle et isopycniqne	34
II.9.1. Principe.....	34
II.9.2. Méthode: Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle	34
II.9.3. Centrifugation sur gradient de Nycodenz	35
II.10. Dosages d'activité d'enzymes marqueurs.....	35
II.10.1 Principe.....	35
II.10.2. Dosage de la cytochrome C oxydase (enzyme marqueur des mitochondries)	36
II.10.3. Dosage de la β -galactosidase (enzyme marqueur des lysosomes)	36
II.10.4. Dosage de la phosphodiesterase alcaline (enzyme marqueur de la membrane plasmique).....	36
II.10.5. Dosage de l' α -glucosidase alcaline (enzyme marqueur du réticulum endoplasmique)	37
II.10.6. Dosage du cholestérol par le kit Amplex Red cholesterol assay (Invitrogen)	37
II.11. Quantification de la production d' $O_2^{(-)}$ mitochondrial par cytométrie de flux	37
Résultats	39
III.1. Tentative de mise au point d'un modèle permettant d'étudier un stress sublétal du RE en réponse à une stimulation par le glutamate.	39
III.1.1. Evaluation de la mortalité des cellules HepG2 incubées en présence de glutamate ou de bréfeldine A.	39
III.1.2. Etude des effets de la bréfeldine A et du glutamate sur l'activité du promoteur de Fis1 en système rapporteur.....	40
III.1.3. Optimisation des conditions de stimulation des cellules HepG2 avec le glutamate	41
III.1.4. Effet du glutamate sur l'expression endogène de hFis1	42
III.2. Etude de l'effet de la BFA sur l'activité du promoteur putatif de Fis1.....	43
III.3. Construction d'un nouveau plasmide rapporteur.....	44
III.3.1 Effet de la bréfeldine A (BFA) sur l'activité du promoteur de hFis1 contrôlant le gène rapporteur Firefly luciférase.....	44
III.3.2. Effet d'un traitement à la bréfeldine A sur l'abondance du transcrit du gène rapporteur (luciférase de Firefly).....	45

III.4. Effets d'un stress du RE sublétal sur l'expression de facteurs impliqués dans la fission mitochondriale (Mff, MiD49 et MiD51)	46
III.4.1. Isolement et purification des mitochondries de cellules HepG2 par fractionnement subcellulaire	47
III.4.2. Analyse de l'abondance des effecteurs de la fission mitochondriale dans les mitochondries de cellules HepG2 exposées à un stress sublétal du RE induit par la BFA.	48
III.5. Effets d'un stress du RE sublétal sur le contenu mitochondrial en cholestérol.....	49
III.6. La protéine JNK comme lien potentiel entre le stress du RE et la fragmentation mitochondriale	52
III.6.1. Effets d'une stimulation à la BFA sur la phosphorylation de la protéine JNK.....	52
III.6.2. Effets d'une inhibition de la JNK par le SP600125 sur la fragmentation du réseau mitochondrial et le dysfonctionnement mitochondrial provoqué par une stimulation à la BFA	52
Conclusion	54
Bibliographie.....	64
Annexe.....	83

Introduction

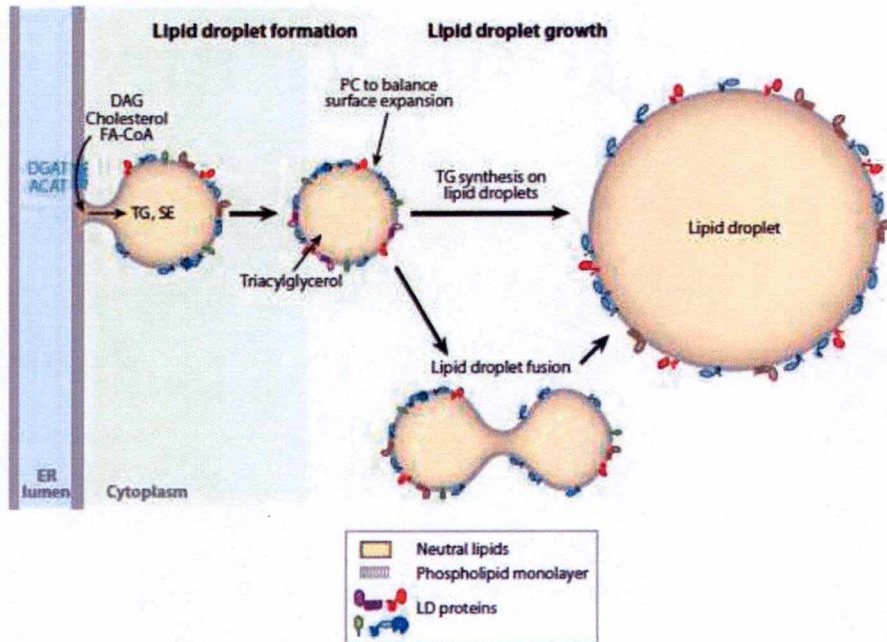


Figure 1 : Schéma expliquant la formation et la croissance de gouttelettes lipidiques. Ces gouttelettes sont formées à partir du RE et peuvent rester attachées ou se détacher de l'organite. Une augmentation de leur taille se fait par une synthèse de lipides neutres, catalysée par les enzymes ACAT ou DGAT ou la fusion entre des gouttelettes existantes. Abréviations : DAG : diacylglycérol, FA-CoA : Fatty-Acyl-Coenzyme A, SE : sterol ester, PC : phosphatidylcholine, TG : triglycerides, LD : lipid droplet (Walther and Farese, 2012)

I. Introduction

L'objectif principal de ce travail étant d'étudier les effets d'un stress du réticulum endoplasmique (RE) sur la population mitochondriale, nous allons commencer cette introduction en décrivant rapidement les deux organites d'intérêt dans ce travail.

Partie I : Le réticulum endoplasmique

I.1. Structure et fonctions à l'état physiologique

Le réticulum endoplasmique (RE) se présente comme un réseau membranaire dynamique formant des structures lamellaires et tubulaires (Borgese et al., 2006, Voeltz et al., 2002). Bien que les membranes de cet organite soient continues, le RE peut être subdivisé en plusieurs sous-domaines comme, par exemple, l'enveloppe nucléaire, le réticulum rugueux et lisse, des régions de jonctions entre le RE et d'autres organites comme les mitochondries et des sites de sortie (ERES : ER exit sites) où des vésicules de transport COP II bourgeonnent pour être acheminées vers l'appareil de Golgi (Voeltz et al., 2002).

I.1.1. Rôle du RE dans le métabolisme lipidique

Ce rôle est majoritairement rempli par le réticulum lisse (Gorlach et al., 2006). Plusieurs types cellulaires, principalement les adipocytes et les hépatocytes, possèdent des gouttelettes lipidiques (LDs : lipid droplets) au sein de leur cytoplasme. Ces gouttelettes sont composées de lipides neutres, de triacylglycérols (TAG) et d'esters de stérols (SE) entourés d'une monocouche de phospholipides (Walther and Farese, 2012, Fujimoto and Parton, 2011, Markgraf et al., 2014). Les gouttelettes lipidiques peuvent augmenter leur taille suite à l'estérification d'acides gras avec le diacylglycérol (DAG) mais peuvent également être totalement hydrolysées en glycérol et en acides gras par la lipolyse ; les acides gras pourront être β -oxydés dans la mitochondrie pour contribuer à la production d'ATP (Markgraf et al., 2014, Zechner et al., 2009). Le RE joue un rôle important dans le métabolisme de ces gouttelettes lipidiques compte tenu du fait que plusieurs enzymes de la synthèse lipidique sont localisées dans le réticulum lisse (Jin et al., 2014b). De plus, il a été proposé que les gouttelettes lipidiques pourraient provenir d'une accumulation de lipides neutres entre les deux feuillettes de la membrane du RE qui pourraient ensuite éventuellement se détacher du RE (Jacquier et al., 2011)(**Figure 1**). Certaines enzymes comme, par exemple, la lipase ATGL (adipose triglyceride lipase), sont transférées du RE vers les gouttelettes lipidiques. Le transport et la régulation de la morphologie des gouttelettes lipidiques sont assurés par le système Arf1/COPI, connu pour son rôle dans le trafic intracellulaire rétrograde du Golgi vers le RE (Wilfling et al., 2014). Ces auteurs ont d'ailleurs montré que le complexe Arf1/COPI augmente le bourgeonnement de nano-LDs à partir des LDs existants, ce qui change la composition membranaire des LDs en phospholipides et augmente la tension de surface des LDs permettant la formation de ponts entre le RE et les LDs pour importer les protéines associées aux LDs (Wilfling et al., 2014).

I.1.2. Rôle du RE dans l'homéostasie calcique

Le RE possède à sa surface membranaire plusieurs canaux calciques comme les récepteurs à l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP_3R) (Serysheva, 2014) et les récepteurs ryanodine (RYRs) (Lanner et al., 2010) qui contrôlent la sortie des ions Ca^{2+} dans le cytosol. Le maintien de l'homéostasie calcique par le RE est alors assuré par des pompes Ca^{2+} /ATPases sarco-endoplasmiques (SERCA 1-3) (Kiviluoto et al., 2013, Vandecaetsbeek et al., 2011) qui transportent le calcium du cytosol vers la lumière du RE. D'autre part, il existe aussi des

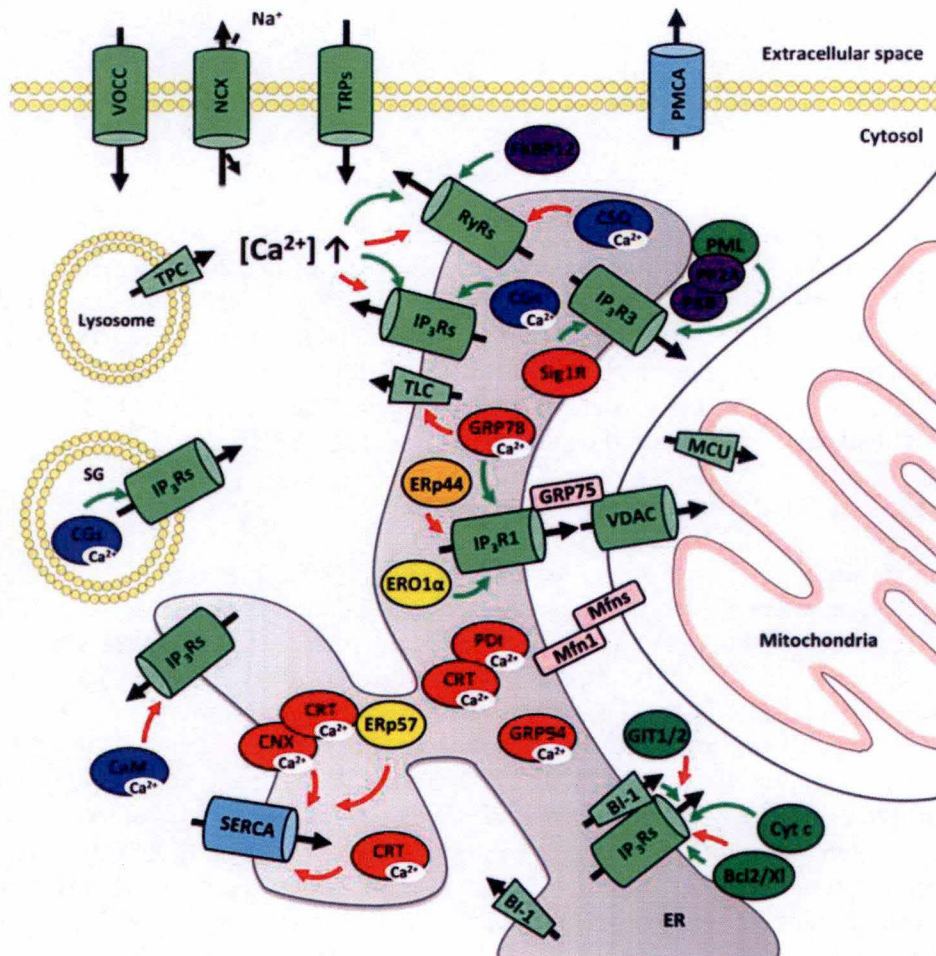


Figure 2 : Schéma montrant les protéines impliquées dans l'homéostasie et les flux calciques au niveau du RE. Code couleur : les canaux Ca^{2+} et transporteurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ sont colorés en vert clair, les pompes calciques sont en bleu clair, les protéines liant le calcium sont en bleu foncé, les chaperonnes sont en rouge, les oxido-réductases sont en jaune, les thioréductases sont en orange, les protéines pro- et anti-apoptotiques sont en vert foncé, des protéines régulatrices sont en violet et des protéines de liaison sont en rose. Les flux de calcium sont représentés par des flèches noires; les flèches vertes et rouges symbolisent respectivement des actions régulatrices activatrices et inhibitrices. Abréviations : BI-1 : Bax inhibitor 1, Bcl2/XI : B-cell lymphoma 2, CaM : calmodulin, CGS: chromogranins, CNX : calnexin, CRT : calreticulin, cyt c : cytochrome c, ERp44 : endoplasmic reticulum protein 44, ERp57 : endoplasmic reticulum protein 57, ERO1 α : endoplasmic reticulum oxydoreductin 1 α , GIT1/2 : Arf GTP-ase activating protein 1 and 2, Grp75 : glucose-regulated protein of 75 kDa, Grp78/BiP : glucose-regulated protein of 78 kDa, Grp94 : glucose -regulated protein of 94 kDa , MCU : mitochondrial calcium uniporter, Mfn1 : mitofusin 1, NCX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, PDI : protein disulfide isomerase, PMCA: plasma membrane Ca^{2+} -ATPase, PP2A : protein phosphatase 2A, RyRs : ryanodine receptor, SERCA : sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase , SG : stress granule, Sig1R : sigma-1 receptor, TLC : translocon, TPC : two-pore channel, TRPs : transient receptor potential channels, VDAC : voltage-dependent channel, VOCC : Ca^{2+} -voltage-dependent channels (Kiviluoto et al., 2013).

I. Introduction

« canaux de fuite ». En effet, le calcium peut aussi être libéré du RE par un pore aqueux qui fait partie du translocon responsable de l'importation des protéines néosynthétisées (Sec61) (Gorlach et al., 2006, Schauble et al., 2012). Ce pore est normalement obturé par le ribosome du côté cytosolique et la chaperonne BiP/GRP78 du côté luminal. La concentration intraluminaire en calcium est tamponnée par la liaison des ions à deux protéines : la calséquestrine et la calréticuline (Berridge, 2002) (**Figure 2**). En effet, le maintien de la forte concentration calcique à l'intérieur du RE (100-800 μM) (Kiviluoto et al., 2013) est essentielle pour assurer l'acquisition de la bonne conformation des protéines synthétisés au sein du RE. Ceci s'explique par le fait que le RE contient de nombreuses chaperonnes Ca^{2+} -sensibles comme BiP/GRP78 (binding immunoglobulin protein/78kDa glucose-regulated protein), GRP94 (endoplasmine), la calnexine, GRP170/ORP150 (170 kDa glucose-regulated protein/150 kDa oxygen-regulated protein) ou ERp57 (ER-regulated protein of 57 kDa) (Gorlach et al., 2006, Ma and Hendershot, 2004). Une déplétion du RE en calcium peut donc résulter en une accumulation de protéines mal repliées entraînant un stress du RE et la réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui sera développée en détails au point 1.2. (Gorlach et al., 2006).

I.1.3. Rôle du RE dans la N-glycosylation des protéines

Le RE est également responsable de la première étape de la synthèse des glycoprotéines, à savoir l'ajout du bloc de base de 14 sucres à l'extrémité N-terminale des glycoprotéines. Ces chaînes oligosaccharidiques subiront ensuite un processus de maturation tout au long de leur trafic dans l'appareil de Golgi. Dans le RE, ces structures oligosaccharidiques jouent un rôle dans la conformation, l'assemblage et l'oligomérisation des protéines, dans le contrôle de qualité et leur adressage aux différents compartiments cellulaires. Les glycans ajoutés au niveau du RE (les « core » glycans) sont homogènes pour toutes les glycoprotéines, contrairement aux formes matures qui diffèrent au niveau de leur composition et branchements selon les glycoprotéines, les types cellulaires, les tissus et les espèces (Helenius and Aebi, 2004) (**Figure 3**).

Par l'action de différentes monosaccharyltransférases, l'unité oligosaccharidique de base est ajoutée sur un précurseur lipidique (dolichylpyrophosphate) lié à la membrane du RE. Une fois assemblée et transloquée à l'intérieur du RE, l'unité de glycans est transférée de manière co-translationnelle à une chaîne polypeptidique naissante moyennant une oligosaccharyltransférase (OST). Les glucoses et mannoses terminaux sont ensuite enlevés par des glucosidases et mannosidases du RE (Helenius and Aebi, 2004) (**Figure 4**).

Dans la lumière du RE, ces chaînes N-glycosidiques sont impliquées dans le repliement correct des protéines. Ceci est montré par le fait qu'en cas d'inhibition de la N-glycosylation par la tunicamycine (Olden et al., 1982), des protéines mal repliées, agrégées et non fonctionnelles s'accumulent dans le RE, ce qui entraîne des réponses de stress du RE (voir paragraphe 1.2.). En effet les chaînes oligosaccharidiques améliorent la compaction de la protéine (Wormald and Dwek, 1999) et permettent l'entrée des glycoprotéines dans le cycle de repliement protéique calnexine-calréticuline (détaillé dans le paragraphe suivant).

I.1.4. Rôle du RE dans la synthèse et le repliement de protéines

La fonction principale du réticulum endoplasmique est notamment le repliement des chaînes protéiques afin que ces protéines deviennent fonctionnelles et puissent entamer leur chemin vers la membrane plasmique ou être adressées aux membranes d'autres organites.

Dans le cytoplasme, le repliement des chaînes protéiques se limite à des interactions hydrophobes, des liaisons ioniques et la formation de ponts hydrogène (Chakrabarti et al., 2011). Afin de trouver leur conformation tridimensionnelle stabilisée par des ponts disulfures,

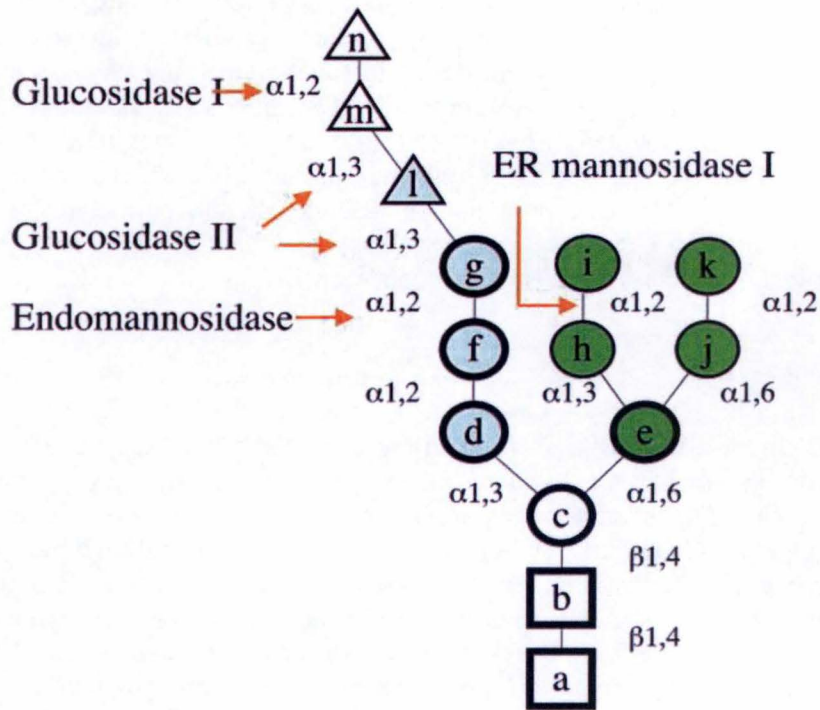


Figure 3 : Structure de l'unité oligosaccharidique de base. Cette unité de 14 sucres (triangles: glucose, cercles: mannose et carrés: 2 N-acétylglucosamines) est transférée sur la protéine et attachée par une liaison N-glycosidique sur la chaîne latérale d'une asparagine qui se trouve dans un motif consensus Asn-X-Ser/Thr. Il y a 3 branches (A, B, C) et chaque saccharide est désigné par une lettre. Les sucres a-g sont ajoutés sur la face cytosolique du RE, le reste est ajouté dans la lumière du RE. Les sucres (bleus) sont impliqués dans l'interaction avec la calnexine et la calréticuline. Les sucres (verts) sont supposés interagir avec EDEM (ER degradation enhancer α -mannosidase like protein). (Helenius and Aebi, 2004).

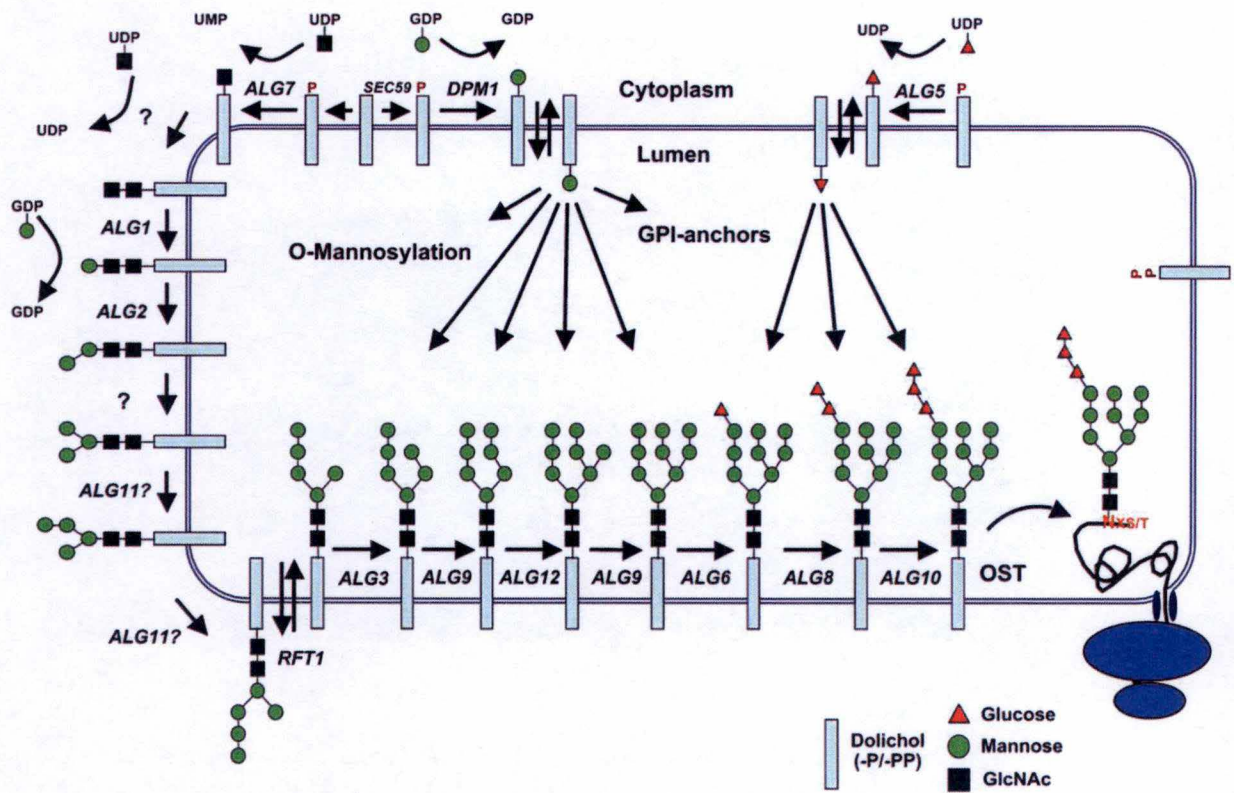


Figure 4 : La synthèse des N-glycans et leur transfert sur la protéine réceptrice. La synthèse commence sur la face cytosolique du RE par l'addition successive des sucres sur le précurseur lipidique. Après l'ajout de 7 groupements, l'oligosaccharide est transféré sur la face intraluminale du RE et 7 autres sucres sont ajoutés. Il s'ensuit le transfert de la chaîne oligosaccharidique, catalysé par l'oligosaccharyltransférase, sur une asparagine d'une protéine néo-synthétisée (Helenius and Aebi, 2004).

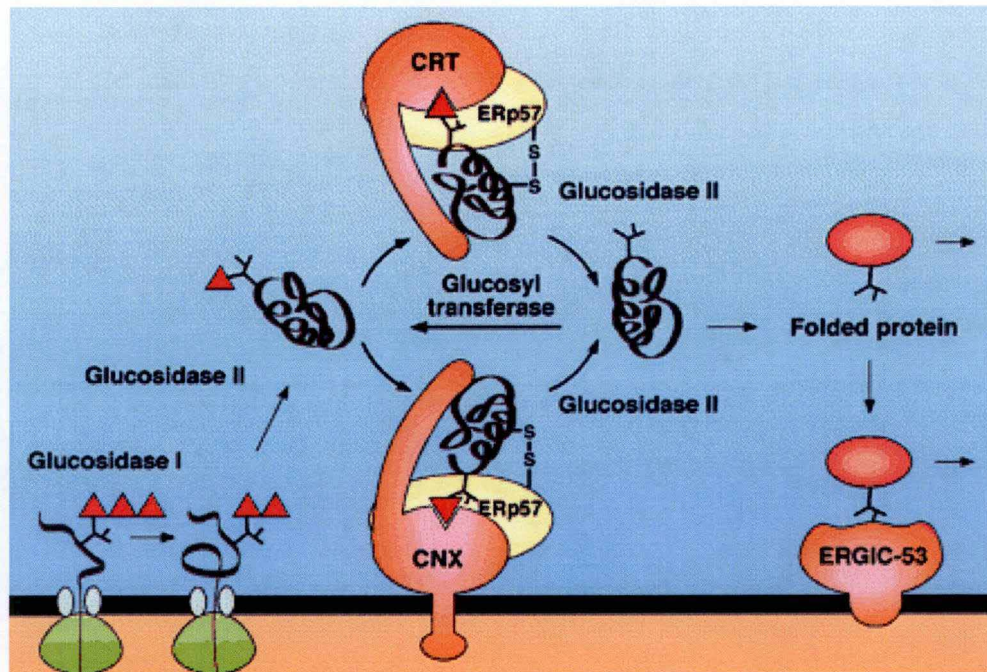


Figure 5 : Le cycle calnexine/calréticuline. Après l'addition de l'unité oligosaccharidique de base à la protéine, la glucosidase I enlève un glucose terminal (n) suivi par la glucosidase II qui clive le glucose suivant (m). Cet oligosaccharide monoglucosylé permet à la protéine d'interagir avec la calnexine (CNX) et la calréticuline (CRT). Ces chaperonnes sont associées à ERp57, une oxido-réductase qui catalyse la formation de ponts disulfures afin de donner la conformation finale à la protéine. Le cycle est terminé par la glucosidase II qui enlève le dernier glucose (l) et libère alors la protéine des chaperonnes. La protéine peut alors prendre 3 voies. Si elle est correctement repliée, elle peut sortir du RE (aidée par les mannose lectines ERGIC-53, VIP36, et VIPL). Si elle est mal repliée, elle peut être re-glucosylée par la glucostransférase et faire un nouveau passage dans le cycle calnexin/calréticuline. Finalement, si la protéine reste mal repliée après plusieurs cycles, elle est reconnue par la RE-mannosidase I qui enlève un mannose (i), ce qui permet alors la reconnaissance de la glycoprotéine par les lectines EDEM et sa dégradation par la voie ERAD. Abréviations : VIP36 : vesicular integral protein 36, VIPL : VIP36-like protein, ERGIC-53: ER-Golgi intermediate compartment protein of 53 kDa, ERp57: ER protein 57, EDEM: ER degradation enhancing α -mannosidase like protein (Helenius and Aebi, 2004).

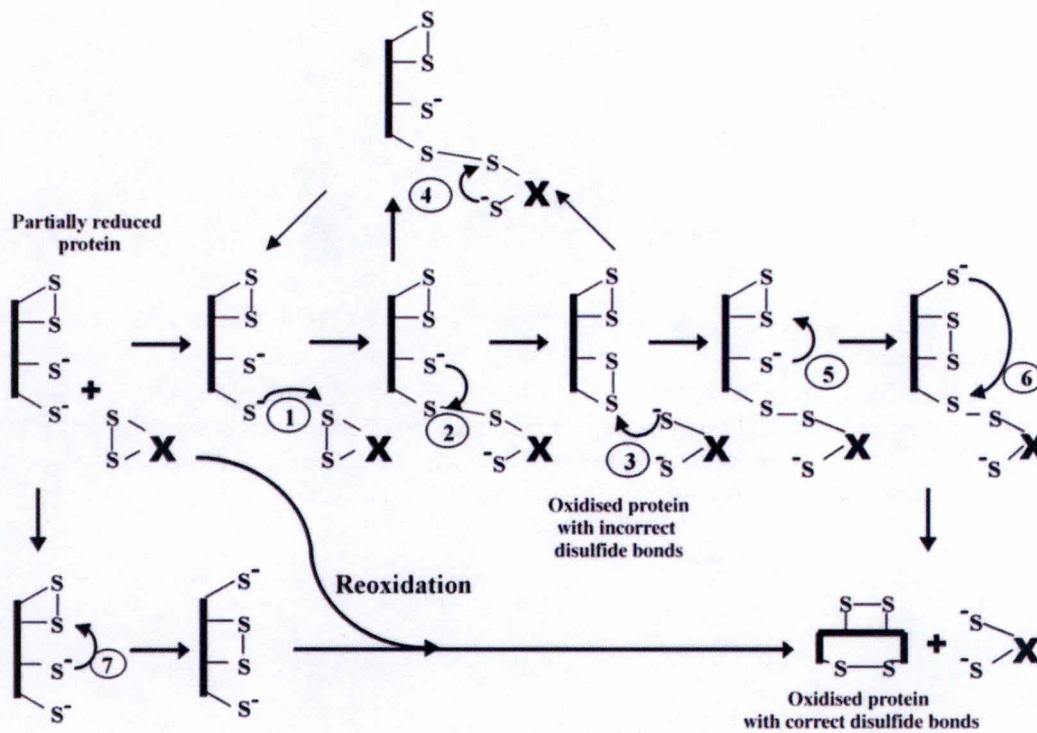


Figure 6 : La formation de ponts disulfure dans le cycle calnexine/calréticuline.

La voie de l'oxydation a pour but d'oxyder les résidus cystéine des polypeptides. Elle commence par une attaque nucléophile d'un groupement thiol du substrat sur une liaison disulfure de la chaperonne, liant par la suite le substrat et l'enzyme (1). Cette liaison transitoire est alors attaquée par un autre groupement thiol du substrat (2). La deuxième attaque génère alors une liaison disulfure intramoléculeaire et libère l'enzyme.

Les protéines peuvent aussi subir des réductions de leurs ponts disulfures. Ce processus est nécessaire pour permettre la relocalisation d'une protéine mal repliée dans le cytosol afin de la soumettre à la voie de dégradation ERAD. La réduction des ponts disulfure se fait par une attaque nucléophile d'un groupement thiol d'une enzyme sur un pont disulfure existant (3). Il se forme alors une liaison intermédiaire entre l'enzyme et la protéine ; cette liaison sera rompue lors d'une deuxième attaque nucléophile d'un thiol de l'enzyme sur la liaison intermédiaire (4). Par cette réaction, une liaison disulfure au sein de l'enzyme sera alors formée et les 2 groupements thiol de la protéine seront réduits.

Cependant, les liaisons formées ne sont pas toujours correctement localisées, ce qui nécessite une isomérisation des liaisons disulfure nouvellement formées. Cette réaction, catalysée par des protéines disulfure isomérases (PDI) commence par une attaque nucléophile d'un groupement thiol de l'enzyme sur une liaison disulfure déjà existante dans la protéine substrat (3). Il se forme alors une liaison mixte entre le substrat et l'enzyme ainsi qu'un groupement thiol nucléophile dans la protéine substrat. Ce thiol nucléophile est alors capable d'attaquer une autre liaison disulfure intramoléculeaire (5). Finalement, la liaison mixte entre enzyme et protéine sera attaquée par un thiol nucléophile du substrat, libérant de nouveau l'enzyme et générant une nouvelle liaison disulfure au sein de la protéine (6).

Il existe aussi une voie alternative dans laquelle un thiol de la protéine attaque une liaison disulfure intramoléculeaire (7) ce qui génère alors une nouvelle liaison. Les thiols libres générés par cette réaction sont alors oxydés par une chaperonne selon le processus détaillé précédemment (Gorlach et al., 2006).

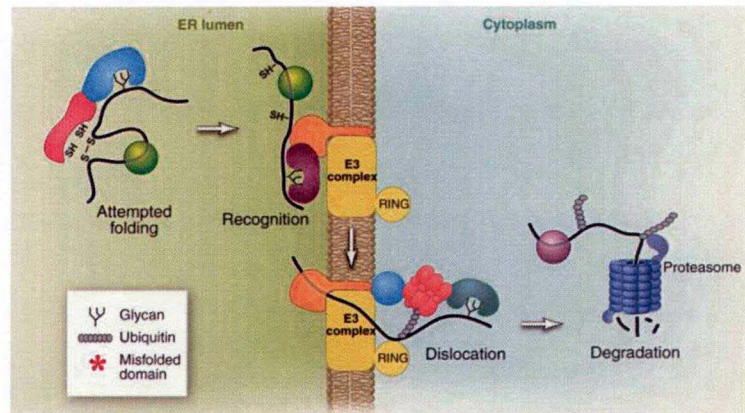


Figure 7 : La voie de dégradation ERAD. Après un échec du repliement de la glycoprotéine, elle est reconnue par le complexe transmembranaire E3. Ce complexe induit la translocation de la protéine dans le cytosol et son ubiquitinylation (par le domaine catalytique RING). La protéine ubiquitinyllée est par la suite dégradée par le protéasome (Smith et al., 2011).

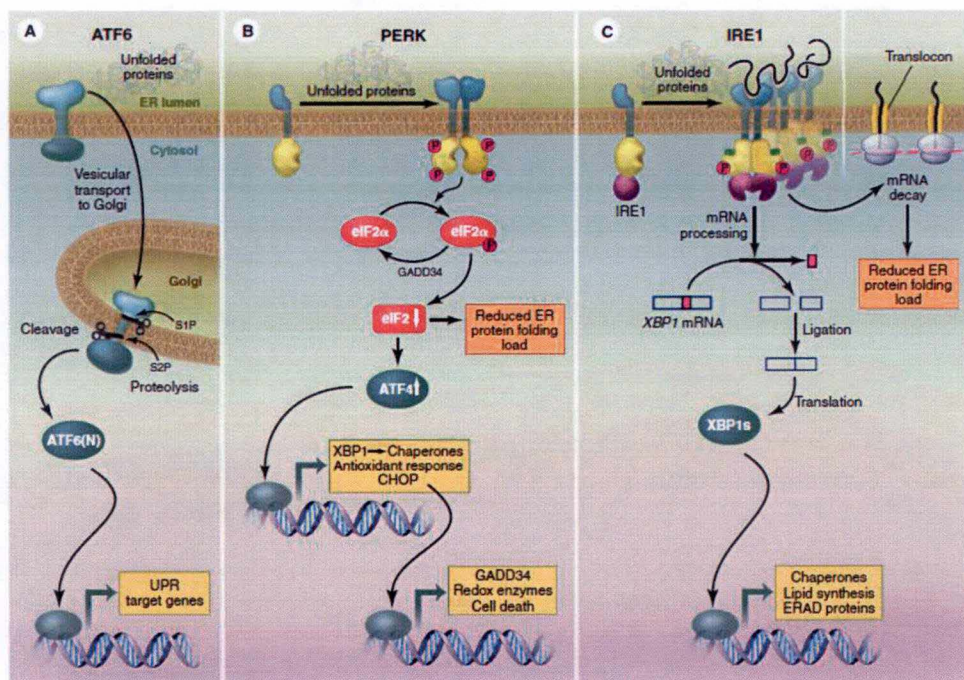


Figure 8 : Les trois branches de la réponse UPR (ATF6, PERK, IRE1). Ces trois récepteurs sont activés par la dissociation de la chaperonne BiP et la transduction de leur signal permet l'activation de facteurs de transcription de type « bZIP » (basic leucine zipper) qui régulent la transcription de gènes destinés à rétablir l'homéostasie cellulaire. (A) La voie ATF6 utilise un processus de protéolyse régulée pour activer le facteur de transcription ATF6N. (B) PERK agit sur le contrôle de la traduction pour diminuer la charge protéique du RE. Cependant la traduction d'ATF4 n'est pas entravée vu que son ARNm possède un site IRES dans son extrémité 5'-UTR. (C) La voie IRE1 régule l'activation de XBP1 suite à un épissage alternatif de son ARNm. Parallèlement à l'activation de la transcription de gènes impliqués dans la réponse UPR, les voies PERK et IRE1 diminuent aussi la charge protéique du RE en inhibant la traduction ou en clivant des ARNm de façon non spécifique (Walter and Ron, 2011).

I. Introduction

les chaînes protéiques nouvellement synthétisées sont importées dans le RE à travers un complexe protéique comprenant Sec61 α,β,γ et des protéines auxiliaires comme TRAM (translocating chain-associating membrane protein) (Dudek et al., 2014). Au sein du RE, les protéines N-glycosylées sont modifiées par les glucosidases I et II générant des glycoprotéines reconnues par des lectines comme la calnexine et la calréticuline. Ces deux chaperonnes, associées à l'oxydo-réductase ERp57 (appartenant à la famille des protéines PDI (protein disulfide isomerase), sont les acteurs principaux de la formation des ponts disulfures stabilisant les glycoprotéines (Gorlach et al., 2006). La calnexine est une protéine membranaire de type I possédant un domaine globulaire de lectine qui lie le glucose N-terminal de la glycoprotéine et une boucle, appelée le domaine P, qui est plutôt impliqué dans des interactions « protéine-protéine » avec la glycoprotéine substrat ou ERp57. La calréticuline est une protéine soluble ayant des domaines lectine et P semblables à la calnexine (Schrag et al., 2003, Schrag et al., 2001) (**Figure 5**). Le cycle calnexine-calréticuline régule alors la formation des ponts disulfures par oxydation, réduction ou isomérisation (**Figure 6**). Ce cycle de repliement se termine par la glucosidase II qui, en clivant davantage la chaîne oligosaccharidique, permet la libération des glycoprotéines des lectines. Ces protéines empruntent alors différentes voies selon leur état de repliement : elles peuvent de nouveau entrer dans le cycle calnexine/calréticuline par glycosylation, entrer dans le trafic intracellulaire si elles sont correctement repliées ou bien, être acheminées vers le processus de dégradation associée au RE (ERAD), si elles sont non- ou mal repliées malgré plusieurs cycles calnexine/calréticuline (Smith et al., 2011). Dans ce cas, la glycoprotéine mal repliée est extraite du cycle calnexine-calréticuline par l'action de l' α -mannosidase I et des protéines EDEM (EDEM1 et 2, ER degradation enhancing α -mannosidase like protein 1 and 2) qui enlèvent, aux glycoprotéines, des mannoses N-terminaux exposant un lien α 1,6-mannose qui sert de signal à la dégradation du type ERAD (ER-associated degradation)(Olivari et al., 2005, Smith et al., 2011). Ces protéines sont ensuite ubiquitinylées par l'intermédiaire des E3 ubiquitin ligases comme la HRD1 (HMG-CoA reductase degradation 1 homolog) et Gp78 (glycoprotein 78). Après ubiquitylation, le substrat protéique est transloqué dans le cytosol par l'action de la ATPase p97 et dégradé par le protéasome (Smith et al., 2011, Helenius and Aebi, 2001) (**Figure 7**).

I.2. Le stress du RE et la réponse UPR

Vu son importance pour le bon fonctionnement cellulaire, le repliement des protéines dans le RE doit donc être étroitement régulé et contrôlé. Comme nous l'avons vu, en cas de mauvaise conformation, les protéines peuvent être redirigées vers le cycle de repliement ou bien être dégradées par la voie ERAD. Cependant, des perturbations du fonctionnement ou un stress du RE tout comme une surcharge en protéines néosynthétisées peuvent quand-même donner lieu à une accumulation de protéines mal repliées dans la lumière du RE. Dans ces conditions, la cellule essaiera de remédier à ces dysfonctionnements en déclenchant la réponse UPR (Unfolded Protein Response) qui aura pour but premier d'améliorer les capacités de repliement du RE et la diminution de la charge protéique du RE.

La voie UPR est activée par 3 récepteurs trans-membranaires du RE : ATF6 (activating transcription factor 6), IRE1 (inositol requiring kinase 1) et PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like endoplasmic reticulum kinase). Cette réponse cellulaire se fait en 3 étapes : l'adaptation, l'alarme et l'apoptose (**Figure 8**). L'étape d'adaptation sert à tenter de rétablir l'homéostasie en augmentant l'expression et l'activité des chaperonnes, en diminuant la traduction de protéines et en stimulant la dégradation des protéines par la voie ERAD (Walter and Ron, 2011). La réponse UPR s'accompagne aussi d'une expansion du RE (Schuck et al., 2009). Si la cellule n'arrive pas à rétablir l'homéostasie, elle entre en phase

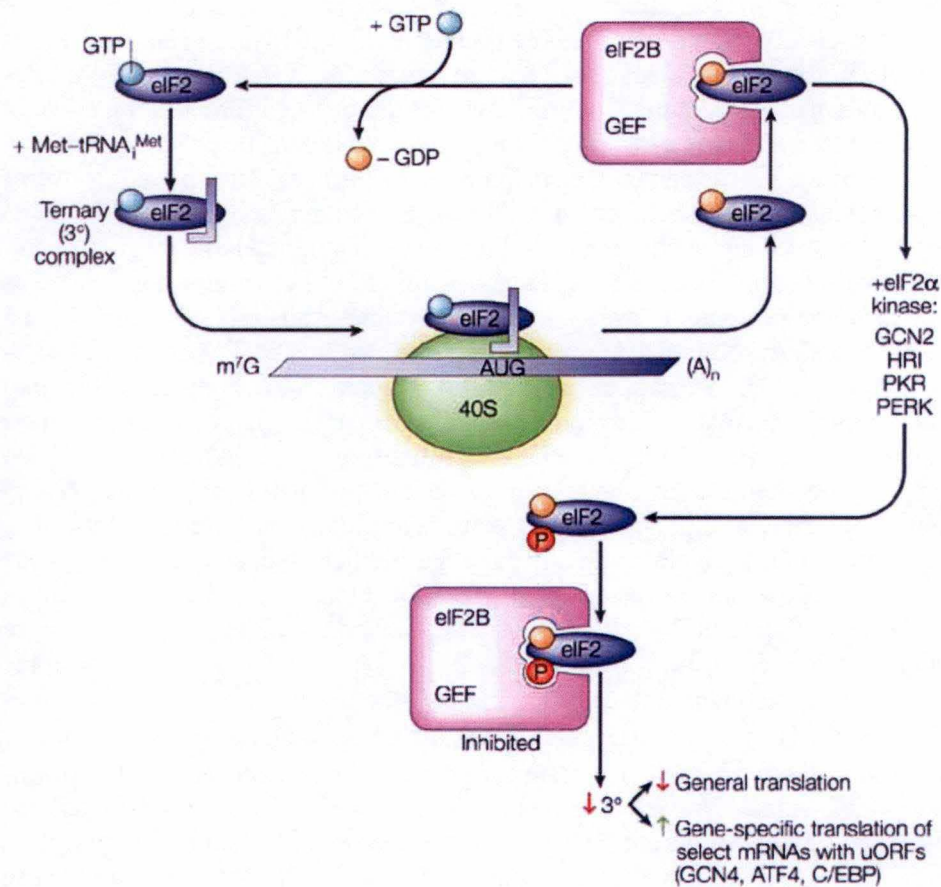


Figure 9 : Régulation de l'initiation de la transcription par eIF2 et eIF2B. Le complexe binaire eIF2-GTP se lie au méthionyl-ARNt ($\text{Met-tRNA}_i^{\text{Met}}$) formant un complexe qui s'associe avec la sous-unité 40S du ribosome. Après reconnaissance du codon « start », le GTP est hydrolysé par eIF2 et le complexe binaire eIF2-GDP est libéré. Le facteur GEF (guanine exchange factor) eIF2B transforme le complexe inactif eIF2-GDP en complexe actif eIF2-GTP par échange GDP-GTP, un processus qui est inhibé par la phosphorylation de la sous-unité α d'eIF2 (Ser51) par une des quatre kinases (GCN2, HRI, PKR, PERK). Cette inhibition d'eIF2B réduit le niveau de complexes ternaires, ce qui réduit la traduction globale mais augmente la traduction d'une classe spécifique d'ARNm ayant des sites IRES dans leur extrémité 5'UTR. Abréviations: ATF4 : activating transcription factor 4, C/EBP : CCAAT/enhancer-binding protein, GCN2/4 : general control non-derepressible 2/4, HRI : haem-regulated initiation factor 2 α kinase, m⁷G : 7-methyl-GTP, PERK : double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase, PKR : protein kinase-RNA regulated (Klann and Dever, 2004).

I. Introduction

d'alarme avec une inhibition de la traduction protéique et une sensibilisation à l'apoptose suite à une diminution de l'expression de facteurs anti-apoptotiques (comme Bcl2). Si le stress du RE persiste trop longtemps ou s'avère être trop intense, la cellule entre en apoptose (Chakrabarti et al., 2011, Walter and Ron, 2011) (**Figure 8**).

I.2.1. Les différentes voies de signalisation de la voie UPR

L'activation des trois voies de signalisation implique l'action de BiP (binding immunoglobulin protein ou Grp78, glucose-regulated protein of 78 kDa), une protéine chaperonne de la famille Hsp70 (heat shock protein d'environ 70 kDa). En cas d'accumulation de protéines mal repliées extériorisant des groupements hydrophobes, cette chaperonne se dissocie des récepteurs intra-membranaires ATF6, PERK et IRE1 et se lie de manière ATP-dépendante aux protéines hydrophobes pour faciliter leur repliement. La dissociation de BiP lève l'inhibition de ces récepteurs (Chakrabarti et al., 2011).

PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase)

Cette voie sert majoritairement à réguler la traduction protéique afin de diminuer le flux de protéines rentrant dans le RE. La dissociation de BiP de l'extrémité N-terminale de PERK, un récepteur transmembranaire de type I active sa dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur sur la tyrosine T981 (Kebache et al., 2004) de son domaine kinase. PERK activé phosphoryle alors la sous-unité α du facteur eucaryotique d'initiation de la traduction (eIF2 α , eukaryotic translation initiation factor 2 α) sur la sérine 51 (Kebache et al., 2004, Scheuner et al., 2001), ce qui entraîne son interaction permanente avec le facteur GEF (guanine nucleotide exchange factor) eIF2B bloquant ainsi l'échange GDP-GTP sur eIF2 α causant une diminution globale de la traduction protéique (**Figure 9**).

Cependant, certains ARNm ayant des sites IRES (internal ribosome entry sites) dans leur extrémité 5'UTR ne sont pas concernés par cette inhibition de la traduction (Schroder and Kaufman, 2005). Un de ces gènes est Atf4/ATF4 (Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-4), codant pour un facteur de transcription se liant à des sites C/EBP (cAMP response element-binding transcription factor). Ce facteur de transcription régule généralement l'expression de gènes impliqués dans la survie cellulaire (transport et synthèse d'acides aminés, réactions redox, sécrétion de protéines).

Cependant ATF4 peut aussi initier la transcription d'un facteur de transcription pro-apoptotique, CHOP-10/GADD153 (transcription factor C/EBP homologous protein-10 ou growth arrest and DNA damage-inducible 153) codé par le gène *Ddit3* et GADD34 (growth arrest and DNA damage-inducible 34) (Harding et al., 2003). CHOP-10 est une protéine de 29 kDa qui possède un domaine de transactivation N-terminal et un domaine bZIP au niveau C-terminal (Ron and Habener, 1992). Cette protéine est capable d'initier l'apoptose en inhibant l'expression de gènes codant pour des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl2 (McCullough et al., 2001).

ATF6 (activating transcription factor 6)

ATF6, un récepteur transmembranaire de 90 kDa se présente sous deux isoformes ATF6 α et ATF6 β (Thuerauf et al., 2007). Le stress du RE induit la dissociation de BiP/Grp78 de ce récepteur, ce qui permet la translocation d'ATF6 dans l'appareil de Golgi où le facteur subit une protéolyse intra-membranaire régulée qui est catalysée par les protéases S1P (secreted site 1 protease) et S2P (site 2 protease) qui clivent son domaine intra-luminal et son ancre intra-membranaire (Walter and Ron, 2011). Ces clivages génèrent un fragment de 50 kDa (ATF6N) qui est transloqué dans le noyau où il joue un rôle de facteur de transcription régulant

I. Introduction

l'expression de gènes jouant un rôle dans la réponse UPR comme BiP, PDI, EDEM1 et XBP1 (X box-binding protein-1)(Lee et al., 2002). La réponse dépendante d'ATF6 conduit à la régulation de l'expression de gènes codant, en règle générale, pour des protéines favorisant la survie cellulaire.

IRE1 (inositol-requiring kinase 1)

La troisième voie de l'UPR est celle qui est la plus conservée parmi les eucaryotes étant donnée qu'elle est aussi présente dans la levure (Walter and Ron, 2011). Cette voie conduit à générer des signaux qui sont pro- ou anti-apoptotiques. Le récepteur IRE1 est une protéine transmembranaire de type 1 de 100 kDa et une enzyme bifonctionnelle possédant un domaine endoribonucléase et un domaine Ser/Thr kinase. L'enzyme est exprimée sous deux isoformes : IRE1 α et IRE1 β exprimées dans différents tissus (par exemple, IRE1 β n'est exprimée que dans l'épithélium intestinal) (Zhou et al., 2006). IRE1 est également activée par la dissociation de BiP ou par une interaction directe avec des protéines mal repliées (Credle et al., 2005). Suite à son activation, IRE1 subit une homo-oligomérisation suivie d'une autophosphorylation sur la Ser724 (Zhou et al., 2006, Papa et al., 2003). Par son activité endoribonucléase, IRE1 clive un fragment de 26 nucléotides de l'ARN messager de XBP1 générant une forme épissée (XBP1^{spliced}), un facteur de transcription (Lee et al., 2002) qui, dans les plasmocytes, régule la transcription de gènes codant pour des enzymes impliquées dans la synthèse lipidique, des protéines de la machinerie ERAD et supporte donc l'expansion du RE (Reimold et al., 2001). IRE1 peut aussi interagir avec l'adaptateur TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2), ce qui active la kinase ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1) qui, à son tour, phosphoryle MKK4 et MKK3, deux kinases qui activent, respectivement, les kinases de stress comme JNK (c-jun NH2-terminal kinase) et p38MAPK (Urano et al., 2000). La JNK activée est alors capable de phosphoryler et d'activer Bim (une protéine pro-apoptotique) sur la Ser65 (Lei and Davis, 2003) et d'inhiber, toujours par phosphorylation, Bcl2 (une protéine anti-apoptotique) sur les Thr69, Ser70 et Ser87 (Wei et al., 2008). La voie IRE1 conduit également à la réduction de l'expression de gènes codants pour des protéines par la réponse RIDD (regulated IRE1-dependent decay). Dans ce cas, IRE1 dégrade des ARNm liés au RE de manière non spécifique et ce, dans le but de réduire l'influx de protéines dans le RE. Le mécanisme qui régule le changement entre l'épissage alternatif très spécifique de XBP1 et la RIDD non spécifique n'est pas encore connu (Walter and Ron, 2011).

I.2.2. Les causes et origines d'un stress du RE

I.2.2.A. Les causes physiologiques et pathologiques d'un stress du RE

Il existe différentes conditions physiologiques et pathologiques qui peuvent déclencher une réponse UPR. Un stress du RE peut, par exemple, être déclenché par des perturbations du pH. De plus, lors du repliement oxydatif des protéines dans le RE, il y a formation d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ROS). Il a en effet été montré que la formation de ponts disulfure par les oxido-réductases PDI, enzymes en interaction avec Ero1 (ER oxido-réductase 1), un accepteur d'électrons qui permet à la PDI de commencer un nouveau cycle de repliement, donne lieu à la production de H₂O₂ (Gorlach et al., 2006) Généralement, le peroxyde d'hydrogène est dégradé par l'action de la catalase (dans les peroxysomes) et des glutathion peroxidases (GPxs), enzymes utilisant le glutathion (GSH). Mais en cas de surcharge protéique, les capacités anti-oxydantes sont dépassées et le RE peut subir un stress oxydatif qui active la voie UPR (Cao and Kaufman, 2014). En outre, le stress oxydatif et le

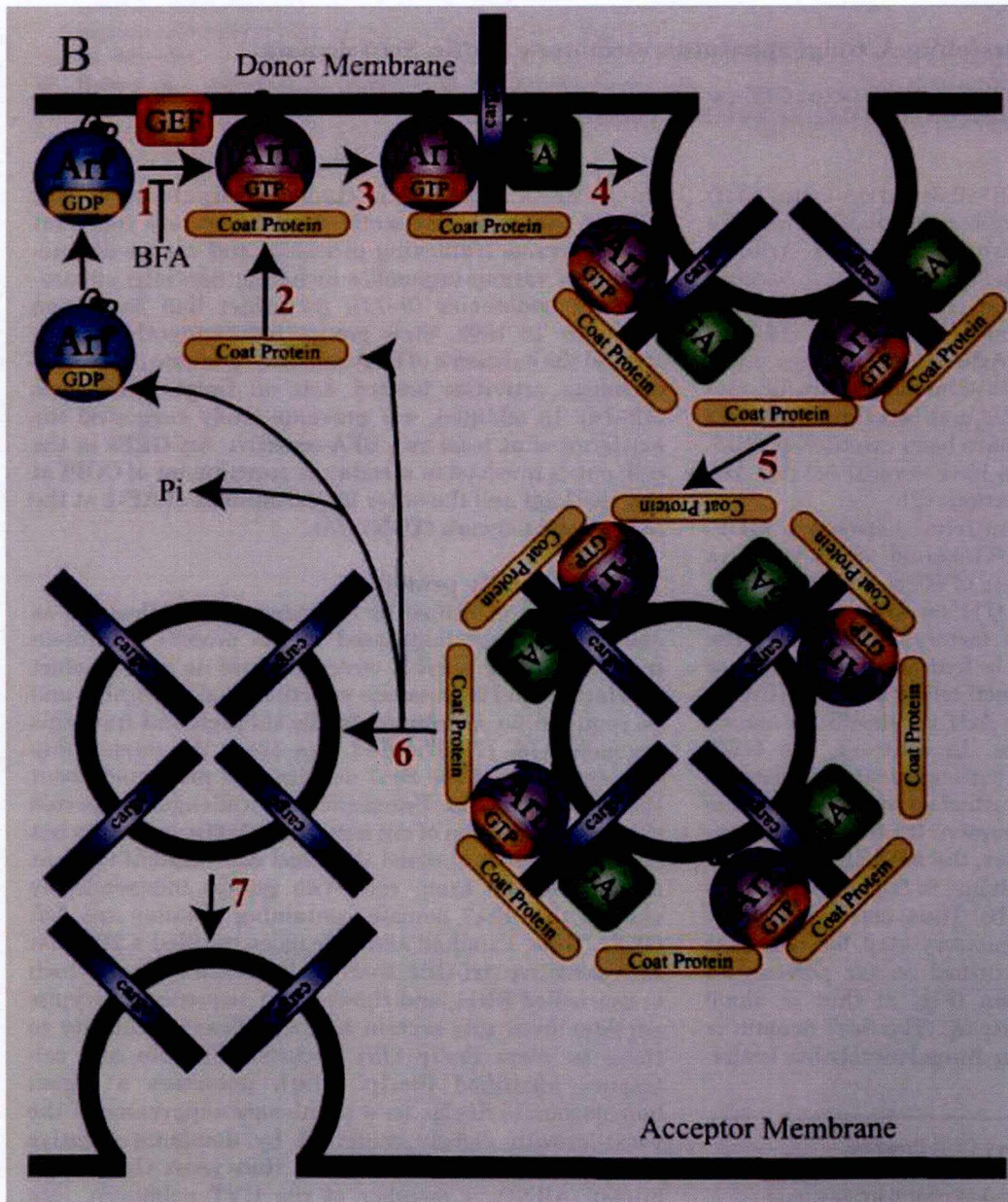


Figure 10: Le cycle GDP-GTP des protéines Arf et la formation de vésicules COP I. (1) L'échange GDP-GTP catalysé par une GEF, permet le recrutement de Arf à la membrane du Golgi. Cette réaction est bloquée par la bréfeldine A. (2) La protéine Arf associée au GTP recrute alors des protéines coatomères du cytosol. (3) La GTPase Arf et les protéines coatomères, enrichissent le site d'assemblage de la vésicule avec du cargo transmembranaire. Il y a aussi recrutement de GAP à la membrane. (4) Polymérisation des coatomères COP I entourant la vésicule et bourgeonnement avec (5) libération de la vésicule de la membrane donneuse. (6) Hydrolyse du GTP par la GAP conduisant à la libération des protéines Arf et coatomères. (7) La vésicule démantelée peut alors fusionner avec une membrane cible (Shin and Nakayama, 2004).

I. Introduction

stress du RE se renforcent mutuellement dans une boucle rétroactive positive. En effet, la voie PERK active le facteur de transcription CHOP-10 qui régule la transcription de GADD34, une phosphatase qui enlève le groupement phosphate inhibant le facteur eIF2 α , permettant ainsi la poursuite de la traduction protéique. D'autre part, CHOP-10 active aussi l'expression du gène codant pour Ero1 α , ce qui contribue davantage au stress oxydatif (Cao and Kaufman, 2014). On retrouve également le stress du RE dans des pathologies comme le **diabète de type II**. Cette pathologie qui se caractérise par une résistance à l'insuline et une forte hyperglycémie, se traduit *in fine*, par une forte sollicitation des cellules β des îlots de Langerhans du pancréas à synthétiser de grande quantité d'insuline pour compenser la perte de sensibilité des tissus périphériques. Le fait que ces cellules sont responsables de la synthèse et de la sécrétion d'insuline en réponse à une hyperglycémie les rend sensibles à une éventuelle surcharge du RE en protéine pro-insuline. Si les capacités de repliement du RE sont dépassées, l'UPR est activée conduisant à la mort des cellules β par apoptose (Biden et al., 2014). L'hyperglycémie associée au diabète type II entraîne en plus une production de ROS en sur-stimulant la chaîne du transport des électrons dans les mitochondries (Martin and McGee, 2014). Ce stress oxydatif perturbe les conditions redox au sein du RE et active l'UPR (Gotoh and Mori, 2006).

I.2.2.B. Les inducteurs chimiques responsables du stress du RE

Un stress du RE peut aussi être induit expérimentalement en exposant les cellules à des agents chimiques. Une des méthodes couramment utilisée pour induire la réponse UPR est de provoquer une **déplétion en calcium des stocks du RE**. Ceci s'explique par le fait que les chaperonnes (calréticuline, BiP, GRP94) nécessitent de fortes concentrations en calcium pour exercer leur activité. Une dérégulation calcique provoquée en inhibant les pompes calciques SERCA responsables de l'internalisation du calcium cytosolique dans le RE peut donc provoquer une réponse UPR (Michelangeli and East, 2011). Il existe plusieurs inhibiteurs des SERCA comme par exemple la CPA (acide cyclopiazonique), le BHQ (2,5-di-(t-butyl)-1,4-hydroquinone) ou encore, le plus utilisé dans la littérature, la thapsigargine (Michelangeli and East, 2011).

Une **perturbation de la N-glycosylation** provoquant une accumulation de protéines non glycosylées et non matures au sein du RE active également la réponse UPR. La molécule la plus utilisée dans ce cadre est la tunicamycine. Cet antibiotique bloque l'action de l'enzyme ALG7 (asparagine-linked glycosylation 7) responsable du transfert du premier groupement saccharidique sur le précurseur dolichol phosphate (Wojtowicz et al., 2012).

Alternativement, on peut aussi **inhiber le trafic des vésicules intracellulaires** entre l'appareil de Golgi et le RE, ce qui conduit à l'accumulation de protéines repliées au sein du RE. C'est par ce mécanisme que la bréfeldine A (BFA), un inhibiteur du transport rétrograde des vésicules à partir de l'appareil de Golgi vers le RE (en inhibant la formation des vésicules « coatées » par COPI) (**Figure 10**) active l'UPR. En 1990, les travaux d'Oda et collègues ont montré que cette molécule synthétisée par le *penicillium brefeldianum* possède une action antivirale contre le virus VSV (vesicular stomatitis virus) car la bréfeldine A bloque le transport de protéines virales entre le RE et l'appareil de Golgi où elles subissent des modifications chimiques pour devenir fonctionnelles (Oda et al., 1990). D'autres travaux ont ensuite montré que la bréfeldine A interfère avec l'assemblage du complexe coatomère COPI à la surface membranaire de l'appareil de Golgi (Chardin and McCormick, 1999, Donaldson et al., 1992). En effet, en situation physiologique, l'activation de protéines GEFs (guanine nucleotide exchange factors) régule l'échange GDP-GTP sur la protéine Arf1 (ADP-ribosylation factor 1) (Anders and Jurgens, 2008). Une fois activé, le complexe Arf1-GTP est transloqué du cytosol vers la membrane de l'appareil de Golgi où il initie l'assemblage des

I. Introduction

coatômères COPI afin de réguler le transport rétrograde de protéines mal repliées du Golgi vers le RE (Zeghouf et al., 2005). Dans les cellules de mammifères, il existe deux classes de GEFs, les GEFs de haut poids moléculaire comme la GBF1, BIG1 et BIG2 qui sont sensibles à la BFA (Kawamoto et al., 2002) et les GEFs de faible poids moléculaire, comme les ARNO/cytohesines-1 à 4, la famille des protéines EFA6, les BRAGs et FBX8 qui sont insensibles à la BFA. Leur point commun étant de posséder un domaine Sec7 d'approximativement 200 acides aminés. Pour plus d'informations voir (Kawamoto et al., 2002, Jackson and Casanova, 2000). Le processus de bourgeonnement de vésicules COPI est aussi régulé par la ArfGAP (GTPase activating protein for Arf1) qui par son activité GTPasique hydrolyse le GTP de Arf1 et permet le recyclage de la protéine sur une autre vésicule bourgeonnante (Lippincott-Schwartz and Liu, 2006).

Il a d'abord été montré que la bréfeldine A interfère avec les facteurs GEF sans inhiber la liaison de GTP à Arf1 (Donaldson et al., 1992). Par cette interférence avec le transport rétrograde de protéines, la bréfeldine A induit une désorganisation de l'appareil de Golgi par fusion entre le RE et le Golgi (Chardin and McCormick, 1999). Cette fusion est illustrée par la redistribution de protéines de l'appareil de Golgi vers le RE avec une création d'un « compartiment BFA » formé par une agrégation du TGN (trans-Golgi network) et les compartiments endosomaux (Anders and Jurgens, 2008). Le travail de Peyroche et collaborateurs portant sur des levures a ensuite permis d'identifier que le mécanisme d'action de la bréfeldine A est en fait de stabiliser l'interaction entre le GDP et le domaine Sec7 de Arf et GEF, ce qui bloque la dissociation d'Arf et la protéine GEF (Peyroche et al., 1999). Des études cristallographiques du complexe Arf-ARNO (ici ARNO a été rendu sensible à la BFA par des mutations ponctuelles Phe190Tyr/Ala191Ser/Ser198Asp/Pro208Met)) ont enfin montré que la BFA se loge dans une poche hydrophobe entre Arf et sa GEF et bloque alors ce complexe dans une conformation non productive qui ne permet plus la libération du GDP après l'hydrolyse du GTP et l'ancrage du complexe à la membrane du Golgi (Zeghouf et al., 2005, Renault et al., 2002). La BFA est donc un inhibiteur non compétitif des GEFs vu qu'il ne se lie pas à l'enzyme seule mais bien au complexe intermédiaire « enzyme-substrat » (Chardin and McCormick, 1999).

Une autre voie souvent utilisée pour activer l'UPR, spécialement dans les cellules neuronales, est l'induction d'un **stress oxydatif par addition de fortes concentrations en glutamate**. Le glutamate est un neurotransmetteur qui peut devenir, à fortes concentrations, un agent cytotoxique majeur dans le système nerveux. Il peut induire un effet cytotoxique selon deux modalités : une excitotoxicité médiée par des récepteurs (Choi, 1988) et une toxicité oxydative indépendante de récepteurs (Murphy et al., 1989).

L'excitotoxicité du glutamate survient dans des cellules excitatrices exprimant les récepteurs ionotropiques au glutamate comme les récepteurs NMDA (N-méthyl-D-aspartate) perméables au calcium (Plaitakis and Shashidharan, 2000). Ces récepteurs peuvent être sur-activés en cas d'excès de glutamate, ce qui résulte en un influx massif de calcium activant des enzymes Ca^{2+} -dépendantes telle que des calpaïnes qui activent la caspase-3 et donc l'apoptose. Une augmentation de la concentration intracellulaire en Ca^{2+} stimule aussi la nNOS (neurone nitric oxyde synthase) produisant du NO toxique qui peut causer un dysfonctionnement mitochondriale avec ouverture du pore PTP et libération de cytochrome c induisant alors l'apoptose (Lobysheva et al., 2013, Zhang et al., 2014, Zhou and Danbolt, 2014, Kritis et al., 2015).

La toxicité oxydative par contre est causée par la saturation de transporteurs glutamate-cystine. Généralement, la cystine importée dans la cellule est rapidement transformée en cystéine, un acide aminé incorporé dans le glutathion qui est un des antioxydants principaux de la cellule. Suite à la saturation des récepteurs par le glutamate, la cellule sera donc déplétée en glutathion, ce qui diminue ses défenses anti-oxydantes pour faire face à un stress oxydatif

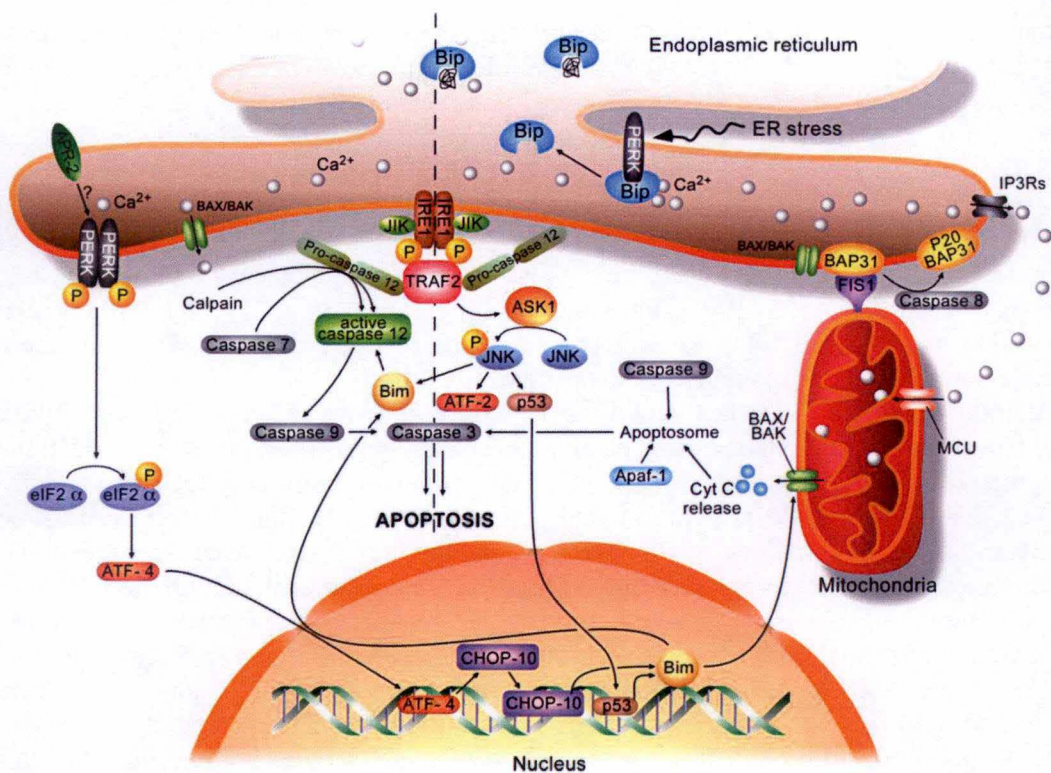


Figure 11 : Les voies dépendantes et indépendantes des mitochondries de l'apoptose. Un stress du RE trop important ou d'une durée trop longue peut déclencher l'apoptose selon deux voies : la voie indépendante des mitochondries (à gauche de la ligne discontinue) ou la voie dépendante des mitochondries (à droite de la ligne discontinue).

Suite à un stress du RE il peut y avoir translocation de la caspase-7 dans la membrane du RE où celle-ci clive la caspase-12. La caspase-12 activée induit alors l'apoptose en déclenchant la cascade caspase-9/caspase-3. Le récepteur membranaire IRE1 peut aussi dimériser et phosphoryler JIK, une action qui favorise le recrutement de TRAF au complexe IRE1-JIK. Le complexe formé peut, à son tour, activer ASK1 qui phosphoryle JNK. L'activation de JNK permet la translocation et l'activation subséquente de la protéine Bim qui peut également activer la caspase-12. Une activation de PERK suite à une libération de calcium du RE peut aussi déclencher la voie caspase-12/caspase-9/caspase-3 par transcription de Bim. Les protéines Bax/Bak se trouvent aussi à la surface du RE où elles peuvent induire une libération de calcium dans le cytosol et une activation des calpains. Les calpains activées déclenchent aussi l'activation de la cascade caspase-12/caspase-9/caspase-3.

La voie de l'apoptose dépendante des mitochondries passerait par l'activation d'IRE1 qui induit une phosphorylation de JNK par ASK1 et une activation de p53. Le facteur de transcription p53 déclenche alors l'expression de Bim, ce qui entraîne l'oligomérisation de Bax/Bak dans l'OMM (Outer Mitochondrial Membrane) qui forme alors un pore dans la membrane mitochondriale permettant la libération du cytochrome c et la formation de l'apoptosome.

Le stress RE peut aussi mener au clivage de Bap31 par la caspase-8, ce qui génère le fragment p20. Ce fragment peut activer les canaux IP₃R du RE et causer une libération massive de calcium dans le cytosol. Ce calcium est alors importé à l'aide du MCU (mitochondrial calcium uniporter) dans la matrice mitochondriale où il induit la libération de cytochrome c par le pore Bax/Bak (Vannuvel et al., 2013).

I. Introduction

(Shih et al., 2006). Ce stress oxydatif est capable de causer une réponse UPR par une dérégulation de l'environnement redox du RE et perturbation de l'homéostasie calcique (Farrukh et al., 2014). Dans ce cadre, Pan et ses collègues ont trouvé que la stimulation de cellules neuronales primaires avec du glutamate induit une augmentation du clivage d'ATF6, une phosphorylation d'IRE1 et l'apoptose des neurones. Cette apoptose peut être prévenue en ajoutant de la taurine (un antioxydant) aux cultures cellulaires, indiquant que la taurine pourrait exercer des effets bénéfiques sur le stress du RE en inhibant les voies ATF6 et IRE1 (Pan et al., 2012). D'autres antioxydants comme la cordycepine (Jin et al., 2014a), le sélénium (Kumari et al., 2012) et les sélénoprotéines dérivées (Moghadaszadeh and Beggs, 2006) ainsi que l'antioxydant mitoQ (Solesio et al., 2013) ont aussi montré une protection contre la toxicité oxydative induite par le glutamate dans différents modèles expérimentaux.

I.2.3. L'apoptose: une conséquence ultime du stress RE

L'intégration des signaux provenant des différentes voies UPR contribue aux choix du destin cellulaire face au stress RE. Si la réponse UPR n'arrive pas à rétablir l'homéostasie cellulaire, la cellule meurt par apoptose suivant deux voies : la voie indépendante des mitochondries et la voie dépendante des mitochondries (Vannuvel et al., 2013, Chakrabarti et al., 2011) (**Figure 11**).

Voie indépendante des mitochondries

- L'activation des caspases

L'apoptose résulte de l'activation de caspases, des cystéinyl aspartate protéases qui participent au démantèlement cellulaire. Certaines caspases sont associées au RE comme par exemple la caspase-12 (présente chez les rongeurs) et la caspase-4 (chez l'homme). L'activation de la caspase-12 suite au stress du RE se fait par translocation de la caspase-7 cytosolique à la surface du RE. La caspase-12 activée va, à son tour, cliver la caspase-9, induisant une cascade qui mène à l'activation de la caspase effectrice, la caspase-3 (Rao et al., 2001, Morishima et al., 2002). La caspase-12 peut aussi être activée par l'intermédiaire de la voie IRE1. En effet, la protéine JIK (c-Jun-N-terminal inhibitory kinase) peut se lier au récepteur IRE1 et le phosphoryler. Ce complexe recrute alors le facteur TRAF2 (TNF receptor-associated factor 2), ce qui permet l'activation de ASK1 (apoptosis signal regulating kinase 1). L'activation de ASK1 donne lieu à une cascade conduisant à la phosphorylation de la p38 MAPK et de la JNK (c-Jun N-terminal kinase). Le recrutement de TRAF2 permet la libération et l'activation de la caspase-12 (Urano et al., 2000). Alternativement, l'activation de JNK suite à la stimulation de la voie IRE1 peut aussi conduire à la phosphorylation de Bim (un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2) et induire sa translocation à la membrane du RE où Bim semble activer la caspase-12 (Morishima et al., 2004). La transcription de la protéine Bim est aussi régulée par la voie PERK via l'activation du facteur de transcription CHOP-10 (Rainbolt et al., 2014).

- Le signal calcique

Les membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme Bax et Bak ne semblent pas seulement se trouver associés aux mitochondries (Bak) ou résider dans le cytosol (Bax), mais sont aussi associés au RE. L'association de Bax au RE lui permet d'être activée en cas de stress du RE, d'interagir avec Bcl-XL et ainsi de lever l'inhibition sur les canaux calciques IP₃R du RE (Ghibelli and Diederich, 2010). La libération massive de calcium suite à cette

I. Introduction

levée d'inhibition est responsable de l'activation de calpaïnes, des protéases cytosoliques sensibles au calcium. Ces calpaïnes activent, à leur tour, la caspase-12 qui est associée au RE (Pandurangan et al., 2014).

Voie dépendante des mitochondries

- CHOP-10 et la voie PERK

Comme l'expression de CHOP-10 n'est pas seulement régulée par la voie PERK, mais aussi par les voies ATF6 et IRE1, la réponse UPR engendre une forte expression du gène *Ddit3* codant pour cette protéine (Li et al., 2014c). CHOP-10 lui-même régule l'expression de plusieurs gènes impliqués dans le stress RE et l'apoptose. En effet CHOP-10 réprime la transcription de Bcl-2 (de Brito and Scorrano, 2010), une protéine anti-apoptotique (McCullough et al., 2001), ce qui permet d'initier l'apoptose en autorisant l'oligomérisation de Bax/Bak dans la MME (membrane mitochondriale externe) et la libération du cytochrome c de l'espace intermembranaire des mitochondries. Le cytochrome c cytosolique se lie ensuite à Apaf-1 (apoptotic protease activating protein 1) engendrant le clivage de la pro-caspase-9. L'activation de la caspase-9 mène alors à la formation de l'apoptosome et à l'activation des caspases effectrices, caspase-3 et -7 (Yuan and Akey, 2013). CHOP-10 régule aussi l'expression du facteur de transcription ATF5 (Activating Transcription Factor 5) qui contrôle la transcription de NOXA, une protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2 qui favorise l'activation de Bax/Bak (Rainbolt et al., 2014).

- Bim

L'expression du gène codant pour cette protéine pro-apoptotique peut être augmentée suite à l'activation de la voie PERK et l'expression de CHOP-10 résultant (Puthalakath et al., 2007). L'activation de Bim résulte d'une phosphorylation par JNK (Wei et al., 2008) activée par IRE1. L'activation de Bim favorise l'oligomérisation de Bax/Bak dans la MME, ce qui conduit à renforcer la libération du cytochrome c dans le cytosol.

- Bap31

Bap31 est une protéine transmembranaire du RE qui est en association étroite avec Fis1, une protéine de la membrane externe des mitochondries qui est impliquée dans la fission de celles-ci (voir point 3.2.2.). En cas d'activation de l'UPR, Bap31 est clivée par la caspase-8, générant un fragment p20 qui cause une fuite calcique du RE via les IP₃Rs (Iwasawa et al., 2011). En fait, ces ions calciques sont aussi importés massivement dans les mitochondries par la protéine MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter) causant un gonflement osmotique de celles-ci et une libération du cytochrome c suite à l'installation du pore transitoire de perméabilisation (PTP) (Breckenridge et al., 2003).

- DR5

En cas de stress réversible du RE, la voie PERK active le facteur de transcription CHOP-10, ce qui augmente aussi la transcription du gène codant pour le récepteur de mort : DR5 (death receptor 5) (Lu et al., 2014). Cependant, l'activation simultanée de la voie IRE1 déclenchant transitoirement la dégradation RIDD évite la traduction des ARNm de DR5, ce qui permet à la cellule de mettre en œuvre des mesures pour rétablir l'homéostasie cellulaire. Par contre, si le stress du RE est trop sévère ou reste prolongé, la transcription de DR5 persiste, tandis que l'action RIDD de la voie IRE1 diminue. Ces événements conduisent à une augmentation globale de l'abondance des ARNm de DR5 et une accumulation du récepteur dans le RE et l'appareil de Golgi. L'isoforme longue du récepteur DR5L a tendance à s'oligomériser, ce qui active le récepteur et assure le clivage de la caspase-8. Cette protéase est responsable du clivage de la protéine Bid en tBid qui interagit alors avec Bax et initie la libération de cytochrome c à partir des mitochondries (Ng et al., 1997).

I. Introduction

- Sab

Comme déjà mentionné auparavant, JNK peut être phosphorylée en aval de la voie IRE1. Win et ses collègues soutiennent l'hypothèse que la phosphorylation de JNK permet à la kinase d'interagir avec Sab, une protéine mitochondriale. Ces auteurs ont d'ailleurs montré que la phosphorylation de Sab par la JNK inhibe, par un mécanisme encore mal connu, la respiration mitochondriale et accélère l'apoptose suite à l'accumulation de ROS résultant de l'inhibition de la respiration (Win et al., 2014).

Partie II: Les interactions du RE avec d'autres organites

II.1. Le trafic intracellulaire des protéines

Dans les cellules de mammifères, les protéines sécrétées et membranaires doivent transiter à travers plusieurs compartiments membranaires avant d'atteindre leur destination.

Une protéine néosynthétisée est d'abord exportée du RE au niveau des sites ERES (ER exit sites), des zones membranaires du RE dépourvues de ribosomes et enrichies en protéines COP II (Stephens, 2003). Ces protéines sont alors chargées dans des vésicules COP II qui transportent leur cargo vers le compartiment ERGIC (ER-Golgi intermediate compartment), un compartiment distinct du RE et du Golgi (Schweizer et al., 1991, Appenzeller-Herzog and Hauri, 2006) qui est stationnaire et sert à trier les vésicules ; celles qui retournent au RE, celles qui peuvent continuer leur chemin vers l'appareil de Golgi et celles restant au sein du ERGIC. Les vésicules de recyclage qui retournent au RE sont enveloppées (« coatées ») par une couche de protéines COP I.

L'appareil de Golgi se présente comme un assemblage de citernes empilées possédant une polarité *cis-trans*. Ces deux faces sont accompagnées de réseaux tubulaires distincts, le *cis*-Golgi network (CGN) et le *trans*-Golgi network (TGN). Le mécanisme de transport des vésicules entre ces différentes citernes est encore fortement controversé (Szul and Sztul, 2011). A partir du TGN, les vésicules contenant les protéines sont soit directement acheminées vers la membrane plasmique ou sont intégrées dans le système endosomal. La fusion des vésicules avec les différentes membranes est régulée par l'interaction entre des protéines d'ancrage et des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor receptors), comportant des v-SNAREs et des t-SNAREs (Szul and Sztul, 2011).

II.2. Les interactions avec le réseau mitochondrial

Depuis longtemps (Franke and Kartenbeck, 1971) il est connu que le RE et les mitochondries se trouvent en contact étroit et qu'ils établissent une communication bidirectionnelle afin de réguler le transfert d'énergie, de calcium et de lipides. En outre, ce contact physique entre les deux organites trouve toute son importance lors du déclenchement de l'apoptose notamment par l'échange de signaux Ca^{2+} (de Brito and Scorrano, 2010, Grimm, 2012).

II.2.1. L'ancrage entre les deux organites

Par le fait que ces deux organites de taille importante se trouvent confinés dans le petit volume cellulaire, il n'est pas étonnant qu'ils puissent établir des liens étroits. Rizzuto et al. ont déterminé que 20 % de la surface mitochondriale est en contact direct avec le RE (Rizzuto et al., 1998). Ces régions de contact ont été appelées MAMs (mitochondria-associated membranes) par Jean Vance en 1990 (Vance, 1990). Après la découverte de ces interactions, s'est posé la question de savoir comment ces organites pouvaient rester en contact étroit alors que chaque organite change perpétuellement de morphologie en fonction des besoins

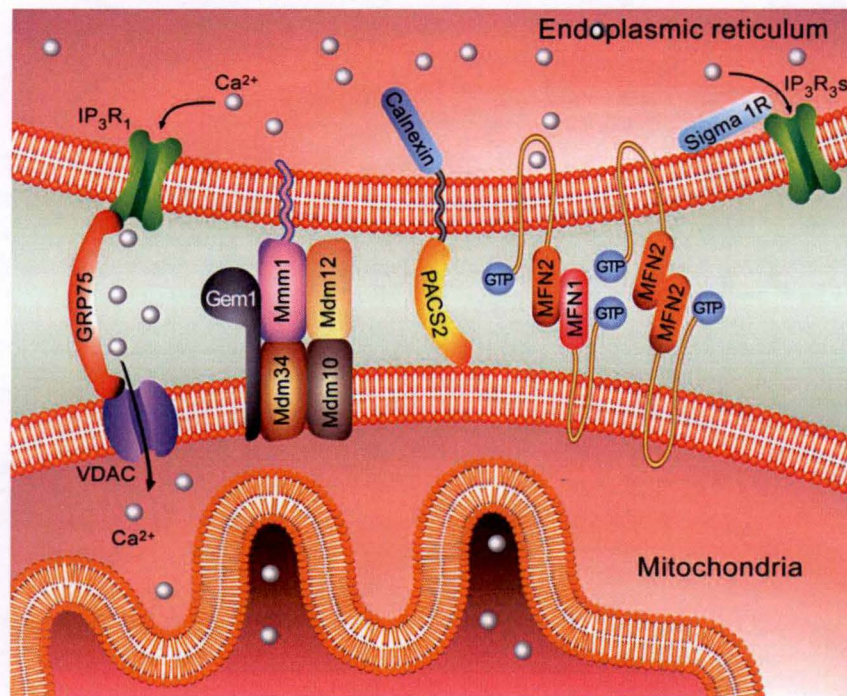


Figure 12 : Les interactions entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Le transfert de calcium est régulé par les interactions IP_3R -VDAC médiées par Grp75. Dans les levures, les deux organites sont liés par le complexe ERMES qui est composé des protéines Mmm1, Mdm12, Mdm34, Mdm10 and Gem1. PACS2 est une protéine du RE qui lie les mitochondries et interagit avec la calnexine du RE. Les Mitofusines 1 et 2 sont aussi capables de lier le RE et les mitochondries en formant des hétéro- ou homo-dimères. Le récepteur Sigma-1 est localisé dans les MAMs où il interagit avec IP_3R en cas de stress du RE provoquant une libération de calcium à partir du RE (Vannuvel et al., 2013).

I. Introduction

physiologiques de la cellule. Ceci a mené à la découverte et à l'identification de complexes protéiques assurant l'interaction entre les deux organites. Un premier complexe protéique identifié été le canal calcique IP₃R du RE qui est en interaction avec la chaperonne Grp75 (glucose regulated protein 75 kDa) assurant la connexion avec le canal VDAC1 (voltage-dependent anion channel 1) qui se trouve dans la MME (Szabadkai et al., 2006). Il existe aussi des points de contact RE-mitochondries formés par la protéine Mfn2 (Mitofusine 2) qui est également impliquée dans le processus de fission des mitochondries (détaillé dans le paragraphe III.2.1). La protéine Mfn2 du RE est capable de former des complexes (homo-ou hétéro-dimères) avec les mitofusines Mfn1 et 2 des mitochondries (Grimm, 2012). Dans la levure, par contre, on retrouve le complexe ERMES (ER-mitochondria encounter complex) dans lequel sont présentes des protéines mitochondriales comme Mdm10 et Mdm34 et des protéines du RE comme Mmm1 et la protéine cytosolique Mdm12 (Kornmann et al., 2009) (Figure 12).

II.2.2. Importance fonctionnelle de cette interaction physique entre le RE et les mitochondries

- Importance pour la synthèse et le transfert de certains lipides

Du fait que les phospholipides hydrophobes ne diffusent que difficilement dans le cytosol, il est important qu'il existe des interactions étroites entre l'organite de synthèse, le RE et l'organite de destination comme les mitochondries (de Brito and Scorrano, 2010). En effet, il a été montré que les phosphatidylsérine synthases 1 et 2 ainsi que la phosphatidyléanolamine méthyltransférase sont enrichies dans les MAMs (Cui et al., 1993). Les MAMs sont aussi impliquées dans le métabolisme du cholestérol via les enzymes diacylglycérol acyltransférase et acyl-CoA cholestérol acyltransférases qui sont présentes au niveau des MAMs (Rusinol et al., 1994). Les MAMs semblent aussi jouer un rôle dans le métabolisme des sphingolipides (Hayashi et al., 2009) et des céramides, métabolites dérivés des sphingolipides, suite à la présence des enzymes céramide synthase et reverse céramidase dans les régions de contact RE-mitochondries (Bionda et al., 2004).

- Importance dans l'homéostasie calcique

Bien que le RE soit la réserve cellulaire principale de calcium, les mitochondries sont aussi capables d'importer et d'accumuler cet ion dans leur matrice (Marchi et al., 2014). En effet, comme les MAMs sont enrichies en récepteurs à l'IP₃ (IP₃Rs) et au ryanodine (RyRs), le transfert des ions calcium entre le RE et les mitochondries est facilité. Le fonctionnement des mitochondries est fortement influencé par la concentration mitochondriale en calcium étant donné que cet ion régule l'activité de plusieurs enzymes du cycle de Krebs et la chaîne de transport des électrons (Bernardi, 1999). Pour importer cet ion dans la matrice mitochondriale, les mitochondries possèdent dans leur membrane interne un canal calcium-spécifique du nom de MCU. Or, ce transporteur ne possède qu'une affinité faible pour l'ion calcique. Les régions d'interaction RE-mitochondrie remédient à ce problème en formant des microdomaines cellulaires dans lesquels la concentration calcique peut être très élevée (>10 μM) afin d'activer les MCUs (Bernardi, 1999, Marchi et al., 2014).

- Importance pour l'apoptose

Nous avons vu qu'un signal déclencheur de l'apoptose est une libération accrue de calcium à partir du RE et une incorporation massive de cet ion dans les mitochondries. Cette libération du calcium à partir du RE peut résulter de l'activation de la voie PERK qui augmente l'expression de S1T, une isoforme tronquée du transporteur SERCA-1. L'accumulation de

I. Introduction

cette protéine dans la membrane du RE cause une déplétion du RE en calcium (Chami et al., 2008). Une autre voie passe par Sig-1R (sigma-1 receptor), une chaperonne membranaire du RE qui se trouve souvent à proximité des MAMs. En cas de stress du RE, Bip se dissocie de Sig-1R, ce qui permet à ce dernier de stabiliser les canaux calciques IP₃R-3 induisant une libération massive de calcium (Hayashi and Su, 2007). Une troisième voie a été décrite dernièrement qui fait intervenir la protéine Bap31 du RE qui est liée à Fis1, une protéine membranaire mitochondriale (Iwasawa et al., 2011). Lors de l'apoptose, les complexes Fis1-Bap31 (aussi appelés ARCosomes) s'organisent en multimères et forment une plateforme d'activation pour la pro-caspase-8. Comme nous l'avons déjà mentionné, suite à l'activation de la caspase-8, Bap31 est clivée en p20, un facteur qui favorise la libération de calcium du RE (Iwasawa et al., 2011, Breckenridge et al., 2003, Alirol et al., 2006).

La hausse de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale déclenche alors l'ouverture du pore PTP suivie d'une chute du potentiel membranaire (l'ordre et la séquence des événements reste controversés et semble dépendre du type cellulaire et du stimulus apoptotique utilisé (Ly et al., 2003)) et de l'élévation de cytochrome c dans le cytosol (Hajnóczky et al., 2006). Le cytochrome c, à son tour, peut renforcer l'activation des canaux calciques IP₃Rs (van Vliet et al., 2014, Marchi et al., 2014).

L'objectif principal de ce travail étant d'étudier les éventuelles modifications de la mitochondrie en réponse à l'activation de l'UPR faisant suite à un stress subléthal du RE, nous allons maintenant continuer cette introduction en décrivant brièvement certains aspects importants relatifs à la biologie mitochondriale.

Partie III : Les mitochondries

III.1. Généralités sur la fonction mitochondriale

La mitochondrie ou plutôt le réseau mitochondrial est un organite très dynamique qui est responsable de la production d'ATP par les phosphorylations oxydatives. Elles produisent jusqu'à 90 % de l'ATP cellulaire selon le type cellulaire considéré (Martin and McGee, 2014). Cependant, les mitochondries assurent aussi d'autres fonctions importantes comme la régulation de l'homéostasie du calcium intracellulaire, la production de ROS, de nombreuses synthèses comme celle du pregnénolone, un précurseur d'hormones stéroïdiennes (Issop et al., 2013), la première étape de la synthèse du hème (Atamna, 2004), des dégradations comme la β -oxydation des acides gras (Demine et al., 2014), la dégradation des acides aminés dans le cycle de l'urée (Morris, 2002) et participent à l'initiation de l'apoptose (mito-dépendante) en cas de dommages cellulaires (Pagani and Eckert, 2011).

Les mitochondries sont entourées d'une double membrane, ce qui délimite 4 compartiments distincts (Ryan and Hoogenraad, 2007). La membrane externe perméable aux solutés (MME) assure l'import et l'export de molécules et d'ions par de nombreux canaux (par exemple : MCU (mitochondrial calcium uniporter) et VDACs (Voltage-dependent calcium channels) ou complexe TOM (translocase of the outer membrane) (Kaufman and Malhotra, 2014, Endo and Kohda, 2002). La MME sert aussi de plateforme de signalisation en concentrant différents récepteurs et molécules de signalisation (Tait and Green, 2012). On peut par exemple citer les récepteurs MAVS (mitochondrial antiviral signalling protein) qui servent comme récepteurs PRR (pattern recognition receptor) dans la réponse immunitaire innée antivirale ou la kinase PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) qui régule la mitophagie en recrutant Parkin, une E3 ubiquitin ligase. La MME permet aussi la régulation de l'apoptose par des facteurs pro-et anti-apoptotiques (par exemple : Bcl2, Bax,...) (Tait and Green, 2012). La membrane externe est aussi le site d'insertion des molécules adaptatrices pour Drp1 (par exemple : Fis1, Mff,

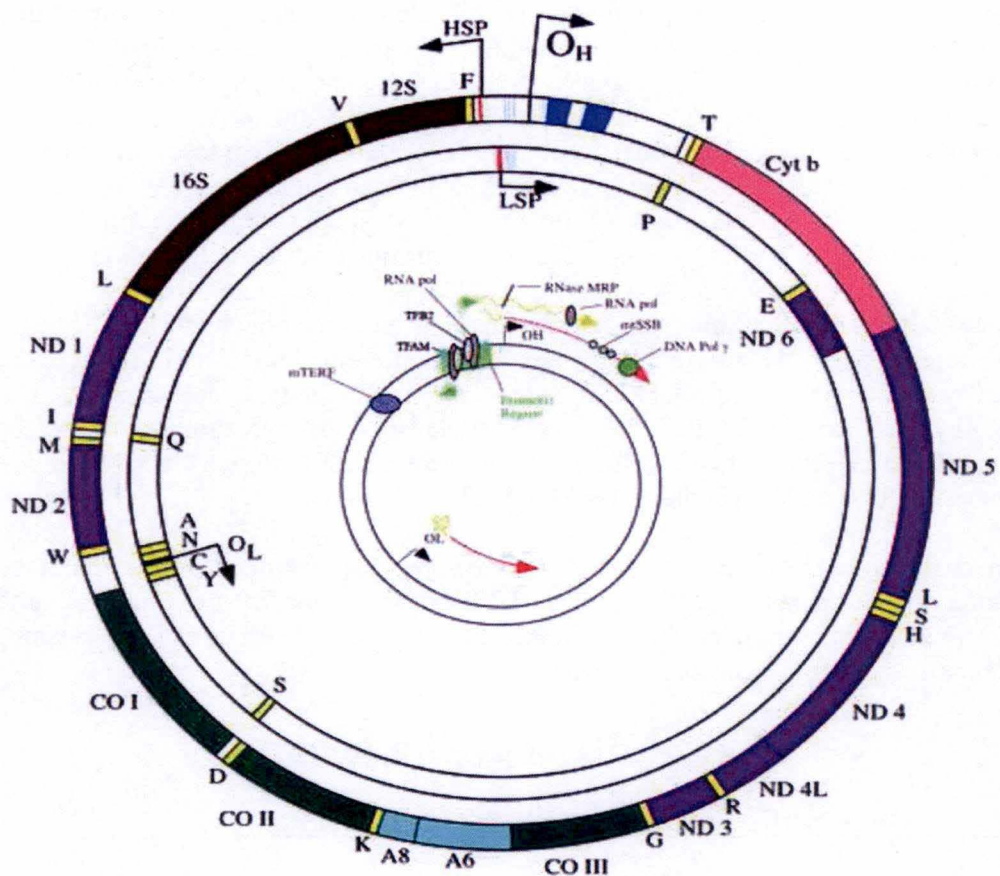


Figure 13 : Structure de l'ADN mitochondrial (mtDNA) : Le mtDNA de 16,569 bp encode 13 peptides, 2 ARNr (16S et 12S, noir) et 22 ARNt (A-Y, jaune). Les gènes codant les peptides codent pour des sous-unités du complexe I (ND1-ND6, violet), complexe III (cyt b, rose), complexe IV (CO I, II et III, vert) et complexe V (sous-unités de l'ATP synthase A8 et A6, turquoise). L'insert illustre un des mécanismes proposés pour la réplication de l'ADN mitochondrial. Il montre aussi le modèle de la transcription polycistronique avec des sites de liaison pour l'ARN polymérase mitochondriale, le facteur de transcription Tfam, la RNase MRP et le facteur de terminaison de la transcription mTERF. Les origines de réplication pour les brins H et L (OH et OL) sont indiqués par des flèches. Abréviations : HSP : heavy-strand promoter, LSP : light-strand promoter, mTERF : mitochondrial transcription termination factor ; TFAM : mitochondrial transcription factor A, RNA pol : RNA polymérase , TFB2 : mitochondrial transcription factor B2 , mtSSB : mitochondrial single-stranded DNA binding protein , DNA Pol γ : mitochondrial DNA polymerase γ (Diaz and Moraes, 2008).

I. Introduction

MiD49, MiD51, voir au point III.2.) régulant la morphologie mitochondriale (Mishra and Chan, 2014). Entre la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie (MMI) se trouve l'espace intermembranaire qui constitue un réservoir de cations et de molécules comme par exemple des protons nécessaires pour la production d'ATP, le cytochrome c, des pro-caspases et le facteur Smac/Diablo jouant un rôle dans l'apoptose (Du et al., 2000, Cosentino and Garcia-Saez, 2014). La membrane interne (MMI) comporte les constituants de la chaîne de transport d'électrons (ETC) (complexes I à IV) et la Fo/F1-ATP synthase (complexe V). Riche en cardiolipines, cette membrane est imperméable au passage de molécules. Les protéines sont cependant importées grâce à la présence de translocases TIM (translocase of the inner mitochondrial membrane) (Ryan and Hoogenraad, 2007). La MMI est constituée d'invaginations, les crêtes mitochondriales, permettant d'augmenter la surface de la MMI. La matrice mitochondriale, quant à elle, contient les nombreuses enzymes nécessaires au cycle de Krebs. Dans la matrice mitochondriale se déroulent aussi d'autres processus biochimiques comme la β -oxydation des acides gras, la synthèse des complexes Fe-S et de l'hème, le cycle de l'urée, et l'oxydation d'acides aminés (Ryan and Hoogenraad, 2007).

Les mitochondries possèdent leur propre ADN (mtDNA) (**Figure 13**), que l'on retrouve dans la matrice mitochondriale. En effet le génome mitochondrial est présent en multiples copies dans chaque structure mitochondriale (1000 à 5000 copies par cellule) et il est hérité de façon strictement maternelle et non-mendélienne. Ce génome consiste en un ADN double brin circulaire de $\pm 16,5$ kb qui encode pour 13 peptides de la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARNt et 2 ARN ribosomiaux (12S et 16S) (Diaz and Moraes, 2008). Les autres gènes codant pour les protéines nécessaires au bon fonctionnement de la mitochondrie doivent donc être transcrits au niveau du noyau cellulaire et les ARNm traduits en protéines dans le cytosol qui seront ensuite importées dans les mitochondries. L'ADN mitochondrial est compacté et organisé dans des structures appelés nucléoïdes qui sont associés à des protéines (par exemple TFAM (mitochondrial transcription factor A)) et sont ancrés et attachés à la membrane mitochondriale interne (Kaufman and Malhotra, 2014).

La production d'énergie se fait par deux processus métaboliques étroitement régulés : le cycle de Krebs et les phosphorylations oxydatives.

Dans le cycle de Krebs, des monomères dérivés d'hydrates de carbones, de lipides et de protéines sont oxydés en produisant des équivalents réducteurs comme le NADH et le FADH₂. Ces deux molécules vont donner leurs électrons à l'ETC (Electron Transport Chain) constituée de 4 complexes protéiques ancrés dans la MMI. Les complexes I et II acceptent respectivement les électrons du NADH et du FADH₂ et les transfèrent à des molécules ayant un potentiel redox plus faible. A la fin de l'ETC, le complexe IV transfère les électrons à l'oxygène moléculaire donnant lieu à la formation d'une molécule d'eau. Tout au long de l'ETC, la nature exergonique des réactions est utilisée pour pomper des protons (H⁺) de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire (au niveau des complexes I, III et IV avec respectivement 4, 2 et 4 protons expulsés) créant ainsi un gradient électrochimique ayant une composante de potentiel électrique et de Δ pH. Ce gradient de protons sert à faire tourner la Fo/F1-ATP synthase (complexe V), un gros complexe protéique et moteur moléculaire capable de phosphoryler l'ADP en ATP (Martin and McGee, 2014).

L'ETC est aussi une source constitutive de radicaux libres dérivés de l'oxygène (ROS) comme les radicaux anioniques superoxyde (O₂^{•-}) et ce, même dans les conditions physiologiques. Les sources principales sont les complexes I et III (Tang et al., 2014). En effet l'oxydation du NADH au niveau du complexe I peut être suivie d'une fuite d'électrons qui sont transférés directement à l'oxygène (réduction monovalente de l'oxygène). Le complexe

I. Introduction

III génère aussi des $O_2^{\cdot(-)}$ si l'oxygène interagit avec des électrons issus du cycle de l'ubiquinone (Blake and Trounce, 2014). En cas de production excessive de mtROS, la cellule est capable d'activer des défenses anti-oxydantes comme les manganèse superoxyde dismutases (MnSOD/SOD2) qui sont rapidement induites et transforment les radicaux anioniques superoxyde se trouvant dans la matrice mitochondriale en H_2O_2 . La CuZnSOD/SOD1 dismute les $O_2^{\cdot(-)}$ dans l'espace inter-membranaire et le cytoplasme. Le H_2O_2 ainsi généré est dégradé par les catalases des peroxysomes et des peroxydases mitochondriales comme la peroxidoxin-3 et -5 et la glutathione peroxydase (Tang et al., 2014). Or le peroxyde généré peut aussi réagir avec l'anion superoxyde $O_2^{\cdot(-)}$ par la réaction Fenton Haber-Weiss, ce qui génère le radical hydroxyl ($OH\cdot$) hautement toxique (Kehrer, 2000). Cette réaction est catalysée par des ions de fer qui sont présents dans la mitochondrie suite à son implication dans la synthèse de l'hème et de complexes Fe-S (Ryan and Hoogenraad, 2007).

Si le stress oxydatif devient trop important, la cellule peut mourir par apoptose, une mort cellulaire dans laquelle les mitochondries jouent aussi un rôle important (voir au point **I.2.3.**). L'intervention des mitochondries dans l'apoptose consiste en la formation d'un pore PTP (composé de la cyclophiline D (CYPD), du transporteur d'adénine nucléotides (ANT), du canal VDAC et de la Fo/F1-ATPsynthase (Kaufman and Malhotra, 2014) et, en cas de stress cellulaire, la libération de molécules pro-apoptotiques telles que le cytochrome c et certaines pro-caspases.

Comme nous l'avons vu, bien que le lieu de stockage principal du calcium cellulaire soit le RE, les mitochondries participent aussi à l'homéostasie calcique. Le rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique consiste en un cycle (influx et efflux) de calcium régulé dans cet organite. Le contrôle étroit de la concentration calcique est important du fait que cet ion est un messenger secondaire participant dans de nombreuses voies de signalisation et un régulateur d'activité enzymatique dans des voies métaboliques fondamentales comme le cycle de Krebs (Martin and McGee, 2014, Rizzuto et al., 1998, Rizzuto et al., 1994). L'influx calcique dans les mitochondries est médié par les canaux calciques voltage-dépendants (VDACs) dans la MME et l'uniprotéine mitochondriale, MCU dans la MMI. En conditions physiologiques, cet influx augmente l'activité des enzymes du cycle de Krebs pour stimuler la production d'énergie. L'efflux fait intervenir des échangeurs comme les antiporteurs H^+/Ca^{2+} (HCLX) et $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ (NCLX). L'échangeur NCLX est situé dans la membrane interne et est particulièrement actif dans des cellules excitables comme les cellules musculaires, contrairement à l'échangeur H^+/Ca^{2+} . Ces échangeurs préviennent une accumulation de Ca^{2+} trop importante dans la matrice et une perte du potentiel membranaire de la MMI (pour plus d'informations voir (Kaufman and Malhotra, 2014).

L'essentiel de ce travail ayant porté sur les changements morphologiques observés au sein de la mitochondrie en réponse à une activation de l'UPR au niveau du RE, nous allons maintenant parcourir l'état de l'art sur les mécanismes qui assurent la fusion et la fission de l'organite lui conférant son caractère dynamique.

III.2. La dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont souvent représentées comme étant des structures isolées réniformes. Cependant, en réalité, dans de très nombreux types cellulaires, les mitochondries forment plutôt un réseau fortement interconnecté et branché, réparti dans l'ensemble du cytoplasme. La morphologie et la connectivité de ce réseau sont continuellement modifiées selon les types cellulaires, les conditions et les besoins énergétiques des cellules (Plecita-Hlavata et al., 2008,

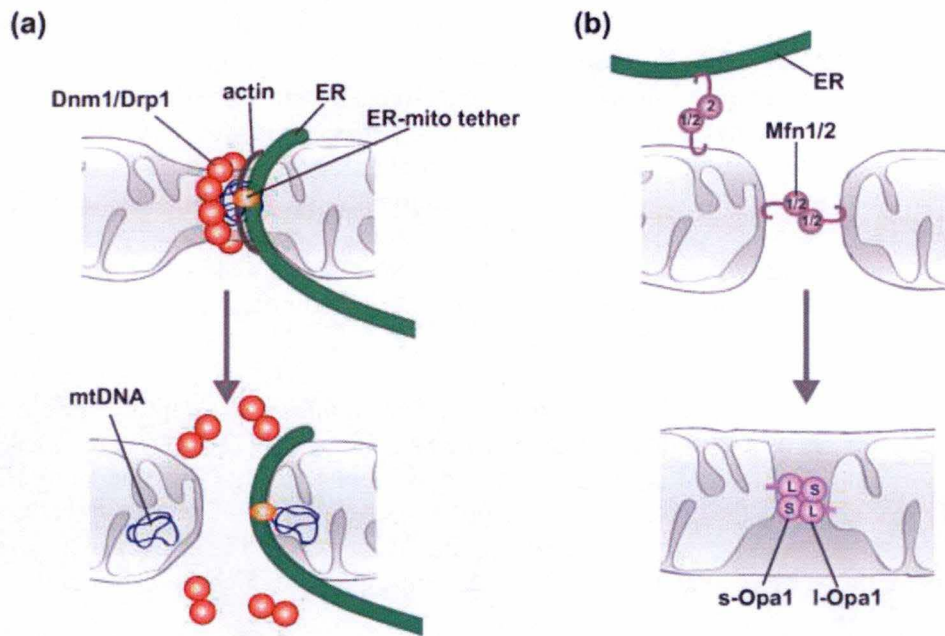


Figure 14 : Les mécanismes à la base de la fission et de la fusion mitochondriale. (a) La fission des mitochondries se base principalement sur un recrutement de Drp1 par des protéines mitochondriales membranaires et une constriction GTP-dépendante des membranes mitochondriales. Des données récentes indiquent cependant qu'il y a aussi intervention de tubules du réticulum endoplasmique qui peuvent, en collaboration avec des formines polymérisant des filaments d'actine, induire une constriction initiale des mitochondries, ce qui facilite le recrutement de Drp1. (b) La fusion des mitochondries nécessite la fusion séquentielle de la MME et de la MMI. La fusion de la MME est régulée par l'interaction des protéines Mfn1 et 2 tandis que la fusion de la MMI implique l'action d'Opa1. La protéine membranaire Mfn2 est aussi localisée au niveau du RE et sert comme protéine d'ancrage entre les mitochondries et le RE (Lackner, 2014).

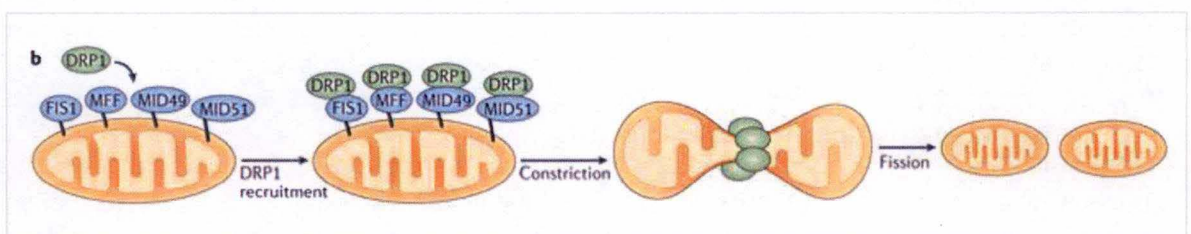


Figure 15 : Les facteurs protéiques impliqués dans la fission mitochondriale. Le recrutement de Drp1 à la MME peut être médié par plusieurs protéines adaptatrices membranaires dont Fis1 (mitochondrial fission 1), Mff (mitochondrial fission factor), MiD49 et MiD51 (mitochondrial dynamics protein of 49 kDa and 51 kDa) (Mishra and Chan, 2014).

I. Introduction

Galloway et al., 2012, Jezek and Plecita-Hlavata, 2009). En effet, la morphologie mitochondriale résulte d'un équilibre finement régulé entre des événements de fission et de fusion mitochondriale tout au long du cycle cellulaire (Lee et al., 2014, Mitra, 2013, Lackner, 2014). La fission de tubules mitochondriaux est nécessaire pour répartir les mitochondries entre les deux cellules-filles (Hermann and Shaw, 1998), assurer le développement embryonnaire (Chen et al., 2007, Mishra and Chan, 2014) et initier l'élimination de mitochondries endommagées par la mitophagie (Twig et al., 2008). Le processus de fusion par contre semble être crucial pour permettre l'échange de composants matriciels comme, par exemple, l'ADN mitochondrial, l'échange de métabolites et le maintien d'un potentiel de membrane élevé (Chen et al., 2005, Chen et al., 2007). En outre, l'équilibre entre la fusion et la fission assure l'homéostasie calcique et est nécessaire pour préserver les fonctions respiratoires des mitochondries (Scorrano, 2013) (**Figure 14**).

III.2.1. La fusion mitochondriale

La fusion des mitochondries est un processus complexe vu qu'il comporte la fusion coordonnée des deux membranes mitochondriales (MME et MMI). La fusion des membranes MME dépend de la Mfn1 (mitofusine 1) et la Mfn2 (mitofusine 2), deux GTPases membres de la superfamille des dynamin-like proteins (Santel and Fuller, 2001). Ces deux protéines possèdent deux domaines transmembranaires qui les ancrent dans la membrane et un domaine GTPase à leur extrémité N-terminale qui pointe vers le cytosol (Chen et al., 2003). Dans leurs extrémités N- et C-terminales, ces protéines comportent des régions coiled-coil (CC1 et CC2) qui par leur interaction permettent le rapprochement et la fusion des MME de 2 fragments de mitochondries (Rojo et al., 2002). La fusion de la MMI est régulée par la protéine transmembranaire Opa1 (Optic atrophy 1) dont un large domaine pointe dans l'espace inter-membranaire. La protéine humaine se présente sous 8 isoformes d'épissage différentes. La fusion nécessite l'intervention de formes longues (non clivées) et courtes (clivées) de Opa1 (Anand et al., 2014). Opa1 régulerait aussi la morphologie des crêtes mitochondriales (DeVay et al., 2009, Scorrano, 2013, Chan, 2006) (**Figure 14**).

III.2.2. La fission mitochondriale

Ce processus dépend de la protéine Drp1 (dynamin-related protein 1), une GTPase cytosolique qui régule aussi la fission des peroxysomes (Yano et al., 2010). Cette protéine est recrutée au niveau de la MME des mitochondries par différentes protéines adaptatrices. Les protéines adaptatrices qui recrutent Drp1 vers la MME sont Mff (mitochondrial fission factor), MiD49 (mitochondrial dynamics protein of 49 kDa), MiD51 (mitochondrial dynamics protein of 51 kDa) et hFis1 (human fission protein1)(Loson et al., 2013, Palmer et al., 2013, Koirala et al., 2013, Zhao et al., 2013) (**Figure 15**).

Le signal de translocation est une libération de Ca^{2+} par la mitochondrie suite à un dysfonctionnement mitochondrial. Cette augmentation de la concentration cytosolique en calcium active la calcineurine, une phosphatase qui déphosphoryle Drp1 (Ser637), ce qui active la GTPase (Cereghetti et al., 2008, Chang and Blackstone, 2010). Pendant la mitose cellulaire, le recrutement de Drp1 est régulé par la phosphorylation de Drp1 par la Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) sur la Ser616 (Taguchi et al., 2007, Alirol et al., 2006, Bossy et al., 2010, Cervený et al., 2007). Une fois arrivée à la membrane mitochondriale, Drp1 s'assemble dans des structures multimériques formant un anneau de constriction autour du tubule mitochondrial. Puis, par une constriction dépendante de l'hydrolyse du GTP, Drp1 est capable de réduire le diamètre de cette structure et ainsi de séparer le tubule mitochondrial en deux fragments (Smirnova et al., 2001).

I. Introduction

- Mff

Mff est une petite protéine qui est fixée par son extrémité C-terminale dans la MME (Scorrano, 2013). Son domaine N-terminal est capable d'interagir avec Drp1. Cette protéine existe sous au moins 9 isoformes différentes chez l'homme (Gandre-Babbe and van der Blik, 2008). Mff forme des foci distincts à la membrane mitochondriale contrairement à hFis1 qui est uniformément exprimée dans la membrane. La fission induite par Mff serait indépendante de hFis1 (Otera and Mihara, 2011, Loson et al., 2013, Otera et al., 2010).

- MiD49 (MIEF2) et MiD51 (MIEF1)

Ces deux protéines sont ancrées dans la MME par leur extrémité N-terminale (Scorrano, 2013, Richter et al., 2014). Elles présentent 45 % d'homologie au niveau de leurs séquences en acides aminés (Palmer et al., 2011) et semblent exercer des fonctions partiellement différentes (Liu et al., 2013) avec MiD49 exerçant une action pro-fusion plus importante en cas de surexpression et formant des oligomères de haut poids moléculaire tandis que MiD51 est principalement trouvé sous la forme de dimères. Les deux protéines sont aussi différemment exprimées dans les tissus humains au cours du développement (Liu et al., 2013). Les protéines MiD peuvent induire la fission mitochondriale en absence de hFis1 et Mff (Loson et al., 2013, Palmer et al., 2013). MiD51 co-localise dans les foci contenant Drp1 et interagit avec cette protéine indépendamment de l'activité GTPasique de Drp1 (Zhao et al., 2011). Cependant, en cas de surexpression des deux protéines dans des cellules MEF, les mitochondries montrent une morphologie allongée suggérant que la fission est entravée (Palmer et al., 2011). En effet un excès de MiD51 semble diminuer la liaison de Drp1 au GTP (Zhao et al., 2011).

- hFis1

La protéine adaptatrice la plus étudiée est hFis1, l'homologue humain de la protéine de levure Fis1 (James et al., 2003, Yoon et al., 2003). Cette protéine est ancrée dans la MME par son seul domaine transmembranaire. La topologie montre que l'extrémité flexible N-terminale pointe vers le cytosol. Le domaine N-terminal comporte six hélices α qui forment un motif TPR (tetratricopeptide repeat-like motif) qui pourrait agir comme domaine d'interaction avec Drp1 (Suzuki et al., 2005, Serasinghe and Yoon, 2008, Stojanovski et al., 2004). En effet, une délétion de ce domaine N-terminal bloque la fragmentation mitochondriale (Yu et al., 2005a). Cette interaction transitoire entre hFis1 et Drp1 a été démontrée *in vitro* dans des cellules COS-7 transfectées avec Myc-hFis1 en utilisant des techniques de FRET et de co-immunoprécipitation (Yoon et al., 2003). Bien que Fis1 soit la protéine la plus étudiée, il a été montré qu'elle ne jouerait qu'un rôle mineur dans le recrutement de Drp1 à la surface des mitochondries dans les levures. En effet, des levures déficientes en Fis1 sont toujours capables d'assurer un niveau basal de fission mitochondriale (Koirala et al., 2013).

- un facteur additionnel : le RE

Friedman et ses collègues ont montré que les tubules du RE jouent un rôle important dans le processus de fission mitochondriale. Ces auteurs montrent qu'il y a un enrichissement de Drp1 aux sites de contact RE-mitochondries. En effet, ces tubules sont capables d'entourer les mitochondries et de réduire ainsi leur diamètre afin de faciliter l'action de Drp1 (Friedman et al., 2011). De cette manière, l'interaction entre le RE et les mitochondries semble définir les futurs sites de fragmentation mitochondriale (Friedman et al., 2011). La constriction initiale des mitochondries par le RE pourrait être régulée par des « formines », des protéines ancrées dans la membrane du RE (Chesaroni et al., 2010). Les formines sont des facteurs protéiques accélérant l'assemblage des filaments d'actine en s'attachant à l'extrémité

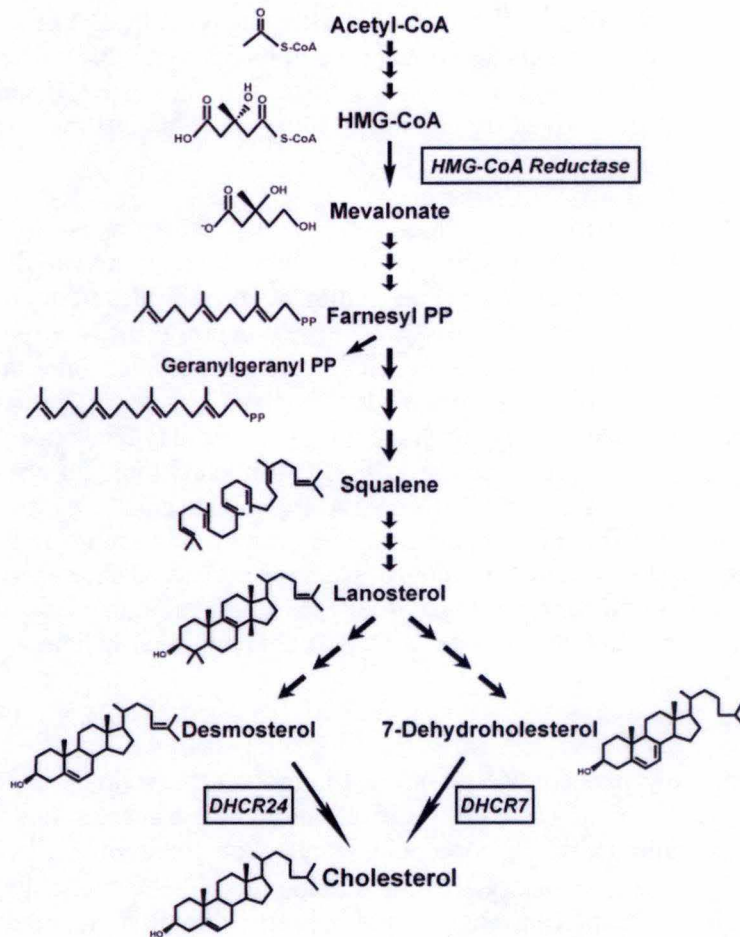


Figure 16 : La voie simplifiée de la synthèse du cholestérol. Cette voie commence par la formation de 3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl CoA (HMG-CoA) et de mévalonate à partir de molécules d'acétyl-CoA. L'étape limitante et la plus régulée est la conversion de HMG-CoA en mévalonate, une réaction catalysée par la HMG-CoA réductase qui est aussi la cible des statines. Le mévalonate est ensuite converti en farnésyl pyrophosphate et squalène. Il s'en suit une cyclisation et une oxygénation du squalène en lanostérol par la squalène monooxygénase et la lanostérol synthase. La réduction de la double liaison Δ^{24} catalysée par la 3 β -hydroxystérol Δ^{24} -réductase (DHCR24) peut conduire à la formation de 7-déhydrocholestérol ou du desmostérol ; les deux molécules sont ensuite réduites en cholestérol par la 7-déhydrocholestérol réductase (DHCR7) ou la DHCR24 respectivement (Cortes et al., 2014).

I. Introduction

croissante du filament. En effet, Korobova et collègues ont trouvé que la formine INF2 (inverted formin 2), est capable de polymériser des filaments d'actine aux sites de contact RE-mitochondries et que la présence du cytosquelette d'actine est nécessaire pour recruter Drp1 (Korobova et al., 2013, Pon, 2013, Hatch et al., 2014).

Partie IV : Le cholestérol

IV.1. Généralités

A côté de son rôle dans la synthèse d'hormones stéroïdiennes (Hu et al., 2010) et de dérivés biliaires (Pellicoro and Faber, 2007), le cholestérol est aussi important pour assurer la structure, la fluidité et la fonction des membranes cellulaires. Ce lipide hydrophobe est essentiellement stocké dans les membranes, et les complexes lipides-protéines comme les gouttelettes lipidiques et les lipoprotéines (Cortes et al., 2014, Soccio and Breslow, 2004). Au sein de la membrane, le cholestérol interagit avec les acides gras des phospholipides et sphingolipides et régule alors la fluidité ainsi que la perméabilité de la membrane. Cependant, il existe des différences subcellulaires très importantes en ce qui concerne la répartition du cholestérol. La membrane plasmique renferme 60-80% du cholestérol cellulaire total (Lange and Ramos, 1983) tandis que les membranes du RE n'en comportent que 0,5-1% (Lange et al., 1999). Un pourcentage de cholestérol comparable peut être retrouvé dans les mitochondries qui sont des organites pauvres en cholestérol puisque la proportion du cholestérol mitochondrial ne représente que 0,5-3% du contenu en cholestérol retrouvé dans la membrane plasmique (Montero et al., 2008, Soccio and Breslow, 2004).

La synthèse du cholestérol a lieu dans le RE à partir d'acétyl-CoA (**Figure 16**). L'étape limitante de cette voie étant la transformation du HMG-CoA (3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A) en mévalonate par l'enzyme HMG-CoA réductase (Cortes et al., 2014). Le cholestérol cellulaire ne provient pas seulement de la synthèse *de novo* mais peut aussi être endocyté à partir de lipoprotéines plasmatiques (Brown and Goldstein, 1986). Cette voie fait intervenir les récepteurs aux LDL (low density lipoproteins) et des vésicules de clathrine. Dans ce cas, les esters de cholestérol contenus dans les lipoprotéines doivent encore être désestérifiés par les lipases lysosomales afin de générer du cholestérol libre et des acides gras libres.

IV.2. Le cholestérol et les mitochondries

Bien que le RE soit principalement impliqué dans la synthèse du cholestérol, les mitochondries peuvent également intervenir dans le métabolisme du cholestérol. Dans les cellules stéroïdogènes, les mitochondries sont responsables de la conversion du cholestérol en pregnénolone, un précurseur d'hormones stéroïdiennes (Issop et al., 2013). Suite à une stimulation hormonale, le cholestérol est transféré du RE dans les mitochondries. Le transport du cholestérol des endosomes vers les mitochondries est encore peu connu mais il semble qu'une intervention des protéines endosomales MLN64 (metastatic lymph node protein 64) (Charman et al., 2010), de NPC1 (Niemann-Pick disease type C1 protein) et de NPC2 (Niemann-Pick disease type C2 protein) (Soccio and Breslow, 2004) soit nécessaire. Le transfert du cholestérol vers la matrice mitochondriale est régulé par le transduceosome (Liu et al., 2006), un complexe multi-protéique comprenant ACBD3 (acyl-CoA binding domain-containing 3), PKA-R1 α (protein kinase A regulatory subunit I alpha), STAR (steroidogenesis acute regulatory protein), TSPO (Translocator protein/mitochondrial peripheral benzodiazepine receptor), et VDAC1 (voltage-dependent anion channel) (**Figure 17**) qui

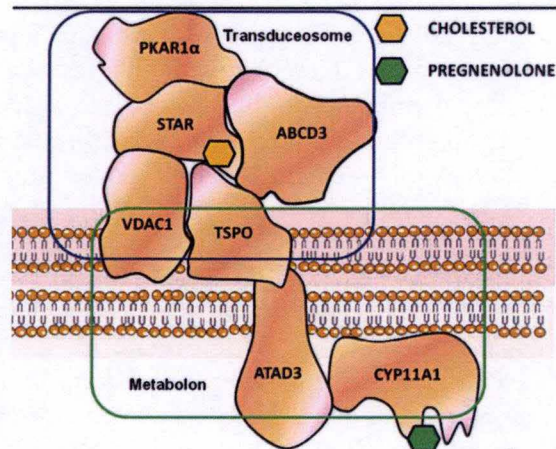


Figure 17: Le complexe protéique mitochondrial impliqué dans la stéroïdogénèse (le transduceosome et le metabolon). En réponse à un stimulus hormonal (pex. ACTH (adrenocorticotrop hormone), LH (luteinizing hormone), FSH (follicule stimulating hormone), les protéines TSPO et VDAC de la MME recrutent ABCD3 et PKA-R1 α en MME des mitochondries. La protéine STAR possédant une séquence d'adressage aux mitochondries est aussi transportée vers la MME où elle interagit avec VDAC et est activée par la PKA (phosphorylation). Ce complexe est appelé transduceome car il transporte le signal cAMP directement vers les mitochondries. Les protéines TSPO, VDAC1, ATAD3 et CYP11A1 font partie du complexe metabolon (800 kDa) qui transforme le cholestérol en pregnénone (Issop et al., 2013).

I. Introduction

transporte le cholestérol à partir des stocks intracellulaires vers la MME et ensuite vers la MMI des mitochondries. Ce complexe est en interaction avec des protéines de la MMI (ATAD3, CYP11A1), ce qui permet de transformer le cholestérol en pregnénolone par CYP11A1, un membre de la famille cytochrome P450 situé à la face matricielle de la MMI.

De manière intéressante dans le cadre de ce travail portant sur les changements morphologiques de la mitochondrie en réponse à un stress du RE et l'activation de l'UPR, Hayashi et ses collègues ont montré qu'il existe une accumulation de cholestérol libre dans des domaines spécifiques des MAMs, des régions appelées « microdomaines semblables aux radeaux lipidiques (lipid raft-like microdomains) » (Hayashi and Su, 2010). Ces zones sont constituées de cholestérol et de lipides comme les céramides ou les gangliosides (Garofalo et al., 2005). Cette découverte suggère que le cholestérol importé dans les mitochondries pourrait ainsi directement provenir du RE en passant par les MAMs. Il est aussi probable que le pregnénolone et la progestérone générés dans les mitochondries passent de nouveau à travers les MAMs vers le RE. D'ailleurs, ces microdomaines « raft-like », situés dans la membrane externe des mitochondries, sont aussi impliqués dans l'apoptose et la dynamique mitochondriale (Sorice et al., 2012, Garofalo et al., 2005). Les deux événements sont étroitement liés comme l'apoptose est souvent associée à une fission accrue des mitochondries (Ciarlo et al., 2010).

Les microdomaines « raft-like » semblent jouer un rôle important dans l'apoptose par le fait que des protéines pro-apoptotiques comme t-Bid et Bak (Ciarlo et al., 2010) sont étroitement associées à ces domaines (Garofalo et al., 2005). Dans des cellules CEM (cellules lymphoblastoïdes humaines), les domaines mitochondriaux comportent des canaux VDAC-1, qui sont des composants du pore apoptotique PTP (Garofalo et al., 2005). La protéine de fission hFis1 fait aussi partie de ces microdomaines, ce qui a été montré par la présence constitutive de hFis1 dans les fractions subcellulaires correspondantes aux microdomaines lipidiques. Dans des cellules CEM traitées par des IgM anti-CD95/Fas induisant l'apoptose, ces mêmes auteurs ont pu mettre en évidence une augmentation de la taille des zones de co-localisation entre hFis1 et GD3 (disialoganglioside 3), un marqueur lipidique des microdomaines, suggérant une réorganisation latérale des microdomaines lipidiques qui rapproche les protéines hFis1. Après induction de l'apoptose de cellules HeLa par des ligands Fas, Ciarlo et collègues ont détecté un recrutement de Drp1 et hFis1 dans les domaines lipidiques mitochondriaux (Ciarlo et al., 2010, Malorni et al., 2007).

Un changement dans le contenu mitochondrial en cholestérol influence aussi le fonctionnement des mitochondries. Des études sur des souris NPC1^{-/-} (maladie de Niemann-Pick de type C1, une maladie neurodégénérative causée par une dérégulation de l'homéostasie du cholestérol) ont montré qu'une augmentation de la concentration en cholestérol membranaire dans les mitochondries induit une diminution du potentiel membranaire ainsi qu'une perturbation de la production d'ATP suite à une inhibition de la Fo/F1-ATP synthase (Yu et al., 2005b). Des changements dans la fluidité membranaire des mitochondries peuvent aussi avoir une influence sur l'ouverture du pore PTP (permeability transition pore) lors de l'apoptose. En effet, un chargement des mitochondries isolées à partir de cellules de foie de rat en cholestérol, effectué en les incubant avec des complexes cholestérol-BSA diminue la fluidité de leur membrane et entrave alors la fonction de l'ANT (adenine nucleotide translocator) un membre du complexe protéique PTP (Colell et al., 2003). Les cellules cancéreuses tirent parti de cet avantage, car de par leur plus forte concentration en cholestérol mitochondrial, elles deviennent insensibles aux agents chimiothérapeutiques agissant sur les mitochondries (trioxyde arsénique, ionidamine, doxorubicine). Les mitochondries enrichies en cholestérol sont aussi résistantes à l'apoptose médiée par tBid/Bax (Montero et al., 2008). Dans certaines maladies neuro-dégénératives comme la maladie d'Alzheimer, il a également

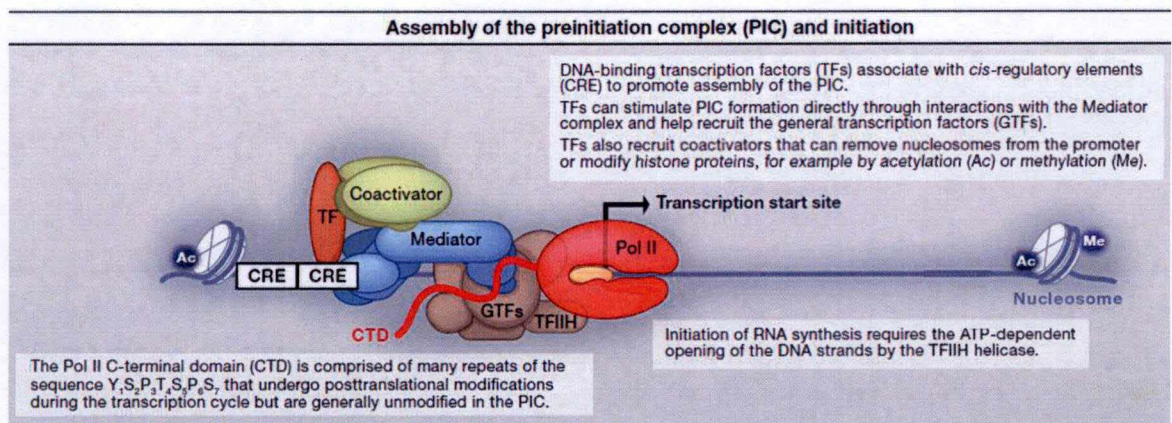


Figure 18: Assemblage du complexe de pré-initiation (PIC) de la transcription et initiation de la transcription dans des cellules de mammifères. Le recrutement de l'ARN polymérase II (Pol II) et des facteurs de transcription généraux (GTFs) est régulé par l'association de facteurs de transcription (TFs) liant des séquences d'ADN spécifiques connus sous le nom d'éléments *cis*-régulateurs (CRE). Les domaines d'activation de la transcription des TFs participent dans de nombreuses interactions avec d'autres protéines co-activatrices qui peuvent remodeler les nucléosomes pour faciliter l'accès à la chromatine (pex : des méthyltransférases). Les TFs interagissent aussi avec le gros complexe médiateur qui fait le pont entre les TFs et la machinerie générale de transcription et stabilise l'interaction entre les GTFs, la Pol II et les co-activateurs. Après formation du complexe PIC, une hélicase faisant partie des GTFs, la TFIIF, sépare les deux brins d'ADN autour du site d'initiation de la transcription (transcription start site, TSS) permettant alors l'accès de la Pol II au brin codant et initiant la synthèse de l'ARN. (Fromm et al., 2013)

I. Introduction

été montré qu'une augmentation de la concentration en cholestérol dans les mitochondries favoriserait aussi une accumulation d'amyloïde β dans les neurones, accélérant la progression de la maladie (Barbero-Camps et al., 2014, Monteiro et al., 2013).

Une des premières hypothèses pour expliquer une modification morphologique des mitochondries en réponse à un stress subléthal du RE étant une adaptation dans la régulation transcriptionnelle des protéines impliquées dans le contrôle de la fusion-fission mitochondriale, nous allons terminer cette introduction en décrivant brièvement les différents facteurs principaux intervenants dans le contrôle de la transcription génique.

Partie V : La régulation transcriptionnelle dans les cellules eucaryotes

V.1. La machinerie basale de transcription et la transcription

Dans les cellules eucaryotes, la transcription des gènes codant pour les protéines et les miRNAs est principalement effectuée par l'ARN polymérase II (ARN Pol II) (Thomas and Chiang, 2006). Cette polymérase est formée d'un complexe de 12 sous-unités protéiques Rbp (RNA B polymérase subunit) et comporte un domaine CTD (C-terminal domain) qui est capable d'interagir avec d'autres protéines comme des histones méthylases ou des histones désacétylases pour réguler l'initiation de la transcription (Buratowski, 2009, Materne et al., 2015). Elle est recrutée au niveau du promoteur d'un gène d'intérêt à l'aide de facteurs de transcription généraux (GTFs, general transcription factors) comme les facteurs TFIID, TFIIH, ... qui forment un complexe protéique (Thomas and Chiang, 2006). La polymérase II ainsi que les facteurs GTF interagissent en plus avec le médiateur, un large complexe multi-protéique (Conaway and Conaway, 2011). L'association de toutes ces protéines forme le complexe de pré-initiation de la transcription (**Figure 18**). Dès que ce complexe s'est assemblé au niveau du promoteur basal, la transcription est alors initiée. Il s'en suit la libération de la machinerie de transcription du promoteur basal avec élongation de l'ARNm dans le sens 5'-3' par ajout de nucléotides (Buratowski, 2009). A la fin de la transcription, la progression de la machinerie de transcription ralentit et quand celle-ci dépasse le signal de polyadénylation, la machinerie de transcription se dissocie de l'ADN et sera recyclée pour la transcription d'un autre ARNm.

V.2. La régulation transcriptionnelle

La régulation de la transcription peut intervenir à toutes les étapes de la transcription (initiation, élongation et terminaison) par l'intervention de plusieurs éléments régulateurs décrits dans les paragraphes suivants.

V.2.1. Les éléments cis-régulateurs

L'élément cis-régulateur le plus important est le promoteur. Cette séquence d'ADN est reconnue par la machinerie de transcription basale et sert aussi de plateforme d'interaction entre les facteurs trans-régulateurs et l'ADN. Il peut être sous-divisé en 3 régions : le promoteur basal (core promoter) (Dikstein, 2011) flanquant ou entourant directement le TSS (transcription start site), le promoteur proximal qui s'étend souvent de -200 à -40 pb en amont de la région transcrite (Rauen et al., 2011, Coulon et al., 2010) et les éléments promoteurs distaux comme des « enhancers » ou des « insulateurs » parfois très éloignés du promoteur proximal (Andersson, 2014).

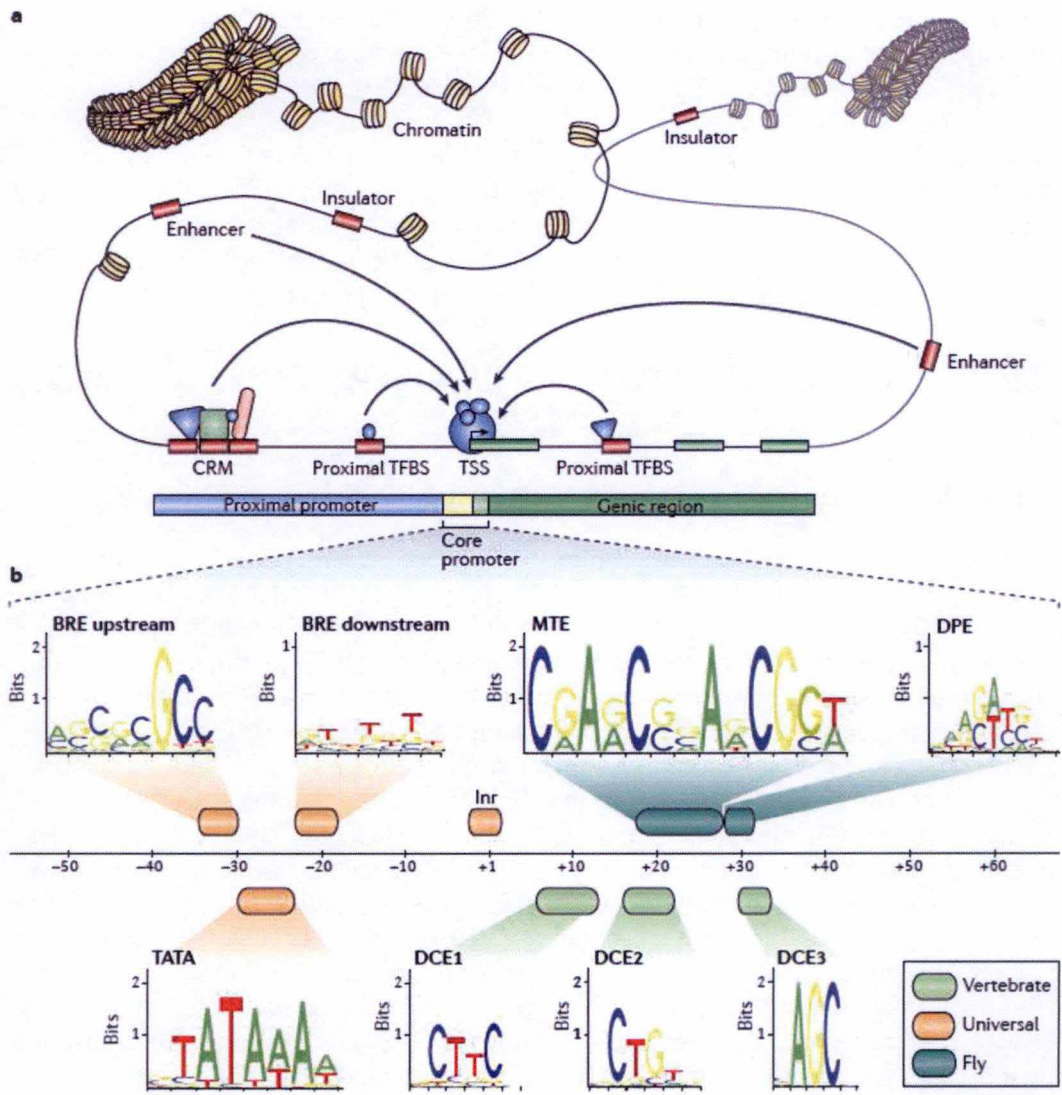


Figure 19 : Un résumé des éléments d'un promoteur et des signaux de régulation.

a) La région flanquant ou entourant le TSS (transcription start site) est souvent subdivisée en un promoteur proximal en amont du TSS et un promoteur basal autour du TSS. Afin de réguler la transcription, des facteurs de transcription peuvent se lier à des séquences d'ADN spécifiques qui sont soit proches du TSS dans le promoteur proximal soit plus éloignées du TSS (dans des régions « enhancer »). Il y a aussi présence d'éléments « insulateurs » qui régulent l'état de condensation de la chromatine. **b)** Des séquences fréquemment retrouvées dans le promoteur basal. La région autour du TSS contient parfois certaines séquences sur-représentées : la boîte TATA et l'Inr (initiator) sont les plus étudiées. Le schéma montre la localisation de ces motifs par rapport au TSS et les séquences consensus. Le motif Inr n'est pas montré étant donné qu'il est très variable. La plupart des promoteurs n'ont qu'un ou plusieurs de ces motifs. Certains motifs sont spécifiques d'une seule espèce. BRE : B recognition element ; DCE : downstream core element; DRE : DNA recognition element; MTE : motif ten element (Lenhard et al., 2012).

I. Introduction

Le promoteur basal est défini comme la région régulatrice minimale qui est indispensable pour assurer l'initiation de la transcription du gène à un niveau basal. Cette région s'étend de -40 à +40 pb du TSS (Dikstein, 2011) et peut comporter plusieurs séquences cis-régulatrices comme la TATA box ou le DPE (downstream promoter element) qui aident à assembler le complexe d'initiation de la transcription. Ce promoteur basal comporte parfois des îlots CpG qui sont des régions de 200-1000 pb dont le contenu en G et C est au moins de 50 % et qui sont la cible de régulations épigénétiques (Antequera, 2003).

Le promoteur proximal régule la transcription de manière plus fine. Cette région comporte plusieurs sites de liaison pour des facteurs trans-régulateurs (TFBS, transcription factor binding sites) (Rauen et al., 2011).

Les éléments promoteurs distaux représentent des régions « enhancer » et « silencer » (Andersson, 2014). Ces régions peuvent se trouver en aval ou en amont de la séquence transcrite et régulent l'activation ou la répression de la transcription par leurs nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription. On pense que le mode d'action de ces régions se fait par l'établissement d'une boucle chromatidienne qui met en contact les facteurs de transcription et les co-régulateurs (co-activateurs ou co-répresseurs) liés directement ou indirectement à la séquence promotrice distale et les protéines de la machinerie de transcription basale (Marsman and Horsfield, 2012). D'autres régions sont connues sous le nom d'insulateurs (Atkinson and Halfon, 2014) et sont responsables de limiter le champ d'action de certains éléments cis-régulateurs (**Figure 19**).

V.2.2. Les éléments trans-régulateurs

Les éléments trans-régulateurs comportent surtout des facteurs de transcription (FTs) et des co-régulateurs. Les facteurs de transcription sont classiquement constitués d'un domaine de liaison à l'ADN, le DBD (DNA-binding domain) et d'un domaine de transactivation TAD (transactivation domain). Certains FTs possèdent, en plus, un ou plusieurs domaines régulateurs (Wingender et al., 2013). Il existe 9 superclasses de TFs, classés selon leur domaine TAD, comme par exemple des FTs à doigt de zinc (zinc finger), les facteurs HTH (helix-turn-helix), et des FTs à domaine de liaison basique. Ces facteurs peuvent agir de différentes façons : ils peuvent réguler de manière directe ou indirecte le recrutement de la machinerie de transcription basale, ou recruter d'autres facteurs de transcription pour assurer leurs fonctions en coopération (Pawlak et al., 2014). Les FTs peuvent aussi influencer la courbure et la topologie de l'ADN, initier, avec d'autres partenaires avec lesquels ils forment des complexes, des modifications épigénétiques, agir selon un mode passif (encombrement stérique, blocage d'interactions entre les « enhancer » et le promoteur, compétition entre FTs,...) ou encore moduler les étapes d'élongation ou de la terminaison de la transcription. Les facteurs de transcription qui régulent l'expression des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale sont encore peu connus. La transcription de la protéine de fusion mitochondriale Mfn2 est par exemple régulée par le facteur MEF2 (myocyte enhancer factor 2) dans des cellules neuronales (Martorell-Riera et al., 2014).

Ces facteurs de transcription agissent souvent avec des co-régulateurs qui sont des co-activateurs ou des co-répresseurs de la transcription (Dasgupta and O'Malley, 2014). Les co-régulateurs, qui sont souvent des gros complexes protéiques, ne se lient pas directement à l'ADN mais peuvent remodeler la chromatine par activité enzymatique (par exemple les histone acétyltransférases (HATs) et les déacétylases (HDACs)) ou peuvent agir comme adaptateurs entre partenaires protéiques (Millard et al., 2013).

V.2.3. Les facteurs épigénétiques

Les changements épigénétiques comportent des méthylations de l'ADN, préférentiellement au niveau des cytosines suivies de guanosine (CpG), des modifications au niveau de la composition, structure ou position des nucléosomes ou l'addition/retrait de nombreux types de groupements chimiques sur la queue des histones (Miceli-Richard, 2014). Ces modifications (phosphorylations, méthylations, acétylations, sumoylation,), dont les effets sur la transcription résultent d'une combinatoire très complexe, ont pour conséquence de changer l'accessibilité à l'ADN, de modifier les interactions entre les facteurs de transcription et leurs sites de liaison ou encore de réguler les rapprochements tridimensionnels entre différentes régions de l'ADN. Ces modifications restent dynamiques tout au long de la vie de l'organisme et sont sensibles aux conditions métaboliques (Gut and Verdin, 2013).

Enfin, une régulation très importante de l'expression génique passe par la transcription d'ARN non codants qui donne lieu à la production de miARNs (microARNs), siARNs (ARN interférants) et lncARNs (long non coding ARN) qui peuvent interférer avec la transcription de gènes et/ou la traduction de protéines (Loscalzo and Handy, 2014). En effet, plusieurs protéines impliquées dans la fusion et la fission des mitochondries sont régulés par des miR's. On peut par exemple citer Drp1 qui est la cible des miR-499 (Wang et al., 2011) et miR-30 (Li et al., 2010), Fis1 qui est régulé par miR-484 (Wang et al., 2012), Mff est inhibé par miR-761 (Long et al., 2013) et miR-27 (Tak et al., 2014), Mfn1 est ciblé par miR-140 (Li et al., 2014a) et miR-19b (Li et al., 2014b) tandis que Mfn2 est contrôlé par le miR-106 (Zhang et al., 2013).

Nous ne développerons pas plus en détails ces multiples niveaux de régulation et de contrôle de l'expression génique. Cependant, nous avons jugé nécessaire de rappeler ces quelques généralités car un des objectifs de ce travail était de tenter de mieux comprendre la régulation de l'expression du gène codant pour la protéine Fis1, qui, comme nous l'avons vu dans le cadre de cette introduction, est un effecteur important de la fission et donc de la fragmentation mitochondriale, un phénotype observé dans les cellules HepG2 en réponse à un stress du RE activant l'UPR. En effet, ce gène est surexprimé (mRNA et protéine) dans ces cellules en réponse à une stimulation par la bréfeldine A.

Objectifs et modèle cellulaire

Objectifs et modèle cellulaire

La vision classique de l'indépendance des différents organites cellulaires a été fortement ébranlée au cours de ces dernières années. Suite à de nombreuses études, il est maintenant clairement démontré que les organites cellulaires sont en perpétuelle interaction (physique et fonctionnelle) et communiquent entre eux, que ce soit de manière indirecte par des voies de signalisation ou de manière directe par des interactions physiques.

Dans ce travail nous nous sommes spécialement intéressés aux interactions existant entre le réticulum endoplasmique et le réseau mitochondrial. D'une part le stress du RE a déjà été étudié depuis longtemps, donnant lieu à la caractérisation de nombreuses voies de signalisation intracellulaires activées comme la réponse UPR (Walter and Ron, 2011, Chakrabarti et al., 2011). D'autre part, il est aussi connu que le réseau mitochondrial est très dynamique et subit de nombreux cycles de fusion et fission en réponse à des stimuli cellulaires (Hermann and Shaw, 1998, Chen and Chan, 2004). Cependant, les études sur les interactions RE-mitochondries ont souvent été limitées à des conditions apoptotiques ne permettant pas d'étudier les effets d'un stress du RE plus physiologique sur les mitochondries. Dans le cadre de sa thèse, Kayleen Vannuvel (thèse en cours, URBC, UNamur) s'est spécialement intéressée aux répercussions d'un stress non létal et transitoire du RE sur la morphologie et la fonction de la population mitochondriale.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons mis au point un modèle de stimulation de cellules HepG2 (cellules d'un hépatocarcinome humain) afin de déclencher une réponse UPR sans induire l'apoptose. Les molécules chimiques utilisées sont la thapsigargine, un inhibiteur des pompes calciques SERCA du RE et la bréfeldine A (BFA), un agent inhibant le transport rétrograde des vésicules entre l'appareil de Golgi et le RE. A l'origine de ce travail, nous savions qu'une stimulation des cellules HepG2 avec 50 nM de thapsigargine pendant 6 h suivie d'un temps de repos de 18 h et une stimulation des cellules avec 500 nM de BFA pendant 10 h avec un temps de repos de 14 h conduit à une activation de la réponse UPR sans induire l'apparition de marqueurs d'apoptose. De plus, dans ces conditions expérimentales, une analyse morphologique à l'aide du programme Image J64 du réseau mitochondrial marqué à l'aide de la sonde Mitotracker a pu mettre en évidence une fragmentation du réseau mitochondrial. Enfin, Kayleen Vannuvel avait montré que l'induction du stress RE par la BFA donne aussi lieu à une augmentation significative de l'expression de hFis1, une protéine qui est impliquée dans la fission mitochondriale.

En se basant sur ces résultats, **les objectifs de ce travail étaient donc 1) d'étudier plus en détails la fragmentation mitochondriale déclenchée par le stress sublétal du RE et 2) tenter de caractériser les mécanismes impliqués dans l'induction de l'expression du gène codant pour Fis-1 dans ces conditions car la régulation de ce gène est totalement inconnue.**

Dans un premier temps nous avons tenté de développer un nouveau modèle permettant d'étudier la réponse du stress du RE sur la population mitochondriale se basant sur une stimulation des cellules par le glutamate, molécule connue pour initier un stress du RE et une fragmentation mitochondriale dans des neurones murins (Kumari et al., 2012). Dans un deuxième temps nous avons essayé d'analyser les mécanismes responsables de la fission mitochondriale en réponse au stress du RE. A cet effet, nous avons tenté de caractériser la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la protéine hFis1 en réponse à une stimulation des cellules HepG2 à la BFA. Dans un troisième temps, nous nous sommes également intéressés à l'abondance protéique d'autres facteurs impliqués dans la fission mitochondriale comme Mff, MiD51 et MiD49. De plus, nous avons tenté de détecter des changements de la concentration en cholestérol dans les mitochondries, un mécanisme qui a

Objectifs et modèle cellulaire

déjà été décrit pour expliquer des perturbations fonctionnelles de la mitochondrie (Colell et al., 2003, Baggetto et al., 1992, Yu et al., 2005). Finalement, en nous basant sur les travaux de Win et collaborateurs, nous nous sommes intéressés à l'état de phosphorylation de la JNK (c-Jun N-terminal kinase), comme les travaux de ces auteurs ont montré qu'en cas de stress du RE dans un contexte apoptotique, la JNK est phosphorylée et interagit avec Sab (SH3 domain-binding protein 5), une protéine localisée à la MME, ce qui perturbe la respiration mitochondriale et déclenche l'apoptose (Win et al., 2014). Ayant montré une phosphorylation activatrice de la JNK dans les conditions d'un stress subléthal du RE, nous avons également étudié les effets d'une inhibition de la JNK sur la fragmentation mitochondriale et le contenu en ROS des mitochondries.

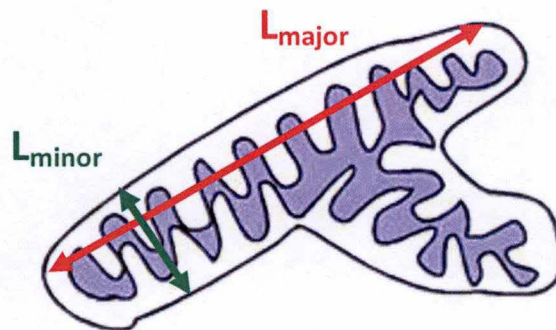
Matériel et Méthodes

Tableau 1 : Matériel requis pour la culture et les stimulations cellulaires

Matériel	Sociétés
Milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) + glucose 1g/L	Gibco by Life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA
PBS (Phosphate Buffered Saline) stérile : 150 mM NaCl, 10 mM tampon $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$; pH : 7,4	Bio Whittaker ® Lonzo, Verviers, Belgique
Boîtes de culture 75 et 25 cm ²	Corning Inc., New York, USA
Centrifugeuse 5702	Eppendorf, Hamburg, Allemagne
Bréfeldine A (stock : 1 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Acide L-glutamique	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

Tableau 2 : Matériel et réactifs nécessaires pour la visualisation du réseau mitochondrial

Matériel	Composition	Sociétés
Chambres de culture Lab-Tek	Nalge Nunc International, Lab-Tek Brand Products, New York, USA	
Tampon KRH (Kreb's Ringer Buffer)	125 mM NaCl 5 mM KCl 1.3 mM CaCl_2 1.2 mM MgSO_4 25 mM HEPES (acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) pH : 7,4	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Sonde MitoTracker Green FM 100 nM	Molecular probes, M7514, Invitrogen by Life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA	
Microscope confocal Leica TCS SP5 II	Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Allemagne	

**Figure 1 : Schéma expliquant le calcul de l'aspect ratio.**

L'aspect ratio (AR) correspond au ratio $L_{\text{major}}/L_{\text{minor}}$ avec L_{major} qui correspond à la longueur d'un tubule mitochondrial et L_{minor} qui correspond à la largeur du tubule mitochondrial. La valeur de l'aspect ratio diminuera si l'état de fragmentation du réseau mitochondrial augmente. (Figure créée sur base des explications fournies dans le manuel d'utilisation du programme ImageJ64 : <http://rsbweb.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>)

II. Matériel et Méthodes

II.1 Culture et stimulation cellulaires:

Les cellules HepG2 (lignée de cellules provenant d'un hépatocarcinome) sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) complémenté avec 10 % de sérum bovin et 1g/L de glucose. La culture se fait dans des boîtes de culture de 75 cm² et de 25 cm² (Corning Inc., USA), dans lesquelles les cellules HepG2 sont cultivées à une densité de 0.2x10⁶ cellules/ml DMEM avec 5 ml DMEM et 15ml DMEM pour les boîtes de 25 et 75 cm² respectivement. Les cellules sont repiquées tous les deux à trois jours. Le milieu de culture est décanté et les cellules sont rincées par 7-10 ml de PBS stérile préchauffé à 37 °C. Une trypsinisation de 2 min (37 °C) à l'aide de 2 ml de trypsine-EDTA (acide éthylène diamine tétracétique, Sigma-Aldrich, USA) permet ensuite de remettre les cellules en suspension. L'action de la trypsine est neutralisée par l'addition de 4 ml de milieu DMEM contenant 10% de sérum bovin. Les cellules sont centrifugées 5 min à 1000 rpm et le surnageant est décanté. Le culot de cellules est resuspendu dans 15 ml de milieu DMEM contenant 10 % de sérum bovin et dilué dans un rapport 1:4 ou 1:6 dans de nouvelles boîtes de culture de 75 cm². Finalement, les cellules sont incubées à 37 °C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. La stimulation des cellules est effectuée en ajoutant de la bréfeldine A (BFA) ou du glutamate au milieu de culture à la concentration voulue (**Tableau 1**).

II.2. Analyse de la morphologie mitochondriale par la sonde MitoTracker green et la microscopie confocale.

II.2.1. Principe:

Cette analyse se base sur la visualisation de la population mitochondriale dans les cellules HepG2 suite à un marquage de l'organite à l'aide de la sonde fluorescente MITOTRACKER Green. La sonde entre dans les cellules vivantes et se fixe aux mitochondries sans tenir compte du potentiel membranaire. Ce marquage permet donc l'étude de l'abondance de la population mitochondriale ou de la morphologie de l'organite suite à une analyse en cytométrie de flux ou une observation en microscopie confocale (Wilson-Fritch et al., 2003).

II.2.2. Méthode

Le jour avant les observations, les cellules sontensemencées dans des chambres de culture Lab-Tek (Nalge Nunc International, Lab-Tek Brand Products, USA) (**Tableau 2**) à une densité de 20000 cellules/chambre. Le lendemain, les cellules sont rincées avec 1ml/chambre de tampon KRH (Kreb's Ringer Buffer, voir composition exacte dans le **Tableau 2**) préchauffé à 37 °C. Ensuite, les mitochondries sont marquées, pendant 30 min à 37 °C à l'obscurité, en incubant les cellules avec la sonde MitoTracker green (Life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA) diluée à 100 nM dans du KRH contenant 2 % de BSA (Bovine Serum Albumin) (1ml / chambre). Les cellules sont alors rincées deux fois avec du KRH contenant 2 % de BSA avant d'être visualisées au microscope confocal Leica TCS SP5 II (Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Allemagne) à 37°C avec λ excitation : 490 nm et λ émission: 516 nm. Les micrographies obtenues sont analysées par le logiciel ImageJ64 afin de calculer « l'aspect ratio » (AR) qui donne une représentation de l'état de fragmentation du réseau mitochondrial (**Figure 1**).

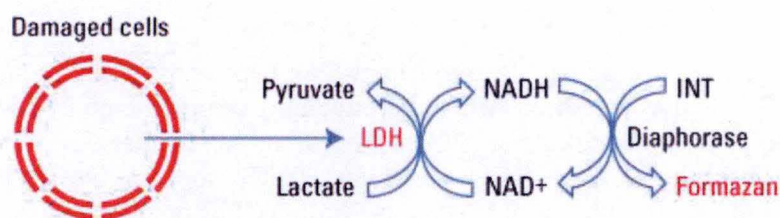


Figure 2 : Schéma expliquant le principe du test LDH. La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme libérée dans le milieu extracellulaire lors d'une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique cellulaire. Elle est responsable de la conversion du lactate en pyruvate dans le milieu extracellulaire. Cette réaction enzymatique génère du NADH qui est utilisé par la diaphorase pour transformer l'INT (un sel de tetrazolium) en formazan chromogène (<http://www.piercenet.com/product/ldh-cytotoxicity-assay-kit>).

Tableau 3 : Matériel requis pour le test LDH :

Matériel	Sociétés
plaque de 24 puits	Costar, Corning Incorporated, Corning, NY, USA
cytotoxicity detection kit bouteille 1 : mélange diaphorase et NAD ⁺ bouteille 2 : mélange d'INT et sodium lactate	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne
Triton X100	Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA
Centrifugeuse 5415R 5	Eppendorf, Hamburg, Allemagne
plaque de 96 puits (96-well ELISA microplate)	Greiner bio-one, Allemagne
xMark microplate spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
chlorure de benzalkonium	Sigma -Aldrich, St Louis, MO, USA

II.3. Test de cytotoxicité : mesure de la libération de la lactate déshydrogénase (LDH)

II.3.1. Principe:

Ce test est utilisé pour quantifier l'effet cytotoxique éventuel d'un traitement sur une culture cellulaire (Korzeniewski and Callewaert, 1983). Il se base sur le principe que les cellules endommagées (entrant en nécrose ou à la fin de l'apoptose) présentent une augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique permettant à l'enzyme cytosolique LDH (lactate déshydrogénase)(140 kDa) d'être libérée dans le milieu de culture. Cette enzyme catalyse l'interconversion (réversible) du pyruvate en lactate en utilisant l'énergie contenue dans le couple $NAD^+/NADH$ (Dashty, 2013). Lors du test, l'activité de la LDH du surnageant est dosée (et sera rapportée à l'activité totale LDH du tapis cellulaire) en ajoutant la diaphorase, une enzyme qui utilise le NADH produit par la réaction d'oxydation du lactate en pyruvate par la LDH pour réduire un sel tetrazolium, le INT (2-(p-iodophényl)-3-(p-nitrophényl)-5-phényltétrazolium), en formazan. Ce formazan est violet et soluble, facile à doser en spectrophotométrie (absorbance à 490 nm) et sa quantité est proportionnelle à l'activité de la LDH (Figure 2).

II.3.2. Méthode:

La libération de la LDH suite à une éventuelle augmentation de la perméabilité de la membrane plasmique est détectée en utilisant le cytotoxicity detection kit (Roche diagnostics GmbH, Allemagne). Les cellules sontensemencées à une densité de 75 000 cellules par puits dans une boîte de culture (Costar, Corning Inc., USA) de 24 puits. Le lendemain, les cellules sont traitées avec différentes concentrations de BFA pendant 10 h ou de glutamate pendant 24 h suivies, respectivement ou non, par un temps de récupération de 14 h pour les cellules incubées à la BFA. Après les traitements, le milieu de culture est collecté et centrifugé à 4 °C (centrifugeuse 5415R 5) pour sédimenter les cellules qui se seraient détachées (5 min à 2000 rpm). Le surnageant obtenu est transféré dans un microtube et le culot est resuspendu dans 250 µl de PBS (Phosphate Buffer Saline; 150 mM NaCl, 10 mM tampon KH_2PO_4/K_2HPO_4 , pH 7,4) contenant 10 % de Triton-X100. Le tapis cellulaire est également lysé pendant 10 minutes à RT sous agitation dans 250 µl de PBS contenant 10 % de Triton-X100. Finalement, le test LDH est effectué dans une plaque de 96 puits (Greiner bio-one, Allemagne) où sont déposés 100 µl de chaque échantillon (culot, surnageant, lysat (dilué 20 x dans du PBS contenant 10% de Triton-X100)). Dans les puits sont ajoutés 100 µl de la mixture de réaction et la réaction est incubée à température ambiante et à l'obscurité. L'absorbance du produit de la réaction colorimétrique est mesurée toutes les 15 min aux longueurs d'onde de 490 et 655 nm (Korzeniewski and Callewaert, 1983). Le contrôle positif utilisé est constitué de cellules incubées pendant 24 h en présence de 0,1 mg/ml de chlorure de benzalkonium (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (Tableau 3). La cytotoxicité, exprimée en pourcentage de libération de la LDH, est déterminée en réalisant le calcul suivant:

$$\% \text{ de cytotoxicité} = 100 * ((C\text{-blc}) + ((S\text{-blc}) * 4) / ((C\text{-blc}) + (S\text{-blc}) * 4) + ((L\text{-blc}) * 20))$$

(C-blc) = différence entre les valeurs d'absorbance obtenues pour les culots de cellules resuspendus de la condition test et le blanc (représenté par du PBS contenant 10 % de Triton-X100)

(S-blc) = différence entre les valeurs d'absorbance obtenues pour les surnageants de la condition test et le blanc (représenté par du DMEM contenant 10 % de sérum bovin et contenant de la LDH)

(L-blc) = différence entre les valeurs d'absorbance obtenues pour les lysats du tapis cellulaire de la condition de test et le blanc (représenté par du PBS contenant 10 % de Triton-X100). Les facteurs 4 et 20 correspondent aux facteurs de dilution du surnageant et du lysat respectivement.

Tableau 4 : Matériel requis pour l'extraction des protéines

Matériel	Composition	Sociétés
Tampon de lyse DLA	-7 M d'urée -2M de thiourée -4% de CHAPS -30mM de tris(hydroxyméthyl)aminométhane -0,16% de PIC et PIB	-Merck KgaA, Darmstadt, Allemagne
PIC (protease inhibitor cocktail)		Roche , Basel, Suisse
PIB (phosphatase inhibitor buffer) :	25 mM de Na ₃ VO ₄ 250 mM de PNPP (4-nitrophénylphosphate) 250 mM de β-glycérophosphate 125 mM NaF	- Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA - RonaCare® Merck KgaA, Darmstadt, Allemagne, 009-004-00-7
Centrifugeuse 5415R	Eppendorf,Hamburg, Allemagne	
Rotator SB2	Stuart ® Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK	
Pierce protein Assay	Thermo Scientific, Rockford, USA	
BSA (Bovine albumin standard), 2mg/ml	Thermo Scientific, Rockford, USA ,23210	
xMark microplate spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA	

Tableau 5 : Matériel et réactifs requis pour l'électrophorèse

Matériel et réactifs	Société
NuPAGE SDS (sodium dodecyl sulfate) Sample Buffer (4x) + 10 % DTT (dithiothréitol)	Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA, NP-0007
gels NuPAGE 4-12% Bis-Tris précollés (1,0mm x 15 wells)	Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA
tampon de migration MES (NuPAGE MES SDS Running Buffer) composition : 50 mM MES (acide 2-(N-morpholino) éthanesulfonique) , 50 mM Tris (hydroxyméthyl)aminométhane) , 0.1% SDS (sodium dodécyl sulfate), 1 mM EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) , pH 7,3	Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA, NP0002
NuPAGE antioxidant ,15 ml	Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA, NP0006
Seebblue® Plus2 Prestained Standard , 500µl	Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA, LC5925
Cuvette d'électrophorèse Invitrogen Novex ® Mini Cell	Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA
Eau milliQ	EMD Millipore, Bellerica, MA, USA
Bloc chauffant Techne Dri-Block ® DB-2D	Bio-Techne, Mc Kinley, Minneapolis, USA

II.4. Western Blot:

II.4.1. Principe:

La technique du Western Blot sert à étudier d'une manière semi-quantitative une ou plusieurs protéines contenues dans un mélange complexe de protéines extrait de cellules. En appliquant un courant électrique, les protéines de la mixture migrent à des vitesses différentes dans un gel d'acrylamide suivant leur taille et leur charge électrique. Les protéines piégées au sein du gel sont ensuite transférées sur une membrane fine afin d'être accessibles à des anticorps. Par la suite, la membrane est mise en contact avec des anticorps primaires spécifiques dirigés contre la protéine d'intérêt et des anticorps secondaires couplés à des molécules fluorescentes qui reconnaissent les anticorps primaires, ce qui permet donc de localiser et quantifier la protéine d'intérêt.

II.4.2. Obtention et dosage de protéines :

Les cellules HepG2 sont cultivées dans des boîtes de 25 cm² à une densité de 1 Mio de cellules/boîte et stimulées à la BFA (**Tableau 4**). Ensuite les boîtes sont placées sur glace et le milieu est décanté. Ils s'ensuivent deux rinçages avec 5 ml de PBS. Afin de collecter les protéines contenues au sein des cellules, les cellules HepG2 sont ensuite lysées en ajoutant 100 µl de tampon de lyse (DLA lysis buffer). Le lysat obtenu est agité pendant 30 minutes sur roue à 4 °C et ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 13000 rpm à 4°C. Le surnageant contenant les protéines intracellulaires est récupéré et congelé à -80°C. Le dosage des protéines est effectué en utilisant la méthode de Pierce (Pierce protein Assay, Thermo Scientific, Rockford, USA) qui se base sur une réaction colorimétrique. Le réactif contient un complexe chromogène métallique dans une solution acide. Ce complexe se lie aux acides aminés chargés positivement, ce qui cause un changement dans la longueur d'absorption du colorant qui est mesuré à 660 nm. Ce dosage se fait dans une plaque de 96 puits (Greiner bio-one, Allemagne). Dans chaque puits sont déposés 8 µl d'eau et 2 µl de l'échantillon protéique. A ce mélange est ajouté 150 µl du réactif de Pierce et la plaque est incubée à RT pendant 5 min pour assurer la stabilisation de la réaction. La lecture de l'absorbance se fait dans le spectrophotomètre xMark (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, USA) à une longueur d'onde de 660 nm. La concentration en protéines de l'échantillon peut alors être déterminée par comparaison à une droite d'étalonnage réalisée à l'aide de concentrations définies en BSA (bovin serum albumine).

II.4.3. Séparation des protéines sur gel par électrophorèse

Un équivalent de 15 µg des extraits protéiques est mélangé à 5 µl du bleu de NuPAGE (colorant permettant de suivre le front de migration) contenant 10 % de DTT (Dithiothréitol : agent réducteur) et le mélange est porté à un volume de 20 µl par de l'eau milliQ. Ensuite, le mélange est chauffé pendant 10 min à 70 °C. Le tampon de migration MES (composition détaillé dans le **Tableau 5**) est préparé en parallèle en ajoutant 50 ml de MES à 950 ml d'eau milliQ. Un volume de 200 ml de ce tampon dilué est repris auquel sont ajoutés 500 µl d'antioxydants. Le gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Novex by Life technologies, USA) précoulé est démoulé et positionné dans la cuvette d'électrophorèse. Après avoir versé les tampons de migration MES dans la cuve d'électrophorèse, les échantillons sont déposés dans les puits du gel et les protéines sont résolues par une migration de 90 min à 150V. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le Seebule Plus2 Prestained Standard.

II.4.4. Transfert et blocage

Les protéines contenues dans le gel sont ensuite transférées sur une membrane Immobilon (Millipore) par un transfert semi-sec. La membrane est d'abord équilibrée pendant 1 min dans

Tableau 6 : matériel requis pour le transfert et blocage

Matériel	Sociétés et composition
membrane Millipore (Immobilon transfer membrane, filter type PVDF (polyvinylidene fluoride) , pore size 0.45 µm)	EMD Millipore, Bellerica, MA, USA
Papiers Whatman (Blotting paper)	Macherey-Nagel GmbH, Düren, Allemagne, REF-2411
Semi-dry blotter	Hofer Inc. , Holliston , USA
Tampon de migration	- 10 ml de tampon de transfert (20X) (NuPAGE® Transfer buffer, Novex by Life technologies, Carlsbad, CA, USA, NP0006) - 20 ml de méthanol 100 % - 400 µl d'antioxydants (Novex) - 169,6 ml d'eau milliQ
Méthanol 100%	Acros organics, Thermo Fisher Scientific Inc. Waltham, USA , 176840025
Odyssey ® blocking buffer (PBS) 500ml	Li-Cor Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA, 927-40000
Boîte LI-COR	Li-Cor Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA

Tableau 7 : matériel requis pour le marquage des protéines à l'aide d'anticorps

Protéine ou matériel	Anticorps primaires	Anticorps secondaires
Fis1	IgG polyclonaux anti-Fis1 de lapin (Sigma sciences prestige antibodies, HPA 017430, dilué 1000 x dans Li-COR + 0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 800CW (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % Tween-20
α -tubuline	anticorps monoclonal anti- α -tubuline de souris (Sigma, USA, T5168, dilué 5000 x dans Li-COR +0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-souris IRDye 680RD (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % Tween-20
Mff	IgG polyclonal anti-Mff de lapin (Proteintech, 17090-1-AP, dilué 500 x dans le tampon enhancer)	anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 800CW (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % Tween-20
MiD49, SMCR7	IgG polyclonal anti-MiD49 de lapin (Proteintech, dilué 2000 x dans Li-COR +0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 800CW (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % Tween-20
MiD51, SMCR7L	IgG polyclonal anti-MiD51 de lapin (Proteintech, 20164-1-AP, dilué 2000 x dans Li-COR +0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 680 (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % Tween-20
Tom 20 (FL -145)	IgG polyclonal anti-Tom20 lapin (Santa Cruz Biotechnology Inc. , Heidelberg, Allemagne, dilué 2000 x dans Li-COR +0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 800CW (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % de Tween-20
JNK	IgG polyclonal anti-JNK lapin (Cell Signaling, Danvers , MA,USA, dilué 1000 x dans Li-COR +0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 800CW (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % de Tween-20
Phospho-JNK	IgG polyclonal anti-Phospho-JNK (Thr 183,Tyr 185) lapin (Cell Signaling, Danvers , MA,USA, dilué 500 x dans Li-COR +0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 800CW (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % de Tween-20
β -actine	IgG monoclonal anti- β -actine souris (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA, dilué 7500 x dans Li-COR +0,1 % de Tween-20)	anticorps de chèvre anti-souris IRDye 680RD (Li-COR) dilué 5000 x dans Li-Cor + 0,1 % Tween-20
Tween 20	BioRad, Hercules, CA, USA, # 170-6531	
SuperSignal ® Western Blot enhancer	Thermo Scientific , Rockford, USA ,46640	

II. Matériel et Méthodes

du méthanol avant d'être immergée dans le tampon de transfert. La construction du « sandwich » comporte séquentiellement: 1 éponge, 2 papiers Whatman, la membrane, le gel, 2 papiers Whatman et 1 éponge. Tout au long du transfert, ce « sandwich » reste trempé au tampon de migration dont la composition est détaillée dans le **Tableau 6**. Le transfert s'effectue dans un Semi-dry blotter (Hoefer Inc., Holliston, USA) pendant 135 min (35 mA pendant les 60 premières minutes et puis 70 mA pour le reste de la durée du transfert). La membrane est ensuite transférée dans une boîte noire Li-COR et bloquée pendant 1 heure avec 10 ml de la solution de blocage de Li-COR diluée 2 fois dans du PBS afin de limiter une adsorption non spécifique des anticorps sur la membrane.

II.4.5. Marquage des protéines avec les anticorps

Les membranes sont mises en contact avec les anticorps primaires appropriés, dilués dans 10 ml de la solution de blocage de Li-COR complétement par 0,1 % de Tween-20 (BioRad), pendant 16 h à 4 °C et sous agitation (**Tableau 7**). Après la fixation des anticorps primaires, la membrane est rincée 3 fois 5 min avec du PBS contenant 0,1 % de Tween-20 (BioRad) afin d'éliminer les anticorps non fixés. Pour l'anticorps anti-MiD49, afin d'augmenter la sensibilité, la membrane est pré-traitée pendant 10 min par une solution du kit Super Signal® Western Blot enhancer (Thermo Scientific) avant le blocage et l'anticorps est dilué dans le tampon fourni dans le kit. Ensuite, les membranes sont incubées avec différents anticorps secondaires couplés à des molécules fluorescentes : des anticorps de chèvre anti-lapin IRDye 800CW et IRDye 680, des anticorps de chèvre anti-souris IRDye 680RD. Les anticorps secondaires sont dilués 5000 fois dans 10 ml de Li-Cor contenant 0,1 % de Tween-20. La membrane est finalement rincée 3 fois 5 min avec du PBS contenant 0,1 % de Tween-20 et 3 fois 5 min avec du PBS afin d'éliminer les anticorps non liés de manière spécifique (visant à réduire le bruit de fond).

II.4.6. Mesure de l'intensité des signaux de fluorescence correspondant aux différentes protéines d'intérêt sur la membrane

Après le marquage aux anticorps, la membrane est séchée à l'obscurité et scannée. Les intensités de fluorescence correspondant aux bandes d'intérêt sont quantifiées avec le système Li-COR Odyssey Infrared (Li-COR Biosciences GmbH, Lincoln, Nebraska, USA). Le logiciel détermine le signal de fluorescence pour chaque bande (exprimé en kCounts). L'intensité de fluorescence de la bande qui est directement proportionnelle à l'abondance de la protéine d'intérêt est ensuite normalisée par rapport à la fluorescence de la bande correspondante à l'immuno-détection de l' α -tubuline ou la β -actine, utilisées comme contrôles de charge. La valeur du « fold change » de l'abondance de la protéine est obtenue en comparant les valeurs de fluorescence normalisées des cellules traitées aux valeurs de fluorescence normalisées des cellules contrôles non traitées.

II.5. Extraction d'ARN total, reverse transcription et PCR en temps réel

II.5.1. Principe :

La technique de PCR quantitative en temps réel se base sur la quantification de la fluorescence d'une sonde tout au long de la réaction d'amplification. L'augmentation du signal fluorescent tout au long des cycles PCR est directement proportionnelle à la quantité initiale de « template », à savoir l'ADNc issu de la reverse transcription des ARNm du gène d'intérêt. La spécificité de la réaction réside dans le fait que des amorces spécifiques de la séquence correspondant au gène d'intérêt sont utilisées pour l'amplification de l'ADNc. Le suivi de l'amplification est basé sur la fluorescence de l'agent intercalant, le SYBR Green I, une molécule dont le comportement optique change et qui devient fluorescente sous excitation

Tableau 8: Matériel et réactifs requis pour l'extraction des ARN

Matériel	Sociétés
RNeasy mini kit: <ul style="list-style-type: none"> - lysis buffer RLT - éthanol 70 % - RNeasy Mini spin column - Buffer RW1 - Buffer RPE - RNase-free water 	Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne, 74106
Qiacube	Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne, 9001292
RNase Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne, 79254
Nanodrop ND-1000 spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA

Tableau 9: Matériel et réactifs requis pour la PCR quantitative

Noms des amorces et Firmes	Séquences	
23 kDa (ribosomal protein L13a (RPL13A) (Integrated DNA technologies IDT, Coralville, USA)	sens: 5'-GCCTACAAGAAAGTTTGCCTATCTG-3'	
	anti-sens: 5'-TGAGCTGTTTCTTCTTCCGGTAGT-3'	
Fis1 (Integrated DNA technologies IDT, Coralville, USA)	sens: 5'-AAT GAT GAC ATC CGT AAA GGC-3'	
	anti-sens: 5'-TCC TCC TTG CTC CCTTTG G-3'	
Firefly luciferase (Integrated DNA technologies IDT, Coralville, USA)	sens: 5' -AAC AGC ATG GGC ATC AGC-3'	
	anti-sens: 5'-CAC GAA GTC GTA CTC GTT GAA G-3'	
Renilla luciferase (Integrated DNA technologies IDT, Coralville, USA)	sens: 5'-GCC TCG TGA AAT CCC GTT AG -3'	
	anti-sens: 5'-CCA TTT CAT CAG GTG CAT CTT-3'	
Matériel	Sociétés	Composition générale
Fast Start Universal SYBR Green Master mix (ROX)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Allemagne	-dNTPs (dATP, dCTP, dGTP et dUTP) -FastStart Taq DNA polymerase -SYBR Green I -colorant de référence ROX (les concentrations exactes sont confidentielles)
Plaques 96 puits (MicroAmp Fast 96-Well Reaction Plates)	Applied Biosystems by Life technologies, USA	
Centrifugeuse Thermo scientific Centra CL3R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	
PCR ViiA7 Protocole : 10 min à 95 °C, 40 cycles d'amplification: 15 s à 95 °C (dénaturation), 1 min à 60 °C (hybridation des amorces) ,1 min à 72 °C (élongation)	Applied Biosystems by Life technologies, Carlsbad, USA	
Eau distillée milliQ	EMD Millipore, Bellerica, MA, USA	

II. Matériel et Méthodes

lorsqu'elle est intercalée dans l'ADN double brin néosynthétisé (Bustin, 2000). La quantification de la fluorescence donne lieu au concept de cycle seuil (cycle threshold, Ct) (Livak and Schmittgen, 2001) ce qui représente le nombre minimal de cycles d'amplification requis afin que la fluorescence mesurée dépasse, de manière significative d'un point de vue statistique, le bruit de fond. Cette valeur du Ct peut donner des indications sur la quantité initiale d'ADNc d'intérêt engagée en la comparant à la valeur de Ct de la protéine 23 kD, un gène de référence (housekeeping gene) qui est défini comme un gène pour lequel la quantité d'ARNm (donc la quantité d'ADNc engagée) reste constante pour la condition expérimentale d'intérêt.

II.5.2. Extraction des ARNs

Pour l'extraction d'ARN total, les cellules HepG2 sont lysées dans 600 µl de tampon de lyse RLT (RLT lysis buffer) du kit RNeasy mini (Qiagen) (**Tableau 8**). Ce tampon est très concentré en guanidine isothiocyanate pour dénaturer des enzymes comme les RNases et les DNases. Les ARNs extraits sont ensuite purifiés à l'aide du Qiacube (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) en utilisant le protocole "Large samples with DNase". La concentration en ARNs est déterminée en déposant 1,5 µl du produit purifié sur le spectrophotomètre Nanodrop. Ce spectrophotomètre pour petits volume mesure l'absorbance de l'échantillon à 260 nm pour quantifier le contenu en acides nucléiques. Les absorbances mesurées à 230 et 280 nm permettent de déterminer, respectivement, le degré de contamination par des sels et des protéines (**Tableau 8**). Le calcul de la concentration en ARN, effectué par le Nanodrop, se base sur la formule de Beer-Lambert : $c = (A * e) / b$

Avec : c : la concentration en acides nucléiques (en ng/µl), A : l'absorbance (en AU, unités d'absorbance), e : le coefficient d'extinction dépendant de la longueur d'onde (en ng-cm/µl), qui correspond à 40 ng-cm/µl pour l'ARN et b : la longueur du trajet optique (en cm) (correspond à 0,1-0.02 cm pour le NanoDrop 1000)

II.5.3. Reverse Transcription des ARNm en ADNc :

La transcription reverse est effectuée en utilisant le kit « Transcriptor First Strand cDNA Synthesis » (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Un équivalent de 2 µg d'ARN est engagé dans la réaction. L'ARN contenu dans l'échantillon est d'abord mélangé à 1 µl d'oligonucléotides-dT (250 ng/µl) et le mélange est porté à 13 µl/condition avec de l'eau RNase free (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). L'incubation de ce mélange à 65 °C pendant 10 min permet la fixation des oligo-dTs aux séquences polyA des ARNm. Après incubation, la solution est placée sur glace et mélangée à une mixture réactionnelle composée (par réaction) de 4 µl de tampon RT, 0,5 µl de reverse transcriptase, 0,5 µl d'inhibiteurs de ribonucléase et 2 µl d'un mélange de dNTPs. Une incubation subséquente de 30 min à 55 °C (bloc chauffant Techne Dri- block®, Bio-Techne, Minneapolis, USA) permet alors la transcription réverse qui est ensuite stoppée par une incubation du mélange pendant 5 min à 85 °C pour dénaturer l'enzyme.

II.5.4. PCR quantitative en temps réel

Les échantillons d'ADNc sont dilués 100 fois dans de l'eau distillée milliQ (EMD Millipore, Bellerica, MA, USA). Un mélange réactionnel pour chaque gène d'intérêt est ensuite préparé. Ce mélange contient (par réaction dans un volume de 25 µl et en format 96 puits) l'amorce anti-sens (2,5 µl à une concentration de 300 nM), l'amorce sens (2,5 µl à une concentration de 300 nM), de l'eau distillée (2,5 µl) et du Fast Start Universal SYBR Green Master mix (ROX) (Roche Diagnostics) (12,5 µl) (**Tableau 9**). Le Fast Start Universal SYBR Green Master mix (2 x concentré) fournit à la réaction des dNTPs, la FastStart Taq DNA polymérase, le SYBR Green I, le colorant de référence ROX et le tampon adéquat pour la réaction. Un volume de 5

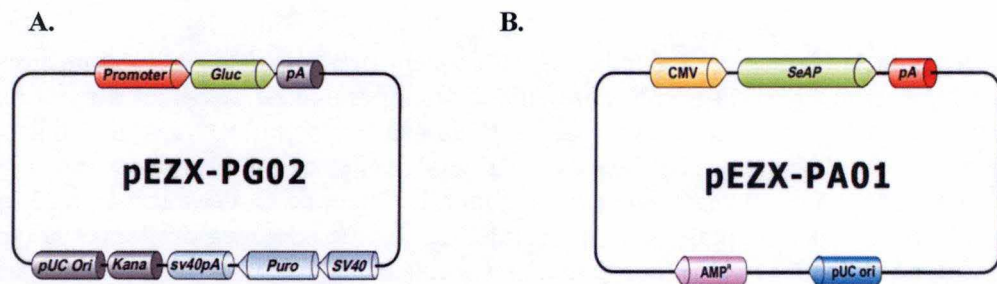


Figure 2 : Représentations schématiques des plasmides utilisés pour le test rapporteur.

(A) Le plasmide GLuc-ON Promoter Reporter pEZX-PG02 encode une luciférase de Gaussia (Gluc) sous le contrôle d'un promoteur d'intérêt (dans ce travail, le promoteur putatif de hFis1 (HPRM20340)). (B) Le plasmide pEZX-PA01 encode une phosphatase alcaline sécrétée (SEAP, secreted embryonic alkaline phosphatase) dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur viral (CMV) et sert comme plasmide contenant un gène rapporteur destiné à estimer l'efficacité de transfection et à comparer son homogénéité entre les conditions expérimentales.

II. Matériel et Méthodes

µl de chaque échantillon d'ADNc dilué 100 fois est déposé dans les puits d'une plaque-96 puits et 20 µl du mélange réactionnel est ajouté. Chaque échantillon est testé en duplicat. Les échantillons sont centrifugés pendant 1 min à 600 rpm dans une centrifugeuse (Thermo scientific Centra CL3R). La PCR quantitative est ensuite réalisée dans l'appareil PCR ViiA7 (Applied Biosystems). Dans le protocole de la PCR, les échantillons sont d'abord soumis pendant 10 min à 95 °C pour activer la polymérase « hot-start », puis à 40 cycles d'amplification (15 s à 95 °C pour la dénaturation des 2 brins d'ADN, 1 min à 60 °C pour permettre l'hybridation des amorces et 1 min à 72 °C pour la polymérisation du brin complémentaire) (**Tableau 9**). Les valeurs de Ct obtenues pour le gène d'intérêt sont ensuite normalisées par celles obtenues pour le gène 23 kD utilisé comme gène de référence, ce qui génère une valeur ΔCt. La valeur ΔCt de la condition de test (cellules traitées) est alors comparée à la valeur ΔCt des cellules contrôles non traitées, ce qui génère une valeur de ΔΔCt. Le changement dans l'abondance des ARNm du gène d'intérêt (fold change) est ensuite calculé en utilisant la formule $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

II.6. Transfection transitoire et mesure de l'activation du promoteur de hFis1 à l'aide d'un gène rapporteur

II.6.1. Principe

Le but de ce test est de détecter une éventuelle augmentation de l'activité du promoteur de hFis1 dans des cellules HepG2 stimulées par du glutamate ou de la BFA.

Les cellules ont d'abord été transitoirement transfectées avec les 2 plasmides suivants :

- le plasmide pEZX-PG02 (Genecopoeia, Rockville, USA). Ce plasmide GLuc-ON Promoter Reporter encode une Gaussia luciférase (Gluc) (pour plus d'informations: <http://www.genecopoeia.com/product/promoter-reporter-clones> et <https://www.neb.com/applications/cellular-analysis/reporter-systems/gaussia-luciferase>) dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur putatif de hFis1 (HPRM20340) ayant une longueur de 1261pb. Cet insert correspond à la séquence promotrice 5' qui s'étend approximativement 1,5 kb en amont et 200 bp en aval du site « start » de la transcription (TSS) du gène (**Figure 2.A**).
- le plasmide utilisé pour normaliser les résultats par l'efficacité de transfection est le pCMV-SEAP (pEZX-PA01) (Genecopoeia, Rockville, USA). Ce plasmide encode une alcaline phosphatase embryonnaire et sécrétée (SEAP, secreted embryonic alkaline phosphatase) dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur viral CMV (Cytomégalovirus) (**Figure 2.B**).

Les enzymes encodées par ces deux plasmides sont sécrétées par les cellules dans le milieu de culture. Ceci permet de mesurer leur activité sans devoir lyser les cellules et constitue une approche expérimentale facilitant les études cinétiques. L'activité des enzymes est dosée en ajoutant leur substrat respectif. Les enzymes catalysent alors une réaction chimique révélée en luminescence et dont l'abondance de RLU (Relative Light Units) est proportionnelle à la quantité de produit formée, elle-même proportionnelle à l'activité (et donc la concentration) en enzyme présente dans le milieu de culture. La mesure de la bioluminescence produite est donc proportionnelle à l'expression et donc à la transcription du gène rapporteur et donc à l'activité du promoteur qui contrôle l'expression du gène.

II.6.2. Transfection transitoire des cellules HepG2

Les cellules HepG2 sont ensemencées dans des boîtes de culture à 12 puits (Corning Costar® Corning Inc., NY, USA) à une densité de 200 000 cellules/puits et incubées à 37 °C pendant 24 h dans une étuve à atmosphère humide contenant 5 % de CO₂. Le lendemain, les cellules

Tableau 10 : Matériel et réactifs requis pour la transfection des cellules HepG2 et la mesure de l'activité enzymatique du gène rapporteur

Matériel	Composition	Sociétés
Superfect transfection reagent		Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne
Secrete-Pair™ Dual Luminescence Assay Kit	- plasmide pEZX-PG02 - plasmide pCMV-SEAP - tampon GL-S, substrat GL - tampon AP, substrat AP - milieu EF1A-PG04	Genecopoeia, Rockville, USA
Boîtes de culture 12-puits		Corning Costar ® Corning Inc., NY, USA
Lucetta™ luminometer		Lonza Group, Basel, Suisse
Tubes luminomètre, 5 ml, 75x12mm		Sarstedt AG, Nümbrecht, Allemagne

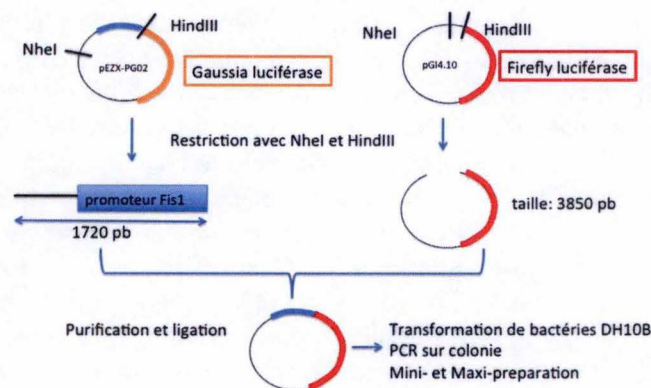


Figure 3: Représentation des étapes requises pour la construction du plasmide rapporteur pGL4.10-Fis1prom. Ceci est en fait un sous-clonage du promoteur de hFis du plasmide pEZX-PG02 dans le plasmide pGL4.10.

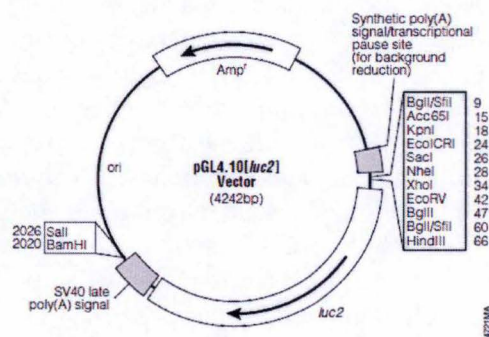


Figure 4: Représentation du vecteur pGL4.10 (luc2). Le plasmide vide contient la séquence codante pour la luciférase de « Firefly » (luc2), plusieurs sites de restriction (BglII/SfiI, Acc651, KpnI, Sall,...), le gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r), une origine de réplication (ori), un site poly (A) artificiel et un site poly(A) du virus SV40 (Simian virus 40). La taille totale du plasmide vide est de 4242 bp. (Figure issue du protocole : <https://www.promega.lu/resources/protocols/product-information-sheets/a/pgl410-vector-protocol/>)

II. Matériel et Méthodes

sont co-transfectées avec les deux plasmides par le Superfect (Superfect transfection reagent, Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne) (**Tableau 10**). Pour chaque puits est préparé un mélange contenant : 1,8 µg de plasmide pEZX-PG02, 0,2 µg de plasmide pCMV-SEAP, 10 µl de Superfect et un volume adéquat de PBS stérile pour porter le mélange à 100 µl. Ce mélange est incubé 10 min à température ambiante pour permettre la formation des complexes ADN-Superfect. Pendant ce temps, les cellules sont rincées 1 fois avec 1 ml de PBS stérile. Les complexes sont ensuite mélangés à 600 µl/puits de DMEM sans sérum puis ajoutés aux cellules. Après une incubation de 4 h à 37 °C et dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS stérile et incubées dans 1 ml de milieu DMEM contenant 10 % de sérum bovin. Le lendemain, les cellules sont incubées pendant 10 h avec différentes concentrations en BFA (500 nM, 1 µM, 2 µM, ou 4 µM).

II.6.3. Dosage de l'activité de la « *Gaussia luciférase* » et de la « *SEAP* »

A la fin de la période de stimulation, le milieu de culture des cellules est transféré dans un microtube. Pour mesurer l'activité de la luciférase, le tampon GL-S (Genecopoeia, USA) (**Tableau 10**) est dilué 10 fois dans de l'eau milliQ. Un volume de 100 µl de tampon GL-S (1x)/réaction est ajouté à 10 µl de substrat GL/réaction. Le mélange (Gluc assay working solution) est ensuite incubé pendant 25 min à l'obscurité. Un volume de 10 µl de milieu de culture est ajouté à 100 µl de la mixture réactionnelle « Gluc assay working solution » et incubé pendant 5 min à l'obscurité avant de faire une lecture au bioluminomètre (LucettaTM luminometer, Lonza Group, Basel, Suisse) pour mesurer le nombre de RLU (relative light unit) correspondant au nombre de photons détectés. Pour doser l'activité de la phosphatase, le milieu de culture prélevé est chauffé pendant 10-15 min à 65 °C et ensuite placé sur glace. Le tampon AP (10x) est dilué 10 fois dans de l'eau milliQ et un volume de 100 µl de tampon AP (1x)/réaction est mélangé à 10 µl de substrat AP/réaction pour obtenir la mixture réactionnelle pour la « *SEAP* ». Après une incubation de 5-10 min à l'obscurité, ce mélange réactionnel est ajouté à 10 µl de milieu de culture. La lecture de luminescence émise par l'activité *SEAP* est effectuée après une incubation de 5 min dans un bioluminomètre LucettaTM luminometer. Le contrôle positif utilisé lors du dosage de l'activité des 2 enzymes est le milieu EF1A-PG04 qui est fourni avec le kit. Ce milieu provient de cellules exprimant la Gluc et la *SEAP* sous le contrôle du promoteur constitutif du gène codant pour le facteur d'élongation 1α (eIF1α) humain, impliqué dans la traduction protéique.

II.7. Construction du plasmide pGL4.10-Fis1prom

II.7.1. Principe (voir Figure 3)

La construction du plasmide rapporteur a été faite en utilisant deux enzymes de restriction (NheI et HindIII) qui coupent dans le site multiple de clonage du vecteur récepteur (pGL4.10 (luc2)) (**Figure 4**) et aussi de part et d'autre de la séquence du promoteur de *Fis1* putatif contenu dans le plasmide pEZX-PG02 (**Figure 2.A**). Le fait que ces deux enzymes génèrent des bouts protrudants non compatibles évite une re-ligation du plasmide sur lui-même et permet de faire un clonage orienté. Les fragments formés par l'étape de restriction sont séparés sur gel d'agarose (7 %) et les bandes d'intérêt sont ensuite excisées (**Figure 5**). Ces bandes sont purifiées en utilisant le kit Wizard SV Gel et PCR Clean-up system (Promega) et une ligation est réalisée. Après la ligation, les plasmides nouvellement formés ont été utilisés pour une transformation dans les bactéries DH10B (*E.coli*) compétentes. Les bactéries transformées sont cultivées pendant 16 h sur du milieu agar solide (2 g de poudre LB (Leeman's Broth) et 1,5 g de poudre Agar dissout dans 100 ml d'eau milliQ) additionné d'ampicilline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, concentration stock : 25 mg/ml) afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide. A partir des colonies obtenues le

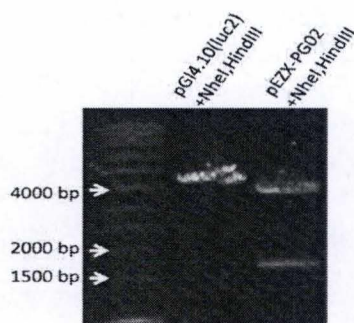


Figure 5: Séparation des produits de restriction sur gel d'agarose 0,7 %. Photographie montrant les différents fragments obtenus après restriction des plasmides pGL4.10 (luc2) et pEZX-PG02 avec NheI et HindIII (pGL4.10 (luc2) clivé (4204 bp) et les deux fragments du pEZX-PG02 clivé : le fragment du promoteur hFis1 (1706 bp) et le reste du plasmide (3856 bp)).

Tableau 11 : Matériel et réactifs requis pour la restriction

Matériel	Sociétés
Tampon Multicore™ 10x	Promega, Madison, USA, R999A
Enzyme de restriction NheI (10 unités/μl)	Promega, Madison, USA
Enzyme de restriction HindIII (10 unités/μl)	Promega, Madison, USA
Acétyl BSA 150 μl, 10 mg/ml	Promega, Madison, USA, R396D
Eau DNase-, RNase- et protease-free, 50 ml	Prime GmbH, Hamburg Allemagne #2900136

Tableau 12 : Matériel et réactifs nécessaires pour la séparation des fragments sur gel d'agarose

Matériel	Sociétés
Ultra pure™ Agarose (100g) (low melting)	Invitrogen, Carlsbad, USA, 16500-100
Tampon TBE (concentré 5x)(0,45M Tris-borate, 0,01 M EDTA, pH 8,3)	Eppendorf, Hamburg, Allemagne
Bromure d'éthidium, 10 ml	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, E1510
Blue/Orange Load Dye (6x) 1ml	Promega, Madison, USA, G190A
Cuve d'électrophorèse GIBCO BRL Horizon 11.14	Gibco by Life technologies, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA
Étalon SmartLadder MW-1700-02	Eurogentec Headquarters Liège Science Park, Seraing, Belgique
Transilluminator UVP	AppliTek scientific instruments, Deinze, Belgique
Caméra : Kaiser RS1	Vilber Lourmat GmbH, Eberhardzell, Allemagne

Tableau 13 : Matériel et réactifs requis pour la purification des bandes excisées du gel

matériel	composition	société
Kit Wizard SV gel et PCR clean-up system	Membrane binding solution Membrane wash solution Colonnes de centrifugation Tubes collecteurs Eau Nuclease-free	Promega, Madison, USA, A9281
Centrifugeuse Allegra™ 21R	Beckman et Coulter, Fullerton, USA	
Plasmide pGL4.10 (luc), 20μg, 1 μg/μl	Promega, Madison, USA, E665A	
Éthanol absolu, 1l	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne	
Eau milliQ	EMD Millipore, Bellerica, MA, USA	

II. Matériel et Méthodes

lendemain suite à la croissance pendant 16 h à 37°C, une PCR sur colonie est réalisée pour identifier les colonies qui contiennent le plasmide avec l'insert d'intérêt. Sur les colonies positives, on réalise une mini-préparation pour purifier les plasmides et les séquencer pour contrôler la séquence du promoteur de Fis1. Les cultures de bactéries contenant les plasmides d'intérêt sont ensuite ensemencées et amplifiées. Une grande quantité de plasmides d'intérêt est alors obtenue par des maxi-préparations réalisées sur les cultures (**Figure 3**).

II.7.2. Restriction

Le mélange réactionnel est préparé sur glace et contient un équivalent de 10 µg de plasmide (pGL4.10 ou PEZX-PG02), 5 µl de tampon MultiCore (10x), 1,25 µl de NheI (12,5 unités enzymatiques) et 1,25 µl de HindIII (12,5 unités enzymatiques), 0,5 µl d'acétyl BSA (sert à stabiliser les enzymes) puis est porté par de l'eau DNase free à un volume final de 50 µl. La réaction de restriction est ensuite réalisée par une incubation de 2 h à 37 °C (**Tableau 11**).

II.7.3. Séparation des produits de restriction sur gel d'agarose 0,7 %

L'électrophorèse sur gel d'agarose est effectuée afin de vérifier si la restriction génère des fragments de taille attendue. Le gel d'agarose 0,7 % est préparé en pesant 560 mg de poudre Ultra Pure Agarose (low melting agarose) qui est ensuite diluée dans 80 ml de TBE (Tris-Borate EDTA) (dilué 5x dans de l'eau milliQ) (**Tableau 12**). Ce mélange est chauffé quelques minutes au four à micro-ondes afin de dissoudre l'agarose. Avant de verser le liquide dans un moule à gels, un volume de 15 µl de bromure d'éthidium (dilué 100x) est ajouté. Après un temps de polymérisation de 45 min, les échantillons contenant 5 µl de plasmides restreints, 5 µl d'eau DNase-free et 2 µl de colorant de charge (Load Dye (6x)) sont déposés dans les puits et l'ADN est séparé par électrophorèse pendant 90 min à 100 V. L'étalon de poids moléculaire utilisé est le SmartLadder (Eurogentec, Belgique). A la fin de la migration, le gel est visualisé sous lumière UV (voir **Figure 5**). En cas de restriction enzymatique non complète, le reste du mélange réactionnel de la restriction (45 µl, voir point **II.7.2.**) est incubé une deuxième fois pendant 1 h à 37°C pour améliorer la restriction. Après ce contrôle de l'efficacité de la restriction, les puits d'un gel sont remplis avec 30 µl du produit de restriction additionné de 6 µl de colorant de charge (6x). La migration par électrophorèse est effectuée comme décrit auparavant. Les bandes de la taille attendue sont ensuite excisées sous lumière UV avec une lame de scalpel.

II.7.4. Purification des bandes excisées du gel (clean-up) par le kit Wizard SV gel et PCR clean-up system

La purification est réalisée selon les instructions du manuel d'utilisation du kit Wizard (**Tableau 13**). Brièvement, un volume de 10 µl de la « Membrane binding solution » est ajouté à environ 10 mg de gel excisé puis les échantillons sont incubés à 55-65 °C jusqu'à ce que le gel soit complètement liquide. Ce gel liquéfié est ensuite transféré sur une colonne. Après une incubation de 1 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 16000 rcf pendant 1 min. L'éluat est décanté et la colonne est rincée deux fois par 700 µl et 500 µl de « Membrane wash solution » (contenant 95 % d'éthanol (Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne)). A la fin, les échantillons sont centrifugés pendant 5 min à 16000 rcf dans des tubes ouverts afin d'évaporer l'éthanol. Ensuite, l'ADN est élué de la colonne et collecté dans 50 µl d'eau Nuclease-free par une centrifugation à 16000 rcf pendant 1 min. L'éluat contenant l'ADN est congelé à -20 °C.

II.7.5. Ligation

La réaction de ligation nécessite la préparation d'un mélange réactionnel contenant: 2 µl de T4 DNA ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA, M0202S), 2 µl de tampon T4 DNA

Tableau 14: Matériel et réactifs requis pour la transformation des bactéries DH10B

Matériel	Sociétés
Poudre Difco™ LB Broth Lennox 500 g	Becton Dickinson and Company, Sparks, USA, REF 240230
Poudre Bacto™ Agar 454 g	Becton Dickinson and Company, Sparks, USA, REF 214010
Autoclave Sanyo	Sanyo Electric Co., Japan
Boîtes Pétri, 94x15, stériles	Greiner bio-one, Allemagne, REF 633179
Étuve à bactéries type 30B	Memmert, Schwabach, Allemagne
Ampicilline (stock : 25 mg/ml)	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA

Tableau 15 : Matériel et réactifs requis pour la PCR sur colonies

Matériel	Séquences	Sociétés
RVprimer3 cw (20 mer), 2ug	5'-CTAGCAAAATAGGCTGTCCC)- 3'	Promega, Madison, USA E4481
Fis1promR	5'-GCA AGC CTC ACA CTA CAG TC-3'	Integrated DNA Technologies IDT, Coralville, USA
5X Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega, Madison, USA M791A	
dNTP Master Mix, 20µM	Eurogentec Headquarters Liège Science Park, Seraing, Belgique	
Go Taq ® G2 DNA polymerase	Promega, Madison, USA, M7848	
Thermal cycler Eppendorf	Eppendorf, Hamburg, Allemagne	

II. Matériel et Méthodes

ligase (New England Biolabs), l'insert et le plasmide récepteur dans un ratio 1:1 et de l'eau DNase-free pour avoir un volume final de 20 µl. Ce mélange est incubé à 16 °C pendant 16 h puis le produit de ligation est congelé à -20°C.

II.7.6. Transformation de bactéries DH10B (*E.coli*) par la méthode du choc thermique

Le milieu liquide LB (Leeman's Broth) est préparé en pesant 20 g de poudre LB qui sont ensuite dissout dans 1 L d'eau milliQ (**Tableau 14**). Le milieu solide LB + Agar se compose de 2 g de poudre LB et de 1,5 g de poudre Agar dissout dans 100 ml d'eau milliQ. Ces deux types de milieu sont ensuite stérilisés par autoclave. Après un léger refroidissement, le milieu solide est additionné d'ampicilline (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) à une concentration de 0,05 mg/ml puis coulé dans des boîtes Pétri sous hotte biologique pour veiller à la stérilité. L'ADN utilisé pour la transformation bactérienne est dilué jusqu'à obtenir 50 ng d'ADN dans 10 µl d'eau stérile (concentration d'ADN: 5ng/µl). Ensuite, 20 µl de cet ADN à 5 ng/µl est dilué 5 fois dans 100 µl de la solution contenant les bactéries DH10B compétentes (concentration finale d'ADN : 1 ng/µl). Les bactéries en contact avec l'ADN sont placées sur glace pendant 10 min avant d'être placées pendant 2 min dans un bloc chauffant porté à 42 °C. Un volume de 300 µl de LB sans antibiotique est ensuite ajouté à la suspension bactérienne et les bactéries sont incubées pendant 30 min à 37°C pour une période de récupération du choc thermique. Les bactéries sont finalement étalées sur le milieu solide (LB+Agar) additionné d'ampicilline (0,05 mg/ml) et sont incubées dans l'étuve à bactéries à 37 °C pendant 16 ou 24 h.

II.7.7. PCR sur colonies

La PCR sur colonie est utilisée pour vérifier que les plasmides des colonies qui se sont formées ont intégré l'insert d'intérêt et discriminer les bactéries qui contiendraient un plasmide refermé sur lui-même. Les primers utilisés sont le RVprimer3, un primer universel s'hybridant sur un des brins d'ADN du vecteur en amont de l'insert, et FispromR, un primer s'hybridant sur l'autre brin à l'intérieur de l'insert (**Tableau 15**). Des bactéries de chaque colonie sont diluées dans 50 µl d'eau DNase-free. Un volume de 20 µl la suspension contenant les bactéries est transféré dans 100 µl de milieu LB (avec ampicilline à la concentration de 0,05 mg/ml) et conservé à 4°C en attendant les résultats de la PCR sur colonies. La PCR sur colonies nécessite la préparation d'une mixture réactionnelle pour chaque clone. Ce mélange comprend: 4 µl de tampon GreenGo Taq, 0,8 µl d'un mélange de dNTP (chaque dNTP est à une concentration stock de 10 mM), 0,4 µl de primer F (RVprimer 3, concentration stock de 27 µM), 0,4 µl de primer R (Fis1prom R, concentration stock de 27 µM), 0,25 µl de GoTaq Polymérase, 9,15 µl d'eau DNase- et RNase-free. Le volume final de 15 µl/clone est déposé dans un tube PCR et un volume de 5 µl de la suspension de bactéries diluées dans H₂O (ou 5 µl d'eau pour le blanc) est ajouté. Les tubes PCR sont ensuite placés dans le thermal cycler Eppendorf et soumis au programme contenant les étapes suivantes: une étape de chauffage de 5 min à 95 °C, 35 cycles d'amplification de 30 s à 95 °C (dénaturation des doubles brins d'ADN), 30 s à 60 °C (hybridation des amorces) et 1 min à 72 °C (réaction d'élongation). La dernière étape est une incubation de 5 min à 72 °C. Un volume de 10 µl du produit de PCR obtenu est déposé sur gel d'agarose (0,7 %) pour vérifier s'il y a eu ou non amplification de la séquence d'intérêt.

II.7.8. Mini-culture et Mini-préparation

Les bactéries positives dans la PCR sur colonies sont transférées dans un tube de mini-culture (17x100 mm, VWR International, LLC Radnor, USA, 60818-725) avec 5 ml de milieu LB additionné d'ampicilline (concentration finale de 0,05 mg/ml) et incubées pendant 16 h à 37°C sous agitation (Innova TM 4300 incubator shaker, New Brunswick Scientific, USA).

Tableau 16 : Matériel et réactifs utilisés pour la mini-préparation des plasmides

Kit	Composition	Sociétés
Qiaprep Spin Miniprep Kit	-Tampon P1 (50 mM, Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) -Tampon P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) -Tampon N3 (4.2 M Gu-HCl (guanidium chloride), 0.9 M acétate de potassium pH 4.8) -Tampon PB (5 M Gu-HCl, 30% isopropanol) -Tampon PE (10 mM Tris-HCl pH 7.5 ,80% éthanol) -Colonnes de filtration	Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne, 27104
Matériel	Sociétés	
tube de mini-culture (17x100 mm)	VWR International, LLC Radnor, USA, 60818-725	
Innova TM 4300 incubator shaker	New Brunswick Scientific, Enfield, USA	
Centrifugeuse Avanti TM J-25	Beckman et Coulter, Fullerton, USA	
Nanodrop ND-1000	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA	

Tableau 17 : Matériel et réactifs utilisés pour la maxi-préparation des plasmides

Kit	Composition	Sociétés
Plasmid Plus Maxi Kit	-Tampon P1 (50 mM, Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) -Tampon P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) -Tampon S3 (la composition exacte est confidentielle) -Tampon BB (la composition exacte est confidentielle) -Tampon ETR (la composition exacte est confidentielle) -Tampon PE (10 mM Tris-HCl pH 7.5 , 80% éthanol) -Colonnes de filtration -Tube extender -Filtre cartridge	Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne, 12165
Centrifugeuse Avanti TM J-25	Beckman et Coulter, Fullerton, USA	
Nanodrop ND-1000 spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA	
Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold	Promega, Madison, USA, A7231	

II. Matériel et Méthodes

La mini-préparation est effectuée selon les instructions du kit Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne, 27104). Un volume de 2 ml de la mini-culture est transféré dans un microtube de 2 ml et les bactéries sont centrifugées pendant 3 min à 6800g (centrifugeuse Avanti TM J-25, Beckman et Coulter, Fullerton USA). Le surnageant est ensuite décanté, le reste de la mini-culture est ajouté et le tout est de nouveau centrifugé pendant 3 min à 6800 g. Le surnageant est décanté et les bactéries sont resuspendues dans 250 µl de Tampon P1 contenant 100 µg/ml de RNase A (**Tableau 16**). Pour la lyse bactérienne un volume de 250 µl de Tampon P2 est ajouté et le tube est inversé plusieurs fois jusqu'à ce que la solution devienne claire. La réaction (hydrolyse alcaline) doit être neutralisée après maximum 5 min en ajoutant 350 µl de Tampon N3 et en inversant immédiatement le tube 4-6 fois. Après une centrifugation de 10 min à 17900 g, le surnageant est repris et déposé sur une colonne Qiaprep spin column. La colonne est soumise à deux cycles de centrifugation de 1 min à 16000 g entrecoupés par des rinçages à l'aide de 500 µl de tampon PB et de 750 µl de Tampon PE (contenant 80% d'éthanol). La dernière centrifugation (1 min à 16000 g) se fait sans couvercle afin d'évaporer l'éthanol du tampon PE. L'ADN retenu dans la colonne est finalement élué dans 50 µl d'eau DNase-free par une centrifugation de 1 min à 16000 g. La concentration en ADN est ensuite déterminée par un dosage au spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA).

II.7.9. Maxi-culture et Maxi-préparation

Des flacons Erlenmeyer stérilisés sont remplis avec 130 ml de milieu LB additionné d'ampicilline (concentration finale de 0,05mg/ml). Un volume de 2 ml de milieu LB+ampicilline à la même concentration et contenant les bactéries de la mini-culture est utilisé pour l'ensemencement de la culture bactérienne. Les bactéries sont ensuite incubées à 37 °C sous agitation pendant 16-18 h (InnovaTM 4300 incubator shaker, New Brunswick Scientific, Enfield, USA). La suspension de bactéries est transférée dans des récipients en plastique qui sont centrifugés pendant 5 min à 7000 g (Centrifugeuse Avanti TM J-25, Beckman et Coulter, Fullerton, USA) (**Tableau 17**). Le surnageant est décanté et les bactéries sont resuspendues dans 5 ml de tampon P1 du kit QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Allemagne). La suspension est ensuite transférée dans un tube de 50 ml et un volume de 5 ml de tampon P2 y est ajouté pour une lyse alcaline. La solution est mélangée par inversion et incubée pendant 3 min à température ambiante (20 °C) avant d'être neutralisée par 5 ml du tampon S3, mélangée et décantée pendant 10 min avant d'être filtrée dans un tube de 50 ml. Pendant ce temps est préparé la pompe à vide (Vac-Man® Laboratory Vacuum Manifold, Promega, Madison, USA, A7231) avec des colonnes de filtration et des adaptateurs (tube extender). Après avoir ajouté 5 ml de tampon BB, la solution est transférée sur la colonne de filtration. La colonne est rincée avec 700 µl de tampon ETR et 700 µl de tampon PE additionné d'éthanol (80%). Ensuite, la colonne est posée sur un tube collecteur et centrifugée pendant 1 minute à 10000 g. Le tube est jeté et la colonne est posée sur un microtube stérile dans lequel l'ADN est finalement élué dans 400 µl d'eau RNase-free par une centrifugation de 1 min à 10000 g. La concentration de l'ADN récupéré est déterminée par une mesure de l'absorbance à 260 nm au spectrophotomètre Nanodrop.

La transfection des cellules HepG2 avec le plasmide pGL4.10-Fis1prom obtenu a été détaillée au point II.6.2.

II.8. Dosage des activités luciférase de Firefly et de Renilla

II.8.1. Principe

Le dosage des deux luciférase se réalise en luminescence à l'aide du kit Dual luciferase reporter assay system (Promega Corporation, Madison, USA). Ce kit permet de doser les activités des deux enzymes (luciférase de Firefly, *Photinus pyralis* et luciférase de Renilla,

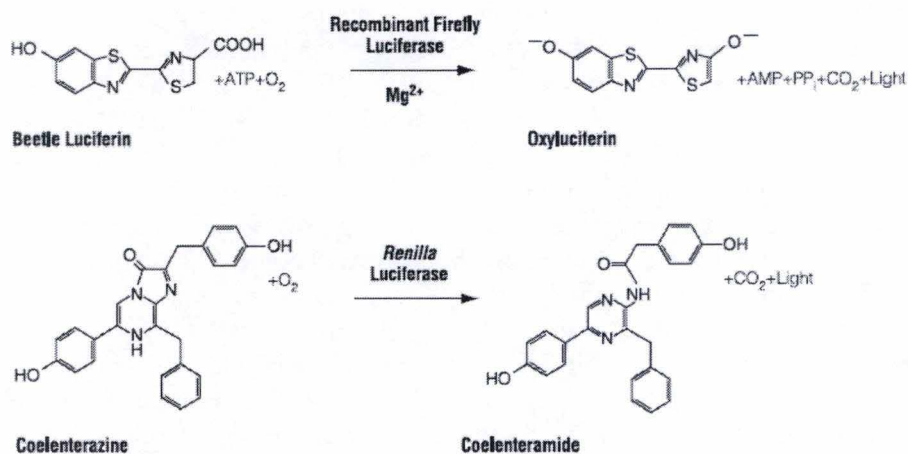


Figure 6: Les réactions bioluminescentes catalysées par les luciférase « Firefly » et « Renilla ». (Figure issue du protocole du kit Dual luciferase reporter assay system (Promega Corporation, Madison, USA) (<https://www.promega.lu/resources/protocols/technical-manuals/0/dual-luciferase-reporter-assay-system-protocol/>))

Tableau 18 : Matériel et réactifs utilisés pour le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle et isopycnique

Matériel	Composition	Sociétés
Boîte de culture de 75 cm ²		Corning Inc, New York, USA
Tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) stérile	150 mM NaCl 10 mM tampon KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ pH : 7,4	Bio Whittaker ® Lonzo, Verviers, Belgique
Tampon HES	255 mM sucrose 1 mM EDTA 20 mM HEPES	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Racloir, 30 cm		TPP Techno Plastic Products Ag., Trasadingen, Suisse
Dounce 7 ml, piston B		Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Centrifugeuse Allegra X-30R		Beckman Coulter Inc, USA
Ultracentrifugeuse L7-35, rotor 50Ti		Beckman Coulter Inc, USA
Tubes d'ultracentrifugation, 16x76mm		Beckman Coulter Inc, USA, REF 35563
Poudre Gentodenz		Gentaur Europe, Bruxelles, Belgique
Ultracentrifugeuse Optima LE-80K, rotor SW 55Ti		Beckman Coulter Inc., USA,

II. Matériel et Méthodes

Renilla reniformis) l'une après l'autre à partir d'un seul échantillon. L'activité de la luciférase de Firefly est dosée en ajoutant le substrat de l'enzyme. La réaction est ensuite stoppée et la réaction catalysée par la luciférase de *Renilla* est dosée suite à l'addition d'un second substrat. La luciférase de Firefly catalyse la réaction d'oxydation de la luciférine en oxyluciférine en produisant de la lumière. La luciférase de *Renilla* catalyse une réaction qui produit de la lumière en transformant la coelenterazine en coelenteramide (**Figure 6**).

II.8.2. Méthode

Les cellules HepG2 sont co-transfectées (selon la méthode détaillée au point **II.6.2**) avec un équivalent de 1,8 µg de plasmide pGL4.10-Fis1 prom codant la luciférase de Firefly dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur de Fis1 et de 0,8 µg de plasmide pRL-TK codant la luciférase de *Renilla* dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur thymidine kinase du virus herpès simplex (Promega Corporation, Madison, USA, E2241) et cultivées dans des boîtes de culture à 12-puits (Corning Inc, New York, USA). Après la transfection, les cellules sont incubées en présence de BFA 0,5 µM pendant 10 h ou 10 h suivi de 14 h de récupération. Au terme des incubations, les cellules sont rincées deux fois avec 1 ml de PBS et un volume de 250 µl de tampon de lyse (Passive Lysis buffer dilué 5x dans de l'eau milliQ, Promega) est ajouté à chaque puits. Les lysats sont récupérés dans un microtube et centrifugés (Centrifugeuse 5415R 5, Eppendorf, Hamburg, Allemagne) à température ambiante pendant 3 min à 13000 rpm. On ajoute ensuite un volume de 20 µl de lysat cellulaire (surnageant) à 60 µl de mixture réactionnelle LAR II (luciférase reagent II) contenant le substrat lyophilisé (luciférine) resuspendu avec le tampon Luciferase assay buffer II (Promega Corporation, E1910, Madison, USA). La luminescence produite par la réaction est immédiatement mesurée à l'aide d'un luminomètre (LucettaTM luminometer, Lonza Group, Basel, Suisse). La réaction catalysée par la luciférase « Firefly » est stoppée et la réaction catalysée par la luciférase de « *Renilla* » est amorcée en ajoutant 60 µl de solution Stop&Glo (diluée 50 x dans le tampon Stop&Glo, Promega) et en mesurant immédiatement la luminescence générée. Les valeurs de luminescence (RLU : relative light unit) de la luciférase de « Firefly » sont ensuite normalisées par celles de la luciférase de « *Renilla* ».

II.9. Préparation d'une fraction cellulaire enrichie en mitochondries par centrifugations différentielle et isopycnique

II.9.1. Principe

Le fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle est utilisé afin d'isoler différentes structures subcellulaires (Peters et al., 1972). La centrifugation permet de séparer les organites selon leur taille et leur densité. La méthode repose sur le principe que plus une particule est grosse ou dense, plus son coefficient de sédimentation est élevé. Le fractionnement commence par une homogénéisation des cellules, une procédure qui rompt la membrane plasmique et libère les structures subcellulaires. L'homogénat obtenu est ensuite centrifugé à des vitesses croissantes afin de sédimenter des particules de plus en plus petites. Néanmoins, les fractions obtenues ne sont pas pures et nécessitent une étape de fractionnement basée sur une technique de centrifugation sur gradient de densité dans laquelle les particules sont séparées selon leur densité par équilibre dans un gradient de densité (De Duve et al., 1955).

II.9.2. Méthode: Fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle

Le protocole utilisé est adapté d'un protocole mis au point pour les adipocytes murins 3T3-L1 et détaillé dans la thèse d'Aurelia de Pauw (URBC, UNamur, 2010). Brièvement, pour chaque condition expérimentale, les cellules HepG2 sont ensemencées dans 4 boîtes de culture de 75 cm² (Corning Inc, New York, USA) (**Tableau 18**). Les cellules sont ensuite traitées 10 h en présence de 0,5 µM BFA. Au terme des incubations, les cellules sont posées sur glace et

Tableau 19 : Matériel et réactifs requis pour le dosage de la cytochrome c oxydase

Matériel	Composition	Sociétés
50 ml Solution substrat	13,5 mg de Cytochrome c 3 ml de tampon phosphate à 0,5 M (150 mM NaCl, 10 mM tampon KH ₂ PO ₄ /K ₂ HPO ₄ ; pH : 7,4) 0,5 ml EDTA à 0,1 M, pH ; 7,4 46,5 ml d'eau distillée	Sigma-Aldrich C-2506, St Louis, MO, USA Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
100 ml Solution de dilution	2 ml Triton X-100 à 2 % 1 ml EDTA à 0,1 M, pH ; 7,4 0,2 ml de tampon phosphate à 0,5 M, pH ; 7,4 96,8 ml eau distillée	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Cuvettes réduites, 10*4*45 mm		Sarsted, Nürnberg, Allemagne, REF 67.742
Dithionite		Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Ferricyanure de potassium		Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Spectrophotomètre Lambda 25 UV/Vis		Perkin Elmer Inc ., Waltham, USA

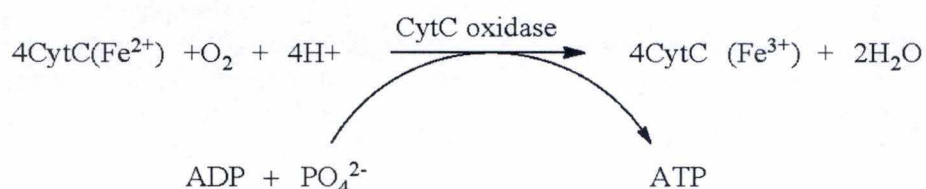


Figure 7 : Réaction biochimique catalysée par la cytochrome C oxydase. (Figure issue de : <http://www.google.com/patents/US20110046538>)

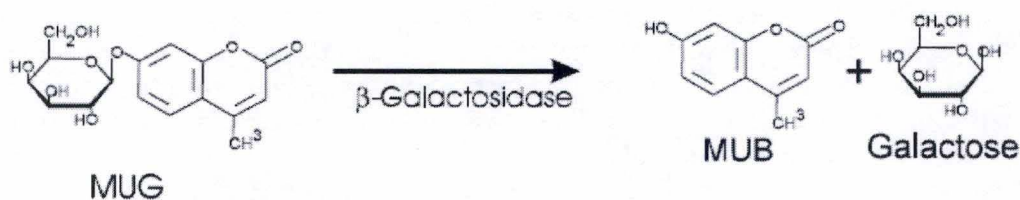


Figure 8 : Hydrolyse de MUG (4-méthylbelliferyl β-D-galactopyranoside) par la β-galactosidase produisant le fluorophore MUB (4-méthylumbellifère) et un galactose. MUB est excité par une longueur d'onde de 372 nm et émis une fluorescence à λ=445 nm. (Figure issue de : <http://www.biotek.com/resources/articles/beta-galactosidase-plate-reader.html>)

II. Matériel et Méthodes

rincées 3 fois par 5 ml de PBS et 3 fois par 5 ml de tampon HES. Les cellules sont ensuite détachées à l'aide d'un racloir (30 cm) dans 1 ml de tampon HES par boîte de culture et transférées dans un Dounce (Dounce de 7 ml, piston B). Les cellules sont homogénéisées en effectuant 10 passages au Dounce et l'homogénat est transféré dans un tube de 15 ml. Le taux de rupture des cellules est vérifié par microscopie optique. L'homogénat H est alors centrifugé à 1700 rpm (= 1000 g) pendant 10 min à 4 °C dans la centrifugeuse Allegra X-30R (Beckman Coulter Inc, USA). Le surnageant E est décanté et le culot N est de nouveau transféré dans un Dounce où la fraction est encore une fois soumise à 6 passages au piston en vue d'augmenter le rendement. La fraction N (renfermant surtout des noyaux, des débris cellulaires et des cellules non homogénéisées) est transférée dans un tube de 15 ml (Corning) et centrifugée pendant 10 min à 4 °C à une vitesse de 2100 rpm (850 g). Le surnageant E est décanté et un volume de 500 µl est prélevé pour faire des dosages enzymatiques (par exemple : la cytochrome C oxydase (enzyme marqueur des mitochondries), la β-galactosidase (enzyme marqueur des lysosomes), la phosphodiesterase alcaline (enzyme marqueur de la membrane plasmique) et l'α-glucosidase alcaline (enzyme marqueur du réticulum endoplasmique), voir point II.10.). Le reste du surnageant E est reparti sur des tubes rigides d'ultracentrifugation et la fraction est centrifugée à une vitesse de 8000 rpm à 4°C (Ultracentrifugeuse L7-35, rotor 50Ti). Le culot M, enrichi en mitochondries, est resuspendu dans 650 µl de tampon HES et le surnageant LPS est réparti dans des tubes rigides. Un volume de 150 µl de la fraction M est transféré dans un tube Eppendorf en vue de faire des dosages enzymatiques tandis que le reste est gardé pour déposer sur le gradient de Nycodenz en vue de réaliser une centrifugation isopycnique. Une centrifugation à 25000 rpm est réalisée pour séparer la fraction PS et d'un culot L qui renferme essentiellement des lysosomes. Le surnageant PS est ensuite centrifugé à 35000 rpm ce qui sépare le culot P (fraction microsomale contenant des peroxyosomes, des fragments de membrane du RE, ...) et le surnageant S qui renferme des petites particules trop légères pour être sédimentées dans ces conditions.

II.9.3. Centrifugation sur gradient de Nycodenz

Afin de construire un gradient de densité, la poudre Gentodenz (Gentaur Europe, Bruxelles, Belgique) est diluée dans du tampon HES pour générer des solutions de densités de 1.05 et 1.24 g/ml. Le gradient continu est obtenu en ajoutant graduellement la solution de haute densité (1.24 g/ml) dans la solution de faible densité (1,05 g/ml) à 4°C. Un volume de 500 µl de la fraction M est déposée à la surface du gradient de Nycodenz et la fraction est centrifugée à 39000 rpm pendant 150 min dans une ultracentrifugeuse Optima LE-80K (Beckman Coulter Inc., USA, rotor SW 55Ti). A la fin de la centrifugation, le tube est découpé en 12 sections. La suspension de chaque fraction est récupérée et transférée dans un microtube et analysée par des dosages enzymatiques pour les enzymes marqueurs (la cytochrome C oxydase, la β-galactosidase, la phosphodiesterase alcaline et l'α-glucosidase alcaline). Les fractions d'intérêt montrant une haute activité de cytochrome c oxydase (enzyme marqueur des mitochondries) sont ensuite soumises à une centrifugation à 8000 rpm pendant 3 min (Ultracentrifugeuse L7-35, rotor 50Ti) pour sédimenter les particules contenus dans le Nycodenz. Le culot obtenu est resuspendu dans du tampon saccharose 0,25 M et congelé à -20°C afin de réaliser les dosages enzymatiques (voir point II.10.), les dosages protéiques et les dosages de cholestérol.

II.10. Dosages d'activité d'enzymes marqueurs

II.10.1 Principe

Des dosages biochimiques de différentes enzymes marqueurs telles que la cytochrome C

Tableau 20: Matériel et réactifs requis pour le dosage de la β -galactosidase

Matériel	Composition	Sociétés
4-méthylbelliferyl β -D-galactopyranoside	10 mM resuspendu dans du DMSO	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, M1633
DMSO (diméthyl sulfoxyde)		Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, M1633
100 ml de tampon citrate à 0,1 M, pH ; 7,4	44,5 ml de solution d'acide citrique à 0,1M 55,5 ml de solution citrate de sodium à 0,1M	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Tampon Stop	Glycine à 0,1M, pH ; 10,4	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Mixture réactionnelle	-Tampon citrate -4-méthylbelliferyl β -D-galactopyranoside (100x) -Triton X-100 (0,5 %)	Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Plaque noire 96-puits		Nalge Nunc International, Roskild, Danmark
Film plastique		Avery Dennison corporation, Glendale, USA
Fluorimètre Fluoroskan ascent		Thermo electron corporation, Waltham, USA

Tableau 21: Matériel et réactifs nécessaires pour le dosage de la phosphodiesterase alcaline

Matériel	Composition	Sociétés
5' monophosphate-p-nitrophényl ester		Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, T4510
Glycine à 0,5 M, pH; 9,6		Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Acetate de zinc à 0,01 M		Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
NaOH 0,1 N		Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Mixture réactionnelle (4 ml pour 20 tests)	3,45 mg de 5' monophosphate-p-nitrophényl ester 1 ml de tampon glycine 1 ml d'acétate de zinc 60 μ l de NaOH à 1N 1,94 ml H ₂ O distillée	Sigma-Aldrich T4510, St Louis, MO, USA Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Cuvettes réduites, 10*4*45 mm		Sarsted, Nürnberg, Allemagne, REF 67.742
Spectrophotomètre Lambda 25 UV/Vis		Perkin Elmer Inc ., Waltham , USA

II. Matériel et Méthodes

oxydase, la β -galactosidase, la phosphodiesterase alcaline et l' α -glucosidase alcaline sont effectués afin d'évaluer l'enrichissement des mitochondries au cours de la purification et évaluer la présence d'autres organites contaminants dans la fraction mitochondriale après fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle et isopycnique. La concentration protéique de chaque fraction est quantifiée par la méthode de Pierce (voir point II.4.2.) Les résultats sont représentés sous forme d'activité spécifique relative (ASR) en fonction du pourcentage cumulé de protéines pour les fractions E à S. Les résultats des fractions 1 à 12 du gradient de Nycodenz sont donnés par la fréquence d'ASR en fonction de la densité de la fraction (g/ml).

II.10.2. Dosage de la cytochrome C oxydase (enzyme marqueur des mitochondries)

Ce test colorimétrique se base sur la diminution de l'absorbance à 550 nm du ferrocyclochrome c (substrat réduit) causée par son oxydation en ferricytochrome c par la cytochrome c oxydase (Storrie and Madden, 1990) (Figure 7). Le substrat de l'enzyme est réduit à 90 % par ajout de dithionite (Tableau 19). Les échantillons des fractions E à S et les 12 fractions obtenus après centrifugation isopycnique sont dilués avec la solution de dilution (les fractions supposées pauvres en mitochondries (E, S, P) sont diluées 2 fois tandis que les fractions riches en mitochondries (N, M) sont diluées 4 fois) et un volume final de 50 μ l de l'échantillon dilué est transféré dans une cuvette réduite contenant 1 ml de mixture réactionnelle contenant le substrat réduit à 90 %. L'absorbance du cytochrome c qui est re-oxydée par l'activité enzymatique de la cytochrome C oxydase est mesurée dans un spectrophotomètre (Perkin Elmer) à une longueur d'onde de 550 nm pendant 1 min et les valeurs y de la droite d'absorbance décroissante sont transformées en logarithme. L'activité enzymatique est calculée avec la formule suivante: $\text{Log}(\text{min}) - \text{Log}(\text{max}) = \Delta\text{Log}$

Avec Log (min) : la valeur logarithmique de la valeur d'absorbance minimale mesurée et Log (max) : la valeur logarithmique de la valeur d'absorbance maximale mesurée

$\text{Activité} = (\Delta\text{Log} * 1,05 * 2 * \text{facteur de dilution de l'échantillon}) / (100 * 0,05)$

Avec : 1,05 μ l étant le volume total de la réaction, 0,05 μ l étant le volume de l'échantillon ajouté et 2 cm étant la longueur du trajet optique.

La condition « blanc » est obtenue en oxydant complètement la solution substrat avec du ferricyanure de potassium.

II.10.3. Dosage de la β -galactosidase (enzyme marqueur des lysosomes)

Ce dosage fluorimétrique se base sur le clivage du substrat non fluorescent 4-méthylbelliferyl β -D-galactopyranoside par la β -galactosidase ce qui génère le fluorophore 4-méthylumbelliférone (Figure 8). Dans les puits d'une plaque 96-puits noire (Nalge Nunc) est déposé un volume de 5 μ l de l'échantillon (fractions E à S et les 12 fractions obtenues après centrifugation isopycnique) non dilué. Ensuite, un volume de 45 μ l de la mixture réactionnelle est ajouté (Tableau 20). La plaque est scellée par un film en plastique et la réaction est incubée à 37 °C et à l'obscurité pendant 1 h. Après l'incubation, la réaction est stoppée par l'addition de 200 μ l de la solution glycine à pH basique et la fluorescence est mesurée au spectrofluorimètre ($\lambda_{\text{excitation}} = 355$ et $\lambda_{\text{émission}} = 460$ nm). Le blanc de ce test est composé du tampon dans lequel la fraction d'intérêt a été resuspendue (le tampon HES pour les fractions E à S, un mélange 1:1 entre la solution Nycodenz lourde (1.24 g/ml) et la solution Nycodenz légère (1.05 g/ml) pour les fractions 1 à 12 obtenues après ultracentrifugation.)

II.10.4. Dosage de la phosphodiesterase alcaline (enzyme marqueur de la membrane plasmique)

La phosphodiesterase hydrolyse le substrat thymidine 5' monophosphate-p-nitrophényl ester et libère alors le p-nitrophénol qui prend une couleur jaune en milieu basique (Figure 9). Un

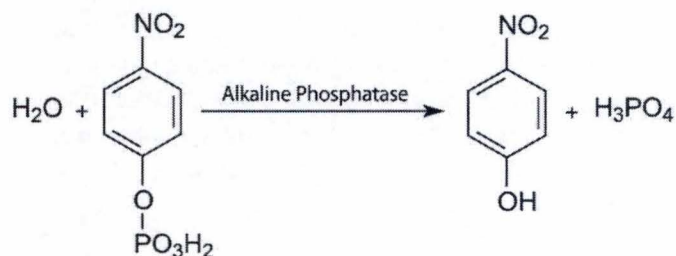


Figure 9: Réaction colorimétrique catalysée par la phosphodiesterase alcaline. Le produit p-nitrophénol qui est libéré possède une coloration jaune (400 nm). <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/n7653?lang=fr®ion=LU>

Tableau 22 : Matériel et réactifs utilisés pour le dosage de l'α-glucosidase alcaline

Matériel	Composition	Sociétés
méthylumbelliféryl-α-glucopyranoside	10 mM méthylumbelliféryl-α-glucopyranoside dilué dans de l'éthanol à 50 %	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA, M9766
Éthanol		Merck KGaA, Darmstadt, Allemagne
Tampon glycine	Glycine 0,5 M, pH; 9,0	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Mixture réactionnelle pour 20 tests	3,12 ml H ₂ O distillée 0,40 ml tampon glycine, pH; 9 0,04 ml Triton X-100 à 2 % 0,04 ml de méthylumbelliféryl-α-glucopyranoside à 10 mM	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Cuvettes 4 faces 45*10*4 mm		Sarsted, Nürnbrecht, Allemagne, REF 67.754
Versa Fluor™ Fluorometer		Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA

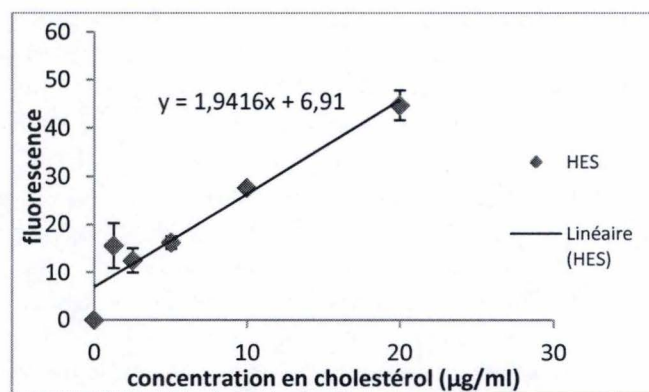


Figure 10 : Exemple d'une droite d'étalonnage utilisée pour le dosage du cholestérol. Cette droite a été établie en faisant des dilutions sériées de la solution de cholestérol standard (2 mg/ml, Invitrogen) dans du tampon HES. Chaque point représente la moyenne ± SD de 8 temps de mesure (0,5h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 8h, et 24h).

II. Matériel et Méthodes

volume de 200 μ l de la mixture réactionnelle (**Tableau 21**) est pipeté dans une cuvette réduite et préchauffé pendant 5 min dans un bain-marie à 25 °C. Pour démarrer la réaction, un volume de 50 μ l de la fraction à tester est ajouté et la réaction est incubée dans le bain-marie jusqu'à ce qu'une couleur jaune apparaisse. La réaction est alors stoppée en ajoutant 1 ml de NaOH à 0,1N. Un volume de 50 μ l de la fraction à tester est également ajouté à la cuvette « blanc » comprenant déjà la mixture réactionnelle (200 μ l) mais la cuvette n'est pas incubée et la réaction est immédiatement stoppée par ajout de 1ml de NaOH à 0,1 N. L'absorbance de la réaction est alors lue au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 400 nm.

II.10.5. Dosage de l' α -glucosidase alcaline (enzyme marqueur du réticulum endoplasmique)

En milieu alcalin, l' α -glucosidase alcaline hydrolyse un substrat, le méthylumbelliféryl- α -glucopyranoside en méthylbelliféron qui est une molécule fluorescente. Cette réaction est arrêtée en ajoutant du tampon stop (voir composition au **Tableau 22**). Un volume de 180 μ l de mixture réactionnelle est pipeté dans des cuvettes en prévoyant un blanc pour chaque fraction analysée. Les tampons de réactions sont préchauffés dans un bain-marie à 37 °C pendant 5 min et la réaction est démarrée par l'addition de 20 μ l de la fraction à tester. Les réactions sont alors poursuivies par une incubation de 2 h à 37 °C dans un bain-marie et sont arrêtées en ajoutant 1,2 ml du tampon stop. Pour les blancs, un volume de 20 μ l de chaque fraction à tester est ajouté à la mixture réactionnelle (180 μ l) mais la cuvette n'est pas incubée dans un bain-marie ; la réaction est immédiatement stoppée par ajout du tampon stop et l'intensité de fluorescence du produit de réaction est mesurée au fluorimètre ($\lambda_{excitation}$ = 365 nm, $\lambda_{émission}$ = 450 nm).

II.10.6. Dosage du cholestérol par le kit Amplex Red cholesterol assay (Invitrogen)

Ce dosage du cholestérol en fluorimétrie se base sur une série de réactions chimiques. Les esters de cholestérol contenus dans l'échantillon sont désestérifiés par la cholestérol estérase pour former du cholestérol libre qui est ensuite transformé en cétone et peroxyde d'hydrogène par la cholestérol oxydase. Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) réagit avec la Horseradish peroxydase (HRP) et l'agent Amplex red pour générer la résorufine, un composé rouge fluorescent qui peut être dosé. Le dosage commence par la préparation d'une courbe standard de cholestérol. A cet effet, 4 μ l de la solution de cholestérol standard (2 mg/ml) sont dilués 100 x dans du tampon HES ou du saccharose 0,25 M. A partir de cette solution sont alors réalisés des dilutions sériées afin d'obtenir des concentrations de 20, 10, 5, 2,5 et 1,25 μ g/ml de cholestérol (voir **Figure 10**). Un volume de 50 μ l de ces échantillons destinés à l'établissement de la courbe standard ou des fractions diluées 5 fois (dans du tampon HES (fractions E à S) ou du saccharose 0,25 M (fractions 1 à 12)) est déposé dans une plaque 96-puits noire (Nalge Nunc). Le contrôle positif utilisé est une solution de H_2O_2 (10 μ M) fournie avec le kit. A chaque puits est ensuite ajouté 50 μ l de la mixture réactionnelle et la plaque est incubée pendant 1 h à l'obscurité et à 37 °C. Au terme de l'incubation, la fluorescence émise est mesurée au fluorimètre aux longueurs d'onde d'excitation (578 nm) et d'émission (612 nm) (**Tableau 23**).

II.11. Quantification de la production d' $O_2^{\cdot(-)}$ mitochondrial par cytométrie de flux

Ce test se base sur un marquage spécifique des mitochondries avec la sonde MitoSoxTM Red fluorescent specific dye (Molecular Probes, Life Technologies) qui devient rouge fluorescente après oxydation par $O_2^{\cdot(-)}$ (la sonde n'est pas oxydée par d'autres ROS ou RNS (reactive nitrogen species))(Mukhopadhyay et al., 2007). La production relative d'anions superoxyde

Tableau 23 : Matériel et réactifs requis pour le dosage du cholestérol dans les fractions subcellulaires

Matériel	Composition	Société
Kit Amplex Red cholesterol assay	-Amplex red reagent (1 mg) -Dimethylsulfoxyde (DMSO) (1,3 ml) -Horseradish peroxidase (HRP) (200 U) -Peroxide d'hydrogène (H ₂ O ₂) (500 µl de solution ~3%) -Reaction Buffer 5x (20 ml de phosphate de potassium 0,5 M, pH ; 7,4, NaCl à 0,25 M, acide cholique à 25 mM, Triton X-100 à 0,5 %) -Cholestérol oxidase (50 U) -Cholestérol esterase (50 U) -Cholestérol de référence pour établissement d'une courbe standard (100 µl à 2 mg/ml) -Sel de Résorufine (470 µg)	Invitrogen, Carlsbad, USA ,A12216
Mixture réactionnelle (pour 20 puits)	15 µl Amplex red 10 µl Horseradish peroxidase 10 µl cholesterol oxidase 1 µl cholesterol esterase 964 µl de tampon de réaction (dilué 5x)	
Plaque 96-puits noire		Nalge Nunc International, Roskild, Danmark
Fluorimètre Fluoroskan Ascent™		Thermo electron corporation, Waltham, USA

Tableau 24 : Matériel et réactifs requis pour la quantification de la production O₂⁽⁻⁾ mitochondrial par cytométrie de flux

Matériel	Composition	Sociétés
plaques de culture 12 puits		Corning Inc., NY, USA
MitoSox™ Red fluorescent specific dye		Molecular Probes, Life Technologies, USA
tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution)	0,137 M NaCl 5,4 mM KCl 0,25 mM Na ₂ HPO ₄ 0,44 mM KH ₂ PO ₄ 1,3 mM CaCl ₂ 1,0 mM MgSO ₄ 4,2 mM NaHCO ₃	Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
antimycine A		Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine)		Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA
Centrifugeuse 5415R 5		Eppendorf, Hamburg, Allemagne
Cytomètre de flux FACScalibur		BD Biosciences, BJ, USA
BD CellQuest™ Pro software		BD Biosciences, BJ, USA
SigmaStat		Jandle Scientific, Allemagne

II. Matériel et Méthodes

mitochondriaux a été mesurée dans des cellules HepG2 incubées en présence ou en absence de 500 nM de BFA pendant 30 min, 1, 2 ou 10 h. Les cellules ont été ensemencées à une densité de 250 000 cellules/puits dans des plaques de culture 12 puits (Corning Inc., NY, USA). Au terme des incubations, les cellules ont été marquées pendant 20 min à 37°C avec 5 µM de MitoSoxTM Red fluorescent specific dye (Molecular Probes, Life Technologies) dilué dans du tampon HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) (voir la composition dans le **tableau 24**). Le contrôle positif ont été des cellules HepG2 incubées avec l'antimycine A (10 µM pendant 10 min) et le contrôle négatif ont été des cellules HepG2 incubées avec du FCCP (Carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) (20 µM pendant 20 min). Les cellules ont ensuite été rincées avec 500 µl de PBS, puis trypsinisées avec 300 µl de trypsine-EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) (Gibco, Life technologies, Thermo Fisher Scientific, USA) (2 min à 37°C) et centrifugées (1000 rpm pendant 5 min) avant d'être resuspendues dans 500 µl de tampon HBSS. Les cellules ont été analysées par cytométrie de flux (FACScalibur (BD Biosciences, BJ, USA)) en utilisant le canal FL2-H. Les données ont été analysées par le programme informatique BD CellQuestTM Pro software (BD Biosciences, BJ, USA). Pour chaque condition a été déterminé le MCFR (Mean channel fluorescence ratio) en calculant le ratio entre la moyenne de l'intensité de fluorescence de MitoSox et la valeur moyenne de l'intensité de l'autofluorescence mesurée pour les cellules correspondantes non marquées à la sonde MitoSox, utilisées comme contrôle négatif. Les résultats sont représentés comme moyenne ±SD de trois expériences indépendantes (n=3). Les analyses statistiques ont été effectuées en appliquant une ANOVA 2 suivi d'un test Holm-Sidak déterminé par le programme informatique SigmaStat (Jandle Scientific, Allemagne).

Résultats et discussions

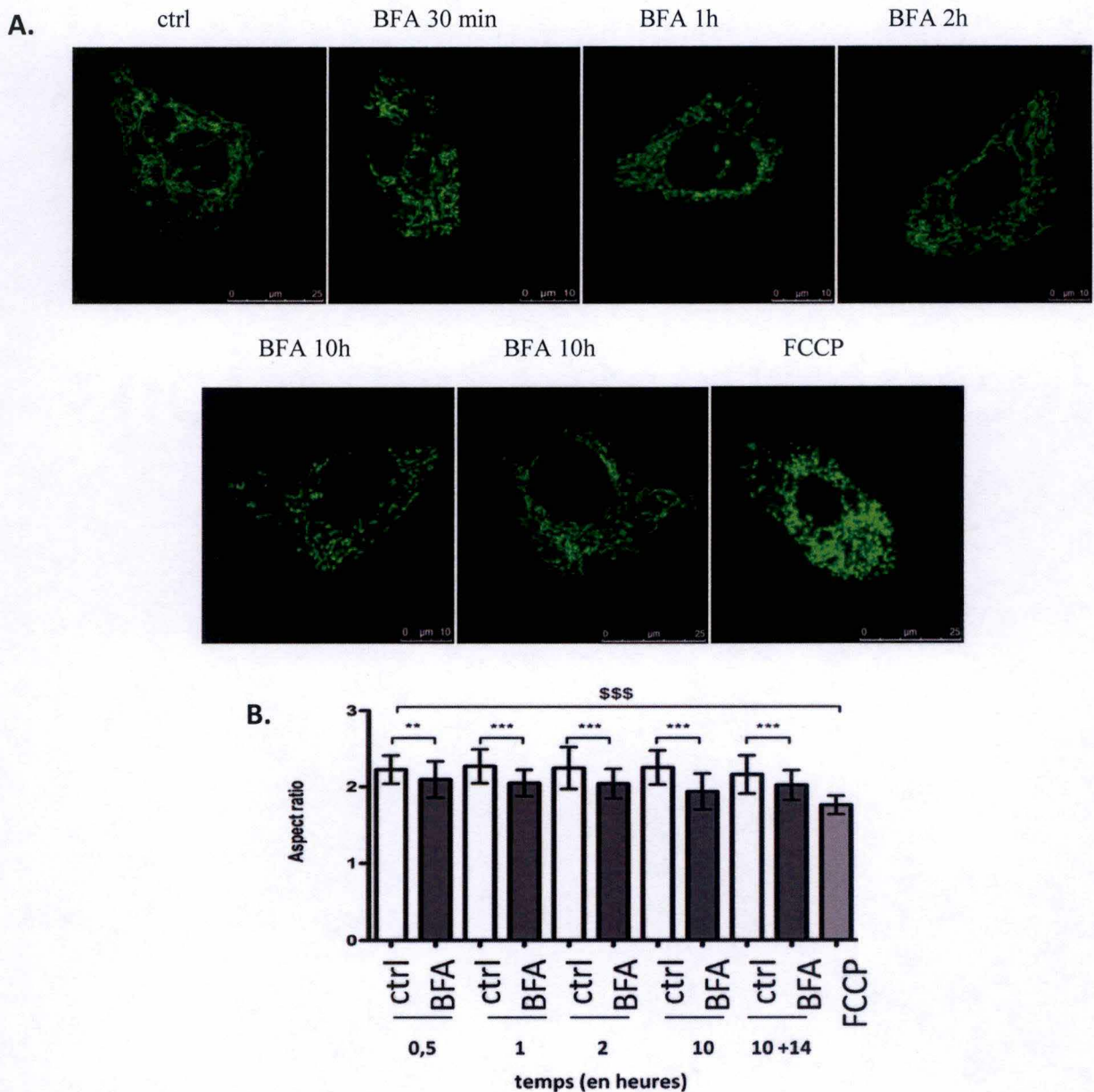


Figure 1 : Effet d'un traitement à la BFA sur la morphologie mitochondriale (*expérience réalisée dans le cadre de la thèse de K.Vannuvel, 2015*)

(A) Des cellules HepG2 ont été stimulées avec 500 nM de BFA pendant 30 min, 1, 2, 10 h ou 10 h suivies de 14 h de récupération sans molécule. La population mitochondriale a été marquée par la sonde Mitotracker Green et les cellules ont été visualisées à l'aide d'un microscope confocal. Des cellules incubées en présence d'un agent découplant comme le FCCP (carbonyl cyanide-4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazine) (20 μ M pendant 30 min) ont été utilisées comme contrôle positif de la fragmentation mitochondriale. (B) Quantification de la fragmentation du réseau mitochondrial suite à un traitement des cellules à la BFA. Les micrographies obtenues par microscopie confocale ont été analysées par le programme ImageJ64 pour calculer l'aspect ratio (le rapport entre la longueur longitudinale et la largeur équatoriale des tubules mitochondriaux). Les données sont exprimées comme la moyenne \pm SD, calculées sur au moins 40 cellules par condition (avec au moins 100 événements/cellule) provenant de 3 expériences indépendantes (n=3), **, ***, \$\$\$: différences statistiquement significatives par rapport aux contrôles correspondant déterminé par une analyse ANOVA 2 suivi d'un test Holm-Sidak avec, respectivement, $p < 0,01$ et $p < 0,001$.

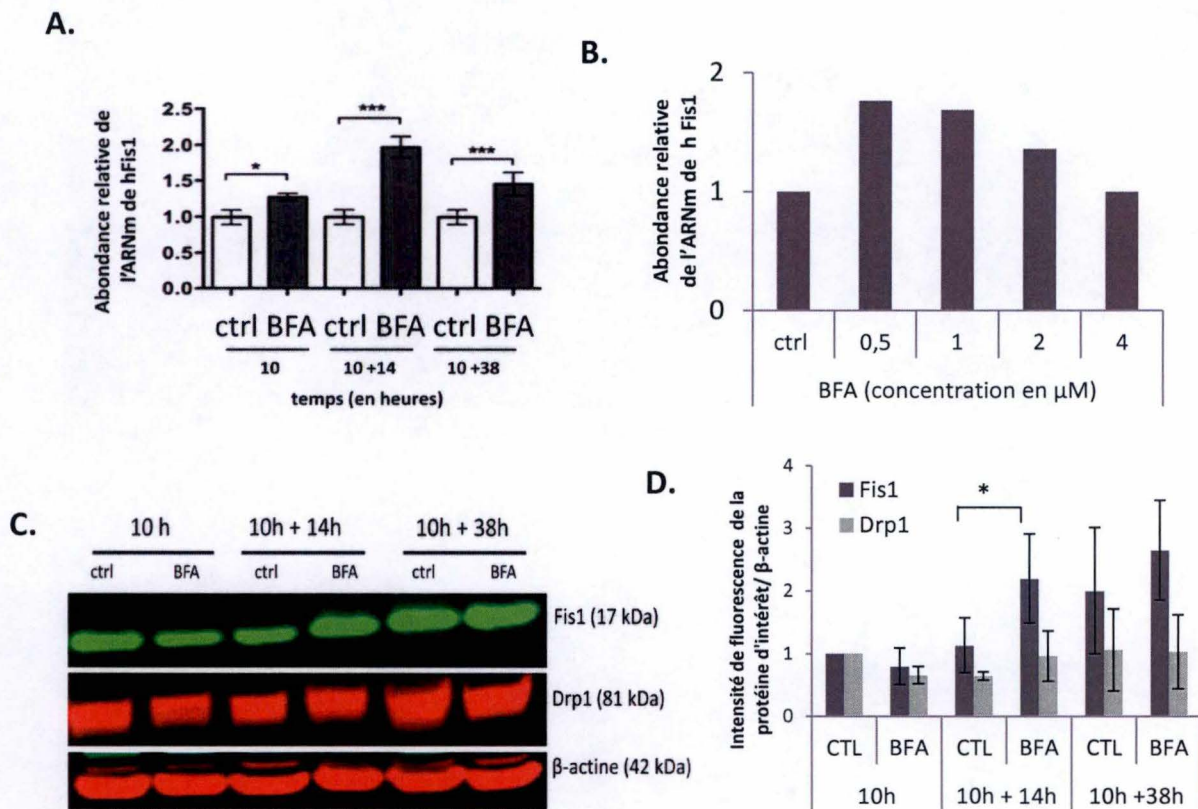


Figure 2: Effet d'un traitement à la BFA sur l'abondance protéique et l'abondance d'ARNm de hFis1 dans les cellules HepG2 (expériences réalisées dans le cadre de la thèse de K.Vannuvel, 2015).

(A) Des cellules HepG2 ont été incubées en présence de BFA à 500 nM pendant différents temps d'incubation (10 h, 10 h suivies de 14 h de repos ou 10 h suivies de 38 h de repos). L'abondance relative des transcrits de hFis1 a ensuite été déterminée en RT-qPCR en temps réel. Les valeurs de Ct (cycle threshold) de Fis1 ont été normalisées par les valeurs de Ct du gène de référence (23 kDa) et l'abondance relative du transcrit a été calculée par la méthode de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SD pour n=3 (3 expériences indépendantes). *,*** : différence statistiquement significative avec $p < 0.05$, et $p < 0,001$ respectivement comme déterminé par un test t de Student. (B) Expérience comparable effectuée dans le cadre de ce mémoire. Les cellules HepG2 ont été stimulées avec différentes concentrations de BFA (0,5, 1, 2, et 4 μ M) pendant 10 h suivies de 14h de récupération et une analyse de l'abondance relative de hFis1 a été réalisée par RT-qPCR. Les résultats représentent la moyenne de triplicats dans une expérience (n=1) (C) L'abondance protéique des protéines Fis1 et Drp1 a été analysée par Western blot en fluorescence sur 15 μ g de protéines de lysats de cellules HepG2 incubées avec de la BFA à 500 nM pendant 10 h ou 10 h suivies d'une période de repos de 14 ou 38 h. L'immuno-détection de la β -actine est utilisée comme contrôle de charge. (D) L'histogramme montre la quantification de la fluorescence des bandes correspondant aux protéines Fis1 ou Drp1 normalisée par la fluorescence de la β -actine. Les valeurs de fluorescence normalisées pour Fis1 et Drp1 sont exprimées par rapport aux valeurs des cellules contrôles incubées en absence de molécule pendant 10 h et représentent la moyenne \pm SD pour n= 4 (4 expériences indépendantes). * : différence statistiquement significative avec $p < 0,05$ comme déterminé par un test t de Student.

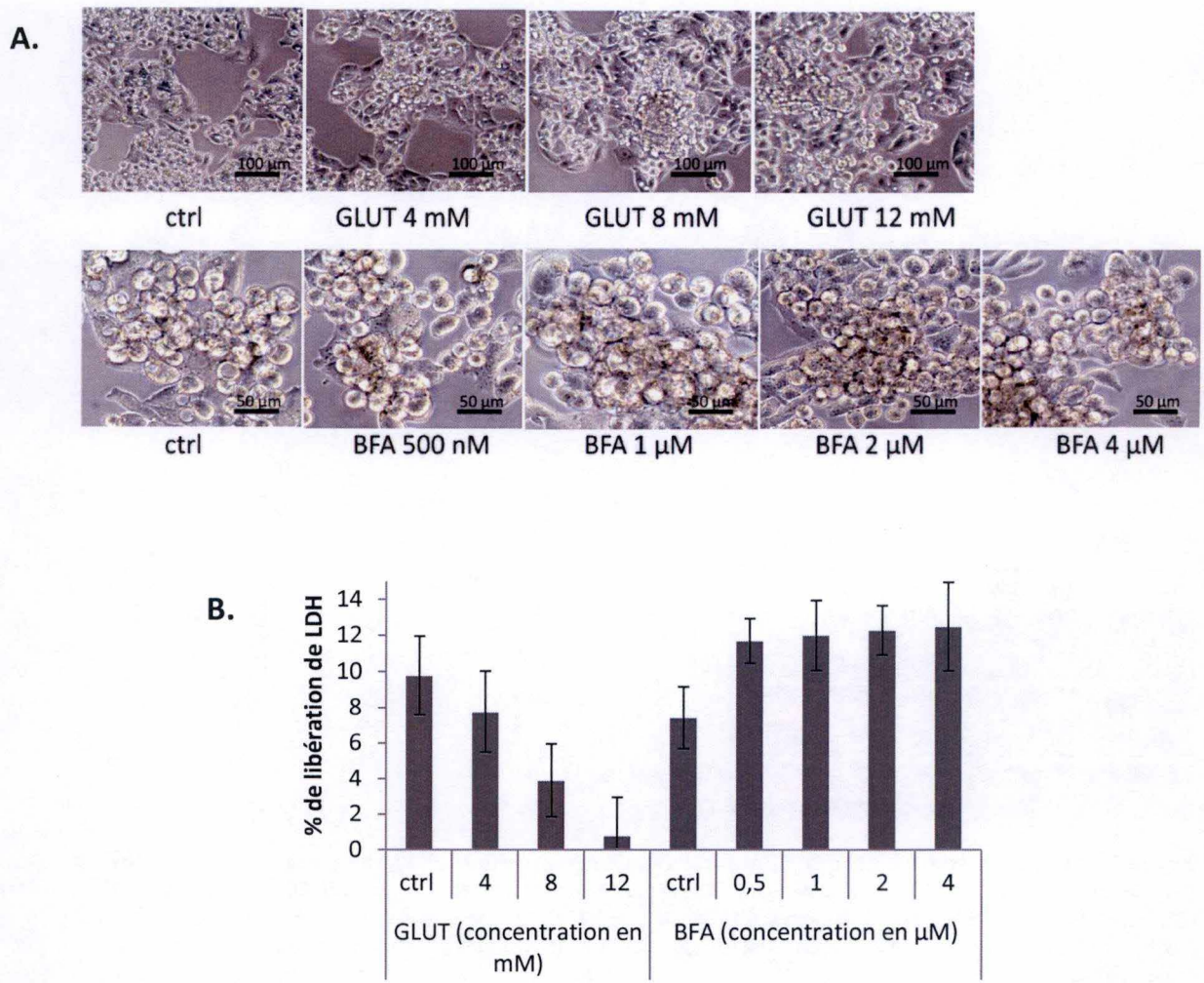


Figure 3: Evaluation de la cytotoxicité du glutamate et de la BFA sur les cellules HepG2 par un test de libération de la LDH.

(A) Micrographies représentant les cellules HepG2 incubées en absence (ctrl) ou en présence de 4, 8, ou 12 mM de glutamate (GLUT) pendant 24 h ou incubées en présence de 500 nM, 1, 2 et 4 μM de bréfeldine A (BFA) pendant 10 h suivies d'un temps de récupération de 14 h. Les micrographies des cellules traitées au glutamate ont été prises à un grossissement de 100 x et les micrographies de cellules incubées avec la BFA ont été prises à un grossissement de 200 x (voir barres d'échelle représentant respectivement 100 et 50 μm). (B) Les cellules HepG2 ont été incubées avec 4, 8, ou 12 mM de glutamate pendant 24 h ou avec différentes concentrations de bréfeldine A (BFA) (0,5, 1, 2, ou 4 μM) pendant 10 h suivies d'un temps de récupération de 14 h. Au terme des incubations les activités LDH ont été dosées dans les milieux de culture conditionnés, les cellules détachées et les tapis cellulaires. Les résultats sont exprimés en pourcentages de libération de la LDH et représentent la moyenne ± SD pour 3 expériences indépendantes (n=3 pour les incubations en présence de GLUT) ou la moyenne ± SD pour des triplicats dans une expérience unique (n=1 pour les incubations avec la BFA).

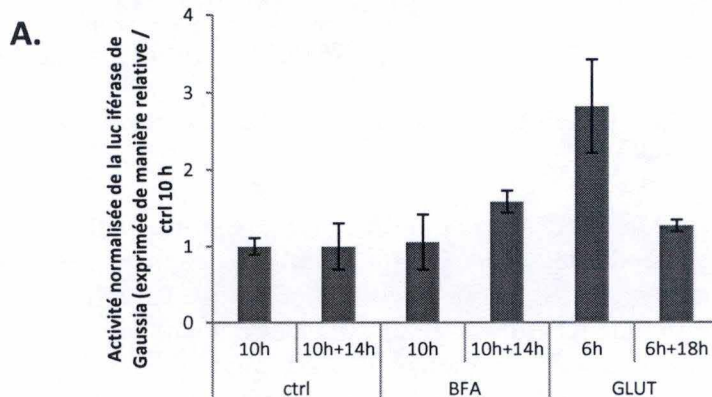
III.1. Tentative de mise au point d'un modèle permettant d'étudier un stress sublétal du RE en réponse à une stimulation par le glutamate.

III.1.1. Evaluation de la mortalité des cellules HepG2 incubées en présence de glutamate ou de bréfeldine A.

Nous avons entrepris de tester un modèle de stimulation cellulaire alternatif pour induire un stress sublétal du RE afin d'étendre les données expérimentales obtenues précédemment par K. Vannuvel (thèse de doctorat en cours). K. Vannuvel a montré que la bréfeldine A (BFA), à 500 nM, induit un stress sublétal du RE, une fragmentation des mitochondries (**Figure 1**) dans les cellules HepG2 et, dans certaines conditions (10 h de stimulation suivies de 14 h de récupération), une augmentation de l'expression de hFis1 au niveau de l'ARNm qui est aussi reflétée au niveau protéique (**Figure 2**). Sur base de l'article de Kumari et de ses collègues, décrivant que la toxicité du glutamate dans les cellules neuronales HT22 est accompagnée par un stress oxydatif et une fragmentation mitochondriale dépendante de la phosphorylation de Drp1 et d'une augmentation de l'expression de hFis1 (Kumari et al., 2012), nous nous sommes intéressés au glutamate comme inducteur potentiel de la fragmentation mitochondriale et de l'expression de hFis1. Compte tenu du fait que le glutamate a souvent été étudié pour son effet neurotoxique (Dolga et al., 2013, Jin et al., 2014), dans ce travail, les conditions de stimulation ont dû être adaptées afin d'induire un stress non létal. En effet, Kumari et collègues ont observé une mortalité cellulaire de 80 % pour des cellules HT22 incubées en présence de 4 mM de glutamate pendant 24 h (Kumari et al., 2012).

Les cellules HepG2 ont donc été incubées avec des concentrations croissantes de glutamate (4, 8 ou 12 mM) pendant 24 h et la mortalité cellulaire a été évaluée en utilisant un test de libération de la LDH (lactate déshydrogénase) (**Figure 3**). Les résultats montrent que, à ces concentrations, le glutamate n'est pas toxique pour les cellules HepG2. En effet, la libération de LDH des cellules traitées avec la molécule est plus faible que dans les cellules contrôles non traitées et ceci d'une manière dépendante de la concentration (**Figure 3B**). Cet effet hépato-protectif pourrait être expliqué par l'expression du récepteur métabotrope mGLU5R dans les cellules HepG2 (Storto et al., 2000) qui est susceptible d'activer la voie de signalisation dépendante de ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et la voie de la PI3-K (phosphoinositide-3 kinase) qui sont connues pour leurs effets pro-survie dans des cellules HepG2 (Mitsui et al., 2001). Il s'y ajoute aussi un effet bénéfique du glutamate qui peut être acheminé sous forme d' α -cétoglutarate suite à sa déamination par la glutamate déshydrogénase dans le cycle de Krebs des cellules HepG2 (Plaitakis and Shashidharan, 2000, Fitzpatrick et al., 1990). Aucun changement dans la morphologie ou la densité des cellules n'a pu être observé pour les cellules incubées en présence de glutamate et ce, quelle que soit la concentration considérée (**Figure 3A**). On peut donc conclure que l'incubation des cellules HepG2 en présence de glutamate, à une concentration comprise entre 4 et 12 mM, n'induit pas de mortalité cellulaire et ce, même pour un temps d'incubation qui est relativement long (24 h). Ces résultats se trouvent en contraste avec l'excitotoxicité et la toxicité oxydative, les deux effets stimulateurs du glutamate sur des cellules excitables et non excitables qui ont été décrits dans l'introduction (point I.2.B.).

Une expérience comparable a aussi été réalisée avec la BFA afin de rechercher une éventuelle toxicité de l'inducteur du stress du RE. Les cellules HepG2 ont été incubées pendant 10 h avec de la BFA à des concentrations de 500 nM, 1, 2 ou 4 μ M. Après 10 h, le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais ne contenant pas de molécule pendant 14 h (= période de récupération). Les résultats montrent une légère augmentation de la mortalité cellulaire et ce, déjà en présence de 0,5 μ M de BFA (**Figure 3B**). Toutefois, le pourcentage de



B.

conditions	Gluc	Gluc- blc	SEAP	SEAP- blc	Gluc /SEAP	Mx (Gluc /SEAP)	SDV Gluc /SEAP	Mx /ctrl	SDV Mx /ctrl
ctrl 10h	134323	133949	112370	111996,75	1,20	1,36	0,15	1,00	0,11
	202849	202475	146282	145908,75	1,39				
	204578	204204	131306	130932,75	1,56				
	111698	111324	85036	84662,75	1,31				
ctrl 10h+14h	192107	191771,25	107912	107577,75	1,78	1,56	0,47	1,00	0,30
	105201	104865,25	122388	122053,75	0,86				
	212223	211887,25	122870	122535,75	1,73				
	197489	197153,25	106314	105979,75	1,86				
BFA 10h	3815	3441	3814	3440,75	1,00	1,44	0,49	1,06	0,36
	4354	3980	4173	3799,75	1,05				
	6731	6357	3606	3232,75	1,97				
	7645	7271	4519	4145,75	1,75				
BFA 10h+14h	253465	253129,25	99062	98727,75	2,56	2,47	0,22	1,58	0,14
	256901	256565,25	110494	110159,75	2,33				
	227375	227039,25	101372	101037,75	2,25				
	273315	272979,25	100220	99885,75	2,73				
GLUT 6h	40708	40334	15245	14871,75	2,71	3,85	0,82	2,82	0,60
	69903	69529	15543	15169,75	4,58				
	71263	70889	16842	16468,75	4,30				
	72969	72595	19417	19043,75	3,81				
GLUT 6h+18h	257035	256699,25	123922	123587,75	2,08	1,98	0,12	1,27	0,07
	229293	228957,25	122810	122475,75	1,87				
	197333	196997,25	104092	103757,75	1,90				
	352014	351678,25	168801	168466,75	2,09				

Figure 4: Effet d'un traitement au glutamate ou à la bréfeldine A sur l'activité du gène rapporteur (luciférase de Gaussia) dont l'expression est contrôlée par le promoteur putatif humain de Fis1 (hFis1). (A) Des cellules HepG2 préalablement co-transfectées de manière transitoire avec deux plasmides (pCMV-SEAP et pEZX-PG02) ont été incubées avec 4 mM de glutamate pendant 6 h ou 6 h suivies de 18 h de repos ou avec 500 nM de bréfeldine A pendant 10 h ou 10 h suivies de 14h de récupération. Les activités luciférase et SEAP ont ensuite été dosées dans les milieux de culture conditionnés. Les résultats sont calculés en activité luciférase de Gaussia normalisée par la SEAP et exprimés par rapport aux valeurs normalisées obtenues pour les cellules contrôles incubées pendant 10 h dans du milieu de culture et portées arbitrairement à 1. Les résultats représentent la moyenne \pm SD (quadruples dans une expérience unique, n=1). (B) Tableau résumant les données brutes obtenues pour les activités des enzymes codées par les gènes rapporteurs : Gaussia luciférase (Gluc) (en RLU : relative light units/s) et alcaline phosphatase sécrétées (SEAP)(en RLU/s) et les données de normalisation entre les valeurs de Gluc et SEAP. Mx=moyenne, SD= écart-type, blc= blanc (cellules non transfectées).

III. Résultats et discussions

libération de la LDH par des cellules incubées en présence de BFA reste faible (environ 12 %), n'augmente pas ou peu en fonction de la concentration en BFA utilisée et n'est pas très différente de la libération de LDH observée pour les cellules contrôles (environ 8 %).

III.1.2. Etude des effets de la bréfeldine A et du glutamate sur l'activité du promoteur de Fis1 en système rapporteur.

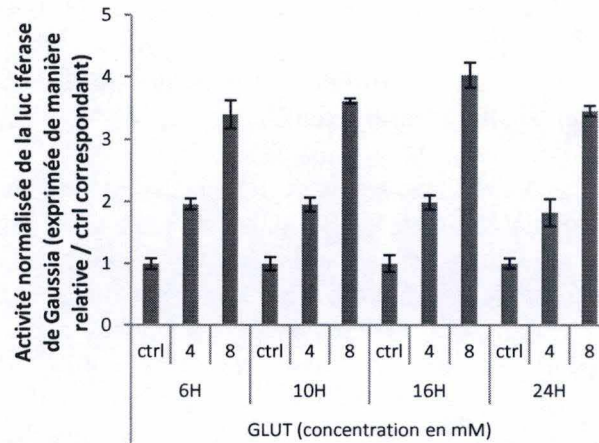
Il est connu que la bréfeldine A induit un stress du RE (Jackson and Casanova, 2000, Shinjo et al., 2013) (thèse de Kayleen Vannuvel, URBC, UNamur). De plus, des effets du stress du RE sur la fission mitochondriale ont aussi été rapportés dans la littérature (Breckenridge et al., 2003). Dans le cadre de sa thèse, K. Vannuvel a pu détecter une augmentation de l'expression du gène codant pour hFis1 dans des cellules HepG2 incubées avec de la BFA (à une concentration de 500 nM pendant 10 h suivies de 14 h de récupération) (**Figure 2**). En outre, le travail de Kumari et ses collègues sur le stress du RE induit par le glutamate montre que le glutamate active l'expression de hFis1 dans des cellules neuronales (Kumari et al., 2012). Tous ces éléments nous ont encouragés à effectuer une expérience préliminaire pour tester l'effet de la bréfeldine A (BFA) et du glutamate (Glut) sur l'activation du promoteur de hFis1 (**Figure 4**).

Afin de comparer les effets de la BFA et du glutamate sur le niveau d'expression de Fis1, nous avons testé l'effet d'une incubation des cellules HepG2 en présence de ces molécules sur l'activation d'un gène rapporteur luciférase dont l'expression est contrôlée par le promoteur de hFis1.

Des cellules HepG2 ont donc été co-transfectées avec un plasmide rapporteur contenant la séquence codante pour la luciférase de *Gaussia* (Gluc) placée sous le contrôle du promoteur putatif de hFis1 (1262 pb) et un plasmide d'expression contenant la séquence codante pour la SEAP (Secreted embryonic alkaline phosphatase : une phosphatase alcaline sécrétée) placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif du cytomégalo virus (CMV). Ces deux plasmides sont de fabrication commerciale (de Genecopoeia, Rockville, USA). Le promoteur putatif de Fis1 intégré dans le plasmide (HPRM20340) a été choisi par Genecopoeia et correspond à la séquence promotrice 5' qui s'étend 1186 bp en amont et 75 bp en aval du site « start » de la transcription (TSS) du gène hFis1. La séquence du gène hFis1 utilisée est celle publiée par NCBI sous la référence NM_016068.2. A titre indicatif, nous avons aussi effectué une analyse bioinformatique de cette séquence visant à trouver les facteurs de transcription et leurs sites de liaison correspondants (voir **Figure en annexe**). Le promoteur putatif a été analysé à l'aide du logiciel Transfac Match public version 1.0 (Biobase GmbH., Braunschweig, Allemagne) avec la matrice « spécifique au foie minimisant la somme des faux positifs et des faux négatifs » (68 sites putatifs trouvés). Les résultats montrent que la séquence de 1262 pb comporte de nombreux sites de liaison pour des facteurs de transcription (comme par exemple : Elk-1 (ETS domain-containing protein 1), Oct-1 (Octamer-binding protein 1), AP-1 (Activator protein 1),...), ce qui supporte son rôle comme séquence régulatrice pour la transcription de hFis1. L'activation de ce fragment de promoteur de hFis1 dans les cellules incubées en présence des inducteurs de stress du RE peut être mesurée en dosant l'activité de la *Gaussia* luciférase (Gluc) qui est directement sécrétée dans le milieu de culture. Afin de normaliser les valeurs d'activité de la Gluc par l'efficacité de la transfection, ces dernières ont été rapportées aux données obtenues pour l'activité SEAP.

Dans cette expérience, les cellules ont été incubées en présence de glutamate (4 mM) pendant 6 h suivies ou non d'une période de récupération de 18 h ou en présence de bréfeldine A (500 nM) pendant 10 h suivies ou non d'une période de récupération de 14 h dans du milieu sans

A.



B.

conditions	Gluc	Gluc -blc	SEAP	SEAP -blc	Gluc/SEAP	Mx (Gluc/SEAP)	SD Gluc/SEAP	Mx/ctrl	SD Mx/ctrl					
6h	ctrl	92422	91896,33	44327	43983,67	2,09	1,90	0,16	1,00	0,09				
		115584	115058,333	64053	63709,67	1,81								
		101817	101291,333	56246	55902,67	1,81								
	GLUT 4 mM	115072	114546,333	30525	30181,67	3,80								
		106596	106070,333	30357	30013,67	3,53								
		101943	101417,333	26642	26298,67	3,86								
	GLUT 8 mM	80861	80335,33	11977	11633,67	6,91					3,73	0,17	1,96	0,09
		96162	95636,33	16155	15811,67	6,05								
		90479	89953,33	14284	13940,67	6,45								
10h	ctrl	168838	168334,333	89387	89042	1,89	1,68	0,18	1,00	0,11				
		178036	177532,333	113447	113102	1,57								
		171566	171062,333	107940	107595	1,59								
	GLUT 4 mM	165181	164677,333	47420	47075	3,50					3,29	0,19	1,96	0,11
		164319	163815,333	52623	52278	3,13								
		149738	149234,333	46244	45899	3,25								
	GLUT 8 mM	158676	158172,333	26047	25702	6,15					6,08	0,07	3,61	0,04
		175763	175259,333	29437	29092	6,02								
		150158	149654,333	24986	24641	6,07								
16h	ctrl	239334	238854,333	231679	231321,33	1,03	1,03	0,14	1,00	0,14				
		239466	238986,333	268101	267743,33	0,89								
		258625	258145,333	220614	220256,33	1,17								
	GLUT 4 mM	219686	219206,333	109791	109433,33	2,00					2,05	0,12	1,99	0,12
		251902	251422,333	128449	128091,33	1,96								
		237187	236707,333	108406	108048,33	2,19								
	GLUT 8 mM	245150	244670,333	54270	53912,33	4,54					4,16	0,41	4,03	0,20
		241184	240704,333	64888	64530,33	3,73								
		218285	217805,333	52005	51647,33	4,22								
24h	ctrl	367906	367396	288333	287897,33	1,28	1,40	0,12	1,00	0,08				
		392533	392023	275965	275529,33	1,42								
		415688	415178	276563	276127,33	1,50								
	GLUT 4 mM	417957	417447	150905	150469,33	2,77					2,55	0,31	1,82	0,22
		285112	284602	129655	129219,33	2,20								
		358595	358085	134114	133678,33	2,68								
	GLUT 8 mM	345125	344615	69887	69451,33	4,96					4,83	0,12	3,45	0,09
		375189	374679	79735	79299,33	4,72								
		324051	323541	67669	67233,33	4,81								

Figure 5: Effet d'un traitement au glutamate sur l'activité du gène rapporteur (luciférase de Gaussia) dont l'expression est contrôlée par le promoteur putatif humain de Fis1 (hFis1).

(A) Les cellules HepG2 préalablement co-transfectées de manière transitoire avec deux plasmides (pCMV-SEAP et pEZX-PG02) ont été incubées avec 4 ou 8 mM de glutamate pendant 6, 10, 16 ou 24 h. Les activités luciférase et SEAP ont ensuite été dosées dans le milieu de culture conditionnés. Les résultats sont calculés en activité luciférase de Gaussia normalisée par la SEAP et exprimés par rapport aux valeurs normalisées obtenues pour les cellules contrôles incubées pendant 6, 10, 16 ou 24 h dans le milieu de culture et portées arbitrairement à 1. Les résultats représentent la moyenne \pm SD (triplicats dans une expérience unique, n=1). (B) Tableau résumant les données brutes obtenues pour les activités des enzymes codées par les gènes rapporteurs : Gaussia luciférase (Gluc) (en RLU : relative light units/s) et alcaline phosphatase sécrétées (SEAP) (en RLU/s) et les données de normalisation entre les valeurs de Gluc et SEAP. Mx=moyenne, SD= écart-type, blc= blanc (cellules non transfectées).

III. Résultats et discussions

molécule. Ces conditions ont été choisies sur base de données préliminaires obtenues dans le cadre de la thèse de Kayleen Vannuvel (**Figure 2**).

Les résultats suggèrent que la stimulation des cellules avec la BFA pendant 10 h suivies d'un temps de récupération de 14 h induit une légère activation de la transcription du gène rapporteur par rapport aux cellules contrôles non traitées (**Figure 4A**). De plus, la stimulation des cellules HepG2 avec du glutamate pendant 6 h provoque une forte augmentation de l'activité de la luciférase. Cependant, la cinétique de l'activation semble être différente de celle obtenue pour une stimulation des cellules par la BFA et l'activation semble transitoire puisque l'activité de la luciférase mesurée à la fin de la période de récupération est nettement plus faible que l'activité mesurée après 6 h d'incubation des cellules avec la molécule.

Ces données suggèrent donc que, bien que par des mécanismes différents et avec des cinétiques et des amplitudes différentes, la BFA et le glutamate pourraient induire une activation du promoteur de *Fis1*. Bien que nous observons des diminutions, parfois importantes, des valeurs pour les activités luciférase et SEAP pour les cellules incubées en présence de BFA ou de glutamate comparées aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles, ces premiers résultats nous ont encouragé à poursuivre ce travail en tentant d'optimiser les conditions de stimulation (temps d'incubation et concentrations) des cellules par le glutamate.

III.1.3. Optimisation des conditions de stimulation des cellules HepG2 avec le glutamate

Dans le but de rechercher les meilleures conditions donnant une activation maximale du promoteur de *Fis1*, nous avons testé deux concentrations (4 et 8 mM) et 4 temps de stimulation (6, 10, 16 et 24 h) pour les incubations des cellules HepG2 en présence de glutamate. En effet, cette molécule, à notre connaissance, a essentiellement été utilisée sur des cellules excitables comme les cellules HT22 d'hippocampe murin ou des neurones primaires du cortex de souris (Jin et al., 2014, Pan et al., 2012, Kumari et al., 2012) mais jamais sur des cellules HepG2. Il est donc possible que les conditions utilisées dans l'expérience préliminaire n'étaient pas optimales.

Les cellules HepG2 ont donc été co-transfectées de manière transitoire avec le plasmide contenant la séquence codante de la luciférase de *Gaussia* placée sous contrôle du promoteur putatif de *hFis1* et le plasmide de normalisation pCMV-SEAP (**Figure 5**). Les résultats montrent que le glutamate induit une activation du rapporteur d'une manière dépendante de la concentration. En effet, une fois normalisée, une activité d'environ 4 fois plus importante de l'activité luciférase a été détectée pour les cellules incubées en présence de 8 mM de glutamate par rapport aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles non traitées (**Figure 5**).

Cependant, une analyse détaillée des résultats bruts de luminescence (**Tableaux présentés aux Figures 4B et 5B**) a révélé que, en réalité, l'activité de la luciférase n'augmente pas dans les cellules incubées en présence de glutamate. Dès lors, l'augmentation apparente de l'activité du gène rapporteur suite à une stimulation des cellules par le glutamate pourrait provenir d'un artefact résultant de la normalisation (ratio) des valeurs d'activité de la luciférase de *Gaussia* par les valeurs anormalement basses d'activité obtenues pour la SEAP dans les cellules traitées. En effet dans le **tableau de la Figure 5B**, on peut voir une diminution (dépendante de la concentration en glutamate) de l'activité SEAP tandis que l'activité de la luciférase n'augmente pas dans les cellules stimulées au glutamate. On voit également une diminution de l'activité SEAP dans les cellules traitées par le glutamate dans le **tableau de la Figure 4B**. Cependant, pour la BFA, on observe également une diminution

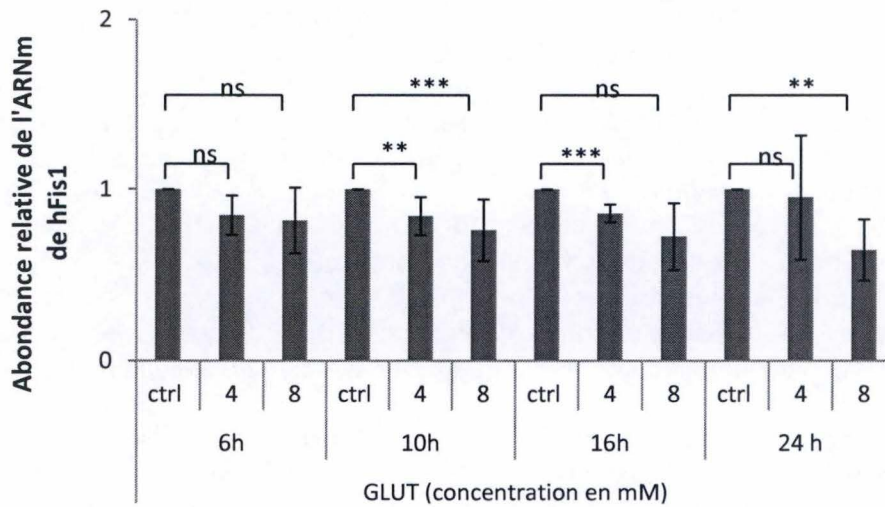
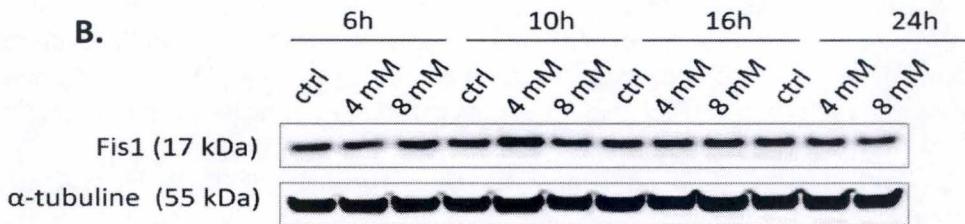
A.**B.**

Figure 6: Effet du glutamate sur l'expression du gène codant pour hFis1.

(A) Analyse de l'abondance de l'ARNm de hFis1 endogène déterminée en RT-qPCR (en temps réel) réalisée sur de l'ADNc préparé à partir de cellules HepG2 incubées avec 4 ou 8 mM de glutamate pendant 6, 10, 16 ou 24 h. Les valeurs de Ct (cycle threshold) de hFis1 ont été normalisées par les valeurs de Ct du gène de référence (23 kDa) et l'abondance relative de l'ARNm a été calculée par la méthode de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Les résultats sont exprimés en abondance relative d'ARNm de hFis1 par rapport aux contrôles correspondant (= des cellules maintenues en culture pendant 6, 10, 16 ou 24 h sans glutamate) et représentent la moyenne \pm SD, pour 4 expériences indépendantes (n=4). * ; ** ; ***: différences statistiquement significatives avec respectivement $p < 0,05$; $p < 0,01$ et $p < 0,001$ comme déterminé par un test t de Student. ns = non significatif

(B) Analyse de l'abondance de la protéine Fis1 en Western blot (en fluorescence) effectuée sur un équivalent de 12 μ g de protéines préparées à partir de lysats de cellules HepG2 incubées avec 4 ou 8 mM de glutamate pendant 6, 10, 16 ou 24 h. L'immuno-détection de l' α -tubuline est utilisée pour contrôler la charge du gel.

III. Résultats et discussions

des activités de la luciférase et de la SEAP dans les cellules incubées en présence de la molécule pendant 10 h. Cependant, pour des cellules incubées en présence de BFA puis maintenues pendant 14 h dans du milieu frais en absence de molécule, on observe une légère augmentation de l'activité du produit du gène rapporteur (luciférase) par rapport aux valeurs obtenues pour les cellules contrôles correspondantes. L'activation du rapporteur dans les cellules incubées pendant 10 h en présence de BFA suivies d'une période de récupération de 14 h pourrait donc signifier une réelle activation du promoteur de hFis1. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus précédemment puisque, rappelons que, dans ces conditions, nous avons montré que l'expression endogène du gène codant pour Fis1 est augmentée (au niveau de l'ARNm et de la protéine) (**Figure 2**).

Néanmoins, ces résultats négatifs et probablement artéfactuels ne supportent pas l'hypothèse que nous avons émise selon laquelle le glutamate pourrait activer le promoteur de Fis1 dans des cellules HepG2. Nous avons donc pensé que si l'activation du promoteur de Fis1 devait être observée dans des cellules incubées en présence de glutamate, nous devrions pouvoir observer un effet sur le niveau d'expression endogène du régulateur de la fission mitochondriale. Dans la suite de ce travail, nous avons donc caractérisé le niveau d'expression de Fis1 (ARNm et protéine) dans des cellules HepG2 incubées en présence de glutamate.

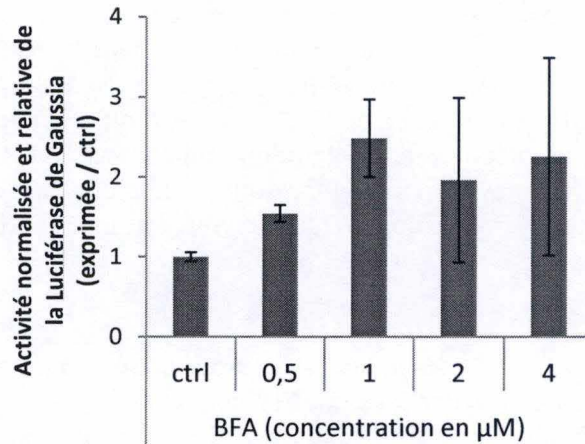
III.1.4. Effet du glutamate sur l'expression endogène de hFis1

Des cellules HepG2 ont été incubées avec 4 ou 8 mM de glutamate pendant 6, 10, 16 ou 24 h. Au terme des incubations, l'abondance relative des ARNm de Fis1 a été analysée par RT-qPCR en temps réel (**Figure 6A**). Les données obtenues ne montrent pas d'induction de l'expression de hFis1 endogène dans des cellules HepG2 incubées en présence de glutamate et ce, quels que soient la concentration et le temps d'incubation étudiés. Dans certaines conditions, l'abondance relative du transcrite de Fis1 est même significativement plus faible dans les cellules incubées en présence de la molécule (**Figure 6A**). L'absence d'induction de l'expression de Fis1 dans les cellules incubées en présence de glutamate a été confirmée au niveau protéique. Des extraits protéiques ont été préparés à partir de cellules HepG2 incubées avec du glutamate (4 ou 8 mM) pendant 6, 10, 16 ou 24 h et l'abondance protéique de Fis1 a été analysée par Western Blot en fluorescence (**Figure 6B**). Dans cette expérience, il semble que l'abondance de Fis1 n'est pas modifiée dans les cellules incubées en présence de glutamate.

On peut donc conclure que, dans les cellules HepG2, le glutamate ne modifie pas le niveau d'expression du gène codant pour hFis1 puisque ni l'abondance du transcrite, ni l'abondance de la protéine Fis1 n'est modifiée dans les cellules stimulées par la molécule.

Sur base de ces résultats négatifs, nous avons donc renoncé à l'idée de tenter de développer un modèle cellulaire permettant d'étudier la réponse à un stress cellulaire induit au glutamate qui s'accompagnerait d'un changement d'expression du gène codant pour hFis1. Puisque l'objectif premier de ce mémoire visant à caractériser l'activation du promoteur de hFis1 en réponse au glutamate pour rechercher les éléments de régulation n'a pas pu être atteint, nous avons décidé de réorienter le sujet du mémoire en tentant de rechercher les mécanismes par lesquels un stress subléthal du RE induit par la BFA conduit à la fragmentation du réseau mitochondrial dans les cellules HepG2 (**Figure 1**).

A.



B.

conditions	Gluc	Gluc - blc	SEAP	SEAP - blc	Gluc / SEAP	Mx (Gluc / SEAP)	SD Gluc / SEAP	Mx / ctrl	SD Mx / ctrl
ctrl	25153	24819,33	9307	9160,67	2,71	2,56	0,15	1	0,06
	24425	24091,33	10144	9997,67	2,41				
	25107	24773,33	9865	9718,67	2,55				
BFA 0,5 µM	14638	14304,33	3513	3366,67	4,25	3,94	0,27	1,54	0,11
	12528	12194,33	3418	3271,67	3,73				
	12501	12167,33	3301	3154,67	3,86				
BFA 1 µM	3893	3559,33	861	714,67	4,98	6,36	1,24	2,49	0,48
	4474	4140,33	764	617,67	6,70				
	7325	6991,33	1093	946,67	7,39				
BFA 2 µM	1302	968,33	283	136,67	7,09	5,02	2,63	1,96	1,03
	1076	742,33	272	125,67	5,91				
	1114	780,33	525	378,67	2,06				
BFA 4 µM	1018	684,33	236	89,67	7,63	5,76	3,16	2,25	1,24
	751	417,33	344	197,67	2,11				
	1311	977,33	276	129,67	7,54				

Figure 7: Effet de la bréfeldine A (BFA) sur l'activité du promoteur de hFis1 analysée par transfection des cellules HepG2 avec un plasmide contenant le gène rapporteur luciférase de Gaussia.

(A) Les cellules ont été co-transfectées avec 1,8 µg d'un plasmide contenant la séquence codante de la luciférase de Gaussia (Gluc) placée sous le contrôle du promoteur putatif de hFis1 et avec 0,2 µg du plasmide de normalisation pCMV-SEAP. Les cellules transfectées ont ensuite été incubées avec 0,5 ; 1 ; 2 ou 4 µM de bréfeldine A pendant 10 h suivies d'un temps de repos de 14 h. Au terme des incubations, le milieu cellulaire a été récupéré et les activités de la Gluc et de la SEAP ont été mesurées à l'aide d'un luminomètre. Les valeurs de l'activité Gluc (RLU/s) ont été normalisées par les valeurs d'activité de la SEAP (RLU/s) (Mx(Gluc/SEAP)). Les résultats sont exprimés par rapport au contrôle et représentent la moyenne ± SD pour des triplicats réalisés dans une expérience (n=1). (B) Tableau détaillant les données brutes des activités Gluc et SEAP et les résultats des calculs de normalisation utilisés pour générer le graphique en (A). Mx=moyenne, SD = écart-type, blc = blanc (cellules non transfectées)

III.2. Etude de l'effet de la BFA sur l'activité du promoteur putatif de Fis1

Nous avons déjà montré que la bréfeldine A est capable de provoquer une augmentation d'expression du gène codant pour hFis1 (**Figure 2**) (thèse de Kayleen Vannuvel, URBC-NARILIS, UNamur). En utilisant l'approche du système rapporteur, nous avons voulu rechercher l'effet d'une incubation des cellules HepG2 en présence de BFA sur l'activité du promoteur putatif de Fis1.

Des cellules HepG2 ont été co-transfectées avec le plasmide rapporteur contenant la séquence codante pour la luciférase de *Gaussia* placée sous le contrôle du promoteur putatif de hFis1 et le plasmide de normalisation encodant la SEAP. Les cellules ont ensuite été incubées avec différentes concentrations en BFA (500 nM, 1, 2, ou 4 μ M) pendant 10 h suivies d'un temps de récupération de 14 h (**Figure 7**). Les résultats normalisés montrent une activation apparente (2 fois ou plus) du promoteur de hFis1 dans les cellules incubées en présence de concentrations supérieures ou égales à 1 μ M en BFA. Cependant, tout comme dans les expériences précédentes, une analyse plus détaillée des valeurs brutes d'activité de la luciférase et de la SEAP secrétées dans le milieu de culture par les cellules incubées en présence de BFA révèle également une diminution importante (et dépendante de la concentration en BFA) des valeurs d'activité pour les deux enzymes (**Figure 7B**).

On peut donc conclure que cette activation est vraisemblablement une « pseudo » activation qui résulte de la normalisation des données. Bien que découverts trop tardivement et liés à un manque de recherche bibliographique, ces résultats indiquent clairement, et de manière bien compréhensible, une interférence importante de la BFA avec les voies de sécrétion intracellulaires. En effet, Badr et ses collègues (2007) ont rapporté que la sécrétion de la luciférase de *Gaussia* par des fibroblastes humains était diminuée de 90 % lorsque les cellules sont incubées en présence de BFA (Badr et al., 2007). Ces auteurs mentionnent également que d'autres molécules pourraient aussi interférer avec les voies intracellulaires de sécrétion et donc mettent en garde contre l'utilisation de ce système rapporteur qui, à première vue, semble plus facile à utiliser puisqu'il ne nécessite pas de lyser les cellules pour doser les activités des enzymes. De plus, Hiramatsu et ses collaborateurs ont également décrit une interférence comparable du stress du RE sur la sécrétion de SEAP dans le cadre de l'étude de l'inflammation utilisant des cellules mésangiales (Hiramatsu et al., 2006). Dans ce travail, les auteurs ont utilisé une lignée de cellules mésangiales qui exprime la SEAP sous contrôle d'un promoteur répondant à NF-kB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) et ils ont observé une diminution dramatique de l'activité SEAP en réponse à une stimulation par des cytokines pro-inflammatoires bien connues pour activer NF-kB et donc pour activer la transcription du gène codant SEAP. En outre, ils ont détecté que l'abondance de l'ARNm de la SEAP est bien augmentée en réponse aux inducteurs de stress du RE (tunicamycine ou thapsigargine). Ils en ont conclu que le stress du RE interfère avec la sécrétion de la SEAP même si le promoteur du gène qui code l'enzyme est activé dans ces conditions.

Sur base de ces données négatives, il nous était donc impossible d'analyser l'effet potentiel de la bréfeldine A sur l'activation du promoteur putatif de hFis1 par cette approche.

En conclusion, on peut dire que l'approche expérimentale choisie basée sur la sécrétion d'enzymes codées par des gènes rapporteurs afin de détecter des effets putatifs de la BFA sur l'activation du promoteur de hFis1 n'était pas appropriée et est incompatible avec les conditions expérimentales et le modèle utilisé pour induire un stress du RE. Dans la suite de ce travail, nous avons donc généré un autre système de gènes rapporteurs plus classique basé

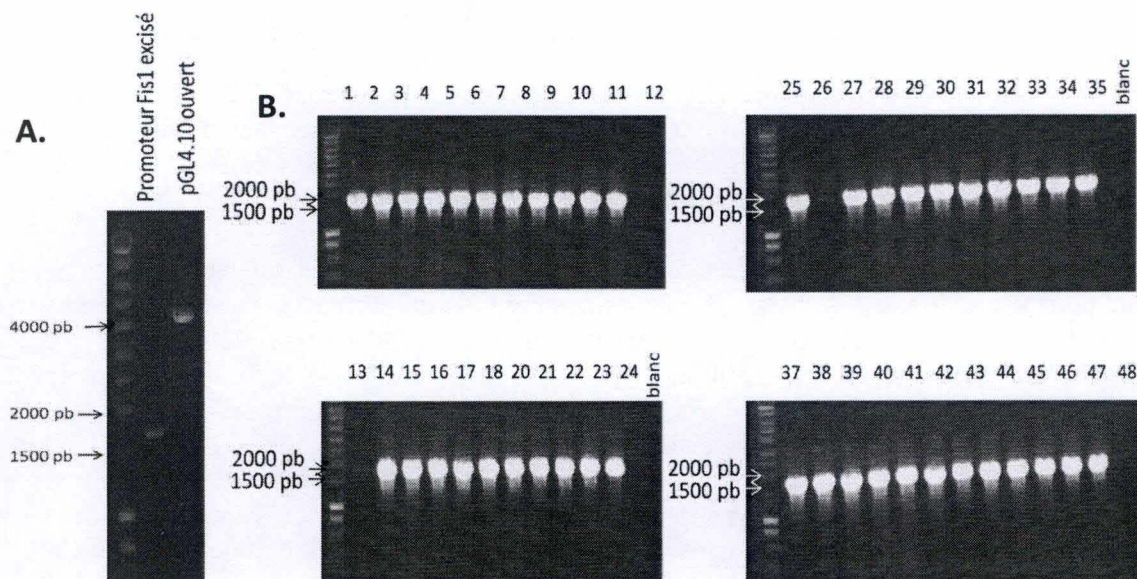


Figure 8 : Construction d'un plasmide rapporteur pGL4.10-Fis1prom.

(A) Scan du gel d'agarose 0,7 % montrant le fragment de promoteur hFis1 purifié (promoteur hFis1 excisé, 1795 pb) et le plasmide pGL4.10 (luc2) restreint par les enzymes NheI et HindIII (pGL4.10(luc2) ouvert, 3850 pb). Un équivalent de 5 μ l de plasmide restreint pendant 2 h à 37 °C a été déposé sur le gel. (B) Gels d'agarose 0,7 % montrant les résultats de la PCR sur colonies. Des bactéries DH10B compétentes ont été transformées avec le produit résultant de la ligation du fragment du promoteur putatif hFis1 et du vecteur pGL4.10(luc 2). 48 des colonies obtenues ont été soumises à une PCR sur colonies afin de déterminer si le fragment du promoteur hFis1 (1795 pb) était correctement intégré dans le plasmide.

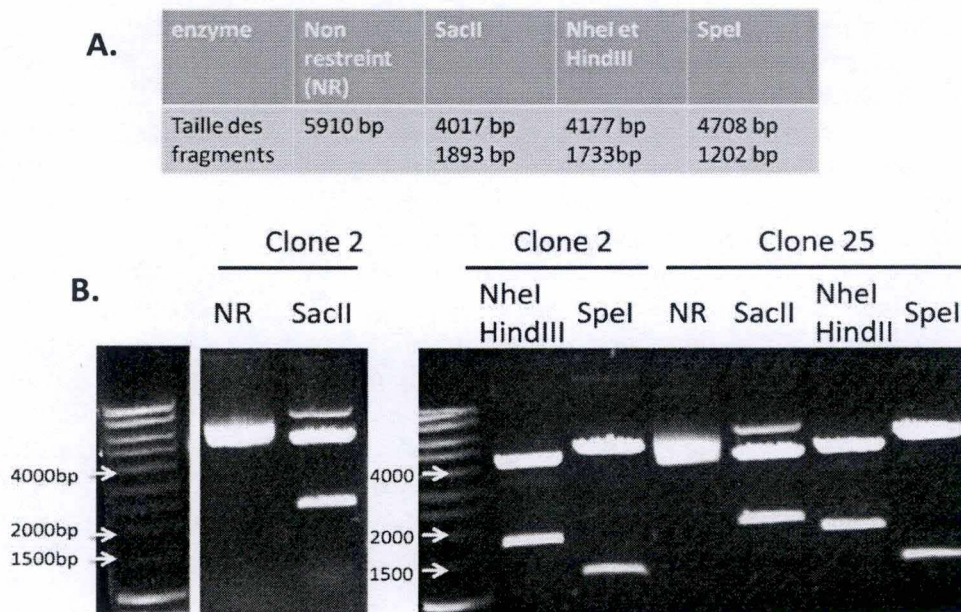


Figure 9 : Profil de restriction du plasmide rapporteur pGL4.10-Fis1prom.

(A) Tableau reprenant les tailles de fragments attendus après restriction avec les différentes enzymes (SacII, NheI, HindIII, SpeI). Les tailles attendues ont été déterminées par le programme ApE (<http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape>). (B) Les plasmides amplifiés et isolés par maxi-préparation (clone 2 et clone 25) ont été restreints par les différentes enzymes citées en (A) pendant 2 h à 37 °C. Les produits de restriction (30 μ l) ont ensuite été résolus dans un gel d'agarose 0,7 %.

III. Résultats et discussions

sur les luciférase de Firefly et de Rénilla, des enzymes qui restent intracellulaires et dont les activités seront dosées dans des lysats cellulaires.

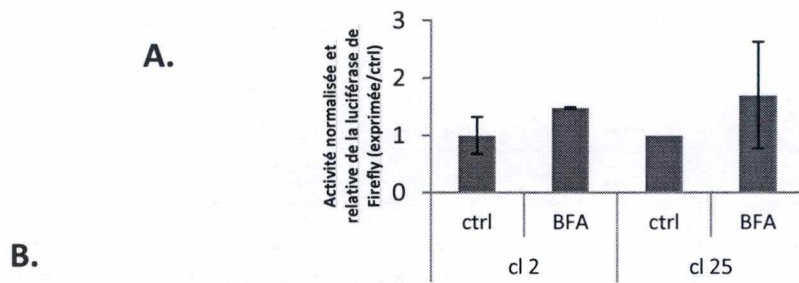
III.3. Construction d'un nouveau plasmide rapporteur

Afin d'étudier un effet éventuel d'un stress sublétalement du RE sur l'activation du promoteur putatif de hFis1 tout en évitant les interférences de la BFA sur la sécrétion des enzymes rapportrices, nous avons donc décidé d'utiliser des plasmides codant pour des enzymes classiquement utilisées dans les systèmes rapporteurs et non sécrétées, comme la luciférase de luciole (Firefly) et la luciférase de Renilla (Ho et al., 2013, Celardo et al., 2013). Dès lors, nous avons sous-cloné le promoteur putatif de hFis1 (1262 pb) dans le plasmide pGL4.10 (luc2) codant pour la luciférase de Firefly.

La construction du nouveau plasmide rapporteur a été réalisée en utilisant deux enzymes de restriction (NheI et HindIII) pour couper dans le site multiple de clonage du vecteur récepteur (pGL4.10 (luc2)) et faire une restriction de part et d'autre de la séquence du promoteur de hFis1 putatif contenu dans le plasmide pEZX-PG02. Le fait que ces deux enzymes génèrent des bouts protrudants non compatibles évite une re-ligation du plasmide sur lui-même et permet de faire un sous-clonage orienté (Liu et al., 2007). Les fragments générés par l'étape de restriction ont été séparés sur gel d'agarose (0,7 %) et les bandes d'intérêt ont été excisées. Ces fragments ont été purifiés (**Figure 8A**). Ensuite, une étape de ligation entre le fragment excisé (1795 pb) et le vecteur récepteur pGL4.10 (luc2) linéarisé (3850 pb) a été réalisée. Après la ligation, des bactéries DH10B (*E.coli*) compétentes ont été transformées avec ces plasmides nouvellement formés. Les bactéries transformées ont été cultivées pendant une nuit sur du milieu agar solide additionné d'ampicilline afin de sélectionner les bactéries ayant intégré le plasmide. A partir des colonies retrouvées sur milieu solide, nous avons effectué une PCR « sur colonie » afin de vérifier que le plasmide intégré contenait bien l'insert attendu (**Figure 8B**). Sur un total de 48 colonies sélectionnées, 45 étaient positives pour l'insert de 1795 pb. Sur deux de ces clones positifs choisis arbitrairement (clones 2 et 25), une mini-préparation a été réalisée pour purifier les plasmides. La séquence intégrée dans les plasmides construits a été vérifiée par une analyse de profil de restriction. Les deux clones ont été soumis à 2 h de restriction par les enzymes SacII, ou NheI et HindIII, ou SpeI et les tailles des fragments obtenus (**Figure 9B**) ont été comparées à celles attendues par l'analyse par le programme ApE (**tableau présenté à la Figure 9A**). Comme les tailles des fragments obtenues pour les 2 clones correspondaient à celles attendues, nous avons considéré que le procédé de sous-clonage utilisé n'a pas modifié la séquence du promoteur putatif de hFis1. La présence d'une troisième bande lors de la restriction du plasmide avec SacII est expliquée par une restriction non complète du plasmide. Après vérification, les plasmides de ces 2 clones positifs ont été amplifiés et quantifiés par une maxi-préparation afin de récupérer assez de matériel pour les expériences de transfection suivantes.

III.3.1 Effet de la bréfeldine A (BFA) sur l'activité du promoteur de hFis1 contrôlant le gène rapporteur Firefly luciférase

Des cellules HepG2 ont été co-transfectées avec les plasmides (provenant des clones 2 ou 25 bactériens) pGL4.10-Fis1prom contenant le gène rapporteur qui code pour la luciférase de Firefly et dont l'expression est placée sous le contrôle du promoteur putatif de hFis1 et le plasmide de normalisation pRL-TK qui contient la séquence codante de la luciférase de Renilla dont l'expression est contrôlée par le promoteur de la thymidine kinase du virus herpès simplex. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de BFA à 500 nM pendant



conditions		Fire	Fire-blc	Ren	Ren-blc	Fire /Ren	Mx (Fire/Ren)	SD Fire /Ren	Mx /ctrl	SD Mx /ctrl
cl 2	ctrl	461346	461242,33	1104	1031,33	447,23	328,33	106,63	1	0,32
		341252	341148,33	1223	1150,33	296,56				
		232208	232104,33	1035	962,33	241,19				
	BFA	177445	177373	298	229	774,55				
		258354	258282	559	490	527,11				
		168343	168271	1135	1066	157,85				
cl 25	ctrl	319488	319447	1127	1068,67	298,92	298,92	278,10	1,70	0,93
		148985	148913	258	189	787,90				
		397738	397666	1785	1716	231,74				
	BFA	232959	232887	531	462	504,08				

Figure 10 : Effet de la bréfeldine A (BFA) sur l'activité du promoteur de hFis1 analysée par transfection de cellules HepG2 avec un plasmide contenant le gène rapporteur luciférase de Firefly.

(A) Les cellules ont été co-transfectées avec 1,8 µg d'un plasmide contenant la séquence codante pour la luciférase de Firefly placée sous le contrôle du promoteur putatif de hFis1 (pGL4.10-Fis1prom) (clone 2 ou clone 25) et avec 0,2 µg d'un plasmide de normalisation pRL-TK (encodant la luciférase de Renilla). Les cellules transfectées ont ensuite été incubées avec 500 nM de bréfeldine A pendant 10 h suivies d'un temps de repos de 14 h. Au terme des incubations, les cellules ont été lysées et les activités des luciférases ont été dosées à l'aide d'un luminomètre. Les valeurs de l'activité de la luciférase de Firefly (Fire) (RLU/s) ont été normalisées par les valeurs d'activité de la luciférase de Renilla (Ren) (RLU/s). Les résultats sont exprimés par rapport aux cellules contrôles et représentent la moyenne ± SD pour des triplicats d'une expérience (n=1). (B) Tableau détaillant les données brutes des activités Fire et Ren et les résultats des calculs de normalisation utilisés pour générer le graphique en (A). Mx=moyenne, SD = écart-type, blc=blanc (cellules non transfectées).

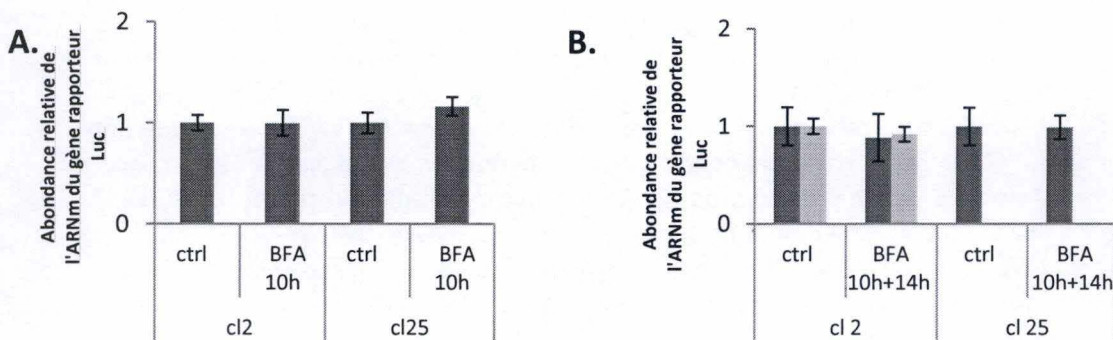


Figure 11 : Effet d'un traitement à la bréfeldine A sur l'abondance relative du transcrite du gène rapporteur luciférase de Firefly.

Analyses de l'abondance de l'ARNm de la luciférase de Firefly par RT-qPCR en temps réel réalisées sur des échantillons préparés à partir de cellules HepG2 co-transfectées avec 1,8 µg de plasmide rapporteur pGL4.10-Fis1prom (clones : cl 2 et 25) et 0,2 µg de plasmide de normalisation pRL-TK (encodant la luciférase de Renilla) puis incubées avec 500 nM de BFA pendant (A) 10 h ou (B) 10 h suivies de 14 h de récupération. Les valeurs de Ct (cycle threshold) de la luciférase de Firefly ont été normalisées par les valeurs de Ct de la luciférase de Renilla et les abondances des transcrits ont été calculées par la méthode de $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$. Les résultats sont exprimés en abondance relative de l'ARNm de la luciférase de Firefly par rapport au contrôle (ctrl) correspondant (des cellules maintenues en culture pendant 10 h (A) ou 24 h (B) sans BFA et représentent la moyenne ± SD pour des triplicats d'une expérience (n=1) (A et B) sauf pour le plasmide du clone 2 (cl2) qui a été testé dans deux expériences indépendantes (n=2).

III. Résultats et discussions

10 h suivies de 14 h de récupération. A la fin de la période d'incubation, les cellules ont été lysées et les activités des enzymes ont été dosées (**Figure 10**). Les résultats normalisés montrent une légère activation du promoteur putatif de hFis1 suite au stress sublétal du RE induit par la BFA. L'augmentation de l'activité de la luciférase de Firefly est comparable pour les deux plasmides (clone 2 et clone 25) testés. Cependant, une analyse des valeurs brutes de luminescence (**Tableau présenté à la Figure 10B**) montre de nouveau que les valeurs d'activité enzymatique de la luciférase de Firefly n'augmentent pas pour les cellules stimulées à la BFA et que ces valeurs sont même inférieures à celles obtenues pour les cellules contrôles. La diminution des valeurs d'activité enzymatique est également observée pour la luciférase de Renilla, qui a été utilisée pour la normalisation. On peut donc de nouveau conclure que la « pseudo » activation apparente du promoteur observée résulte du ratio des activités enzymatiques et n'est probablement pas le reflet d'une réelle activation du rapporteur.

En effet, nous pouvons émettre l'hypothèse qu'un stress du RE perturbe la synthèse protéique (Arslan et al., 2012, Michels et al., 1997). En effet, une inhibition globale de la traduction protéique suite à l'activation de la voie PERK et à la phosphorylation de eIF2 α (Kebache et al., 2004, Scheuner et al., 2001) résultant du stress du RE pourrait donc expliquer la diminution d'activité des deux enzymes. Ces interférences causées par le stress RE sur la synthèse protéique pourraient donc éventuellement masquer une activation sous-jacente du promoteur de hFis1 et ne permettent donc pas d'utiliser cette approche pour mettre en évidence un éventuel effet d'un stress sublétal du RE sur l'expression de hFis1. Si notre hypothèse concernant une interférence d'un stress du RE sur la synthèse protéique affectant l'expression du gène rapporteur est correcte, nous devrions pouvoir mettre en évidence une augmentation de l'abondance relative du transcrite de ce gène dans des cellules transfectées et incubées en présence de BFA à condition que le stress du RE conduise à activer des éléments régulateurs contrôlant l'activation du promoteur putatif de hFis1.

III.3.2. Effet d'un traitement à la bréfeldine A sur l'abondance du transcrite du gène rapporteur (luciférase de Firefly).

Afin d'éviter une interférence du stress du RE induit par la BFA sur le repliement ou le niveau de traduction des enzymes codées par les gènes rapporteurs, nous avons donc décidé d'analyser l'activation du promoteur putatif de hFis1 en quantifiant l'abondance relative des transcrits (ARNm) des deux luciférases. Des cellules HepG2 ont été co-transfectées avec un des plasmides (clone 2 ou 25 bactérien) encodant la luciférase de Firefly dont l'expression est contrôlée par le promoteur putatif de hFis1 et le plasmide de normalisation pRL-TK codant pour la luciférase de Renilla. Les cellules ont ensuite été stimulées avec 500 nM de BFA pendant 10 h ou pendant 10 h suivies de 14 h de repos dans du milieu ne contenant pas la molécule avant d'être lysées. L'ARN total a été extrait, les ARNm ont été retro-transcrits en cDNA et l'abondance des transcrits des deux luciférases a été analysée par PCR quantitative en temps réel en utilisant des amorces spécifiques aux transcrits des gènes rapporteurs (**Figure 11**). Les résultats montrent une activité basale du promoteur dans les cellules non traitées ainsi que dans les cellules traitées avec la BFA, ce qui montre que les constructions sont fonctionnelles. Cependant, aucune activation supra-basale du promoteur putatif de hFis1 n'a pu être mise en évidence dans les cellules incubées en présence de BFA que ce soit pour un temps d'incubation de 10 h ou une stimulation de 10 h (**Figure 11A**) suivie par une période de 14 h de récupération (**Figure 11B**).

En conclusion, en utilisant la technique des plasmides rapporteurs codant pour les gènes de la luciférase de Firefly ou de Gaussia, nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une

III. Résultats et discussions

activation du promoteur putatif de hFis1 suite à un stress du RE sublétal généré par la BFA dans les cellules HepG2. Les hypothèses tentant d'expliquer ces résultats négatifs sont multiples. Nous pourrions considérer une absence de l'activation du promoteur de hFis1 en réponse au stress du RE. Cependant, cette hypothèse est peut probable dans la mesure où des résultats préliminaires obtenus par Kayleen Vannuvel dans le cadre de sa thèse montrent une augmentation de l'expression du gène endogène de Fis1 dans des cellules HepG2 incubées en présence de 500 nM de BFA pendant 10 h suivies de 14 h de récupération et ce, au niveau de l'ARNm et de la protéine (**Figure 2**). La cause la plus probable est que la séquence promotrice et/ou la taille du promoteur utilisée n'était pas adaptée. En effet, la taille des promoteurs endogènes est souvent variable et pas toujours bien définie (Kristiansson et al., 2009). En plus, les promoteurs de gènes exprimés en situation de stress sont généralement plus longs que ceux des gènes essentiels. En construisant un plasmide avec une séquence promotrice (HPRM20340) minimale (1262 pb) mais fonctionnelle, on n'a peut-être pas intégré l'ensemble des séquences régulatrices comme des « enhancers », qui sont responsables d'un contrôle de la transcription dans certaines conditions physiologiques (par exemple : un léger stress du RE)(Andersson, 2014). Ces séquences peuvent en effet se trouver parfois très éloignées du TSS. Il existe également des gènes tels que, par exemple, le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) (Turner et al., 2010), le co-activateur PGC1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator 1) (Martinez-Redondo et al., 2015) ou le gène **SERPINA1** de l' α 1-antitrypsine (AAT) (Matamala et al., 2015) qui possèdent un (ou même des) promoteur(s) alternatif(s) en plus du promoteur assurant une expression basale et qui ne s'active(nt) que dans certaines cellules ou suite à des stimuli spécifiques. Rien n'étant connue sur le contrôle de l'expression de hFis1, l'existence de tels mécanismes de régulation pourrait augmenter considérablement le niveau de complexité de l'étude de la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la protéine hFis1 (Davuluri et al., 2008).

Comme nous n'avons pas pu atteindre notre premier objectif visant à caractériser l'activation du promoteur de hFis dans des cellules exposées à un stress sublétal et transitoire du RE, nous n'avons pas pu poursuivre l'objectif de tenter d'identifier les facteurs impliqués dans la régulation de l'expression du gène par la méthode développée au laboratoire et reposant sur une capture des protéines interagissant avec un fragment d'ADN suivie d'identifications en spectrométrie de masse (Tacheny et al., 2013, Tacheny et al., 2012)

Nous avons donc continué ce travail en tentant d'analyser les mécanismes moléculaires et les effecteurs responsables de la fragmentation des mitochondries observées dans les cellules HepG2 exposées à un stress du RE (**Figure 1**). Dans un premier temps, nous avons cherché à savoir si un stress du RE pouvait influencer l'expression d'effecteurs protéiques, autres que hFis1, également impliqués dans le contrôle de la dynamique mitochondriale et plus particulièrement, la fission de l'organite.

III.4. Effets d'un stress du RE sublétal sur l'expression de facteurs impliqués dans la fission mitochondriale (Mff, MiD49 et MiD51)

En plus de hFis1 assurant le recrutement de Drp1, le facteur actuellement le plus connu et le plus étudié dans le contrôle de la fission mitochondriale (James et al., 2003, Yoon et al., 2003) mais qui pourrait jouer un rôle mineur dans les cellules eucaryotes de mammifères (Koirala et al., 2013), d'autres protéines ont été découvertes et décrites récemment pour leur rôle dans la fragmentation de l'organite. En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction (voir point **III.2.2.**) les protéines Mff (mitochondrial fission factor), MiD49 (mitochondrial dynamics

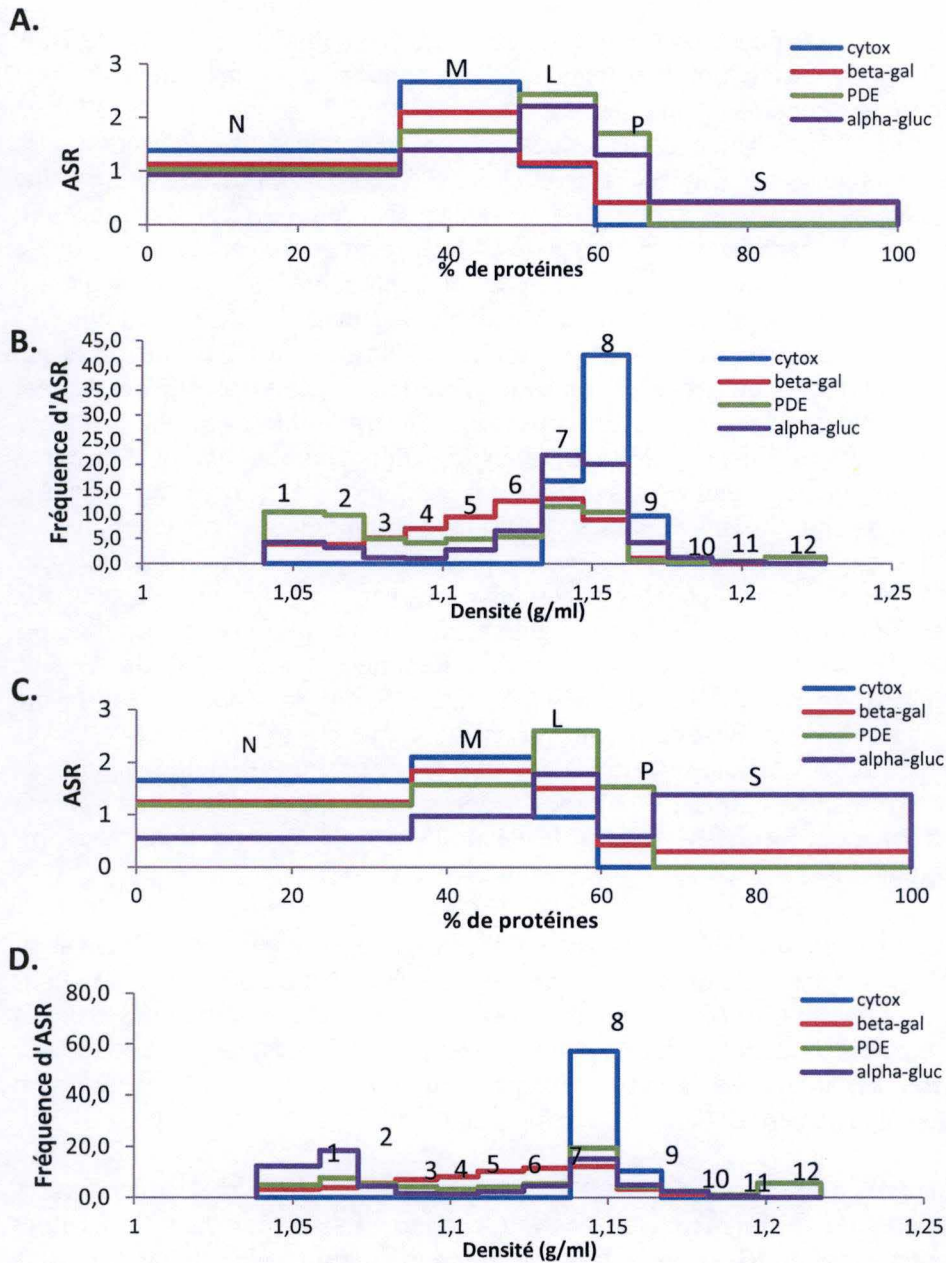


Figure 12 : Analyse de la distribution des activités d'enzymes marqueurs dans des fractions cellulaires de cellules HepG2 obtenues par centrifugations différentielle et isopycnique.

Des cellules HepG2 contrôles (ctrl) (A) et (B) ou incubées en présence de 500 nM de bréfeldine A pendant 10 h (C) et (D) ont été homogénéisées et soumises à un fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle pour obtenir les fractions N, M, L, P, S (A et C). Un volume de 500 μ l des fractions M obtenues a ensuite été déposé sur un gradient de Nycodenz et les fractions M ont été subdivisées en 12 fractions par centrifugation isopycnique. Les graphiques reportent les activités spécifiques relatives (ASR) des différentes enzymes marqueurs en fonction du contenu protéique de la fraction (pour les fractions N-S (A) et (C)) et en fonction de la densité (g/ml) du gradient (pour les fractions 1-12 de l'histogramme de fréquence présenté en (B) et (D)). ASR : activité spécifique relative, N : fraction nucléaire, M : fraction mitochondriale, L : fraction lysosomale, P : fraction microsomale, S : surnageant, Cytox : cytochrome c oxydase (marqueur des mitochondries), beta-gal : β -galactosidase (marqueur des lysosomes), PDE : phosphodiesterase alcaline (marqueur de la membrane plasmique), alpha-gluc : α -glucosidase (marqueur de l'appareil de Golgi)

III. Résultats et discussions

protein of 49 kDa) et MiD51 (mitochondrial dynamics protein of 51 kDa) pourraient également jouer un rôle dans le recrutement de Drp1 à la membrane mitochondriale externe et pourraient donc influencer la morphologie de cet organite en réponse à un stress cellulaire comme un stress léger du RE (Loson et al., 2013, Palmer et al., 2013, Koirala et al., 2013, Zhao et al., 2013).

III.4.1. Isolement et purification des mitochondries de cellules HepG2 par fractionnement subcellulaire

Compte tenu du fait que les protéines Mff, MiD49 et MiD51 sont localisées dans la membrane externe des mitochondries (Scorrano, 2013, Richter et al., 2014), nous avons décidé d'isoler et de purifier les mitochondries afin d'analyser l'abondance de ces protéines dans les cellules HepG2 exposées à un stress du RE induit par la BFA.

L'isolement de la fraction mitochondriale a été réalisé en utilisant la technique de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle (Peters et al., 1972, De Duve, 1971, De Duve et al., 1955). Cette technique se base sur la succession de plusieurs étapes de centrifugation à des vitesses croissantes de manière à séparer les différents constituants cellulaires sur base de leur densité et leur taille (voir matériel et méthodes point II.9) (Peters et al., 1972, De Duve, 1971, De Duve et al., 1955). Les fractions obtenues se nomment d'après leur constituant majoritaire : E (extrait cellulaire), N (noyaux), M (mitochondries), L (lysosomes), P (fraction microsomale) et S (constituants solubles). Sur base de la biologie des organites, de leur aspect dynamique et de leurs interactions physiques, il est impossible d'obtenir des fractions parfaitement pures pour un organite donné. Ainsi, la fraction M ne comprend pas uniquement des mitochondries mais encore des lysosomes, des débris membranaires du RE et du Golgi, des peroxysomes, ...C'est la raison pour laquelle, afin d'isoler et d'enrichir et de purifier d'avantage certaines fractions en mitochondries, la fraction M a ensuite été déposée sur un gradient de Nycodenz et soumise à une centrifugation isopycnique séparant les constituants selon leur densité. Cette expérience a été réalisée selon un protocole détaillé dans la thèse d'Aurelia de Pauw (URBC, UNamur, 2010). De cette manière la fraction M a pu être subdivisée en 12 fractions décrites dans un histogramme de fréquence d'activités spécifiques relatives (ASR) pour différentes enzymes marqueurs (**Figure 12 B et D**).

Des cellules HepG2 ont été incubées pendant 10 h en présence de BFA à 500 nM avant d'être homogénéisées par 16 passages au Dounce. L'homogénat cellulaire obtenu a été engagé dans le fractionnement cellulaire. La « pureté » des différentes fractions subcellulaires a été déterminée en analysant l'activité de quelques enzymes marqueurs des différents constituants cellulaires : la cytochrome c oxydase (marqueur des mitochondries), la β -galactosidase (marqueur des lysosomes), la phosphodiesterase alcaline (marqueur de la membrane plasmique), l' α -glucosidase (marqueur de l'appareil de Golgi) (**Figure 12**). La concentration protéique de chaque fraction a été quantifiée par la méthode de Pierce. Les résultats sont représentés sous forme d'activité spécifique relative (ASR = activité enzymatique rapportée aux pourcentages cumulés de protéines pour les fractions N à S). La surface de chaque rectangle représente donc le pourcentage d'activité de l'enzyme marqueur mesurée dans cette fraction par rapport à l'activité mesurée dans l'homogénat de départ (E). Les résultats reprenant les activités des enzymes marqueurs dans les différentes fractions (fractions 1 à 12) obtenues lors de la centrifugation isopycnique de la fraction M dans un gradient de Nycodenz sont exprimés sous la forme d'un histogramme de fréquences d'ASR en fonction de la densité de la fraction (g/ml).

III. Résultats et discussions

Les analyses des fractions cellulaires (N à S) montrent que la fraction M comporte majoritairement des mitochondries tant dans les cellules non traitées (**Figure 12A**) que dans les cellules traitées à la BFA (**Figure 12C**) puisque l'ASR est, respectivement, de 2,67 et 2,10. Cependant, comme l'attestent les ASR de différentes enzymes marqueurs, des lysosomes (β -galactosidase), des fragments de membranes plasmiques (phosphodiesterase alcaline) ainsi que des portions de l'appareil de Golgi (α -glucosidase) sont encore bien présents dans la fraction M. Les pourcentages importants en protéines (33,49 et 35,43 % pour, respectivement, les cellules contrôles et les cellules traitées avec la BFA) dans la fraction N pourraient résulter d'une mauvaise homogénéisation des cellules maintenant une grande proportion de cellules encore intactes. Ce problème également rencontré par d'autres auteurs (Gasingirwa et al., 2008) pourrait s'expliquer par la petite taille relative des cellules HepG2 et leur tendance à former des amas cellulaires, deux caractéristiques qui diminuent l'efficacité de l'homogénéisation.

La centrifugation isopycnique de la fraction M a donné lieu à un bon enrichissement en mitochondries dans la fraction 8, comme le montre le pic d'activité de la cytochrome c oxydase dans cette fraction et la plus faible ASR dosée dans les fractions adjacentes (fractions 7 et 9) qui est également très faible (voir nulle) dans des fractions plus éloignées (**Figure 12B et D**). Cependant, la fraction 8 obtenue à partir de cellules traitées à la BFA ou contrôles (non traitées) n'est pas pure, comme illustrée par la détection d'activités faibles, mais bien présentes, d'autres enzymes marqueurs comme la β -galactosidase, la phosphodiesterase alcaline et l' α -glucosidase.

On peut tout de même conclure que le fractionnement cellulaire par centrifugations différentielle et isopycnique nous a permis d'isoler une fraction 8 enrichie mais non pure en mitochondries. Un point important est que la distribution des activités enzymatiques est comparable pour les cellules contrôles et les cellules traitées à la BFA. Cependant, le processus d'homogénéisation ne semble pas encore optimal puisqu'on retrouve des pourcentages trop élevés de protéines dans la fraction N. Par manque de temps, nous n'avons pas pu optimiser ces conditions expérimentales. Nous avons donc recherché, dans ces fractions, l'abondance protéique d'effecteurs de la fission mitochondriale par des analyses en Western blot et nous avons dosé le cholestérol dans ces fractions. En effet, une augmentation de la concentration en cholestérol dans les mitochondries pourrait conduire à une fragmentation des mitochondries en diminuant le potentiel membranaire des mitochondries et en perturbant la synthèse d'ATP (Yu et al., 2005). Ce sont ces deux aspects que nous allons développer dans la suite de ce travail.

III.4.2. Analyse de l'abondance des effecteurs de la fission mitochondriale dans les mitochondries de cellules HepG2 exposées à un stress sublétal du RE induit par la BFA.

Dans le but d'étudier plus en détails les mécanismes responsables de la fragmentation du réseau mitochondrial en réponse à un stress sublétal du RE, nous nous sommes intéressés aux protéines mitochondriales recrutant la protéine cytosolique Drp1. En effet, bien que la protéine transmembranaire hFis1 soit la plus étudiée, il existe également d'autres acteurs connus pour jouer un rôle d'adaptateur pour la protéine Drp1 puisque, comme nous l'avons déjà mentionné, des protéines comme Mff, MiD49 et MiD51 sont aussi localisées en MME et interagissent avec Drp1 (Losen et al., 2013, Palmer et al., 2013, Koirala et al., 2013, Zhao et al., 2013). En général, elles sont associées à une fission mitochondriale. Cependant, il existe encore une controverse concernant MiD49 et MiD51 (Palmer et al., 2011, Zhao et al., 2011). En effet, il a été montré qu'une surexpression ectopique du facteur MiD51, aussi connu sous

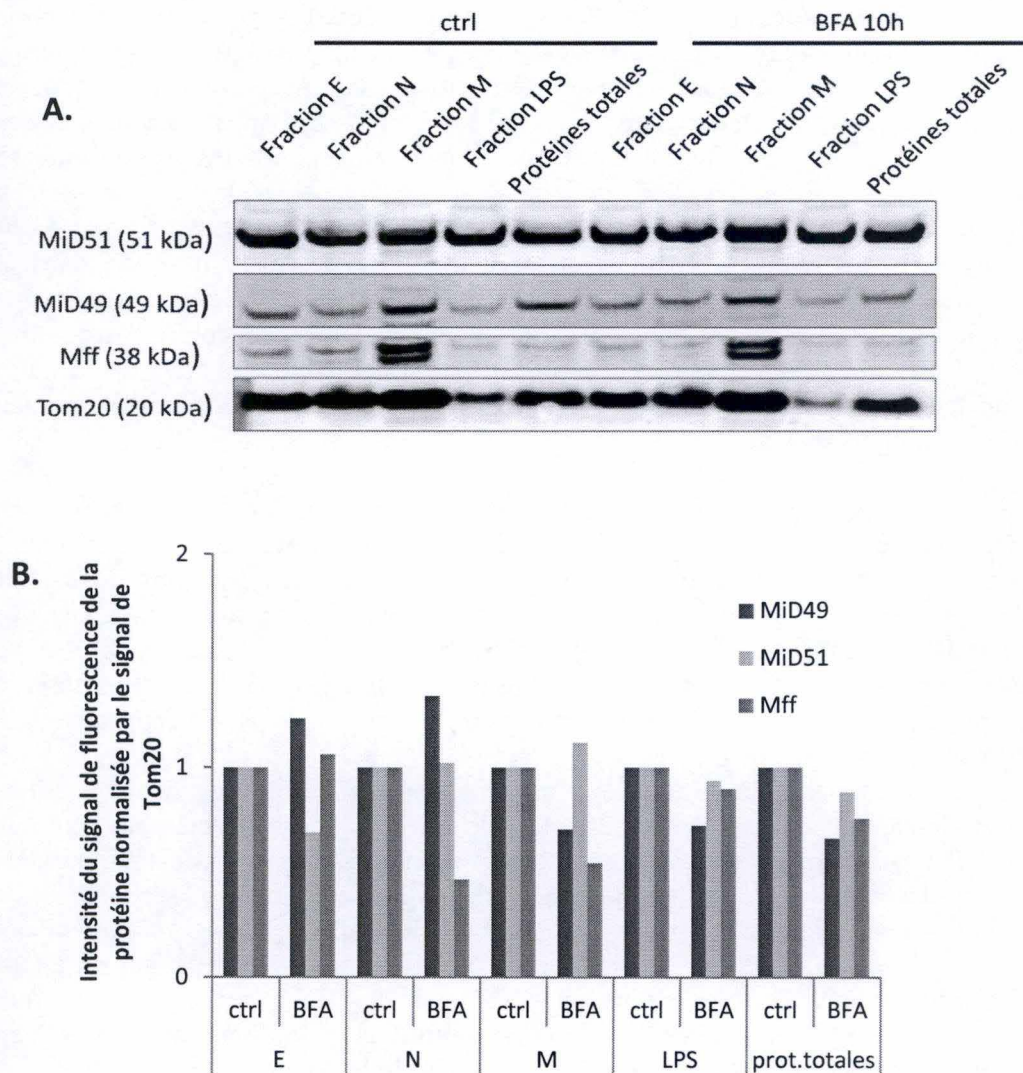


Figure 13: Effet d'une incubation des cellules HepG2 en présence de BFA sur l'abondance protéique des protéines de fission mitochondriale MiD49, MiD51 et Mff.

(A) Une analyse de l'abondance des protéines MiD49, MiD51 et Mff par Western Blot en fluorescence a été réalisée sur un équivalent de 15 μ g de protéines préparés à partir d'homogénats de cellules HepG2 incubées en absence (ctrl) ou en présence de 500 nM de BFA pendant 10 h. Les différentes fractions cellulaires E, N, M, LPS ont été obtenues par centrifugation différentielle. La condition « protéines totales » représente des protéines obtenues à partir de lysats totaux des cellules. (B) L'histogramme montre la quantification de la fluorescence des bandes de MiD49, MiD51 et Mff normalisée par la fluorescence des signaux obtenus pour Tom20 dont l'immuno-détection a été utilisée pour estimer l'enrichissement en mitochondries et comme contrôle de charge en les échantillons contrôles et les tests. Les valeurs de fluorescence normalisées des différentes fractions et de homogénat total des conditions tests ont ensuite été divisées par celles des fractions correspondantes des conditions contrôles portées arbitrairement à 1 pour les 3 protéines d'intérêt.

Fraction E : homogénat total et cellules non homogénéisées, Fraction N : fraction nucléaire, Fraction M : renferme majoritairement des mitochondries, Fraction LPS : contient la majorité des lysosomes, des peroxysomes mais aussi essentiellement des microsomes provenant de membranes du RE et du Golgi, Protéines totales : extraits protéiques préparés à partir de lysats de cellules

III. Résultats et discussions

le nom de MIEF1 (mitochondrial elongation factor 1) dans des cellules 293T (cellules humaines et embryonnaires du rein) est par exemple associée à une élongation des tubules mitochondriaux suite à une inhibition de la fonction de Drp1.

Nous avons donc recherché l'abondance de ces protéines dans les mitochondries de cellules HepG2 incubées en présence ou en absence de BFA. Des cellules HepG2 ont été incubées en présence de 500 nM de bréfeldine A pendant 10 h avant d'isoler les mitochondries par centrifugation différentielle. Les protéines des fractions cellulaires (E, N, M, et LPS) ont ensuite été résolues sur un gel d'électrophorèse 4-12% Bis-Tris et l'abondance des protéines d'intérêt a été analysée par Western blot en fluorescence. Une condition supplémentaire représentée par le contenu protéique total des cellules (cellules lysées) a aussi été ajoutée.

D'après la littérature, les protéines Mff, MiD51 et MiD49 sont ancrées dans la membrane externe des mitochondries (Scorrano, 2013, Richter et al., 2014). Une augmentation de leur abondance devrait donc être observable dans la fraction M. En effet, les protéines MiD49 et Mff sont majoritairement retrouvées dans la fraction M (**Figure 13**). La protéine MiD51 est présente dans chaque fraction, quoique légèrement plus abondante dans la fraction M. Cependant, et contrairement à notre hypothèse, nous n'avons pas pu mettre en évidence une augmentation de l'abondance de ces protéines dans les cellules HepG2 incubées en présence de BFA. En effet, l'abondance de ces différentes protéines est comparable à celle observée pour les cellules contrôles non traitées. On voit même une légère diminution de l'abondance de Mff et MiD49 dans les cellules incubées en présence de BFA. Cette expérience n'ayant été réalisée qu'une seule fois, il est difficile, voir impossible de tirer, des conclusions. Cette expérience devra être répétée pour pouvoir analyser l'effet éventuel d'un stress du RE sur l'abondance de ces différentes protéines jouant un rôle dans le contrôle de la morphologie mitochondriale.

III.5. Effets d'un stress du RE sublétal sur le contenu mitochondrial en cholestérol

A côté des protéines de la membrane mitochondriale comme hFis1, Mff, MiD41 et MiD51 susceptibles de recruter Drp1 et de participer à la fission mitochondriale, il existe aussi d'autres facteurs capables d'influencer l'état de fragmentation du réseau mitochondrial. Un de ces facteurs est la concentration membranaire en cholestérol qui est connu pour jouer un rôle important dans la fluidité de la membrane plasmique et être un constituant essentiel des radeaux lipidiques (Hu et al., 2010). Ce lipide est également retrouvé dans les membranes des organites comme le RE et, bien que dans une moindre mesure, dans les mitochondries, où il peut faire partie de « microdomaines » comparables aux radeaux lipidiques (Hayashi and Su, 2010). Dans des cellules humaines lymphoblastoïdes (cellules CEM), ces « microdomaines », qui sont localisés à la membrane externe des mitochondries, peuvent réguler l'apoptose et la dynamique mitochondriale par le fait qu'ils recrutent des facteurs pro-apoptotiques (t-Bid et Bax) et regroupent des facteurs de fission mitochondriale (hFis1) lors d'un stress apoptotique provoqué par une incubation des cellules avec des anticorps ant-CD95/Fas (cluster of differentiation 95) (Garofalo et al., 2005). Le contenu membranaire en cholestérol régule aussi l'association entre les mitochondries et le RE au niveau des MAMs (Fujimoto et al., 2012). Ces auteurs ont trouvé qu'une déplétion des MAMs en cholestérol augmente la liaison entre les deux membranes. Dans des souris modèles de la maladie de Niemann-Pick type C1 (NPC1), une maladie qui est associée à une accumulation de cholestérol dans les mitochondries, les neurones montrent une modification de la morphologie des mitochondries (mitochondries petites et rondes avec des crêtes irrégulières), une perte du potentiel membranaire des mitochondries et une diminution de l'activité ATP synthase (Yu et al.,

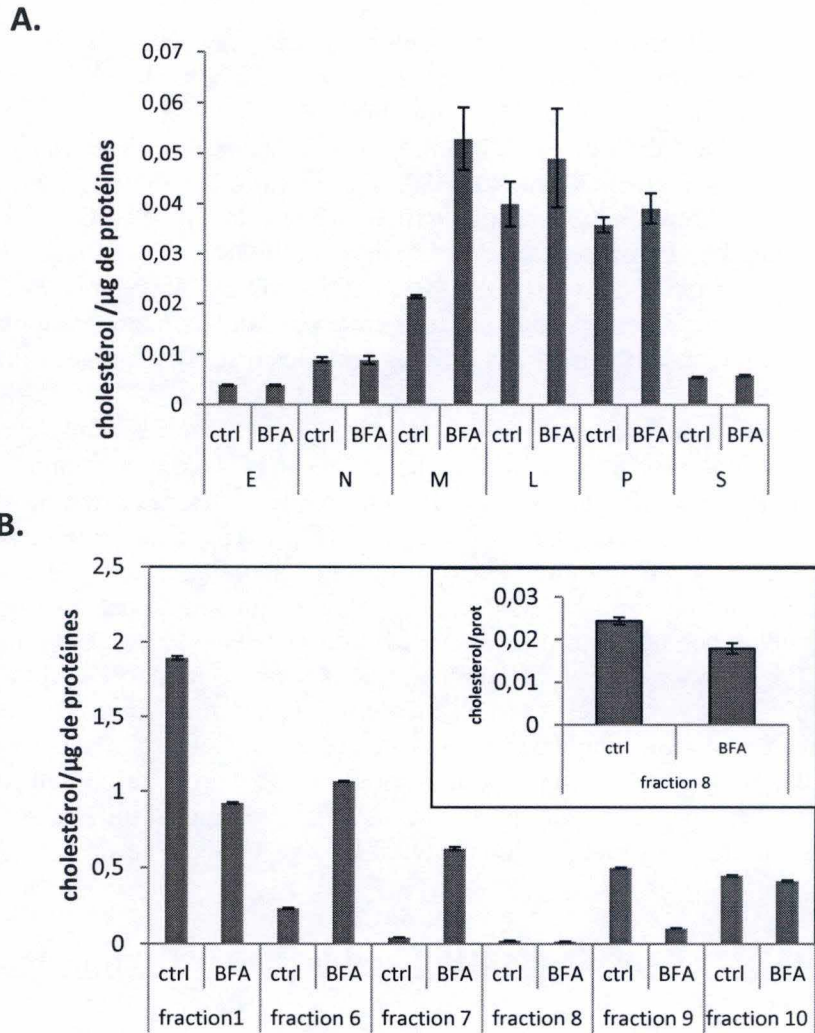


Figure 14 : Dosage du contenu en cholestérol dans les fractions cellulaires de cellules HepG2 incubées en présence ou en absence de BFA.

Les dosages de cholestérol ont été effectués à l'aide d'un kit de dosage du cholestérol (Amplex Red Cholesterol Assay kit, Invitrogen) sur les différentes fractions cellulaires (E, N, M, L, P, S)(A) et les fractions 1, 6, 7, 8, 9 et 10 (B) obtenues à partir de la centrifugation isopycnique (gradient de Nycodenz) au départ de la fraction M de cellules HepG2 incubées en absence (contrôles : ctrl) ou en présence de 500 nM de BFA pendant 10 h. Les concentrations en cholestérol ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ont été obtenues en comparant les valeurs de fluorescence de la résorufine mesurées après 30 min d'incubation à celles d'une droite d'étalonnage pour des concentrations connues en cholestérol. La concentration en cholestérol de chaque échantillon a ensuite été normalisée par la concentration en protéines ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) de chaque fraction, déterminée par un dosage de Pierce. Le graphique (B) contient un agrandissement des résultats obtenus pour la fraction 8 évitant l'effet d'échelle. Les résultats représentent la moyenne \pm SD pour des triplicats d'une expérience unique ($n=1$).

III. Résultats et discussions

2005). Les maladies alcooliques du foie (ALD, Alcoholic Liver Disease) (un terme regroupant des altérations hépatiques comme la stéatose hépatique, la cirrhose et l'hépatocarcinome) sont d'autres pathologies qui mettent en relation le contenu mitochondrial en cholestérol et le dysfonctionnement des mitochondries (Mari et al., 2014). En effet, l'hyperhomocystéinémie et une augmentation de l'expression de l'ASMase (acid sphingomyelinase) qui sont associés à une consommation chronique d'alcool provoquent un stress du RE par la production accrue de ceramide (Fernandez et al., 2013, Liangpunsakul et al., 2012). Une activation des voies UPR induit alors une expression de StARD1 (steroidogenic acute regulatory protein) qui est un composant du complexe qui importe le cholestérol dans la MME (voir introduction point IV.2) (Fernandez et al., 2013). Une accumulation de cholestérol dans la MME change alors la dynamique membranaire en augmentant la viscosité de la membrane, ce qui entrave la fonction de l'antiporteur OGC (2-oxoglutarate carrier) qui est responsable de l'échange 2-oxoglutarate/GSH (glutathion) (Coll et al., 2003). Dès lors, une augmentation du contenu en cholestérol peut diminuer les défenses antioxydantes des mitochondries en inhibant l'import de GSH. En plus de dépléter les mitochondries en GSH, l'accumulation membranaire du cholestérol dans les mitochondries peut induire une lipotoxicité. Une étude de Gan et collaborateurs sur des hépatocytes primaires de souris chargés avec du cholestérol par incubation *in vitro* avec des LDLs (low density lipoproteins) a montré que le dépôt de cholestérol dans les mitochondries cause l'apoptose par activation de JNK1 (c-Jun N-terminal protein kinase 1). L'activation de la voie JNK1 est accompagnée d'une ouverture du PTP, la libération de cytochrome c, un stress oxydatif et une diminution de la production d'ATP (Gan et al., 2014).

Comme une augmentation en cholestérol dans les membranes mitochondriales peut provoquer l'apoptose, un évènement qui est souvent associé à une fission accrue des mitochondries (Ciarlo et al., 2010), nous avons donc trouvé intéressant de chercher à savoir si un stress sublétal et transitoire du RE pouvait modifier le contenu membranaire en cholestérol des mitochondries de cellules exposées au stress du RE et ainsi influencer la fission mitochondriale. En effet, le RE participe au métabolisme des stérols (Issop et al., 2013) et possède des complexes protéiques membranaires pour importer et échanger le cholestérol avec les mitochondries (Liu et al., 2006, Charman et al., 2010, Soccio and Breslow, 2004).

Des cellules HepG2 ont donc été soumises à une stimulation avec de la BFA (500 nM) pendant 10 h et la fraction mitochondriale M a été isolée par centrifugation différentielle puis déposée sur un gradient de Nycodenz. La concentration en cholestérol a ensuite été déterminée dans les différentes fractions obtenues après la centrifugation différentielle (**Figure 14A**) ainsi que dans certaines fractions (fractions 1, 6, 7, 8, 9, et 10) (**Figure 14 B**) générées à partir du gradient de densité et présentées à la **Figure 12**. La méthode de dosage du cholestérol utilise un kit commercial (Kit Amplex Red cholesterol assay, Invitrogen) et repose sur une réaction catalysée par la « cholesterol oxidase » générant du peroxyde d'hydrogène qui réagit avec l'Amplex Red dont le produit de réaction peut être dosé en fluorimétrie (voir la section « Matériel et Méthodes », point II.10.6) (**Figure 14**).

Comme cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, la prudence est de rigueur pour tenter de décrire et d'interpréter les résultats obtenus. En ce qui concerne la fraction M, les résultats montrent une forte augmentation du contenu en cholestérol dans les cellules traitées avec la BFA en comparaison avec les cellules contrôles non traitées. Une petite augmentation de la concentration en cholestérol est aussi observée dans la fraction L de cellules incubées avec la BFA. Cependant, nous avons vu que la fraction M est contaminée par la présence de nombreux organites et nous ne pouvons pas nécessairement attribuer la présence de

III. Résultats et discussions

cholestérol dans cette fraction aux mitochondries. L'analyse des différentes fractions obtenues après centrifugation isopycnique (**Figure 14B**) révèle que la concentration en cholestérol est très faible dans la fraction 8 (la fraction renfermant la majorité des mitochondries) et ceci tant pour les cellules incubées en présence de BFA que pour les cellules contrôles. Cette faible concentration est compatible avec le fait que les mitochondries sont connues comme des organites relativement pauvres en cholestérol (Montero et al., 2008, Soccio and Breslow, 2004). Les résultats obtenus pour la fraction 8 montrent une légère diminution de la concentration en cholestérol dans les cellules incubées en présence de BFA. Cette donnée est à vérifier dans des expériences futures car, bien que le dosage soit très reproductible d'un point de vue technique, les données ne portent que sur un seul échantillon biologique réalisé en triplicats techniques. On ne retrouve donc plus la tendance observée dans la fraction M et les différences observées entre les fractions M sont donc probablement dues à la présence d'organites contaminants (et plus riches en cholestérol que les mitochondries) en proportions plus importantes dans la fraction M de cellules incubées en présence de BFA par rapport à la fraction M de cellules contrôles ou bien à des concentrations plus élevées en cholestérol dans des organites contaminants comme les lysosomes, le RE, ... (mais dont les proportions seraient comparables) de la fraction M de cellules traitées à la BFA par rapport à la fraction M de cellules contrôles. Les fractions 1 et 9 préparées à partir de cellules exposées au stress du RE induit par la BFA montrent également une diminution du contenu en cholestérol. Par contre, les fractions 6 et 7 présentent une plus forte concentration en cholestérol lorsqu'elles ont été préparées à partir de cellules incubées en présence de BFA. Bien que l'on ait essayé d'avoir des conditions de fractionnement cellulaire optimales afin d'obtenir une fraction enrichie en mitochondries, les dosages enzymatiques des enzymes marqueurs ont montré une présence de contaminants dans les fractions 1 à 10. Cette présence d'autres organites (ou fragments membranaires de ces organites) riches en cholestérol comme par exemple le RE ou l'appareil de Golgi et leurs proportions variables dans ces fractions pourraient expliquer les différences de concentrations en cholestérol entre la fraction M et la fraction 8, enrichie en mitochondries. Nous n'avons donc pas pu mettre en évidence une augmentation de la concentration en cholestérol dans les mitochondries de cellules HepG2 exposées à un stress subléthal du RE causé par la BFA.

Pour terminer ce travail et la recherche d'une piste visant à expliquer la fragmentation mitochondriale dans les cellules incubées en présence de BFA, nous nous sommes intéressés à une hypothèse prometteuse en nous basant sur les travaux de Win et de ses collaborateurs qui ont montré qu'en cas de stress RE dans un contexte apoptotique, la JNK (c-Jun N-terminal kinase), un membre de la famille des MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) est phosphorylée sur les résidus Thr 183 et Tyr 185 et interagit avec Sab (Win et al., 2014). Ces auteurs montrent que cette interaction perturbe la respiration mitochondriale et déclenche l'apoptose.

L'effet inhibiteur de l'activation de la JNK sur la respiration mitochondriale pourrait être expliqué par le fait que la protéine JNK phosphorylée interagit physiquement avec la chaîne de transport des électrons. En effet, la JNK phosphorylée sur ses résidus Thr 183 et Tyr 185 peut-être co-immunoprécipitée avec la sous-unité UQCRC2 du complexe III de la chaîne de transport des électrons dans des cardiomyocytes de rat (Jang and Javadov, 2014).

Nous avons donc recherché une éventuelle phosphorylation activatrice de la JNK dans des cellules HepG2 incubées en présence de BFA.

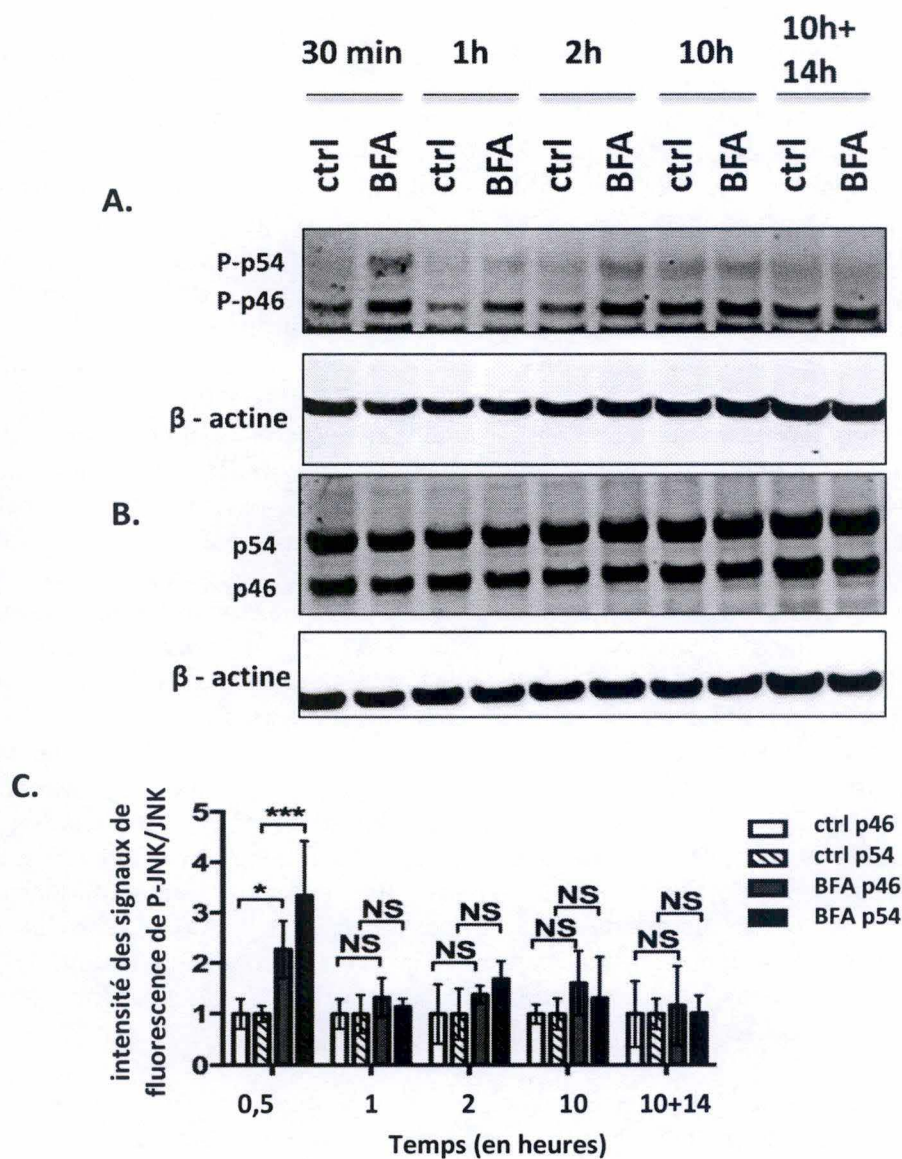


Figure 15 : Effet d'une stimulation à la BFA sur la phosphorylation de la protéine JNK

(A) et (B) Analyse de l'abondance des formes phosphorylées (sur les acides aminés Thr 183 et Tyr 185) et totale des JNKs en Western blot à fluorescence réalisée sur 15 μ g de protéines obtenues à partir de lysats clairs de cellules HepG2 incubées en présence de 500 nM de BFA pendant 30 min, 1, 2, et 10 h, ou 10 h suivies de 14 h de récupération. (A) Visualisation de l'abondance de la forme phosphorylée de ces isoformes. L'immuno-détection de la β -actine a été utilisée comme contrôle de charge. (B) Western blot reprenant l'abondance totale pour les deux isoformes de la JNK (p46 et p54) qui ont été marquées. (C) Quantification de la fluorescence des signaux de fluorescence de la forme phosphorylée des 2 isoformes de la JNK (p46, p54) normalisée par la fluorescence de la forme non phosphorylée des deux isoformes de JNK. Les résultats sont exprimés en tant que rapports de fluorescence exprimés par rapport à la condition contrôle (ctrl) constituée de cellules incubées en absence de molécule pendant 30 min et représentent la moyenne \pm SD pour 3 expériences indépendantes (n= 3). **, ***: différences statistiquement significatives par rapport aux contrôles correspondants avec, respectivement, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ comme déterminé par un test ANOVA 2. ns= non significatif

III.6. La protéine JNK comme lien potentiel entre le stress du RE et la fragmentation mitochondriale

On sait qu'un dysfonctionnement mitochondrial et surtout une dépolarisation de la membrane mitochondriale interne s'accompagne d'une fragmentation du réseau mitochondrial permettant à la cellule d'éliminer les mitochondries endommagées par mitophagie (Twig et al., 2008). La JNK est une kinase candidate potentiellement intéressante dans le contexte d'un stress du RE puisqu'elle est activée (par phosphorylation) en aval du senseur IRE1 α , une enzyme bifonctionnelle possédant une activité kinase et endonucléase (Walter and Ron, 2011). Suite à son activation en réponse à un stress du RE provoquant l'UPR, IRE1 α interagit avec TRAF2 et déclencherait l'activation d'une cascade de kinases (Urano et al., 2000). Une phosphorylation de JNK pourrait donc causer un dysfonctionnement mitochondrial suivi de la fragmentation de l'organite.

III.6.1. Effets d'une stimulation à la BFA sur la phosphorylation de la protéine JNK

Dans un premier temps, nous sommes d'abord intéressés à l'état de phosphorylation de la protéine JNK dans les cellules HepG2 exposées à un stress sublétal du RE déclenché par une stimulation à la BFA. Pour ce faire, des cellules HepG2 ont été stimulées avec 500 nM de BFA pendant 30 min, 1, 2, 10 h ou 10 h suivies d'une période de récupération de 14 h ou de 38 h. Au terme des incubations, des lysats cellulaires clairs ont été préparés et l'abondance des formes totales et phosphorylées de la JNK a été analysée par Western Blot en fluorescence (**Figure 15**). Une phosphorylation des 2 isoformes de la JNK (p46 et p54) est déjà observée après 30 min dans les cellules incubées en présence de BFA. Cette augmentation de la phosphorylation de JNK est rapide et transitoire, car elle est plus difficilement détectable pour des temps plus longs. Après un temps de repos de 14 ou 38 h par contre, aucune différence n'est observable pour la phosphorylation de la JNK entre les cellules traitées avec la BFA et les cellules contrôle non traitées. Une stimulation des cellules à la BFA peut donc induire une phosphorylation rapide (déjà présente 30 min après stimulation) et transitoire des 2 isoformes de JNK (p46 et p54) sur les acides aminés Thr 183 et Tyr 185, souvent utilisés comme marqueurs de l'activation de la Ser/Thr kinase (Davis, 2000).

III.6.2. Effets d'une inhibition de la JNK par le SP600125 sur la fragmentation du réseau mitochondrial et le dysfonctionnement mitochondrial provoqué par une stimulation à la BFA

Afin d'étudier plus en détails la relation entre la phosphorylation des JNKs et la fragmentation du réseau mitochondrial ou le dysfonctionnement mitochondrial, les cellules HepG2 ont été incubées avec du SP600125, un inhibiteur chimique des JNK 1, 2 et 3 (Bennett et al., 2001). Les cellules HepG2 ont été cultivées en présence de BFA (500 nM) avec ou sans SP600125 à 40 μ M (une concentration qui inhibe complètement la phosphorylation de la JNK dans ces conditions : Kayleen Vannuvel, thèse en cours) pendant 30 min, 1, 2, ou 10 h avant d'être marquées avec la sonde Mitotracker Green afin de visualiser et de quantifier l'état de fragmentation du réseau mitochondrial. L'efficacité de l'inhibition des JNK a été montrée par Western Blot (Kayleen Vannuvel, thèse en cours, données non montrées). L'analyse quantitative par ImageJ64 de la morphologie des mitochondries des micrographies obtenues (**Figure 16A**) montre une fragmentation très significative du réseau mitochondrial dans les cellules incubées en présence de BFA, ce qui valide les résultats présentés au début du travail

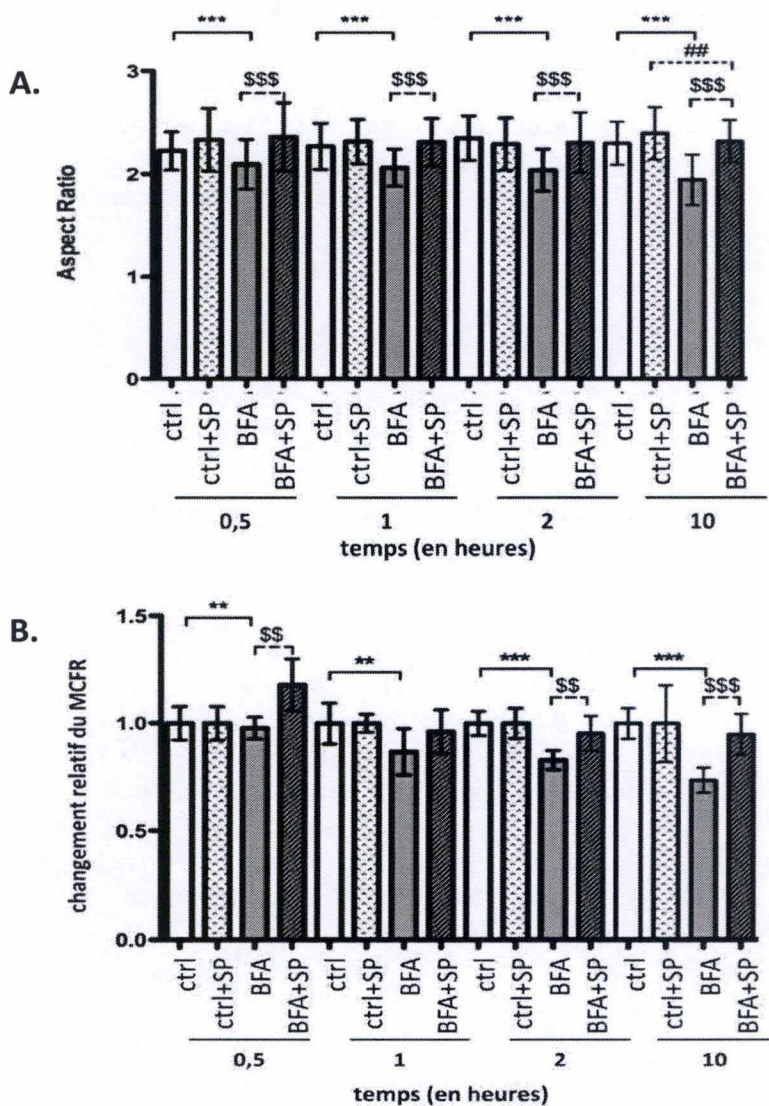


Figure 16 : Effets d'une inhibition de la phosphorylation de la JNK par le SP600125 sur la fragmentation du réseau mitochondrial et le contenu en ROS ($O_2^{\cdot-}$) mitochondriaux

(A) Des cellules HepG2 ont été ou non pré-incubées en présence de SP600125 (SP) à 40 μ M pendant 1 h avant d'être incubées en présence de 500 nM de BFA pendant 30 min, 1, 2 ou 10 h. Les cellules ont ensuite été incubées en présence de 100 nM de la sonde Mitotracker Green pour marquer les mitochondries. Les cellules vivantes ont ensuite été visualisées par microscopie confocale. Les micrographies des cellules ont été analysées à l'aide du programme ImageJ 64 afin de déterminer l'état de fragmentation du réseau mitochondrial à l'aide de l'« aspect ratio » (AR). Les résultats représentent la moyenne \pm SD pour au moins 100 événements par cellule et plus que 40 cellules/condition sélectionnées à partir de 3 expériences indépendantes (n=3). ***, \$\$\$; ## : différences statistiquement significatives par rapport aux contrôles correspondants avec respectivement $p < 0,001$; $p < 0,001$ et $p < 0,01$ comme déterminé par un test ANOVA 2. (B) Des cellules HepG2 ont été incubées en présence ou en absence (ctrl) de 500 nM de BFA avec ou sans SP600125 (SP) pendant 30 min, 1, 2 ou 10 h puis marquées avec la sonde MitoSOX pour déterminer le contenu en ($O_2^{\cdot-}$) par cytométrie de flux. Les résultats sont exprimés en changement relatif du MCFR (mean channel fluorescence ratio) et représentent la moyenne \pm SD avec au moins 100 événements par cellule et plus que 40 cellules/condition sélectionnées pour 3 expériences indépendantes (n=3). **, \$\$, ***, \$\$\$: différences statistiquement significatives par rapport aux contrôles correspondants avec, respectivement, $p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ comme déterminé par un test ANOVA 2.

III. Résultats et discussions

(**Figure 1**). De plus, la présence de l'inhibiteur SP600125 diminue, de manière significative, la fragmentation du réseau mitochondrial provoquée par le stress sublétal du RE et ce, pour tous les temps d'incubation testés. L'activation des JNKs semble donc participer directement ou indirectement à l'altération du réseau mitochondrial dans les cellules exposées au stress du RE.

Ayant montré une phosphorylation activatrice de la JNK sur les résidus Thr 183 et/ou Tyr 185 suite à un stress du RE (**Figure 15**) et une diminution de la fragmentation mitochondriale par inhibition des JNK dans les mêmes conditions de stress du RE (**Figure 16A**), nous nous sommes intéressés à déterminer les liens mécanistiques entre l'activation de la voie JNK et la fission mitochondriale. Dans leur article, Win et collègues ont émis l'hypothèse que, dans des conditions de stress du RE létal, l'interaction entre la forme phosphorylée de JNK et Sab, une protéine de la MME, perturbe la respiration mitochondriale, ce qui crée ainsi un stress oxydatif (Win et al., 2014). Le lien entre stress oxydatif et la fission mitochondriale a été montré par les travaux sur des cellules ASTC-a-1 (cellules d'un cancer pulmonaire humain) et des cellules COS-7 (cellules de rein de singe) qui ont été soumis à une irradiation à laser (HF-LPLI, high-fluence low-power laser irradiation) causant une augmentation des ROS dans les mitochondries (Wu et al., 2011). Plus que 75% des cellules soumis à ce traitement HF-LPLI montraient une morphologie fragmentée et punctiforme des mitochondries, ce qui est expliquée par un recrutement accru de Drp1 à la MME. Ces cellules montraient aussi un potentiel de membrane mitochondrial diminué, une activation de Bax et une libération de cytochrome c, indiquant le déclenchement de l'apoptose suite à une irradiation HF-LPLI.

Finalement, une expérience a également été réalisée pour étudier l'effet d'une inhibition des JNKs sur le contenu en ROS des mitochondries. Des cellules HepG2 incubées pendant différents temps (30 min, 1, 2, ou 10 h) en présence de 500 nM en BFA avec ou sans inhibiteur de JNK ont été marquées avec la sonde MitoSOX (sonde fluorescente détectant les radicaux libres anioniques superoxydes spécifiquement dans les mitochondries (Piacenza et al., 2007) et analysées en cytométrie de flux (**Figure 16B**). Les résultats montrent une diminution significative du contenu mitochondrial en $O_2^{(-)}$ dans les cellules incubées en présence de BFA. Cette diminution de la production en radicaux anioniques est très prononcée dans les cellules incubées en présence de la molécule pendant 10 h mais est déjà significative après 30 min d'incubation. En présence de l'inhibiteur des JNKs, la diminution du contenu en ROS des mitochondries est partiellement, mais significativement, prévenue dans les cellules incubées en présence de BFA. Les effets d'une inhibition des JNKs sont les plus importants pour les temps d'incubation de 2 et 10 h en présence de BFA. Les JNKs semblent donc jouer un rôle dans le changement de la production des ROS des cellules HepG2 exposées au stress du RE, un processus qui pourrait être lié au changement de la morphologie de l'organite.

En conclusion, la phosphorylation activatrice des JNKs sur les résidus Thr 183 et Tyr 185 déclenchée par un stress sublétal du RE semble donc être partiellement responsable de la fragmentation mitochondriale associée à une diminution de l'abondance des ROS ($O_2^{(-)}$). Les mécanismes moléculaires par lesquels les JNKs médient ces effets restent cependant à identifier.

Conclusion,
Discussions et
perspectives

IV. Conclusion, discussions et perspectives

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite qui contrôle de nombreuses fonctions cellulaires et voies métaboliques comme le métabolisme des lipides (Gorlach et al., 2006, Jin et al., 2014b), l'homéostasie du calcium (Gorlach et al., 2006, Schauble et al., 2014, Kiviluoto et al., 2013), la N-glycosylation (Helenius and Aebi, 2004) et surtout le repliement des protéines membranaires et sécrétées (Chakrabarti et al., 2011, Gorlach et al., 2006). Vu l'importance de cet organite pour la cellule, il est crucial qu'il existe au sein du RE des voies de signalisation qui soient activées en réponse à une surcharge protéique massive, à des changements de pH, à une perte d'homéostasie calcique ou à des perturbations dans le trafic intracellulaire des protéines (Cao and Kaufman, 2014). Cette réponse du RE face au stress, nommée UPR, regroupe 3 branches (PERK, IRE1 et ATF6) dont l'activation sert, dans un premier temps à l'adaptation, visant à augmenter la capacité de repliement du RE et à diminuer la charge protéique (Chakrabarti et al., 2011, Walter and Ron, 2011).

Evidemment, si le stress du RE est trop important dans sa sévérité ou sa durée, la cellule entre en apoptose en activant directement des voies indépendantes et/ou dépendantes de la mitochondrie. Ceci illustre la forte interaction physique et la communication fonctionnelle qu'entretient le RE avec les mitochondries, qui sont communément plus connues pour leur fonction dans le métabolisme énergétique des cellules (Grimm, 2012, de Brito and Scorrano, 2010). Or les mitochondries, elles-aussi, assurent de nombreuses autres fonctions essentielles que la production énergétique comme la régulation de l'apoptose, la participation au maintien de l'homéostasie calcique et le contrôle du métabolisme de lipides (Vannuvel et al., 2013, Pagani and Eckert, 2011). Les mitochondries sont souvent organisées sous la forme d'un réseau étendu très dynamique qui subit de nombreux cycles de fission et de fusion au cours de la vie cellulaire (Lee et al., 2014, Mitra, 2013, Lackner, 2014). Cette dynamique mitochondriale fait aussi intervenir la communication entre le RE et les mitochondries par l'intermédiaire d'interactions physiques et des échanges de signaux moléculaires (Szabadkai et al., 2006, Grimm, 2012, Kornmann et al., 2009).

Des problèmes au niveau de cette communication entre les deux organites, ainsi que des dysfonctionnements dans la dynamique des mitochondries sont aussi associés à des maladies largement répandues dans la population occidentale comme le diabète de type II ou des maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer ou maladie de Parkinson).

En effet, les neurones sont particulièrement sensibles au dysfonctionnement mitochondrial en raison de leurs besoins énormes en énergie pour le transport des vésicules sécrétoires dans leurs axones et pour tamponner les variations de concentrations en calcium dans leurs extrémités synaptiques (DuBoff et al., 2013). Il est en effet connu qu'un patient souffrant de la maladie d'Alzheimer (AD) présente des changements morphologiques des mitochondries (mitochondries fragmentées) et une accumulation d'amyloïde β ($A\beta$) dans la matrice mitochondriale et la MMI causant des dysfonctionnements mitochondriaux (DuBoff et al., 2013, Manczak et al., 2006, Wang et al., 2009).

Le diabète de type II est aussi étroitement lié au dysfonctionnement mitochondrial et au stress du RE. Cette maladie, caractérisée par une résistance à l'insuline et une hyperglycémie chronique, conduit, *in fine*, à la mort des cellules β du pancréas (Martin and McGee, 2014). Ces cellules productrices d'insuline doivent faire face à un stress chronique du RE suite à l'accumulation intraluminale de pro-insuline non repliée (Biden et al., 2014) et à un stress oxydatif résultant d'une sollicitation des voies métaboliques dépendantes des mitochondries (Brownlee, 2001, Blake and Trounce, 2014).

Sur bases de ces observations, des études ont été réalisées afin de mieux comprendre les effets d'un stress du RE sur les fonctions des mitochondries. Au sein du laboratoire URBC-NARILIS (UNamur), un projet étudiant les répercussions d'un stress du RE subléta sur la

IV. Conclusion, discussions et perspectives

morphologie et le fonctionnement des mitochondries a été initié dans le cadre de la thèse de doctorat de Madame Kayleen Vannuvel (thèse en cours). Dans le cadre de ce travail, il a été montré qu'un stress sublétal et transitoire du RE est capable d'augmenter la fragmentation du réseau mitochondrial dans des cellules HepG2 incubées en présence de BFA, un phénomène associé à une augmentation significative de l'expression de hFis1, une protéine transmembranaire régulatrice de la fission mitochondriale (**Figure 2**).

Ces observations nous ont poussé à investiguer, plus en détails, les mécanismes régulant la dynamique mitochondriale en réponse à un stress du RE.

Le premier objectif de ce travail était donc l'étude de la régulation transcriptionnelle de hFis1 en réponse à un stress léger du RE avec l'espoir de pouvoir trouver des conditions d'activation du promoteur en systèmes rapporteurs. Le but ultime poursuivi était donc de tenter à identifier des facteurs de transcription et co-activateurs responsables de l'expression du gène codant pour hFis1 par un système de capture à l'aide de sondes nucléotidiques et une identification en spectrométrie de masse comme décrit pour l'identification de protéines liées à la séquence 5' LTR du HIV (Tacheny et al., 2012).

Dans cette perspective, nous avons donc tenté de mettre au point un modèle d'induction de stress du RE utilisant le glutamate afin de rechercher les effets de cette molécule sur l'expression de hFis1. Cependant, cette méthode de stimulation pour induire l'expression de hFis1 s'est révélée inefficace dans les cellules HepG2. En effet, ni l'abondance du transcrite de Fis1 (**Figure 6A**), ni l'abondance protéique de hFis1 (**Figure 6B**) n'augmente dans les cellules en présence de glutamate et ce, contrairement à ce qui était attendu en se basant sur la littérature de cellules neuronales (Kumari et al., 2012).

L'explication réside probablement dans le fait que le type cellulaire utilisé dans notre travail (HepG2) est fort différent des cellules neuronales (HT22, N18-RE-105) utilisées dans les études rapportées dans les articles consultés (Jin et al., 2014a, Kumari et al., 2012, Murphy et al., 1989, Ha and Park, 2006). En effet, les cellules neuronales possédant le récepteur NMDAR sont sensibles à l'effet excitotoxique du glutamate. L'excitotoxicité s'explique par l'activation des récepteurs ionotropiques NMDAR ou AMPAR générant un influx excessif d'ions calcium dérégulant l'homéostasie calcique cellulaire et causant l'apoptose suite au gonflement des mitochondries et à l'activation de calpaïnes (Choi, 1988). Pour les cellules HepG2 par contre, on pensait qu'elles pourraient être potentiellement sensibles à une toxicité liée à un stress oxydatif susceptible d'être induit par le glutamate (oxytosis) (Murphy et al., 1989). Cette voie de toxicité survient dans des cellules non excitables qui n'expriment pas NMDAR et chez lesquelles un excès de glutamate cause une saturation des canaux membranaires glutamate-cystine. Ces cellules deviennent alors déplétées en cystéine, un acide aminé qui est nécessaire pour maintenir le niveau intracellulaire de glutathion. Appauvries en glutathion, ces cellules perdent ou diminuent leurs défenses antioxydantes et ne peuvent plus faire face à la production de ROS responsables du stress oxydatif (Tan et al., 1998). Les cellules HT22 (hippocampe murin), par le fait qu'elles n'expriment pas le récepteur NMDAR lorsqu'elles ne sont pas différenciées (He et al., 2013, Zhao et al., 2012), pourraient être utilisées comme modèle pour tester la toxicité oxydative du glutamate et son effet sur l'expression de Fis1. Le fait qu'un excès de glutamate induise la mort cellulaire par un stress oxydatif a été montré dans des études qui rapportent que le traitement des cellules HT22 stimulées au glutamate en présence de molécules connues pour leur rôle antioxydant comme le sélénium (Kumari et al., 2012), la cordycépine (Jin et al., 2014a), ou la taurine (Pan et al., 2012, Jong et al., 2012) diminue la mort cellulaire induite par le glutamate.

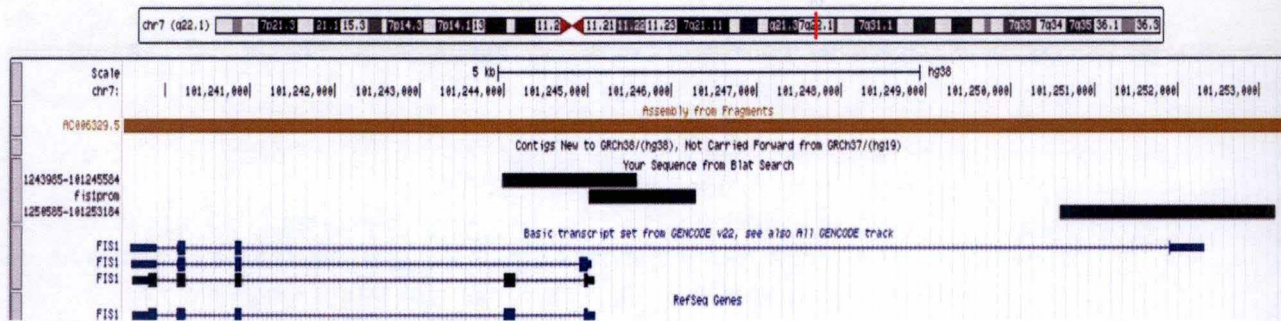


Figure 17 : Analyse in silico de la séquence promotrice de hFis1. Le schéma montre la localisation des régions promotrices de hFis1 trouvées par une recherche sur « ensembl » (rectangles noirs avec les coordonnées chromosomiques 1243985-101245584 et 1250585-101253184) par rapport à la séquence promotrice de hFis1 qui a été utilisée dans ce mémoire (rectangle noir fis1prom). La figure montre aussi où se trouve la région d'intérêt sur le chromosome 7 (trait rouge sur le schéma du chromosome en haut). Les rectangles et tirets bleus foncés et noirs en bas du schéma montrent les exons et introns des différents transcrits de hFis1 des plateformes GENCODE v22 et RefSeq. L'outil informatique utilisé pour réaliser ce Blast et la représentation schématique a été UCSC Genome Browser (<http://genome-euro.ucsc.edu>) en utilisant la version Dec.2013 (GRCh38/hg38) de l'assemblage du génome humain.

IV. Conclusion, discussions et perspectives

Dans le cadre de ce mémoire nous nous attendions donc à voir un effet de toxicité oxydative du glutamate pour les cellules HepG2, comme celles-ci ne sont pas des cellules excitaables. Cependant, nous avons montré que la libération de LDH est plus faible dans les cellules HepG2 incubées en présence de glutamate et ce, d'une manière dépendante de la concentration (**Figure 3**) suggérant que le glutamate n'est pas toxique (et peut-être même protecteur) pour ce type cellulaire. Cet effet hépato-protecteur pourrait être expliqué par l'expression du récepteur métabotrope mGLU5R dans les cellules HepG2 (Storto et al., 2000) qui est susceptible d'activer la voie de signalisation dépendante de ERK (Extracellular signal-regulated kinase) et la voie de la PI3-K (phosphoinositide-3 kinase) qui sont connues pour leurs effets pro-survie dans des cellules HepG2 (Mitsui et al., 2001). Une fois activé par le glutamate, le récepteur métabotrope mGLU5R peut interagir avec HOMER1 (Homer protein homolog 1) et PIKE (phosphoinositide-3 kinase enhancer) qui sont aussi exprimés dans le foie (Chan and Ye, 2011) et ainsi activer la voie PI3-K (Gross et al., 2015). La voie ERK semble aussi réguler la viabilité de cellules tumorales (Wu et al., 2012). En effet une inhibition de ces récepteurs mGLU5R par le MPEP (2-méthyl-6-(phényléthyl)-pyridine) cause une chute dans la production d'ATP et une augmentation du nombre de cellules HepG2 entrant en apoptose (Wu et al., 2012). Il n'est pas donc pas exclu que le récepteur mGLU5R exprimé par les cellules HepG2, joue un rôle important dans les réponses cellulaires au glutamate dans ces cellules.

Ajoutons encore que les cellules hépatiques HepG2 incubées en présence d'un excès de glutamate pourraient bénéficier d'un carburant métabolique alimentant le cycle de Krebs (Plaitakis and Shashidharan, 2000, Fitzpatrick et al., 1990). En effet, les hépatocytes, exprimant l'enzyme glutamine synthétase, peuvent synthétiser de la glutamine à partir du glutamate (Smith and Campbell, 1988, Demine et al., 2014). La glutamine importée dans les mitochondries y peut être de nouveau dégradée en glutamate et ammoniac par la glutaminase et la déamination du glutamate produisant de l' α -cétoglutarate qui alimente le cycle de Krebs.

Si on devait mettre au point l'induction d'un stress du RE par une incubation des cellules en présence de glutamate, il serait donc plus judicieux d'utiliser un autre modèle cellulaire. En prenant des cellules neuronales HT22, on pourrait donc essayer d'étudier les effets d'un stress léger du RE induit par un excès de glutamate sur la transcription de hFis1 et analyser les effets d'une fragmentation mitochondriale. L'utilisation de ce modèle cellulaire serait sûrement intéressante pour approfondir les connaissances sur les interactions RE-mitochondries et ce modèle serait plus pertinent pour l'étude de changements de ces interactions dans le cadre des maladies neuro-dégénératives (Choi, 1988).

La stimulation au glutamate s'avérant infructueuse nous avons poursuivi l'étude d'un traitement des cellules à la BFA pour déclencher le stress du RE afin d'étudier l'expression de hFis1. Dans le but d'identifier des protéines et co-facteurs régulateurs de la transcription de hFis1 nous avons utilisé la transfection transitoire de cellules avec un plasmide encodant un gène rapporteur luciférase dont l'expression est placée sous le contrôle de la séquence promotrice de hFis1. La première approche n'a pas donné de résultats exploitables à cause des effets interférentiels potentiels de la bréfeldine A sur la sécrétion des enzymes codées par les gènes rapporteurs (luciférase de *Gussia* et phosphatase alcaline sécrétée) (**Figure 7**). Le promoteur putatif (mais probablement incomplet pour ses éléments de régulation) de Fis1 a ensuite été sous-cloné dans un autre plasmide contenant le gène rapporteur luciférase de *Firefly* sans obtenir de résultats plus concluants. En effet, rappelons que nous travaillons dans le cadre de l'UPR dans un contexte de répression globale de la synthèse protéique. Afin d'éviter l'effet interférentiel du stress du RE induit par la BFA sur la synthèse des enzymes dont l'activité est dosée comme un indicateur de l'activité du promoteur de hFis1 (luciférase

de Firefly) ou de l'efficacité de transfection (luciférase de Renilla), nous avons ensuite analysé l'activation potentielle du promoteur dans les cellules HepG2 exposées à la BFA en quantifiant l'abondance relative de l'ARNm codant les luciférases par RT-qPCR (**Figure 11**). Dans ces conditions, nous avons pu détecter une transcription basale des séquences codant pour les enzymes utilisées comme rapporteurs, mais nous n'avons pas observé d'augmentation de la transcription dans les cellules en réponse à un stress du RE sublétal induit par la BFA et ce, contrairement à ce qui a été montré pour l'expression endogène du gène codant pour hFis1 (**Figure 2**) (Kayleen Vannuvel, thèse en cours, URBC-NARILIS, UNamur).

Ces résultats contradictoires pourraient résulter de l'utilisation d'une séquence promotrice de hFis1 de taille non adaptée et insuffisante (une séquence de 1262 pb a été utilisée) ne contenant probablement pas tous les éléments permettant la régulation dans les conditions d'activation étudiées dans ce travail. En effet, les promoteurs de gènes d'eucaryotes sont de taille très variables, parfois difficiles à délimiter et sont souvent régulés par plusieurs séquences « enhancer », « silencer » et « insulateurs » qui sont tantôt localisées très loin en aval ou en amont du TSS et même, parfois, dans les introns (Andersson, 2014).

Il est donc probable que la séquence utilisée dans ce travail était trop courte et qu'elle ne comportait donc pas tous les éléments essentiels à une activation du promoteur dans des conditions patho-physiologiques particulières comme par exemple un stress du RE. Dans une étude comparable (Soriano et al., 2012) visant à étudier la régulation transcriptionnelle du gène codant pour la mitofusine 2 (Mfn2), les auteurs ont utilisé une séquence promotrice de 2 kb qui est une taille plus grande que celle utilisée dans notre expérience. Il se pourrait aussi que le gène *hFis1* soit un gène qui est régulé par un/ou plusieurs promoteur(s) alternatif(s) différent de celui utilisé pour l'expression basale et responsables de la régulation lors de l'activation (Ayoubi and Van De Ven, 1996, Xin et al., 2008). Cependant, il semble que la séquence utilisée comporte néanmoins le promoteur proximal indispensable à l'initiation de la transcription, comme indiqué par le fait qu'une transcription basale du gène codant la luciférase a bien été détectée dans les cellules transfectées avec le plasmide contenant le gène rapporteur (**Figure 11**).

Pour tenter de remédier à ces problèmes et augmenter les chances d'obtenir des données sur la régulation transcriptionnelle de hFis1 on devrait donc essayer de sous-cloner un fragment de promoteur plus long dans le plasmide pGL4.10 (luc2) tout en veillant à ce que la taille du plasmide obtenu ne compromette pas l'efficacité de transfection.

Afin de trouver des séquences régulatrices intéressantes, on pourrait se servir d'outils bioinformatiques tels que le site « ensembl Genome browser » (<http://www.ensembl.org/index.html>). En lançant une recherche sur le gène de hFis1, on trouve plusieurs transcrits et deux régions promotrices annotées (colorées en rouge).

En prenant les coordonnées chromosomiques de ces régions on peut obtenir les séquences nucléotidiques par « UCSC Genome browser » (<http://genome-euro.ucsc.edu>) et comparer ces séquences à celle intégrée dans le plasmide rapporteur en effectuant un BLAST nucléotidique sur « NCBI » (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>). Ces analyses *in silico* nous montrent que la séquence promotrice putative de hFis1 que nous avons utilisée pour le test du plasmide rapporteur s'aligne parfaitement avec la fin de la première séquence promotrice annotée par « ensembl » (**voir Figure 17**). En fusionnant alors ces deux séquences on pourrait obtenir un nouveau promoteur d'une taille plus grande (2276 bp) qui renferme potentiellement les sites requis pour une activation de la transcription du gène codant pour hFis1 en réponse à un stress du RE. On devrait alors aussi générer une deuxième construction plasmidique contenant la deuxième séquence promotrice détectée sur « ensembl ».

IV. Conclusion, discussions et perspectives

Afin d'éviter les problèmes d'interférences entre le stress du RE déclenché par la BFA et la synthèse protéique, susceptible d'affecter l'activité des gènes rapporteurs, on devrait aussi continuer à analyser l'abondance des transcrits de la Firefly luciférase par la méthode de RT-qPCR, une méthode qui a fourni des résultats fiables dans ce travail pour renseigner sur l'expression et ce, de manière indépendante de la formation de la protéine (**Figure 11**). L'accumulation de la protéine Fis1 endogène dans un contexte de synthèse protéique diminuée par l'UPR dans des cellules HepG2 incubées à la BFA (**Figure 2**) pourrait non seulement être expliquée par une augmentation de la transcription mais aussi par une stabilisation éventuelle de l'ARNm de hFis1 (Cheadle et al., 2005). Donc afin de déterminer si une augmentation de l'abondance des transcrits de hFis1 dans les cellules incubées en présence de BFA observée résulte d'une réelle activation de la transcription ou d'un simple effet de stabilisation des ARNm, on pourrait traiter les cellules avec un inhibiteur de la polymérase II comme l'actinomycine D avant de quantifier l'abondance des transcrits des luciférases (Leclerc et al., 2002, Al-Haj et al., 2012) ou de hFis1. Cependant, comme un blocage de la transcription peut avoir des effets aspécifiques, des expériences de « nuclear run on » seraient la solution expérimentale pour répondre au mieux à cette question (Smale, 2009).

Les problèmes rencontrés nous ont poussé à réorienter les objectifs de ce mémoire et à rechercher d'autres pistes qui pourraient expliquer la fragmentation mitochondriale en réponse à un stress modéré du RE. En effet, la protéine hFis1 n'est pas la seule protéine membranaire des mitochondries connue pour interagir avec Drp1 lors du processus de la fission mitochondriale. Des études ont montré qu'il existe d'autres protéines recrutant Drp1 à la surface des mitochondries comme notamment Mff, MiD49 et MiD51 (Palmer et al., 2011, Gandre-Babbe and van der Blik, 2008, Otera and Mihara, 2011, Loson et al., 2013) qui, dans les cellules eucaryotes, pourraient même être les principales molécules participant à la fission de l'organite puisqu'elles sont capables de contrôler la fission mitochondriale en absence de Fis1 (Palmer et al., 2013, Loson et al., 2013). Compte tenu que ces protéines sont encore peu caractérisées, nous avons voulu déterminer si leur abondance pouvait varier en réponse à un stress subléthal du RE dans les cellules HepG2. Comme ces protéines sont localisées à la membrane mitochondrial externe, nous avons entrepris d'isoler les mitochondries par la technique de centrifugation différentielle.

Le protocole utilisé appliqué semble efficace pour isoler une fraction M enrichie en mitochondries (activité maximale de cytochrome c oxydase dans cette fraction (**Figure 12**)). Cependant, la séparation des organites est rarement optimale (Gasingirwa et al., 2008) et le type cellulaire utilisé (cellules HepG2) est particulièrement résistant à une homogénéisation au Dounce en raison de leur petite taille cellulaire et de leur tendance à former des amas. Cependant, dans nos conditions expérimentales, l'analyse de l'abondance protéique de Mff, MiD49 et MiD51 n'a révélé aucune accumulation de ces protéines dans les cellules soumises à un stress RE par rapport aux cellules contrôles (**Figure 13**). Une stimulation des cellules HepG2 semble donc ne pas activer l'expression de ces protéines, contrairement à ce qui était mis en évidence pour hFis1 (Kayleen Vannovel, thèse en cours, URBC, UNamur). Cependant, cette expérience n'a été effectuée qu'une seule fois. Elle devrait donc être répétée pour confirmer ou infirmer ces résultats. Dans cette expérience préliminaire, les protéines Mff et MiD49 ont été principalement détectées dans la fraction M mais le marquage de MiD51 était positif dans chacune des fractions. Bien qu'aucune localisation subcellulaire de MiD51 autre que mitochondriale n'a été décrite jusqu'à présent, la détection de MiD51 dans toutes les fractions cellulaires ne pourrait être expliquée que par la présence de la protéine dans d'autres compartiments cellulaires ou encore la présence de mitochondries ou de fragments de

IV. Conclusion, discussions et perspectives

membrane mitochondriale dans les autres fractions cellulaires. Cette observation nous montre aussi la nécessité d'optimiser le protocole du fractionnement cellulaire dont certaines options seront décrites plus tard.

L'absence d'une augmentation de l'abondance des ces protéines de fission dans les cellules exposées au stress du RE n'exclue cependant pas une augmentation de leur interaction avec Drp1 médiée par des modifications post-traductionnelles. Bien que des modifications post-traductionnelles ne soient pas encore décrites pour Mff, MiD51 et MiD49, il est connu que Drp1 subit des phosphorylations activatrices et inhibitrices (Cereghetti et al., 2008, Chang and Blackstone, 2010, Taguchi et al., 2007, Alirol et al., 2006, Bossy et al., 2010, Cervený et al., 2007) ainsi que des sumoylations, ubiquitylations et S-nitrosylations (Chang and Blackstone, 2010). Il serait donc intéressant d'étudier, dans des expériences de co-localisation ou de co-immunoprécipitation, les interactions éventuelles entre ces protéines et Drp1 ou entre Fis1 et Drp1 pour déterminer si le nombre et/ou la force des interactions entre ces protéines est/sont modifiée(s) dans les cellules incubées en présence de BFA. On pourrait donc également analyser et déterminer si en absence de changement d'abondance des protéines Mff, MiD49 ou MiD51, elles changent leur distribution au niveau de la membrane mitochondriale externe lors d'un stress du RE. Comme mentionné, on pourrait adresser ces différentes questions biologiques dans le futur par des expériences d'immunoprécipitation et de co-localisation de protéines marquées et visualisées par immunofluorescence afin d'étudier les interactions entre les différents acteurs et détecter d'éventuels changements dans leur localisation au niveau des mitochondries. Des expériences d'inactivation utilisant des siRNA pour « silencer » l'expression d'une ou de plusieurs gènes codant pour ces protéines pourraient aussi donner des renseignements quant à l'importance de ces acteurs protéiques dans la fission mitochondriale induite par le stress du RE.

Un autre facteur potentiellement responsable de la fragmentation mitochondriale auquel nous nous sommes intéressés dans ce travail est le contenu membranaire des mitochondries en cholestérol. En effet, il est connu que le cholestérol joue un rôle important dans la fluidité des membranes plasmiques et fait partie des radeaux lipidiques qui sont des plateformes de signalisation intracellulaires, également retrouvées dans les membranes de certains organites (Cortes et al., 2014, Soccio and Breslow, 2004). Outre la membrane plasmique, le RE et l'appareil de Golgi, la membrane externe des mitochondries renferme aussi du cholestérol, bien qu'en faible concentration (Garofalo et al., 2005). La fluidité la MME pourrait donc être modulée par une variation dans son contenu en cholestérol d'autant plus que, dans certains types cellulaires stéroïdogènes, les mitochondries importent du cholestérol pour alimenter la synthèse des hormones stéroïdiennes (Issop et al., 2013). La protéine de fission hFis1 ferait aussi partie de ces microdomaines lipidiques (Garofalo et al., 2005). De plus, une augmentation de la concentration en cholestérol membranaire dans les mitochondries induit une diminution du potentiel membranaire (également observée dans les mitochondries de cellules incubées en présence de BFA (Kayleen Vannuvel, thèse en cours)) ainsi qu'une perturbation de la production d'ATP et peut déclencher l'apoptose, un évènement accompagné de la fission mitochondriale (Yu et al., 2005).

Pour pouvoir mesurer spécifiquement la concentration en cholestérol mitochondrial et minimiser le bruit de fond résultant de la présence de cholestérol enfermé dans d'autres organites (essentiellement lysosomes, RE, appareil de Golgi et membrane plasmique), nous avons isolé les mitochondries. La technique de fractionnement cellulaire par centrifugation différentielle a été suivie d'une centrifugation de la fraction M sur un gradient de Nycodenz afin de séparer le plus possible les mitochondries d'autres organites contaminants (Gasingirwa et al., 2008, Gronemeyer et al., 2013). L'analyse des enzymes marqueurs des différents

IV. Conclusion, discussions et perspectives

compartiments montre que le protocole appliqué permet d'obtenir une fraction renfermant majoritairement des mitochondries, mais ne permet pas d'exclure entièrement la présence d'autres organites (lysosomes, débris membranaires du RE et de la membrane plasmique,...) (**Figure 12**). Une quantification de la concentration en cholestérol montre une augmentation du contenu en cholestérol dans la fraction M issue de cellules traitées avec de la BFA (**Figure 14**). Malheureusement, ces résultats ne se reflètent pas dans la fraction 8 (fraction montrant une forte activité cytochrome oxydase, obtenue après dépôt de la fraction M sur le gradient de Nycodenz) qui présentait une quantité très faible en cholestérol pour les cellules traitées et les cellules contrôles et même, une légère diminution du contenu en cholestérol dans les mitochondries des cellules soumises à un stress du RE (**Figure 14**). Le fait que les mitochondries sont des organites pauvres en cholestérol explique le faible contenu en cholestérol retrouvé dans les fractions 8 (Montero et al., 2008, Soccio and Breslow, 2004). En ce qui concerne les résultats divergents du contenu en cholestérol entre les fractions M et 8 de mitochondries de cellules exposées à un traitement à la BFA (augmentation du contenu cholestérol dans la fraction M et diminution du contenu en cholestérol dans la fraction 8 dans les mitochondries des cellules stimulées avec la BFA), nous émettons l'hypothèse que la cause réside dans la présence résiduelle d'organites « contaminants » dont la proportion et/ou le contenu en cholestérol pourrai(en)t aussi varier en condition de stress du RE. La BFA, par le fait qu'elle perturbe le transport rétrograde des vésicules endosomales de l'appareil de Golgi vers le RE, induit une réduction partielle du transport du cholestérol vers la membrane plasmique, causant alors une légère accumulation de celui-ci dans les membranes intracellulaires (Heino et al., 2000). Cependant, cette diminution du transport du cholestérol n'interviendrait que pour environ 20 % du trafic, supportant l'existence d'une voie alternative de transport mettant en œuvre des contacts directs entre les organites (Voelker, 2005). D'autre part, un biais quant à la normalisation peut être exclu car la distribution et la concentration en protéines, utilisée pour normaliser les valeurs en contenu de cholestérol, est très comparable entre les différentes fractions de cellules contrôles et de cellules soumises à un stress du RE (données non montrées).

Suite à ces résultats difficilement interprétables et obtenus dans le cadre d'une expérience unique, il est important de répéter cette expérience de fractionnement cellulaire et dosage du contenu mitochondrial en cholestérol pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Afin de diminuer davantage la présence d'autres organites dans la fraction analysée, on pourrait essayer d'optimiser davantage le protocole de fractionnement cellulaire. Ceci pourrait être réalisé en essayant d'autres techniques d'homogénéisation que le Dounce (par exemple l'utilisation d'une seringue 23G (Manunta et al., 2007) avant homogénéisation dans un Balch (« cell cracker ») (German and Howe, 2009) ou cavitation à l'azote (Kristian et al., 2006)), ou en testant différents nombres de passages au Dounce, puisque cette étape n'a pas été optimisée. Une fois les mitochondries isolées, il serait aussi intéressant d'étudier les effets d'une déplétion en cholestérol par ajout de méthyl- β -cyclodextryl, un agent chélateur du cholestérol (Yu et al., 2005, Garofalo et al., 2005), sur le fonctionnement mitochondrial en réponse à un stress du RE induit par la BFA.

Parallèlement à ce mémoire, différentes autres voies cellulaires ont été investiguées par Kayleen Vannuvel dans le but de caractériser les modifications morphologiques et fonctionnelles observées dans les mitochondries de cellules soumises à un stress du RE modéré.

Elle s'est d'abord intéressée aux modifications post-traductionnelles des protéines régulant la fission/fusion des mitochondries. En effet, il est connu que l'activité de la protéine de fission mitochondriale Drp1 peut être modifiée par des phosphorylations (Cereghetti et al., 2008,

IV. Conclusion, discussions et perspectives

Chang and Blackstone, 2010, Taguchi et al., 2007, Alirol et al., 2006, Bossy et al., 2010, Cervený et al., 2007). En effet, Drp1 est inactivée par une phosphorylation sur la Ser637 (Cereghetti et al., 2008, Chang and Blackstone, 2010) et peut être activée suite à la phosphorylation de la Ser616 ou la Ser600 (Han et al., 2008). Les analyses de WB visant à rechercher des changements d'abondance de la forme phosphorylée de Drp1 (Ser637) dans les cellules incubées en présence de BFA se sont révélées négatives (Kayleen Vannovel, thèse en cours, URBC, UNamur, données non montrées).

Kayleen Vannovel s'est également basée sur les travaux de Sugiura et collègues qui ont montré une régulation des contacts RE-mitochondries par MITOL (mitochondrial ubiquitin-ligase, aussi appelée MARCH5, membrane-associated RING-CH V) une E3 ubiquitin ligase ancrée dans la MME qui interagit avec la Mfn2 mitochondriale (Sugiura et al., 2013). Ces auteurs ont montré que MARCH5 est responsable de l'addition d'une chaîne de polyubiquitines (de type K63) sur le résidu K192 de Mfn2, ce qui active cette GTPase et permet son oligomérisation, un événement nécessaire pour stabiliser les domaines MAM et réguler la fusion mitochondriale. On pourrait donc poser l'hypothèse qu'une perturbation de MARCH5 dans le cadre d'un stress subléthal du RE pourrait diminuer l'ubiquitylation de Mfn2, inhiber l'activité de cette protéine de fusion mitochondriale et ainsi augmenter la fission mitochondriale. Des expériences d'immunoprécipitation visant à détecter une diminution de l'abondance des chaînes polyubiquitines de type K63 dans les cellules traitées à la BFA n'ont pas pu montrer un changement de leur abondance entre les cellules contrôles et les cellules traitées à la BFA (Kayleen Vannovel, thèse en cours, données non montrées).

L'ubiquitine ligase MARCH5 n'interagit pas seulement avec Mfn2 mais il est connu qu'elle lie aussi Drp1, Fis1 et Mfn1 (Nakamura et al., 2006, Yonashiro et al., 2006). Une délétion de MARCH5 induit une hyperfusion des mitochondries avec une augmentation de la sénescence cellulaire (Park et al., 2010). MARCH5 est aussi responsable d'une régulation fine de la morphologie mitochondriale en effectuant un contrôle de qualité sur Mfn1 (Park et al., 2014). En condition de stress cellulaire, il y a une accumulation de Mfn1, induisant une élongation du réseau mitochondrial et sensibilisant les cellules à l'apoptose. La survie cellulaire est améliorée par MARCH5 qui lie et ubiquityle Mfn1 acétylé, ce qui régule le niveau de Mfn1 de nouveau à la baisse pour assurer l'homéostasie mitochondriale. Une perturbation de ce mécanisme médié par MARCH5 suite à un stress du RE pourrait donc également perturber la dynamique mitochondriale et induire une fragmentation mitochondriale. Dans cette optique, il serait aussi intéressant d'étudier les interactions MARCH5-Mfn1 par des co-immunoprécipitations, détailler les modifications post-traductionnelles et l'activité de Mfn1 et analyser les effets d'une surexpression de MARCH5 ou de USP30 (ubiquitin-specific protease 30, une dés-ubiquitinase localisée à la MME) (Nakamura and Hirose, 2008) sur la morphologie mitochondriale de cellules exposées à un stress du RE pour voir si un déficit de fusion ne pourrait pas être responsable de l'augmentation de fragmentation mitochondriale observée dans ces conditions.

Une autre hypothèse prometteuse se basait sur le fait que le stress du RE, est capable d'activer la kinase JNK en aval de la branche IRE1 α de l'UPR (Urano et al., 2000). Cette kinase est alors recrutée aux mitochondries par Sab (SH3BP5, SH3-domain binding protein 5), une protéine associée à la MME, ayant pour conséquence de perturber la respiration mitochondriale et de sensibiliser les cellules à l'apoptose (Win et al., 2014) en inhibant des protéines anti-apoptotiques comme Bcl2 et en activant le clivage de Bid (Tournier et al., 2000, Dhanasekaran and Reddy, 2008). Une phosphorylation de JNK pourrait donc causer un dysfonctionnement mitochondrial suivi d'une fission accrue des mitochondries.

IV. Conclusion, discussions et perspectives

En réalisant des analyses de Western Blot (**Figure 15**), nous avons pu détecter une phosphorylation de JNK en réponse à un stress du RE induit par la BFA. Une inhibition de JNK (par l'inhibiteur SP600125) dans des conditions de stress léger du RE permet également de prévenir partiellement la fragmentation mitochondriale analysée par le marquage des mitochondries avec la sonde MitoTracker et une visualisation au microscope confocal sur cellules vivantes (**Figure 16A**). L'inhibition de la JNK conduit également à prévenir la diminution de la production de ROS mitochondriaux dans les cellules traitées à la BFA (**Figure 16B**). La voie JNK semble donc réguler partiellement la fragmentation mitochondriale et le fonctionnement de la chaîne de transport des électrons.

Sur base de ces données, il serait donc intéressant d'étudier davantage les mécanismes et les acteurs intervenants dans cette voie. Comme Win et al. montrent une interaction entre P-JNK et la protéine mitochondriale Sab (Win et al., 2011), on pourrait envisager de déléter cette protéine par une approche siRNA afin d'étudier d'avantage comment cette protéine influence la morphologie et les fonctions des mitochondries. Il serait aussi intéressant d'effectuer des expériences de co-localisation de protéines marquées et visualisées par immunofluorescence ou des immunoprécipitations afin d'étudier les interactions entre Sab et d'autres protéines mitochondriales impliquées dans la régulation de la morphologie mitochondriale (pex : hFis1, Mff,...) ou de l'apoptose (pex : Bcl2, Bid (Prakasam et al., 2014),...) ou d'autres MAPK kinases, comme Win et al. suggèrent que Sab pourrait servir de plateforme de signalisation (Win et al., 2011).

Le mécanisme exact expliquant comment une interaction P-JNK et Sab à la MME induit la perturbation de la respiration mitochondriale ayant lieu en MMI n'est pas encore connu. Un lien possible entre ces deux phénomènes pourrait être la machinerie mitochondriale d'importation de protéines qui, par emprunt de translocases TOM et TIM, permet le transport de protéines du cytosol vers la matrice mitochondriale (pour plus d'informations voir les revues (Harbauer et al., 2014, Ryan and Hoogenraad, 2007)). D'une part, les sous-unités des translocases (pex : TOM22) pourraient être des cibles de phosphorylations (pex : la caséine kinase 1 ou la PKA) influençant leur activité et leur assemblage en complexe translocase (Gerbeth et al., 2013) et ayant alors des répercussions sur l'environnement biochimique des mitochondries, ce qui pourrait aussi avoir des effets sur le fonctionnement mitochondrial. De la même façon, des protéines substrats importées pourraient être phosphorylées par des kinases activées et recrutées aux mitochondries, ce qui change alors l'efficacité avec laquelle elles sont reconnues par les translocases (Avadhani et al., 2011). La présence et la quantification de ces modifications post-traductionnelles pourraient être adressées par des Western Blots utilisant des anticorps ciblant des sous-unités de translocases phosphorylées. Des co-immunoprécipitations pourraient aussi aider à trouver les kinases responsables de ces modifications post-traductionnelles.

D'autre part, l'import de protéines dans les mitochondries est aussi fortement dépendant de l'état bioénergétique des mitochondries (Malhotra et al., 2013). En effet, le transport intermembranaire est fortement influencé par le potentiel membranaire et l'activité du complexe translocase TIM23 dépend de l'hydrolyse d'ATP. Une diminution du potentiel membranaire ou une perturbation de la respiration mitochondriale suite à un stress du RE, comme observé par Kayleen Vannuvel (thèse en cours, données non montrées) pourraient donc diminuer l'importation protéique, ce qui peut avoir des effets sur l'alimentation et la régulation des voies biochimiques ayant lieu dans les mitochondries. D'ailleurs des modifications du transport intermembranaire des protéines peuvent aussi avoir des influences sur la morphologie mitochondriale. En effet, Ehses et al. ont pu montrer, dans leur travail utilisant des levures, qu'un stress des mitochondries associé à une diminution de la production

IV. Conclusion, discussions et perspectives

d'ATP, change l'équilibre de la production des différentes isoformes courtes et longues de la protéine Opa1 par activation de la peptidase OMA1 qui est ATP-indépendante, ce qui diminue la fusion des mitochondries et augmente alors la fragmentation mitochondriale (Ehse et al., 2009). Dans ce cadre, il serait intéressant d'évaluer l'abondance relative des différentes isoformes d'Opa1 par Western Blot ou par RT-qPCR dans des conditions de stress subléthal du RE induit par la BFA.

En conclusion, la poursuite de ces études visant à mieux comprendre les interactions entre le RE et les mitochondries dans le cadre de stress du RE et/ou de la mitochondrie devrait contribuer, à terme, à mieux comprendre le rôle de ces organites et de leur(s) dysfonctionnement(s) dans le cadre de pathologies comme les maladies neurodégénératives et métaboliques dans lesquelles des changements de la biologie de ces structures subcellulaires sont souvent observées.

Bibliographie

Bibliographie

- AL-HAJ, L., BLACKSHEAR, P. J. & KHABAR, K. S. 2012. Regulation of p21/CIP1/WAF-1 mediated cell-cycle arrest by RNase L and tristetraprolin, and involvement of AU-rich elements. *Nucleic Acids Res*, 40, 7739-52.
- ALIROL, E., JAMES, D., HUBER, D., MARCHETTO, A., VERGANI, L., MARTINO, J. C. & SCORRANO, L. 2006. The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Biol Cell*, 17, 4593-605.
- ANAND, R., WAI, T., BAKER, M. J., KLADT, N., SCHAUSS, A. C., RUGARLI, E. & LANGER, T. 2014. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*, 204, 919-29.
- ANDERS, N. & JURGENS, G. 2008. Large ARF guanine nucleotide exchange factors in membrane trafficking. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3433-45.
- ANDERSSON, R. 2014. Promoter or enhancer, what's the difference? Deconstruction of established distinctions and presentation of a unifying model. *Bioessays*.
- ANTEQUERA, F. 2003. Structure, function and evolution of CpG island promoters. *Cell Mol Life Sci*, 60, 1647-58.
- APPENZELLER-HERZOG, C. & HAURI, H. P. 2006. The ER-Golgi intermediate compartment (ERGIC): in search of its identity and function. *J Cell Sci*, 119, 2173-83.
- ARSLAN, M. A., CHIKINA, M., CSERMELY, P. & SOTI, C. 2012. Misfolded proteins inhibit proliferation and promote stress-induced death in SV40-transformed mammalian cells. *FASEB J*, 26, 766-77.
- ATAMNA, H. 2004. Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. *Ageing Res Rev*, 3, 303-18.
- ATKINSON, T. J. & HALFON, M. S. 2014. Regulation of gene expression in the genomic context. *Comput Struct Biotechnol J*, 9, e201401001.
- AVADHANI, N. G., SANGAR, M. C., BANSAL, S. & BAJPAI, P. 2011. Bimodal targeting of cytochrome P450s to endoplasmic reticulum and mitochondria: the concept of chimeric signals. *FEBS J*, 278, 4218-29.
- AYOUBI, T. A. & VAN DE VEN, W. J. 1996. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J*, 10, 453-60.
- BADR, C. E., HEWETT, J. W., BREAKFIELD, X. O. & TANNOUS, B. A. 2007. A highly sensitive assay for monitoring the secretory pathway and ER stress. *PLoS One*, 2, e571.
- BAGGETTO, L. G., CLOTTE, E. & VIAL, C. 1992. Low mitochondrial proton leak due to high membrane cholesterol content and cytosolic creatine kinase as two features of the deviant bioenergetics of Ehrlich and AS30-D tumor cells. *Cancer Res*, 52, 4935-41.
- BARBERO-CAMPS, E., FERNANDEZ, A., BAULIES, A., MARTINEZ, L., FERNANDEZ-CHECA, J. C. & COLELL, A. 2014. Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid beta neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking. *Am J Pathol*, 184, 2066-81.
- BENNETT, B. L., SASAKI, D. T., MURRAY, B. W., O'LEARY, E. C., SAKATA, S. T., XU, W., LEISTEN, J. C., MOTIWALA, A., PIERCE, S., SATOH, Y., BHAGWAT, S. S., MANNING, A. M. & ANDERSON, D. W. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13681-6.
- BERNARDI, P. 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev*, 79, 1127-55.
- BERRIDGE, M. J. 2002. The endoplasmic reticulum: a multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium*, 32, 235-49.

Bibliographie

- BIDEN, T. J., BOSLEM, E., CHU, K. Y. & SUE, N. 2014. Lipotoxic endoplasmic reticulum stress, beta cell failure, and type 2 diabetes mellitus. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 389-98.
- BIONDA, C., PORTOUKALIAN, J., SCHMITT, D., RODRIGUEZ-LAFRASSE, C. & ARDAIL, D. 2004. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J*, 382, 527-33.
- BLAKE, R. & TROUNCE, I. A. 2014. Mitochondrial dysfunction and complications associated with diabetes. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 1404-12.
- BORGESE, N., FRANCOLINI, M. & SNAPP, E. 2006. Endoplasmic reticulum architecture: structures in flux. *Curr Opin Cell Biol*, 18, 358-64.
- BOSSY, B., PETRILLI, A., KLINGLMAYR, E., CHEN, J., LUTZ-MEINDL, U., KNOTT, A. B., MASLIAH, E., SCHWARZENBACHER, R. & BOSSY-WETZEL, E. 2010. S-Nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2, S513-26.
- BRECKENRIDGE, D. G., STOJANOVIC, M., MARCELLUS, R. C. & SHORE, G. C. 2003. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol*, 160, 1115-27.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232, 34-47.
- BROWNLEE, M. 2001. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813-20.
- BURATOWSKI, S. 2009. Progression through the RNA polymerase II CTD cycle. *Mol Cell*, 36, 541-6.
- BUSTIN, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25, 169-93.
- CAO, S. S. & KAUFMAN, R. J. 2014. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress in cell fate decision and human disease. *Antioxid Redox Signal*, 21, 396-413.
- CELARDO, I., GRESPI, F., ANTONOV, A., BERNASSOLA, F., GARABADGIU, A. V., MELINO, G. & AMELIO, I. 2013. Caspase-1 is a novel target of p63 in tumor suppression. *Cell Death Dis*, 4, e645.
- CEREGHETTI, G. M., STANGHERLIN, A., MARTINS DE BRITO, O., CHANG, C. R., BLACKSTONE, C., BERNARDI, P. & SCORRANO, L. 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 15803-8.
- CERVENY, K. L., TAMURA, Y., ZHANG, Z., JENSEN, R. E. & SESAKI, H. 2007. Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol*, 17, 563-9.
- CHAKRABARTI, A., CHEN, A. W. & VARNER, J. D. 2011. A review of the mammalian unfolded protein response. *Biotechnol Bioeng*, 108, 2777-93.
- CHAMI, M., OULES, B., SZABADKAI, G., TACINE, R., RIZZUTO, R. & PATERLINI-BRECHOT, P. 2008. Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Mol Cell*, 32, 641-51.
- CHAN, C. B. & YE, K. 2011. What we have learnt about PIKE from the knockout mice. *Int J Biochem Mol Biol*, 2, 228-39.
- CHAN, D. C. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 22, 79-99.
- CHANG, C. R. & BLACKSTONE, C. 2010. Dynamic regulation of mitochondrial fission through modification of the dynamin-related protein Drp1. *Ann N Y Acad Sci*, 1201, 34-9.

Bibliographie

- CHARDIN, P. & MCCORMICK, F. 1999. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell*, 97, 153-5.
- CHARMAN, M., KENNEDY, B. E., OSBORNE, N. & KARTEN, B. 2010. MLN64 mediates egress of cholesterol from endosomes to mitochondria in the absence of functional Niemann-Pick Type C1 protein. *J Lipid Res*, 51, 1023-34.
- CHEADLE, C., FAN, J., CHO-CHUNG, Y. S., WERNER, T., RAY, J., DO, L., GOROSPE, M. & BECKER, K. G. 2005. Stability regulation of mRNA and the control of gene expression. *Ann N Y Acad Sci*, 1058, 196-204.
- CHEN, H. & CHAN, D. C. 2004. Mitochondrial dynamics in mammals. *Curr Top Dev Biol*, 59, 119-44.
- CHEN, H., CHOMYN, A. & CHAN, D. C. 2005. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem*, 280, 26185-92.
- CHEN, H., DETMER, S. A., EWALD, A. J., GRIFFIN, E. E., FRASER, S. E. & CHAN, D. C. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*, 160, 189-200.
- CHEN, H., MCCAFFERY, J. M. & CHAN, D. C. 2007. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell*, 130, 548-62.
- CHESARONE, M. A., DUPAGE, A. G. & GOODE, B. L. 2010. Unleashing formins to remodel the actin and microtubule cytoskeletons. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, 62-74.
- CHOI, D. W. 1988. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, 1, 623-34.
- CIARLO, L., MANGANELLI, V., GAROFALO, T., MATARRESE, P., TINARI, A., MISASI, R., MALORNI, W. & SORICE, M. 2010. Association of fission proteins with mitochondrial raft-like domains. *Cell Death Differ*, 17, 1047-58.
- COLELL, A., GARCIA-RUIZ, C., LLUIS, J. M., COLL, O., MARI, M. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2003. Cholesterol impairs the adenine nucleotide translocator-mediated mitochondrial permeability transition through altered membrane fluidity. *J Biol Chem*, 278, 33928-35.
- COLL, O., COLELL, A., GARCIA-RUIZ, C., KAPLOWITZ, N. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2003. Sensitivity of the 2-oxoglutarate carrier to alcohol intake contributes to mitochondrial glutathione depletion. *Hepatology*, 38, 692-702.
- CONAWAY, R. C. & CONAWAY, J. W. 2011. Function and regulation of the Mediator complex. *Curr Opin Genet Dev*, 21, 225-30.
- CORTES, V. A., BUSSO, D., MAIZ, A., ARTEAGA, A., NERVI, F. & RIGOTTI, A. 2014. Physiological and pathological implications of cholesterol. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 19, 416-28.
- COSENTINO, K. & GARCIA-SAEZ, A. J. 2014. Mitochondrial alterations in apoptosis. *Chem Phys Lipids*, 181, 62-75.
- COULON, V., CHEBLI, K., CAVELIER, P. & BLANCHARD, J. M. 2010. A novel mouse c-fos intronic promoter that responds to CREB and AP-1 is developmentally regulated in vivo. *PLoS One*, 5, e11235.
- CREDLE, J. J., FINER-MOORE, J. S., PAPA, F. R., STROUD, R. M. & WALTER, P. 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18773-84.
- CUI, Z., VANCE, J. E., CHEN, M. H., VOELKER, D. R. & VANCE, D. E. 1993. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J Biol Chem*, 268, 16655-63.

Bibliographie

- DASGUPTA, S. & O'MALLEY, B. W. 2014. Transcriptional coregulators: emerging roles of SRC family of coactivators in disease pathology. *J Mol Endocrinol*, 53, R47-59.
- DASHTY, M. 2013. A quick look at biochemistry: carbohydrate metabolism. *Clin Biochem*, 46, 1339-52.
- DAVIS, R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, 103, 239-52.
- DAVULURI, R. V., SUZUKI, Y., SUGANO, S., PLASS, C. & HUANG, T. H. 2008. The functional consequences of alternative promoter use in mammalian genomes. *Trends Genet*, 24, 167-77.
- DE BRITO, O. M. & SCORRANO, L. 2010. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J*, 29, 2715-23.
- DE DUVE, C. 1971. Tissue fractionation. Past and present. *J Cell Biol*, 50, 20d-55d.
- DE DUVE, C., PRESSMAN, B. C., GIANETTO, R., WATTIAUX, R. & APPELMANS, F. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem J*, 60, 604-17.
- DEMINE, S., REDDY, N., RENARD, P., RAES, M. & ARNOULD, T. 2014. Unraveling biochemical pathways affected by mitochondrial dysfunctions using metabolomic approaches. *Metabolites*, 4, 831-78.
- DEVAY, R. M., DOMINGUEZ-RAMIREZ, L., LACKNER, L. L., HOPPINS, S., STAHLBERG, H. & NUNNARI, J. 2009. Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol*, 186, 793-803.
- DHANASEKARAN, D. N. & REDDY, E. P. 2008. JNK signaling in apoptosis. *Oncogene*, 27, 6245-51.
- DIAZ, F. & MORAES, C. T. 2008. Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium*, 44, 24-35.
- DIKSTEIN, R. 2011. The unexpected traits associated with core promoter elements. *Transcription*, 2, 201-6.
- DOLGA, A. M., NETTER, M. F., PEROCCHI, F., DOTI, N., MEISSNER, L., TOBABEN, S., GROHM, J., ZISCHKA, H., PLESNILA, N., DECHER, N. & CULMSEE, C. 2013. Mitochondrial small conductance SK2 channels prevent glutamate-induced oxytosis and mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem*, 288, 10792-804.
- DONALDSON, J. G., FINAZZI, D. & KLAUSNER, R. D. 1992. Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature*, 360, 350-2.
- DU, C., FANG, M., LI, Y., LI, L. & WANG, X. 2000. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42.
- DUBOFF, B., FEANY, M. & GOTZ, J. 2013. Why size matters - balancing mitochondrial dynamics in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 36, 325-35.
- DUDEK, J., PFEFFER, S., LEE, P. H., JUNG, M., CAVALIE, A., HELMS, V., FORSTER, F. & ZIMMERMANN, R. 2014. Protein Transport into the Human Endoplasmic Reticulum. *J Mol Biol*.
- EHSES, S., RASCHKE, I., MANCUSO, G., BERNACCHIA, A., GEIMER, S., TONDERA, D., MARTINO, J. C., WESTERMANN, B., RUGARLI, E. I. & LANGER, T. 2009. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol*, 187, 1023-36.
- ENDO, T. & KOHDA, D. 2002. Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim Biophys Acta*, 1592, 3-14.

Bibliographie

- FARRUKH, M. R., NISSAR, U. A., AFNAN, Q., RAFIQ, R. A., SHARMA, L., AMIN, S., KAISER, P., SHARMA, P. R. & TASDUQ, S. A. 2014. Oxidative stress mediated Ca(2+) release manifests endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response in UV-B irradiated human skin cells. *J Dermatol Sci*, 75, 24-35.
- FERNANDEZ, A., MATIAS, N., FUCHO, R., RIBAS, V., VON MONTFORT, C., NUNO, N., BAULIES, A., MARTINEZ, L., TARRATS, N., MARI, M., COLELL, A., MORALES, A., DUBUQUOY, L., MATHURIN, P., BATALLER, R., CABALLERIA, J., ELENA, M., BALSINDE, J., KAPLOWITZ, N., GARCIA-RUIZ, C. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2013. ASMase is required for chronic alcohol induced hepatic endoplasmic reticulum stress and mitochondrial cholesterol loading. *J Hepatol*, 59, 805-13.
- FITZPATRICK, S. M., HETHERINGTON, H. P., BEHAR, K. L. & SHULMAN, R. G. 1990. The flux from glucose to glutamate in the rat brain in vivo as determined by ¹H-observed, ¹³C-edited NMR spectroscopy. *J Cereb Blood Flow Metab*, 10, 170-9.
- FRANKE, W. W. & KARTENBECK, J. 1971. Outer mitochondrial membrane continuous with endoplasmic reticulum. *Protoplasma*, 73, 35-41.
- FRIEDMAN, J. R., LACKNER, L. L., WEST, M., DIBENEDETTO, J. R., NUNNARI, J. & VOELTZ, G. K. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*, 334, 358-62.
- FROMM, G., GILCHRIST, D. A. & ADELMAN, K. 2013. SnapShot: Transcription regulation: pausing. *Cell*, 153, 930-930 e1.
- FUJIMOTO, M., HAYASHI, T. & SU, T. P. 2012. The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 417, 635-9.
- FUJIMOTO, T. & PARTON, R. G. 2011. Not just fat: the structure and function of the lipid droplet. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- GALLOWAY, C. A., LEE, H. & YOON, Y. 2012. Mitochondrial morphology-emerging role in bioenergetics. *Free Radic Biol Med*, 53, 2218-28.
- GAN, L. T., VAN ROOYEN, D. M., KOINA, M. E., MCCUSKEY, R. S., TEOH, N. C. & FARRELL, G. C. 2014. Hepatocyte free cholesterol lipotoxicity results from JNK1-mediated mitochondrial injury and is HMGB1 and TLR4-dependent. *J Hepatol*, 61, 1376-84.
- GANDRE-BABBE, S. & VAN DER BLIEK, A. M. 2008. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 19, 2402-12.
- GAROFALO, T., GIAMMARIOLI, A. M., MISASI, R., TINARI, A., MANGANELLI, V., GAMBARDELLA, L., PAVAN, A., MALORNI, W. & SORICE, M. 2005. Lipid microdomains contribute to apoptosis-associated modifications of mitochondria in T cells. *Cell Death Differ*, 12, 1378-89.
- GASINGIRWA, M. C., THIRION, J., COSTA, C., FLAMION, B., LOBEL, P. & JADOT, M. 2008. A method to assess the lysosomal residence of proteins in cultured cells. *Anal Biochem*, 374, 31-40.
- GERBETH, C., SCHMIDT, O., RAO, S., HARBAUER, A. B., MIKROPOULOU, D., OPALINSKA, M., GUIARD, B., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2013. Glucose-induced regulation of protein import receptor Tom22 by cytosolic and mitochondria-bound kinases. *Cell Metab*, 18, 578-87.
- GERMAN, C. L. & HOWE, C. L. 2009. Preparation of biologically active subcellular fractions using the Balch homogenizer. *Anal Biochem*, 394, 117-24.

Bibliographie

- GORLACH, A., KLAPPA, P. & KIETZMANN, T. 2006. The endoplasmic reticulum: folding, calcium homeostasis, signaling, and redox control. *Antioxid Redox Signal*, 8, 1391-418.
- GOTOH, T. & MORI, M. 2006. Nitric oxide and endoplasmic reticulum stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 26, 1439-46.
- GRIMM, S. 2012. The ER-mitochondria interface: the social network of cell death. *Biochim Biophys Acta*, 1823, 327-34.
- GRONEMEYER, T., WIESE, S., OFMAN, R., BUNSE, C., PAWLAS, M., HAYEN, H., EISENACHER, M., STEPHAN, C., MEYER, H. E., WATERHAM, H. R., ERDMANN, R., WANDERS, R. J. & WARSCHIED, B. 2013. The proteome of human liver peroxisomes: identification of five new peroxisomal constituents by a label-free quantitative proteomics survey. *PLoS One*, 8, e57395.
- GROSS, C., CHANG, C. W., KELLY, S. M., BHATTACHARYA, A., MCBRIDE, S. M., DANIELSON, S. W., JIANG, M. Q., CHAN, C. B., YE, K., GIBSON, J. R., KLANN, E., JONGENS, T. A., MOBERG, K. H., HUBER, K. M. & BASSELL, G. J. 2015. Increased expression of the PI3K enhancer PIKE mediates deficits in synaptic plasticity and behavior in fragile X syndrome. *Cell Rep*, 11, 727-36.
- GUT, P. & VERDIN, E. 2013. The nexus of chromatin regulation and intermediary metabolism. *Nature*, 502, 489-98.
- HA, J. S. & PARK, S. S. 2006. Glutamate-induced oxidative stress, but not cell death, is largely dependent upon extracellular calcium in mouse neuronal HT22 cells. *Neurosci Lett*, 393, 165-9.
- HAJNOCZKY, G., CSORDAS, G., DAS, S., GARCIA-PEREZ, C., SAOTOME, M., SINHA ROY, S. & YI, M. 2006. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium*, 40, 553-60.
- HAN, X. J., LU, Y. F., LI, S. A., KAITSUKA, T., SATO, Y., TOMIZAWA, K., NAIRN, A. C., TAKEI, K., MATSUI, H. & MATSUSHITA, M. 2008. CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol*, 182, 573-85.
- HARBAUER, A. B., ZAHEDI, R. P., SICKMANN, A., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2014. The protein import machinery of mitochondria—a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab*, 19, 357-72.
- HARDING, H. P., ZHANG, Y., ZENG, H., NOVOA, I., LU, P. D., CALFON, M., SADRI, N., YUN, C., POPKO, B., PAULES, R., STOJDL, D. F., BELL, J. C., HETTMANN, T., LEIDEN, J. M. & RON, D. 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*, 11, 619-33.
- HATCH, A. L., GUREL, P. S. & HIGGS, H. N. 2014. Novel roles for actin in mitochondrial fission. *J Cell Sci*, 127, 4549-60.
- HAYASHI, T., RIZZUTO, R., HAJNOCZKY, G. & SU, T. P. 2009. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol*, 19, 81-8.
- HAYASHI, T. & SU, T. P. 2007. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell*, 131, 596-610.
- HAYASHI, T. & SU, T. P. 2010. Cholesterol at the endoplasmic reticulum: roles of the sigma-1 receptor chaperone and implications thereof in human diseases. *Subcell Biochem*, 51, 381-98.
- HE, M., LIU, J., CHENG, S., XING, Y. & SUO, W. Z. 2013. Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural Regen Res*, 8, 1297-306.

Bibliographie

- HEINO, S., LUSA, S., SOMERHARJU, P., EHNHOLM, C., OLKKONEN, V. M. & IKONEN, E. 2000. Dissecting the role of the golgi complex and lipid rafts in biosynthetic transport of cholesterol to the cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 8375-80.
- HELENIUS, A. & AEBI, M. 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science*, 291, 2364-9.
- HELENIUS, A. & AEBI, M. 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem*, 73, 1019-49.
- HERMANN, G. J. & SHAW, J. M. 1998. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 14, 265-303.
- HIRAMATSU, N., KASAI, A., HAYAKAWA, K., NAGAI, K., KUBOTA, T., YAO, J. & KITAMURA, M. 2006. Secreted protein-based reporter systems for monitoring inflammatory events: critical interference by endoplasmic reticulum stress. *J Immunol Methods*, 315, 202-7.
- HO, P. I., YUE, K., PANDEY, P., BREAU, L., HARBINSKI, F., MCBRIDE, A. J., WEBB, B., NARAHARI, J., KARASSINA, N., WOOD, K. V., HILL, A. & AULD, D. S. 2013. Reporter enzyme inhibitor study to aid assembly of orthogonal reporter gene assays. *ACS Chem Biol*, 8, 1009-17.
- HU, J., ZHANG, Z., SHEN, W. J. & AZHAR, S. 2010. Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutr Metab (Lond)*, 7, 47.
- ISSOP, L., RONE, M. B. & PAPADOPOULOS, V. 2013. Organelle plasticity and interactions in cholesterol transport and steroid biosynthesis. *Mol Cell Endocrinol*, 371, 34-46.
- IWASAWA, R., MAHUL-MELLIER, A. L., DATLER, C., PAZARENTZOS, E. & GRIMM, S. 2011. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J*, 30, 556-68.
- JACKSON, C. L. & CASANOVA, J. E. 2000. Turning on ARF: the Sec7 family of guanine-nucleotide-exchange factors. *Trends Cell Biol*, 10, 60-7.
- JACQUIER, N., CHOUDHARY, V., MARI, M., TOULMAY, A., REGGIORI, F. & SCHNEITER, R. 2011. Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, 124, 2424-37.
- JAMES, D. I., PARONE, P. A., MATTENBERGER, Y. & MARTINOU, J. C. 2003. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*, 278, 36373-9.
- JANG, S. & JAVADOV, S. 2014. Inhibition of JNK aggravates the recovery of rat hearts after global ischemia: the role of mitochondrial JNK. *PLoS One*, 9, e113526.
- JEZEK, P. & PLECITA-HLAVATA, L. 2009. Mitochondrial reticulum network dynamics in relation to oxidative stress, redox regulation, and hypoxia. *Int J Biochem Cell Biol*, 41, 1790-804.
- JIN, M. L., PARK, S. Y., KIM, Y. H., OH, J. I., LEE, S. J. & PARK, G. 2014a. The neuroprotective effects of cordycepin inhibit glutamate-induced oxidative and ER stress-associated apoptosis in hippocampal HT22 cells. *Neurotoxicology*, 41, 102-11.
- JIN, Y., MCFIE, P. J., BANMAN, S. L., BRANDT, C. & STONE, S. J. 2014b. Diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) and monoacylglycerol acyltransferase-2 (MGAT2) interact to promote triacylglycerol synthesis. *J Biol Chem*, 289, 28237-48.
- JONG, C. J., AZUMA, J. & SCHAFFER, S. 2012. Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids*, 42, 2223-32.

Bibliographie

- KAUFMAN, R. J. & MALHOTRA, J. D. 2014. Calcium trafficking integrates endoplasmic reticulum function with mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*.
- KAWAMOTO, K., YOSHIDA, Y., TAMAKI, H., TORII, S., SHINOTSUKA, C., YAMASHINA, S. & NAKAYAMA, K. 2002. GBF1, a guanine nucleotide exchange factor for ADP-ribosylation factors, is localized to the cis-Golgi and involved in membrane association of the COPI coat. *Traffic*, 3, 483-95.
- KEBACHE, S., CARDIN, E., NGUYEN, D. T., CHEVET, E. & LAROSE, L. 2004. Nck-1 antagonizes the endoplasmic reticulum stress-induced inhibition of translation. *J Biol Chem*, 279, 9662-71.
- KEHRER, J. P. 2000. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology*, 149, 43-50.
- KIVILUOTO, S., VERVLIET, T., IVANOVA, H., DECUYPERE, J. P., DE SMEDT, H., MISSIAEN, L., BULTYNCK, G. & PARYS, J. B. 2013. Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 1612-24.
- KLANN, E. & DEVER, T. E. 2004. Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 5, 931-42.
- KOIRALA, S., GUO, Q., KALIA, R., BUI, H. T., ECKERT, D. M., FROST, A. & SHAW, J. M. 2013. Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E1342-51.
- KORNMANN, B., CURRIE, E., COLLINS, S. R., SCHULDINER, M., NUNNARI, J., WEISSMAN, J. S. & WALTER, P. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*, 325, 477-81.
- KOROBOVA, F., RAMABHADRAN, V. & HIGGS, H. N. 2013. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science*, 339, 464-7.
- KORZENIEWSKI, C. & CALLEWAERT, D. M. 1983. An enzyme-release assay for natural cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 64, 313-20.
- KRISTIAN, T., HOPKINS, I. B., MCKENNA, M. C. & FISKUM, G. 2006. Isolation of mitochondria with high respiratory control from primary cultures of neurons and astrocytes using nitrogen cavitation. *J Neurosci Methods*, 152, 136-43.
- KRISTIANSSON, E., THORSEN, M., TAMAS, M. J. & NERMAN, O. 2009. Evolutionary forces act on promoter length: identification of enriched cis-regulatory elements. *Mol Biol Evol*, 26, 1299-307.
- KRITIS, A. A., STAMOULA, E. G., PANISKAKI, K. A. & VAVILIS, T. D. 2015. Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci*, 9, 91.
- KUMARI, S., MEHTA, S. L. & LI, P. A. 2012. Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium. *PLoS One*, 7, e39382.
- LACKNER, L. L. 2014. Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol*, 12, 35.
- LANGE, Y. & RAMOS, B. V. 1983. Analysis of the distribution of cholesterol in the intact cell. *J Biol Chem*, 258, 15130-4.
- LANGE, Y., YE, J., RIGNEY, M. & STECK, T. L. 1999. Regulation of endoplasmic reticulum cholesterol by plasma membrane cholesterol. *J Lipid Res*, 40, 2264-70.
- LANNER, J. T., GEORGIU, D. K., JOSHI, A. D. & HAMILTON, S. L. 2010. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2, a003996.

Bibliographie

- LECLERC, G. J., LECLERC, G. M. & BARREDO, J. C. 2002. Real-time RT-PCR analysis of mRNA decay: half-life of Beta-actin mRNA in human leukemia CCRF-CEM and Nalm-6 cell lines. *Cancer Cell Int*, 2, 1.
- LEE, K., TIRASOPHON, W., SHEN, X., MICHALAK, M., PRYWES, R., OKADA, T., YOSHIDA, H., MORI, K. & KAUFMAN, R. J. 2002. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev*, 16, 452-66.
- LEE, S., PARK, Y. Y., KIM, S. H., NGUYEN, O. T., YOO, Y. S., CHAN, G. K., SUN, X. & CHO, H. 2014. Human mitochondrial Fis1 links to cell cycle regulators at G2/M transition. *Cell Mol Life Sci*, 71, 711-25.
- LEI, K. & DAVIS, R. J. 2003. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2432-7.
- LENHARD, B., SANDELIN, A. & CARNINCI, P. 2012. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation. *Nat Rev Genet*, 13, 233-45.
- LI, J., DONATH, S., LI, Y., QIN, D., PRABHAKAR, B. S. & LI, P. 2010. miR-30 regulates mitochondrial fission through targeting p53 and the dynamin-related protein-1 pathway. *PLoS Genet*, 6, e1000795.
- LI, J., LI, Y., JIAO, J., WANG, J., LI, Y., QIN, D. & LI, P. 2014a. Mitofusin 1 is negatively regulated by microRNA 140 in cardiomyocyte apoptosis. *Mol Cell Biol*, 34, 1788-99.
- LI, X., WANG, F. S., WU, Z. Y., LIN, J. L., LAN, W. B. & LIN, J. H. 2014b. MicroRNA-19b targets Mfn1 to inhibit Mfn1-induced apoptosis in osteosarcoma cells. *Neoplasma*, 61, 265-73.
- LI, Y., GUO, Y., TANG, J., JIANG, J. & CHEN, Z. 2014c. New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 46, 629-40.
- LIANGPUNSAKUL, S., RAHMINE, Y., ROSS, R. A., ZHAO, Z., XU, Y. & CRABB, D. W. 2012. Imipramine blocks ethanol-induced ASMase activation, ceramide generation, and PP2A activation, and ameliorates hepatic steatosis in ethanol-fed mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302, G515-23.
- LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & LIU, W. 2006. Insights into COPI coat assembly and function in living cells. *Trends Cell Biol*, 16, e1-4.
- LIU, J., RONE, M. B. & PAPADOPOULOS, V. 2006. Protein-protein interactions mediate mitochondrial cholesterol transport and steroid biosynthesis. *J Biol Chem*, 281, 38879-93.
- LIU, T., YU, R., JIN, S. B., HAN, L., LENDAHL, U., ZHAO, J. & NISTER, M. 2013. The mitochondrial elongation factors MIEF1 and MIEF2 exert partially distinct functions in mitochondrial dynamics. *Exp Cell Res*, 319, 2893-904.
- LIU, Y., REN, L., AN, J. & ZHOU, H. 2007. Molecular cloning and expression of glycoprotein IIb and IIIa. *Mol Biol Rep*, 34, 121-5.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOBYSHEVA, N. V., SELIN, A. A., VANGELI, I. M., BYVSHEV, I. M., YAGUZHINSKY, L. S. & NARTSISSOV, Y. R. 2013. Glutamate induces H2O2 synthesis in nonsynaptic brain mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 65, 428-35.
- LONG, B., WANG, K., LI, N., MURTAZA, I., XIAO, J. Y., FAN, Y. Y., LIU, C. Y., LI, W. H., CHENG, Z. & LI, P. 2013. miR-761 regulates the mitochondrial network by targeting mitochondrial fission factor. *Free Radic Biol Med*, 65, 371-9.

Bibliographie

- LOSCALZO, J. & HANDY, D. E. 2014. Epigenetic modifications: basic mechanisms and role in cardiovascular disease (2013 Grover Conference series). *Pulm Circ*, 4, 169-74.
- LOSON, O. C., SONG, Z., CHEN, H. & CHAN, D. C. 2013. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*, 24, 659-67.
- LU, M., LAWRENCE, D. A., MARSTERS, S., ACOSTA-ALVEAR, D., KIMMIG, P., MENDEZ, A. S., PATON, A. W., PATON, J. C., WALTER, P. & ASHKENAZI, A. 2014. Cell death. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis. *Science*, 345, 98-101.
- LY, J. D., GRUBB, D. R. & LAWEN, A. 2003. The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis*, 8, 115-28.
- MA, Y. & HENDERSHOT, L. M. 2004. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat*, 28, 51-65.
- MALHOTRA, K., SATHAPPA, M., LANDIN, J. S., JOHNSON, A. E. & ALDER, N. N. 2013. Structural changes in the mitochondrial Tim23 channel are coupled to the proton-motive force. *Nat Struct Mol Biol*, 20, 965-72.
- MALORNI, W., GIAMMARIOLI, A. M., GAROFALO, T. & SORICE, M. 2007. Dynamics of lipid raft components during lymphocyte apoptosis: the paradigmatic role of GD3. *Apoptosis*, 12, 941-9.
- MANCZAK, M., ANEKONDA, T. S., HENSON, E., PARK, B. S., QUINN, J. & REDDY, P. H. 2006. Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet*, 15, 1437-49.
- MANUNTA, M., IZZO, L., DUNCAN, R. & JONES, A. T. 2007. Establishment of subcellular fractionation techniques to monitor the intracellular fate of polymer therapeutics II. Identification of endosomal and lysosomal compartments in HepG2 cells combining single-step subcellular fractionation with fluorescent imaging. *J Drug Target*, 15, 37-50.
- MARCHI, S., PATERGNANI, S. & PINTON, P. 2014. The endoplasmic reticulum-mitochondria connection: one touch, multiple functions. *Biochim Biophys Acta*, 1837, 461-9.
- MARI, M., MORALES, A., COLELL, A., GARCIA-RUIZ, C. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2014. Mitochondrial cholesterol accumulation in alcoholic liver disease: Role of ASMase and endoplasmic reticulum stress. *Redox Biol*, 3, 100-8.
- MARKGRAF, D. F., KLEMM, R. W., JUNKER, M., HANNIBAL-BACH, H. K., EJSING, C. S. & RAPOPORT, T. A. 2014. An ER protein functionally couples neutral lipid metabolism on lipid droplets to membrane lipid synthesis in the ER. *Cell Rep*, 6, 44-55.
- MARSMAN, J. & HORSFIELD, J. A. 2012. Long distance relationships: enhancer-promoter communication and dynamic gene transcription. *Biochim Biophys Acta*, 1819, 1217-27.
- MARTIN, S. D. & MCGEE, S. L. 2014. The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta*, 1840, 1303-12.
- MARTINEZ-REDONDO, V., PETTERSSON, A. T. & RUAS, J. L. 2015. The hitchhiker's guide to PGC-1alpha isoform structure and biological functions. *Diabetologia*, 58, 1969-77.
- MARTORELL-RIERA, A., SEGARRA-MONDEJAR, M., MUNOZ, J. P., GINET, V., OLLOQUEQUI, J., PEREZ-CLAUSELL, J., PALACIN, M., REINA, M., PUYAL, J., ZORZANO, A. & SORIANO, F. X. 2014. Mfn2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death. *EMBO J*, 33, 2388-407.

Bibliographie

- MATAMALA, N., MARTINEZ, M. T., LARA, B., PEREZ, L., VAZQUEZ, I., JIMENEZ, A., BARQUIN, M., FERRAROTTI, I., BLANCO, I., JANCIAUSKIENE, S. & MARTINEZ-DELGADO, B. 2015. Alternative transcripts of the SERPINA1 gene in alpha-1 antitrypsin deficiency. *J Transl Med*, 13, 211.
- MATERNE, P., ANANDHAKUMAR, J., MIGEOT, V., SORIANO, I., YAGUE-SANZ, C., HIDALGO, E., MIGNION, C., QUINTALES, L., ANTEQUERA, F. & HERMAND, D. 2015. Promoter nucleosome dynamics regulated by signaling through the CTD code. *Elife*, 4.
- MCCULLOUGH, K. D., MARTINDALE, J. L., KLOTZ, L. O., AW, T. Y. & HOLBROOK, N. J. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol*, 21, 1249-59.
- MICELI-RICHARD, C. 2014. Epigenetics and lupus. *Joint Bone Spine*.
- MICHELANGELI, F. & EAST, J. M. 2011. A diversity of SERCA Ca²⁺ pump inhibitors. *Biochem Soc Trans*, 39, 789-97.
- MICHELS, A. A., KANON, B., KONINGS, A. W., OHTSUKA, K., BENSUADE, O. & KAMPINGA, H. H. 1997. Hsp70 and Hsp40 chaperone activities in the cytoplasm and the nucleus of mammalian cells. *J Biol Chem*, 272, 33283-9.
- MILLARD, C. J., WATSON, P. J., FAIRALL, L. & SCHWABE, J. W. 2013. An evolving understanding of nuclear receptor coregulator proteins. *J Mol Endocrinol*, 51, T23-36.
- MISHRA, P. & CHAN, D. C. 2014. Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 15, 634-46.
- MITRA, K. 2013. Mitochondrial fission-fusion as an emerging key regulator of cell proliferation and differentiation. *Bioessays*, 35, 955-64.
- MITSUI, H., TAKUWA, N., MARUYAMA, T., MAEKAWA, H., HIRAYAMA, M., SAWATARI, T., HASHIMOTO, N., TAKUWA, Y. & KIMURA, S. 2001. The MEK1-ERK map kinase pathway and the PI 3-kinase-Akt pathway independently mediate anti-apoptotic signals in HepG2 liver cancer cells. *Int J Cancer*, 92, 55-62.
- MOGHADASZADEH, B. & BEGGS, A. H. 2006. Selenoproteins and their impact on human health through diverse physiological pathways. *Physiology (Bethesda)*, 21, 307-15.
- MONTEIRO, J. P., OLIVEIRA, P. J. & JURADO, A. S. 2013. Mitochondrial membrane lipid remodeling in pathophysiology: a new target for diet and therapeutic interventions. *Prog Lipid Res*, 52, 513-28.
- MONTERO, J., MORALES, A., LLACUNA, L., LLUIS, J. M., TERRONES, O., BASANEZ, G., ANTONSSON, B., PRIETO, J., GARCIA-RUIZ, C., COLELL, A. & FERNANDEZ-CHECA, J. C. 2008. Mitochondrial cholesterol contributes to chemotherapy resistance in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*, 68, 5246-56.
- MORISHIMA, N., NAKANISHI, K., TAKENOUCI, H., SHIBATA, T. & YASUHIKO, Y. 2002. An endoplasmic reticulum stress-specific caspase cascade in apoptosis. Cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *J Biol Chem*, 277, 34287-94.
- MORISHIMA, N., NAKANISHI, K., TSUCHIYA, K., SHIBATA, T. & SEIWA, E. 2004. Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 279, 50375-81.
- MORRIS, S. M., JR. 2002. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu Rev Nutr*, 22, 87-105.
- MUKHOPADHYAY, P., RAJESH, M., YOSHIHIRO, K., HASKO, G. & PACHER, P. 2007. Simple quantitative detection of mitochondrial superoxide production in live cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 358, 203-8.

Bibliographie

- MURPHY, T. H., MIYAMOTO, M., SASTRE, A., SCHNAAR, R. L. & COYLE, J. T. 1989. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron*, 2, 1547-58.
- NAKAMURA, N. & HIROSE, S. 2008. Regulation of mitochondrial morphology by USP30, a deubiquitinating enzyme present in the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*, 19, 1903-11.
- NAKAMURA, N., KIMURA, Y., TOKUDA, M., HONDA, S. & HIROSE, S. 2006. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep*, 7, 1019-22.
- NG, F. W., NGUYEN, M., KWAN, T., BRANTON, P. E., NICHOLSON, D. W., CROMLISH, J. A. & SHORE, G. C. 1997. p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-XL- and procaspase-8-associated protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*, 139, 327-38.
- ODA, K., FUJIWARA, T. & IKEHARA, Y. 1990. Brefeldin A arrests the intracellular transport of viral envelope proteins in primary cultured rat hepatocytes and HepG2 cells. *Biochem J*, 265, 161-7.
- OLDEN, K., PARENT, J. B. & WHITE, S. L. 1982. Carbohydrate moieties of glycoproteins. A re-evaluation of their function. *Biochim Biophys Acta*, 650, 209-32.
- OLIVARI, S., GALLI, C., ALANEN, H., RUDDOCK, L. & MOLINARI, M. 2005. A novel stress-induced EDEM variant regulating endoplasmic reticulum-associated glycoprotein degradation. *J Biol Chem*, 280, 2424-8.
- OTERA, H. & MIHARA, K. 2011. Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small GTPases*, 2, 167-172.
- OTERA, H., WANG, C., CLELAND, M. M., SETOGUCHI, K., YOKOTA, S., YOULE, R. J. & MIHARA, K. 2010. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*, 191, 1141-58.
- PAGANI, L. & ECKERT, A. 2011. Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 925050.
- PALMER, C. S., ELGASS, K. D., PARTON, R. G., OSELLAME, L. D., STOJANOVSKI, D. & RYAN, M. T. 2013. Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. *J Biol Chem*, 288, 27584-93.
- PALMER, C. S., OSELLAME, L. D., LAINE, D., KOUTSOPOULOS, O. S., FRAZIER, A. E. & RYAN, M. T. 2011. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep*, 12, 565-73.
- PAN, C., PRENTICE, H., PRICE, A. L. & WU, J. Y. 2012. Beneficial effect of taurine on hypoxia- and glutamate-induced endoplasmic reticulum stress pathways in primary neuronal culture. *Amino Acids*, 43, 845-55.
- PANDURANGAN, M., HWANG, I., ORHIRBAT, C., JIEUN, Y. & CHO, S. H. 2014. The calpain system and diabetes. *Pathophysiology*, 21, 161-7.
- PAPA, F. R., ZHANG, C., SHOKAT, K. & WALTER, P. 2003. Bypassing a kinase activity with an ATP-competitive drug. *Science*, 302, 1533-7.
- PARK, Y. Y., LEE, S., KARBOWSKI, M., NEUTZNER, A., YOULE, R. J. & CHO, H. 2010. Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J Cell Sci*, 123, 619-26.
- PARK, Y. Y., NGUYEN, O. T., KANG, H. & CHO, H. 2014. MARCH5-mediated quality control on acetylated Mfn1 facilitates mitochondrial homeostasis and cell survival. *Cell Death Dis*, 5, e1172.

Bibliographie

- PAWLAK, M., LEFEBVRE, P. & STAELS, B. 2014. Molecular Mechanism of PPARalpha Action and its Impact on Lipid Metabolism, Inflammation and Fibrosis in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *J Hepatol*.
- PELLICORO, A. & FABER, K. N. 2007. Review article: The function and regulation of proteins involved in bile salt biosynthesis and transport. *Aliment Pharmacol Ther*, 26 Suppl 2, 149-60.
- PETERS, T. J., MULLER, M. & DE DUVE, C. 1972. Lysosomes of the arterial wall. I. Isolation and subcellular fractionation of cells from normal rabbit aorta. *J Exp Med*, 136, 1117-39.
- PEYROCHE, A., ANTONNY, B., ROBINEAU, S., ACKER, J., CHERFILS, J. & JACKSON, C. L. 1999. Brefeldin A acts to stabilize an abortive ARF-GDP-Sec7 domain protein complex: involvement of specific residues of the Sec7 domain. *Mol Cell*, 3, 275-85.
- PIACENZA, L., IRIGOIN, F., ALVAREZ, M. N., PELUFFO, G., TAYLOR, M. C., KELLY, J. M., WILKINSON, S. R. & RADI, R. 2007. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem J*, 403, 323-34.
- PLAITAKIS, A. & SHASHIDHARAN, P. 2000. Glutamate transport and metabolism in dopaminergic neurons of substantia nigra: implications for the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurol*, 247 Suppl 2, II25-35.
- PLECITA-HLAVATA, L., LESSARD, M., SANTOROVA, J., BEWERSDORF, J. & JEZEK, P. 2008. Mitochondrial oxidative phosphorylation and energetic status are reflected by morphology of mitochondrial network in INS-1E and HEP-G2 cells viewed by 4Pi microscopy. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 834-46.
- PON, L. A. 2013. Mitochondrial fission: rings around the organelle. *Curr Biol*, 23, R279-81.
- PRAKASAM, A., GHOSE, S., OLEINIK, N. V., BETHARD, J. R., PETERSON, Y. K., KRUPENKO, N. I. & KRUPENKO, S. A. 2014. JNK1/2 regulate Bid by direct phosphorylation at Thr59 in response to ALDH1L1. *Cell Death Dis*, 5, e1358.
- PUTHALAKATH, H., O'REILLY, L. A., GUNN, P., LEE, L., KELLY, P. N., HUNTINGTON, N. D., HUGHES, P. D., MICHALAK, E. M., MCKIMM-BRESCHKIN, J., MOTOYAMA, N., GOTOH, T., AKIRA, S., BOUILLET, P. & STRASSER, A. 2007. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*, 129, 1337-49.
- RAINBOLT, T. K., SAUNDERS, J. M. & WISEMAN, R. L. 2014. Stress-responsive regulation of mitochondria through the ER unfolded protein response. *Trends Endocrinol Metab*, 25, 528-37.
- RAO, R. V., HERMEL, E., CASTRO-OBREGON, S., DEL RIO, G., ELLERBY, L. M., ELLERBY, H. M. & BREDESEN, D. E. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem*, 276, 33869-74.
- RAUEN, T., BENEDYK, K., JUANG, Y. T., KERKHOFF, C., KYTTARIS, V. C., ROTH, J., TSOKOS, G. C. & TENBROCK, K. 2011. A novel intronic cAMP response element modulator (CREM) promoter is regulated by activator protein-1 (AP-1) and accounts for altered activation-induced CREM expression in T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *J Biol Chem*, 286, 32366-72.
- REIMOLD, A. M., IWAKOSHI, N. N., MANIS, J., VALLABHAJOSYULA, P., SZOMOLANYI-TSUDA, E., GRAVALLESE, E. M., FRIEND, D., GRUSBY, M. J., ALT, F. & GLIMCHER, L. H. 2001. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 412, 300-7.

Bibliographie

- RENAULT, L., CHRISTOVA, P., GUIBERT, B., PASQUALATO, S. & CHERFILS, J. 2002. Mechanism of domain closure of Sec7 domains and role in BFA sensitivity. *Biochemistry*, 41, 3605-12.
- RICHTER, V., PALMER, C. S., OSELLAME, L. D., SINGH, A. P., ELGASS, K., STROUD, D. A., SESAKI, H., KVANSAKUL, M. & RYAN, M. T. 2014. Structural and functional analysis of MiD51, a dynamin receptor required for mitochondrial fission. *J Cell Biol*, 204, 477-86.
- RIZZUTO, R., BASTIANUTTO, C., BRINI, M., MURGIA, M. & POZZAN, T. 1994. Mitochondrial Ca²⁺ homeostasis in intact cells. *J Cell Biol*, 126, 1183-94.
- RIZZUTO, R., PINTON, P., CARRINGTON, W., FAY, F. S., FOGARTY, K. E., LIFSHITZ, L. M., TUFT, R. A. & POZZAN, T. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*, 280, 1763-6.
- ROJO, M., LEGROS, F., CHATEAU, D. & LOMBES, A. 2002. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci*, 115, 1663-74.
- RON, D. & HABENER, J. F. 1992. CHOP, a novel developmentally regulated nuclear protein that dimerizes with transcription factors C/EBP and LAP and functions as a dominant-negative inhibitor of gene transcription. *Genes Dev*, 6, 439-53.
- RUSINOL, A. E., CUI, Z., CHEN, M. H. & VANCE, J. E. 1994. A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J Biol Chem*, 269, 27494-502.
- RYAN, M. T. & HOOGENRAAD, N. J. 2007. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu Rev Biochem*, 76, 701-22.
- SANTEL, A. & FULLER, M. T. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*, 114, 867-74.
- SCHAUBLE, N., CAVALIE, A., ZIMMERMANN, R. & JUNG, M. 2014. Interaction of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A with the human Sec61 complex suppresses passive calcium efflux from the endoplasmic reticulum. *Channels (Austin)*, 8, 76-83.
- SCHAUBLE, N., LANG, S., JUNG, M., CAPPEL, S., SCHORR, S., ULUCAN, O., LINXWEILER, J., DUDEK, J., BLUM, R., HELMS, V., PATON, A. W., PATON, J. C., CAVALIE, A. & ZIMMERMANN, R. 2012. BiP-mediated closing of the Sec61 channel limits Ca²⁺ leakage from the ER. *EMBO J*, 31, 3282-96.
- SCHEUNER, D., SONG, B., MCEWEN, E., LIU, C., LAYBUTT, R., GILLESPIE, P., SAUNDERS, T., BONNER-WEIR, S. & KAUFMAN, R. J. 2001. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. *Mol Cell*, 7, 1165-76.
- SCHRAG, J. D., BERGERON, J. J., LI, Y., BORISOVA, S., HAHN, M., THOMAS, D. Y. & CYGLER, M. 2001. The Structure of calnexin, an ER chaperone involved in quality control of protein folding. *Mol Cell*, 8, 633-44.
- SCHRAG, J. D., PROCOPIO, D. O., CYGLER, M., THOMAS, D. Y. & BERGERON, J. J. 2003. Lectin control of protein folding and sorting in the secretory pathway. *Trends Biochem Sci*, 28, 49-57.
- SCHRODER, M. & KAUFMAN, R. J. 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res*, 569, 29-63.
- SCHUCK, S., PRINZ, W. A., THORN, K. S., VOSS, C. & WALTER, P. 2009. Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *J Cell Biol*, 187, 525-36.

Bibliographie

- SCHWEIZER, A., MATTER, K., KETCHAM, C. M. & HAURI, H. P. 1991. The isolated ER-Golgi intermediate compartment exhibits properties that are different from ER and cis-Golgi. *J Cell Biol*, 113, 45-54.
- SCORRANO, L. 2013. Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur J Clin Invest*, 43, 886-93.
- SERASINGHE, M. N. & YOON, Y. 2008. The mitochondrial outer membrane protein hFis1 regulates mitochondrial morphology and fission through self-interaction. *Exp Cell Res*, 314, 3494-507.
- SERYSHEVA, II 2014. Toward a high-resolution structure of IP(3)R channel. *Cell Calcium*, 56, 125-32.
- SHIH, A. Y., ERB, H., SUN, X., TODA, S., KALIVAS, P. W. & MURPHY, T. H. 2006. Cystine/glutamate exchange modulates glutathione supply for neuroprotection from oxidative stress and cell proliferation. *J Neurosci*, 26, 10514-23.
- SHIN, H. W. & NAKAYAMA, K. 2004. Guanine nucleotide-exchange factors for arf GTPases: their diverse functions in membrane traffic. *J Biochem*, 136, 761-7.
- SHINJO, S., MIZOTANI, Y., TASHIRO, E. & IMOTO, M. 2013. Comparative analysis of the expression patterns of UPR-target genes caused by UPR-inducing compounds. *Biosci Biotechnol Biochem*, 77, 729-35.
- SMALE, S. T. 2009. Nuclear run-on assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009, pdb prot5329.
- SMIRNOVA, E., GRIPARIC, L., SHURLAND, D. L. & VAN DER BLIEK, A. M. 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 12, 2245-56.
- SMITH, D. D., JR. & CAMPBELL, J. W. 1988. Distribution of glutamine synthetase and carbamoyl-phosphate synthetase I in vertebrate liver. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 160-4.
- SMITH, M. H., PLOEGH, H. L. & WEISSMAN, J. S. 2011. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*, 334, 1086-90.
- SOCCIO, R. E. & BRESLOW, J. L. 2004. Intracellular cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24, 1150-60.
- SOLESIO, M. E., PRIME, T. A., LOGAN, A., MURPHY, M. P., DEL MAR ARROYO-JIMENEZ, M., JORDAN, J. & GALINDO, M. F. 2013. The mitochondria-targeted anti-oxidant MitoQ reduces aspects of mitochondrial fission in the 6-OHDA cell model of Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta*, 1832, 174-82.
- SORIANELLO, E., SORIANO, F. X., FERNANDEZ-PASCUAL, S., SANCHO, A., NAON, D., VILA-CABALLER, M., GONZALEZ-NAVARRO, H., PORTUGAL, J., ANDRES, V., PALACIN, M. & ZORZANO, A. 2012. The promoter activity of human Mfn2 depends on Sp1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*, 94, 38-47.
- SORICE, M., MATTEI, V., MATARRESE, P., GAROFALO, T., TINARI, A., GAMBARDELLA, L., CIARLO, L., MANGANELLI, V., TASCIO, V., MISASI, R. & MALORNI, W. 2012. Dynamics of mitochondrial raft-like microdomains in cell life and death. *Commun Integr Biol*, 5, 217-9.
- STEPHENS, D. J. 2003. De novo formation, fusion and fission of mammalian COPII-coated endoplasmic reticulum exit sites. *EMBO Rep*, 4, 210-7.
- STOJANOVSKI, D., KOUTSOPOULOS, O. S., OKAMOTO, K. & RYAN, M. T. 2004. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*, 117, 1201-10.

Bibliographie

- STORRIE, B. & MADDEN, E. A. 1990. Isolation of subcellular organelles. *Methods Enzymol*, 182, 203-25.
- STORTO, M., DE GRAZIA, U., KNOPFEL, T., CANONICO, P. L., COPANI, A., RICHELMI, P., NICOLETTI, F. & VAIRETTI, M. 2000. Selective blockade of mGlu5 metabotropic glutamate receptors protects rat hepatocytes against hypoxic damage. *Hepatology*, 31, 649-55.
- SUGIURA, A., NAGASHIMA, S., TOKUYAMA, T., AMO, T., MATSUKI, Y., ISHIDO, S., KUDO, Y., MCBRIDE, H. M., FUKUDA, T., MATSUSHITA, N., INATOME, R. & YANAGI, S. 2013. MITOL regulates endoplasmic reticulum-mitochondria contacts via Mitofusin2. *Mol Cell*, 51, 20-34.
- SUZUKI, M., NEUTZNER, A., TJANDRA, N. & YOULE, R. J. 2005. Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem*, 280, 21444-52.
- SZABADKAI, G., BIANCHI, K., VARNAI, P., DE STEFANI, D., WIECKOWSKI, M. R., CAVAGNA, D., NAGY, A. I., BALLA, T. & RIZZUTO, R. 2006. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol*, 175, 901-11.
- SZUL, T. & SZTUL, E. 2011. COPII and COPI traffic at the ER-Golgi interface. *Physiology (Bethesda)*, 26, 348-64.
- TACHENY, A., DIEU, M., ARNOULD, T. & RENARD, P. 2013. Mass spectrometry-based identification of proteins interacting with nucleic acids. *J Proteomics*, 94, 89-109.
- TACHENY, A., MICHEL, S., DIEU, M., PAYEN, L., ARNOULD, T. & RENARD, P. 2012. Unbiased proteomic analysis of proteins interacting with the HIV-1 5'LTR sequence: role of the transcription factor Meis. *Nucleic Acids Res*, 40, e168.
- TAGUCHI, N., ISHIHARA, N., JOFUKU, A., OKA, T. & MIHARA, K. 2007. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem*, 282, 11521-9.
- TAIT, S. W. & GREEN, D. R. 2012. Mitochondria and cell signalling. *J Cell Sci*, 125, 807-15.
- TAK, H., KIM, J., JAYABALAN, A. K., LEE, H., KANG, H., CHO, D. H., OHN, T., NAM, S. W., KIM, W. & LEE, E. K. 2014. miR-27 regulates mitochondrial networks by directly targeting the mitochondrial fission factor. *Exp Mol Med*, 46, e123.
- TAN, S., SAGARA, Y., LIU, Y., MAHER, P. & SCHUBERT, D. 1998. The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J Cell Biol*, 141, 1423-32.
- TANG, X., LUO, Y. X., CHEN, H. Z. & LIU, D. P. 2014. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front Physiol*, 5, 175.
- THOMAS, M. C. & CHIANG, C. M. 2006. The general transcription machinery and general cofactors. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 41, 105-78.
- THUERAUF, D. J., MARCINKO, M., BELMONT, P. J. & GLEMBOTSKI, C. C. 2007. Effects of the isoform-specific characteristics of ATF6 alpha and ATF6 beta on endoplasmic reticulum stress response gene expression and cell viability. *J Biol Chem*, 282, 22865-78.
- TOURNIER, C., HESS, P., YANG, D. D., XU, J., TURNER, T. K., NIMNUAL, A., BAR-SAGI, D., JONES, S. N., FLAVELL, R. A. & DAVIS, R. J. 2000. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, 288, 870-4.
- TURNER, J. D., ALT, S. R., CAO, L., VERNOCCHI, S., TRIFONOVA, S., BATTELLO, N. & MULLER, C. P. 2010. Transcriptional control of the glucocorticoid receptor: CpG islands, epigenetics and more. *Biochem Pharmacol*, 80, 1860-8.

Bibliographie

- TWIG, G., ELORZA, A., MOLINA, A. J., MOHAMED, H., WIKSTROM, J. D., WALZER, G., STILES, L., HAIGH, S. E., KATZ, S., LAS, G., ALROY, J., WU, M., PY, B. F., YUAN, J., DEENEY, J. T., CORKEY, B. E. & SHIRIHAI, O. S. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*, 27, 433-46.
- URANO, F., WANG, X., BERTOLOTTI, A., ZHANG, Y., CHUNG, P., HARDING, H. P. & RON, D. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science*, 287, 664-6.
- VAN VLIET, A. R., VERFAILLIE, T. & AGOSTINIS, P. 2014. New functions of mitochondria associated membranes in cellular signaling. *Biochim Biophys Acta*, 1843, 2253-62.
- VANCE, J. E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*, 265, 7248-56.
- VANDECAETSBEK, I., VANGHELUWE, P., RAEYMAEKERS, L., WUYTACK, F. & VANOEVELEN, J. 2011. The Ca²⁺ pumps of the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- VANNUVEL, K., RENARD, P., RAES, M. & ARNOULD, T. 2013. Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J Cell Physiol*, 228, 1802-18.
- VOELKER, D. R. 2005. Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem Sci*, 30, 396-404.
- VOELTZ, G. K., ROLLS, M. M. & RAPOPORT, T. A. 2002. Structural organization of the endoplasmic reticulum. *EMBO Rep*, 3, 944-50.
- WALTER, P. & RON, D. 2011. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334, 1081-6.
- WALTHER, T. C. & FARESE, R. V., JR. 2012. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. *Annu Rev Biochem*, 81, 687-714.
- WANG, J. X., JIAO, J. Q., LI, Q., LONG, B., WANG, K., LIU, J. P., LI, Y. R. & LI, P. F. 2011. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1. *Nat Med*, 17, 71-8.
- WANG, K., LONG, B., JIAO, J. Q., WANG, J. X., LIU, J. P., LI, Q. & LI, P. F. 2012. miR-484 regulates mitochondrial network through targeting Fis1. *Nat Commun*, 3, 781.
- WANG, X., SU, B., LEE, H. G., LI, X., PERRY, G., SMITH, M. A. & ZHU, X. 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29, 9090-103.
- WEI, Y., WENG, D., LI, F., ZOU, X., YOUNG, D. O., JI, J. & SHEN, P. 2008. Involvement of JNK regulation in oxidative stress-mediated murine liver injury by microcystin-LR. *Apoptosis*, 13, 1031-42.
- WILFLING, F., THIAM, A. R., OLARTE, M. J., WANG, J., BECK, R., GOULD, T. J., ALLGEYER, E. S., PINCET, F., BEWERSDORF, J., FARESE, R. V., JR. & WALTHER, T. C. 2014. Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife*, 3, e01607.
- WILSON-FRITCH, L., BURKART, A., BELL, G., MENDELSON, K., LESZYK, J., NICOLORO, S., CZECH, M. & CORVERA, S. 2003. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol*, 23, 1085-94.
- WILTSHIRE, C., MATSUSHITA, M., TSUKADA, S., GILLESPIE, D. A. & MAY, G. H. 2002. A new c-Jun N-terminal kinase (JNK)-interacting protein, Sab (SH3BP5), associates with mitochondria. *Biochem J*, 367, 577-85.

Bibliographie

- WIN, S., THAN, T. A., FERNANDEZ-CHECA, J. C. & KAPLOWITZ, N. 2014. JNK interaction with Sab mediates ER stress induced inhibition of mitochondrial respiration and cell death. *Cell Death Dis*, 5, e989.
- WIN, S., THAN, T. A., HAN, D., PETROVIC, L. M. & KAPLOWITZ, N. 2011. c-Jun N-terminal kinase (JNK)-dependent acute liver injury from acetaminophen or tumor necrosis factor (TNF) requires mitochondrial Sab protein expression in mice. *J Biol Chem*, 286, 35071-8.
- WINGENDER, E., SCHOEPS, T. & DONITZ, J. 2013. TFClass: an expandable hierarchical classification of human transcription factors. *Nucleic Acids Res*, 41, D165-70.
- WOJTOWICZ, K., SZAFARSKI, W., JANUCHOWSKI, R., ZAWIERUCHA, P., NOWICKI, M. & ZABEL, M. 2012. Inhibitors of N-glycosylation as a potential tool for analysis of the mechanism of action and cellular localisation of glycoprotein P. *Acta Biochim Pol*, 59, 445-50.
- WORMALD, M. R. & DWEK, R. A. 1999. Glycoproteins: glycan presentation and protein-fold stability. *Structure*, 7, R155-60.
- WU, S., ZHOU, F., ZHANG, Z. & XING, D. 2011. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission-fusion proteins. *FEBS J*, 278, 941-54.
- WU, Y. L., WANG, N. N., GU, L., YANG, H. M., XIA, N. & ZHANG, H. 2012. The suppressive effect of metabotropic glutamate receptor 5 (mGlu5) inhibition on hepatocarcinogenesis. *Biochimie*, 94, 2366-75.
- XIN, D., HU, L. & KONG, X. 2008. Alternative promoters influence alternative splicing at the genomic level. *PLoS One*, 3, e2377.
- YAMADORI, T., BABA, Y., MATSUSHITA, M., HASHIMOTO, S., KUROSAKI, M., KUROSAKI, T., KISHIMOTO, T. & TSUKADA, S. 1999. Bruton's tyrosine kinase activity is negatively regulated by Sab, the Btk-SH3 domain-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6341-6.
- YAMAGUCHI, F., HIRATA, Y., AKRAM, H., KAMITORI, K., DONG, Y., SUI, L. & TOKUDA, M. 2013. FOXO/TXNIP pathway is involved in the suppression of hepatocellular carcinoma growth by glutamate antagonist MK-801. *BMC Cancer*, 13, 468.
- YAMAGUCHI, F., TAKATA, M., KAMITORI, K., NONAKA, M., DONG, Y., SUI, L. & TOKUDA, M. 2008. Rare sugar D-allose induces specific up-regulation of TXNIP and subsequent G1 cell cycle arrest in hepatocellular carcinoma cells by stabilization of p27kip1. *Int J Oncol*, 32, 377-85.
- YANO, T., OKU, M., AKEYAMA, N., ITOYAMA, A., YURIMOTO, H., KUGE, S., FUJIKI, Y. & SAKAI, Y. 2010. A novel fluorescent sensor protein for visualization of redox states in the cytoplasm and in peroxisomes. *Mol Cell Biol*, 30, 3758-66.
- YONASHIRO, R., ISHIDO, S., KYO, S., FUKUDA, T., GOTO, E., MATSUKI, Y., OHMURA-HOSHINO, M., SADA, K., HOTTA, H., YAMAMURA, H., INATOME, R. & YANAGI, S. 2006. A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J*, 25, 3618-26.
- YOON, Y., KRUEGER, E. W., OSWALD, B. J. & MCNIVEN, M. A. 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*, 23, 5409-20.
- YU, T., FOX, R. J., BURWELL, L. S. & YOON, Y. 2005a. Regulation of mitochondrial fission and apoptosis by the mitochondrial outer membrane protein hFis1. *J Cell Sci*, 118, 4141-51.

Bibliographie

- YU, W., GONG, J. S., KO, M., GARVER, W. S., YANAGISAWA, K. & MICHIKAWA, M. 2005b. Altered cholesterol metabolism in Niemann-Pick type C1 mouse brains affects mitochondrial function. *J Biol Chem*, 280, 11731-9.
- YUAN, S. & AKEY, C. W. 2013. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*, 21, 501-15.
- ZECHNER, R., KIENESBERGER, P. C., HAEMMERLE, G., ZIMMERMANN, R. & LASS, A. 2009. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res*, 50, 3-21.
- ZEGHOUF, M., GUIBERT, B., ZEEH, J. C. & CHERFILS, J. 2005. Arf, Sec7 and Brefeldin A: a model towards the therapeutic inhibition of guanine nucleotide-exchange factors. *Biochem Soc Trans*, 33, 1265-8.
- ZHANG, C., YUAN, X. R., LI, H. Y., ZHAO, Z. J., LIAO, Y. W., WANG, X. Y., SU, J., SANG, S. S. & LIU, Q. 2014. Downregulation of dynamin-related protein 1 attenuates glutamate-induced excitotoxicity via regulating mitochondrial function in a calcium dependent manner in HT22 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 443, 138-43.
- ZHANG, Y., YANG, L., GAO, Y. F., FAN, Z. M., CAI, X. Y., LIU, M. Y., GUO, X. R., GAO, C. L. & XIA, Z. K. 2013. MicroRNA-106b induces mitochondrial dysfunction and insulin resistance in C2C12 myotubes by targeting mitofusin-2. *Mol Cell Endocrinol*, 381, 230-40.
- ZHAO, J., LENDAHL, U. & NISTER, M. 2013. Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cell Mol Life Sci*, 70, 951-76.
- ZHAO, J., LIU, T., JIN, S., WANG, X., QU, M., UHLEN, P., TOMILIN, N., SHUPLIAKOV, O., LENDAHL, U. & NISTER, M. 2011. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J*, 30, 2762-78.
- ZHAO, Z., LU, R., ZHANG, B., SHEN, J., YANG, L., XIAO, S., LIU, J. & SUO, W. Z. 2012. Differentiation of HT22 neurons induces expression of NMDA receptor that mediates homocysteine cytotoxicity. *Neurol Res*, 34, 38-43.
- ZHOU, J., LIU, C. Y., BACK, S. H., CLARK, R. L., PEISACH, D., XU, Z. & KAUFMAN, R. J. 2006. The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14343-8.
- ZHOU, Y. & DANBOLT, N. C. 2014. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm*, 121, 799-817.

Annexe

Annexe

Annexe : Analyse des sites putatifs de liaison de facteurs de transcription dans la séquence promotrice putative de Fis1 (longueur totale 1262 pb, HPRM20340).

La séquence analysée provient des fiches techniques du plasmide pEZX.PG02 (HPRM20340, GRCh38.2 primary assembly) de Genecopoeia (disponible sur : <http://genecopoeia.com/product/search/detail.php?prt=22&key=HPRM20340>). Elle a été analysée à l'aide du logiciel Transfac Match public version 1.0 (Biobase GmbH., Braunschweig, Allemagne) avec la matrice « spécifique au foie minimisant la somme des faux positifs et des faux négatifs »

Transfac Match public version 1.0 avec la matrice « spécifique au foie minimisant la somme des faux positifs et des faux négatifs » (68 sites putatifs détectés)

matrix identifiant	position (strand)	core match	matrix match	sequence (always the (+)-strand is shown)	factor name
V\$FREAC2_01	15 (-)	1.000	0.988	gccttGTTTAcCaatta	Freac-2
VSOC1_Q6	28 (-)	1.000	0.844	ttaaTTGGCtttttc	Oct-1
V\$ELK1_02	36 (-)	1.000	0.927	ctttTTCGtggtt	Elk-1
V\$HNF3B_01	40 (+)	1.000	0.900	ttccgTGTTTattca	HNF-3beta
V\$FOXJ2_01	40 (-)	1.000	0.939	ttccgTGTTTattcaaca	FOXJ2
V\$XFD2_01	41 (-)	1.000	0.946	tcctgtTTTATtca	XFD-2
V\$FREAC7_01	41 (-)	1.000	0.964	tcctgtTTTATtcaac	Freac-7
V\$HFH8_01	42 (+)	1.000	0.977	cctGTGTTTattca	HFH-8
V\$FOX3_01	53 (-)	0.944	0.893	caacaAATATtt	FOX3
V\$FOX3_01	57 (+)	0.944	0.888	aaATATtattg	FOX3
V\$GATA_C	105 (+)	1.000	0.982	gGATAAgcaag	GATA-X
V\$AP1_Q4	150 (+)	1.000	0.969	tgTGACTcaag	AP-1
V\$AP1_C	151 (-)	1.000	0.981	gTGACTcaa	AP-1
V\$PAX4_01	186 (-)	0.881	0.759	ttaccacagtcCCTCActgca	Pax-4
V\$HNF4_01	228 (-)	0.883	0.783	tccacacCTTCTccttcc	HNF-4
VSOC1_Q6	239 (-)	0.776	0.807	ctctTCCCatgctc	Oct-1
V\$PAX4_01	251 (-)	0.881	0.764	ctctgatagctCCTCActgct	Pax-4
V\$PAX4_01	276 (-)	0.977	0.841	tgccattgccCGTGAcccca	Pax-4
V\$USF_Q6	283 (-)	1.000	0.934	tgccCGTGAc	USF
V\$USF_C	294 (-)	0.929	0.941	ccATGTGg	USF
VSOC1_Q6	335 (+)	0.909	0.930	gtttatGTAAAtaat	Oct-1
V\$VBP_01	336 (-)	0.982	0.946	ttaTGTAaA	VBP
V\$HNF3B_01	338 (-)	1.000	0.912	tatgtAAATAatatt	HNF-3beta
V\$XFD1_01	338 (+)	1.000	0.980	tatGTAAAtaatat	XFD-1
V\$XFD3_01	338 (+)	1.000	0.914	tatGTAAAtaatat	XFD-3
V\$FOXJ2_02	342 (+)	1.000	0.866	taaATAATattgaa	FOXJ2
VSOC1_Q6	365 (+)	0.883	0.816	ttctctGCCAAtaat	Oct-1
V\$MYB_01	382 (-)	1.000	0.946	ggCCGTGct	v-Myb
V\$MYB_02	383 (-)	1.000	0.983	gCCGTGct	v-Myb
V\$ELK1_02	399 (-)	0.927	0.932	aaactTCCGttga	Elk-1
V\$CETS1P54_01	400 (-)	0.942	0.949	aaactTCCGct	c-Ets-1(p54)
V\$MYB_01	404 (-)	1.000	0.949	tcCCGTGat	v-Myb
V\$RF1_02	460 (-)	1.000	0.911	caGTTGCctctgctcttg	RF1
V\$AP1_Q2	483 (-)	1.000	0.960	tgagAGTCAGc	AP-1
V\$AP1_Q4	483 (-)	1.000	0.921	tgagAGTCAGc	AP-1
V\$RF1_02	493 (+)	0.982	0.921	cagaggcccaaGAAACcc	RF1
V\$PAX4_01	611 (+)	0.986	0.814	cggacTCAAGcgatectctctg	Pax-4
V\$MYOD_01	656 (+)	1.000	0.893	gtacCAGGTgcac	MyoD
V\$AREB6_02	656 (-)	1.000	0.980	gtacAGGTGcac	AREB6
V\$AREB6_03	656 (-)	1.000	0.995	gtacCAGGTgcac	AREB6
V\$AHRARNT_01	662 (-)	1.000	0.963	gtgCACGCcaccacgc	Ahr/Arnt
V\$GATA1_02	701 (+)	1.000	0.992	gtagAGATAgggtc	GATA-1
V\$LMO2COM_02	704 (+)	1.000	0.995	gGATAggg	Lmo2complex
V\$HNF4_01	784 (-)	0.829	0.821	tgttgggCTTCGgactgga	HNF-4
V\$CDPCR1_01	846 (-)	0.776	0.843	gcgatGAAATa	CDP_CR1
V\$ARNT_01	853 (+)	1.000	0.989	atagtcACGTGgcctc	Arnt
V\$USF_01	854 (+)	1.000	0.993	tagtCACGTggcct	USF
V\$USF_01	854 (-)	1.000	0.993	tagtcACGTGgcct	USF
V\$NMYC_01	855 (+)	1.000	0.985	agtcACGTGgcc	N-Myc
V\$NMYC_01	855 (-)	1.000	0.993	agtCACGTggcc	N-Myc
V\$MYCMax_02	855 (-)	1.000	0.932	agtcACGTGgcc	c-Myc/Max
V\$USF_Q6	856 (+)	1.000	1.000	gtCACGTggc	USF
V\$USF_Q6	856 (-)	0.987	0.986	gtcaCGTGGc	USF
V\$USF_C	857 (+)	1.000	0.993	tCACGTgg	USF
V\$USF_C	857 (-)	1.000	0.998	tcACGTGg	USF
V\$HNF4_01	915 (-)	0.752	0.792	ctgtgatCTCTGgtcagct	HNF-4
V\$PADS_C	916 (+)	0.937	0.952	tGTGATctc	Poly A
downstream					element
V\$GATA3_03	916 (-)	0.977	0.950	tgTGATCtct	GATA-3
VSOC1_Q6	949 (-)	0.893	0.815	gctgTTTTCatctg	Oct-1
V\$OLF1_01	989 (-)	0.990	0.898	ccagtttcctAGGGAagcctc	Olf-1
V\$MYOD_01	1032 (-)	1.000	0.898	aggaACCTGgga	MyoD

Annexe

12-08-2012

<u>V\$AREB6 03</u>	1032 (+)	1.000	0.979	aggcACCTGgga
<u>V\$IK1 01</u>	1036 (+)	1.000	0.968	acctGGGAagacc
<u>V\$CETS1P54 01</u>	1179 (+)	1.000	0.959	gCCGGAcgcc
<u>V\$ELK1 02</u>	1183 (+)	1.000	0.992	gacgcCGGAagtgg
<u>V\$CETS1P54 01</u>	1186 (+)	1.000	0.995	gCCGGAagtg
<u>V\$NRF2 01</u>	1186 (+)	1.000	0.960	gccGGAAgtg
<u>V\$USF Q6</u>	1209 (+)	0.931	0.929	gCCACTgggc

AREB6
Ik-1
c-Ets-1(p54)
Ik-1
c-Ets-1(p54)
NRF-2
USF