



**HAL**  
open science

## Mitochondrie et stress énergétique : voies de signalisation et adaptations cellulaires

Valérie Desquiret

► **To cite this version:**

Valérie Desquiret. Mitochondrie et stress énergétique : voies de signalisation et adaptations cellulaires. Biologie cellulaire. Université d'Angers, 2008. Français. NNT: . tel-00433520

**HAL Id: tel-00433520**

**<https://theses.hal.science/tel-00433520>**

Submitted on 19 Nov 2009

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**MITOCHONDRIE ET STRESS ENERGETIQUE :  
VOIES DE SIGNALISATION ET ADAPTATIONS CELLULAIRES**

**THESE DE DOCTORAT**

**Spécialité : Biologie Cellulaire**

**ECOLE DOCTORALE D'ANGERS**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le : 28 avril 2008**

**à : Angers**

**par : Valérie DESQUIRET**

**Devant le jury ci-dessous :**

**M. Pascal FERRE** (Rapporteur), Professeur, Université de Paris 6

**M. Jean-Louis GUEANT** (Rapporteur), Professeur, Université de Nancy

**M. Jean-Yves LE GUENNEC** (Examineur), Professeur, Université de Tours

**M. Patrick RITZ** (Examineur), Professeur, Université d'Angers

**M. Gilles SIMARD** (Examineur), Maître de Conférences, Université d'Angers

**Directeur de thèse : M. Yves MALTHIERY**, Professeur, Université d'Angers

**Nom et coordonnées du laboratoire : Unité INSERM U694, Laboratoire de  
Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU, 4 rue Larrey, 49033 ANGERS  
Cedex 01**



# **REMERCIEMENTS**

Je remercie vivement *Messieurs Pascal Ferré et Jean-Louis Guéant* d'avoir accepté d'être rapporteurs et de donner de leur temps pour juger ce travail. Je vous prie de croire en ma profonde reconnaissance.

Je remercie *Monsieur Jean-Yves Le Guennec* d'avoir accepté de faire partie du jury et de m'avoir formée sur la technique de mesure de la concentration intracellulaire en calcium ainsi que pour ses précieux conseils et le temps qu'il a accordé à ce travail.

Je remercie *Monsieur Gilles Simard* pour ses conseils, son aide et son encadrement. Je le remercie également pour la disponibilité et la patience dont il a fait preuve pendant ces trois années et pour avoir accepté d'être examinateur de ce manuscrit.

Je remercie *Monsieur Patrick Ritz* pour avoir accepté de faire partie du jury ainsi que pour le soutien qu'il a apporté à ce travail, le temps qu'il a consacré à ce projet et ses précieux conseils scientifiques.

Je remercie *Monsieur Yves Malthiery* pour m'avoir accueillie dans le laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire ainsi que pour ses nombreux conseils, son soutien et son encadrement tout au long de ce travail.

Je remercie *Angers Loire Métropole* pour m'avoir financée pendant ces trois années de thèse.

Je remercie *Madame Christiane Guillouzo* pour m'avoir fourni les cellules HepaRG et *Madame Denise Glaise* pour m'avoir formée à leur culture.

Je remercie *Damien Roussel et Dominique Loiseau* pour la partie «découplage par le DNP» du projet. Damien, tes connaissances, ton enthousiasme et ton dynamisme m'ont donné goût à la recherche, merci.

Je remercie *Josseline Hodbert* pour sa formation en culture cellulaire et pour sa gentillesse.

Je remercie *Naïg Gueguen* pour le temps qu'elle a consacré à ce projet. Ta gentillesse, ta disponibilité, tes connaissances, ton investissement et ta rigueur scientifique m'ont vraiment aidé tout au long de ce travail, merci.

Je remercie *Céline Wetterwald et Anaïs Planconneau* pour leur aide précieuse pour les dosages de complexes ainsi que pour leur bonne humeur malgré les longues séries de tubes ...

Je remercie *Mélissa Flamment, Louis Gourdin, Caroline Jacques, Julie Poirier, Julien Royer et Mireille Wertheimer*, les colocataires de la fac qui ont, grâce à leurs conseils et leur bonne humeur, rendu ces trois années (et quelques mois...) de thèse très agréables.

Je remercie tous les membres du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire pour leur aide et soutien: *Agnès, Anne, Arnaud, Aurélie, Carole, Chadi, Christelle, Christine, Dany, Delphine, Dominique, Frédérique, Gyasi, Jean-Fred, Jean-Luc, Laetitia, Marc, Marie-Anne, Mathilde, Matthieu, Mélanie, Nadège, Pascal, Patrice, Patrizia, Philippe, Soazig, Virginie et tous les techniciens d'UF2*.

Enfin, je remercie aussi ceux qui m'ont soutenu aussi en dehors du labo, ceux qui savent dire les mots qu'il faut au moment où il faut, ceux qui sont toujours là pour moi et pour qui je serai toujours là aussi : *Papa, Maman, Manon et Dilette et tout le reste de la grande famille*. *Papou*, ta curiosité et ta gentillesse ont toujours été un exemple pour moi, j'aurais tellement aimé que tu sois auprès de nous aujourd'hui.

Je dois aussi remercier le laboratoire à un titre beaucoup plus personnel, celui de m'avoir permis de rencontrer celui dont le soutien quotidien, le dynamisme et la « zen attitude » m'ont donné l'énergie nécessaire pour mener à bien ce projet. *Jean-François*, merci beaucoup pour tout le bonheur que tu m'apportes et tout ce que nous partageons tous les deux.

*A Maman et Papa,*

*A Jean-François,*

*A Manon et Dilette,*

*A ma famille,*

*En mémoire de Papou,*

*« La phrase la plus excitante à entendre en science, celle qui annonce de nouvelles découvertes, n'est pas eurêka (j'ai trouvé) mais plutôt tiens, c'est marrant ... ».*  
*Isaac Assimov.*



# **ABBREVIATIONS**

## **Abréviations**

- ADH** : hormone antidiurétique
- ADN** : acide desoxyribonucléique
- ADP** : adenosine 5'-diphosphate
- AIF**: apoptosis inducing factor
- AMP**: adenosine 5'-monophosphate
- AMPK**: adenosine monophosphate kinase
- ARN**: acide ribonucléique
- ATF<sub>2</sub>**: activating transcription factor 2
- ATP**: adenosine 5'-triphosphate
- BSA** : albumine bovine
- CBG** : corticosteroid binding globulin
- CCCP** : carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
- cGR** : récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes
- COX** : cytochrome c oxydase
- CREB** : cAMP response element binding
- CRF** : corticotrophin releasing factor
- CS** : citrate synthase
- DAG** : diacylglycérol
- DNP** : 2,4 Dinitrophénol
- EORs** : espèces Oxygénées réactives
- FAD** : flavine adenine dinucléotide
- FADH<sub>2</sub>** : flavine adenine dinucléotide hydrogénée
- FCCP** : carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone
- GABP** : GA-binding protein
- GR** : récepteur aux glucocorticoïdes
- GRE** : élément de réponse aux glucocorticoïdes
- GRU** : unité de réponse aux glucocorticoïdes
- G<sub>6</sub>Pase** : glucose-6-phosphatase
- HIF<sub>1</sub>** : hypoxia-inducible factor 1
- HNF4-A**: hepatic nuclear factor 4-A
- HSD (11 $\beta$ )** : hydrostéroïde deshydrogénase
- HSP** : heat shock protein
- IP<sub>3</sub>**: inositol triphosphate

**MAPK:** mitogen activated protein kinase  
**mClCCP :** identique au CCCP  
**MEF2:** myocyte-specific enhancer factor 2  
**MERRF:** myoclonus epilepsy associated with ragged-red fibers  
**MELAS:** Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke  
**mGR :** récepteur membranaire aux glucocorticoïdes  
**MR :** récepteur aux minéralocorticoïdes  
**NAD<sup>+</sup> :** nicotinamide-adenine dinucléotide  
**NADH :** nicotinamide-adenine dinucléotide hydrogéné  
**NFAT :** facteur nucléaire des cellules T activées  
**NFκB :** facteur de nécrose de tumeur  
**NLS :** signal de localisation nucléaire  
**NO :** monoxyde d'azote  
**NOS :** NO synthase  
**NRF<sub>1</sub>:** nuclear respiratory factor 1  
**NRF<sub>2</sub>:** nuclear respiratory factor 2  
**OXPHOS :** phosphorylation oxydative  
**PEPCK :** phosphoenolpyruvate carboxykinase  
**PGC<sub>1</sub> :** PPAR gamma coactivateur 1  
**PiP<sub>2</sub>:** phosphatidyl inositol bisphosphate  
**PPAR γ:** peroxysome proliferator-activated receptor γ  
**PTP:** pore de transition de perméabilité  
**Sp1 :** specificity protein 1  
**TFAM :** facteur de transcription mitochondriale A  
**TIM :** transporteur de la membrane interne mitochondriale  
**TOM :** transporteur de la membrane externe mitochondriale  
**TORC:** transducer of regulated CREB activity  
**UCP:** protéine découplante  
**VDAC:** porine ou voltage dependent anion channel  
**YY1:** facteur de transcription Yin Yang 1

# **LISTES DES FIGURES**

## **Liste des figures**

Figure 1. ....	verso page 6
Figure 2.....	verso page 8
Figure 3.....	verso page 8
Figure 4.....	verso page 10
Figure 5.....	verso page 16
Figure 6.....	verso page 17
Figure 7.....	verso page 18
Figure 8.....	verso page 27
Figure 9.....	verso page 31
Figure 10.....	verso page 31
Figure 11.....	verso page 31
Figure 12.....	verso page 32
Figure 13.....	verso page 34
Figure 14.....	verso page 36
Figure 15.....	verso page 37
Figure 16.....	verso page 45
Figure 17.....	verso page 82
Figure 18.....	verso page 84
Figure 19.....	verso page 92
Figure 20.....	verso page 93
Figure 21.....	verso page 94
Figure 22.....	page 109
Figure 23.....	page 110
Figure 24.....	page 118
Figure 25.....	page 137
Figure 26.....	page 138
Figure 27.....	page 138
Figure 28.....	page 171
Figure 29.....	page 172
Figure 30.....	page 175
Figure 31.....	page 183
Figure 32.....	page 184
Figure 33.....	page 185
Figure 34.....	page 186
Figure 35.....	page 187
Figure 36.....	page 188

# **SOMMAIRE**

<b>AVANT-PROPOS .....</b>	<b>1</b>
<b>DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>4</b>
I. METABOLISME ENERGETIQUE CELLULAIRE .....	5
II. METABOLISME ENERGETIQUE MITOCHONDRIAL .....	6
A. <i>La mitochondrie : structure</i> .....	6
B. <i>La mitochondrie : fonctions</i> .....	7
1. <i>Fonctionnement</i> .....	8
2. <i>Composition:</i> .....	8
III. REGULATION DU FONCTIONNEMENT DE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE MITOCHONDRIALE .....	12
A. <i>Variation de la phosphorylation oxydative.</i> .....	13
1. <i>Contrôle de la respiration mitochondriale.</i> .....	13
2. <i>Contrôle de l'efficacité de synthèse d'ATP.</i> .....	13
3. <i>Phosphorylation de sous-unités de complexes de la chaîne respiratoire.</i> .....	17
4. <i>Contrôle transcriptionnel</i> .....	19
B. <i>Le dialogue mitochondrie/noyau : régulateur important du métabolisme mitochondrial</i> ...	19
C. <i>Calcium et mitochondrie.</i> .....	23
1. <i>Microdomaines calciques mitochondriaux.</i> .....	23
2. <i>Transporteurs calciques mitochondriaux.</i> .....	24
3. <i>Rôles du calcium dans le fonctionnement mitochondrial.</i> .....	27
IV. LES GLUCOCORTICOÏDES : DEFINITION.....	30
A. <i>Synthèse des glucocorticoïdes</i> .....	30
B. <i>Les 11<math>\beta</math>HSD</i> .....	31
C. <i>Les glucocorticoïdes de synthèse</i> .....	31
V. LES GLUCOCORTICOÏDES : EFFETS PHYSIOLOGIQUES.....	32
A. <i>Rôle immunosuppresseur et anti-inflammatoire</i> .....	32
B. <i>Contrôle de l'homéostasie cellulaire</i> .....	32
C. <i>Rôle sur le métabolisme cellulaire</i> .....	33
1. <i>Néoglucogenèse</i> .....	33
2. <i>Protéolyse</i> .....	34
3. <i>Lipolyse</i> .....	35
4. <i>Insulinorésistance</i> .....	35
VI. LES GLUCOCORTICOÏDES : VOIES D'ACTION AU NIVEAU CELLULAIRE .....	36
A. <i>Effets génomiques des glucocorticoïdes</i> .....	36
1. <i>Les mécanismes d'action</i> .....	36
2. <i>Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR)</i> .....	37
3. <i>Le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR)</i> .....	39
B. <i>Effets non génomiques des glucocorticoïdes</i> .....	40
1. <i>Les effets rapides, non spécifiques, des glucocorticoïdes:</i> .....	40
2. <i>Les effets spécifiques rapides des glucocorticoïdes:</i> .....	41

C.	Interactions entre le récepteur membranaire aux glucocorticoïdes et les effets génomiques .....	45
VII.	LES GLUCOCORTICOÏDES : ACTIONS SUR LE METABOLISME ENERGETIQUE	
	MITOCHONDRIAL.....	47
A.	Effets des glucocorticoïdes sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	47
1.	<i>Rats traités par glucocorticoïdes.</i> .....	47
2.	<i>Effets génomiques sur le fonctionnement de la mitochondrie</i> .....	48
B.	Présence de récepteurs aux glucocorticoïdes dans la mitochondrie.....	49
	<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>51</b>
I.	MATERIEL BIOLOGIQUE ET REACTIFS. ....	52
A.	Cellules: .....	52
B.	Réactifs pour incuber avec les cellules en culture :.....	53
II.	MESURE DE LA RESPIRATION CELLULAIRE SUR CELLULES ENTIERES NON PERMEABILISEES.....	53
A.	Principe de la technique .....	55
B.	Réactifs .....	56
C.	Protocole .....	57
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	57
2.	<i>Mesure de la respiration par polarographie</i> .....	57
3.	<i>Dosage de la concentration en protéines dans les échantillons</i> .....	58
III.	MESURE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL PAR CYTOMETRIE EN FLUX.....	59
A.	Principe de la technique .....	59
B.	Réactifs .....	59
C.	Protocole.....	60
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	60
2.	<i>Incubation avec les réactifs</i> .....	60
3.	<i>Lecture de la fluorescence par cytométrie en flux</i> .....	61
IV.	DOSAGE DE L'ACTIVITE NADH UBIQUINOL REDUCTASE (COMPLEXE I) SUR CELLULES.....	62
A.	Principe de la technique .....	62
B.	Réactifs .....	63
C.	Protocole.....	64
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	64
2.	<i>Mesure de l'activité du complexe I par spectrophotométrie</i> .....	64
3.	<i>Calcul de l'activité du complexe I</i> .....	65
V.	DOSAGE DE L'ACTIVITE SUCCINATE UBIQUINONE REDUCTASE (COMPLEXE II) SUR CELLULES.....	66



A.	Principe de la technique .....	66
B.	Réactifs .....	66
C.	Protocole.....	68
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	68
2.	<i>Mesure de l'activité du complexe II par spectrophotométrie</i> .....	68
3.	<i>Calcul de l'activité du complexe II</i> .....	69
VI.	DOSAGE DE L'ACTIVITE UBIQUINONE CYTOCHROME C REDUCTASE (COMPLEXE III) SUR CELLULES . .....	69
A.	Principe de la technique .....	69
B.	Réactifs .....	70
C.	Protocole.....	72
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	72
2.	<i>Mesure de l'activité du complexe III par spectrophotométrie</i> .....	72
3.	<i>Calcul de l'activité du complexe III</i> .....	73
VII.	DOSAGE DE L'ACTIVITE DE LA CYTOCHROME C OXYDASE (COMPLEXE IV) SUR CELLULES.....	73
A.	Principe de la technique .....	73
B.	Réactifs .....	74
C.	Protocole.....	75
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	75
2.	<i>Mesure de l'activité du complexe IV par spectrophotométrie</i> .....	75
3.	<i>Calcul de l'activité du complexe IV</i> .....	75
VIII.	DOSAGE DE L'ACTIVITE CITRATE SYNTHASE (CS) SUR CELLULES.....	76
A.	Principe de la technique .....	76
B.	Réactifs .....	76
C.	Protocole.....	77
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	77
2.	<i>Mesure de l'activité du complexe IV par spectrophotométrie</i> .....	77
3.	<i>Calcul de l'activité de la citrate synthase</i> .....	78
IX.	PREPARATION DE MEMBRANES PLASMIQUES A PARTIR DE CELLULES HEPG2 ET INCUBATION EN PRESENCE DE DEXAMETHASONE-FITC.....	78
A.	Principe de la technique .....	78
B.	Réactifs .....	78
C.	Protocole.....	80
1.	<i>Préparation des cellules</i> .....	80
2.	<i>Purification des membranes</i> .....	80
3.	<i>Incubation avec la dexamethasone-FITC</i> .....	81
X.	EXTRACTION DES ARN TOTAUX A PARTIR DE CELLULES.....	81
A.	Principe de la technique .....	81
B.	Protocole.....	82
1.	<i>Lyse des cellules</i> .....	82

2. Extraction des ARN totaux. ....	82
3. Elution des ARN totaux. ....	82
4. Mesure de la concentration en ARN. ....	82
XI. REVERSE TRANSCRIPTION .....	83
A. Principe de la technique .....	83
B. Protocole.....	83
XII. RT PCR QUANTITATIVE .....	84
A. Principe de la technique .....	84
B. Protocole.....	84
1. Préparation des standards .....	84
2. PCR quantitative.....	85
3. Vérification des produits d'amplification par migration sur gel d'agarose. ....	85
XIII. WESTERN BLOT .....	86
A. Principe de la technique .....	86
B. Réactifs .....	86
C. Anticorps .....	89
D. Protocole.....	89
1. Préparation des échantillons. ....	89
2. Préparation du gel d'acrylamide. ....	90
3. Dépôt des échantillons et migration. ....	90
4. Transfert sur membrane de nylon. ....	91
5. Saturation des membranes. ....	91
6. Incubation avec l'anticorps primaire. ....	91
7. Incubation avec l'anticorps secondaire.....	91
8. Révélation. ....	92
9. Quantification.....	92
XII. MESURE DE LA CONCENTRATION INTRACELLULAIRE EN CLACIUM PAR MICROFLUORIMETRIE .....	92
A. Principe de la technique.....	92
B. Réactifs.....	93
C. Protocole .....	94
1. Préparation des cellules.....	94
2. Mesure de la fluorescence des cellules. ....	94
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>95</b>
ARTICLE 1 .....	96
Introduction .....	97
Article 1 .....	99
Résultats complémentaires .....	109
Résultats et discussion.....	112
ARTICLES 2 ET 3.....	119

Introduction .....	120
Article 2 .....	123
Résultats complémentaires de l'article 2.....	137
Article 3 .....	140
Résultats et discussion.....	164
<b>TRAVAIL COMPLEMENTAIRE SUR LES CELLULES HEPARG .....</b>	<b>173</b>
Introduction .....	174
Résultats .....	176
Discussion .....	179
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>189</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>196</b>
<b>PUBLICATIONS.....</b>	<b>232</b>

# **AVANT-PROPOS**

L'équipe INSERM U694 développe un axe de recherche sur la régulation de la conversion énergétique mitochondriale dans différents modèles de stress métaboliques tels que la restriction calorique, la cachexie cancéreuse ou l'hypermétabolisme induit par le traitement par les hormones glucocorticoïdes.

Les conséquences fonctionnelles mitochondriales de l'hypermétabolisme induit par les glucocorticoïdes ont été étudiées sur un modèle de rat traité par dexaméthasone (Dumas *et al.*, 2003, Roussel *et al.*, 2003). Ces travaux ont permis de montrer, au niveau des mitochondries isolées de foie, une diminution de l'efficacité de la conversion énergétique mitochondriale associée à une augmentation de la fuite de protons. Ces travaux ayant mis en évidence l'action découplante de la dexaméthasone dans les mitochondries hépatiques, la question principale de mon projet de thèse était de savoir si ce phénomène correspondait à un effet non spécifique direct de l'hormone (modification de l'environnement lipidique membranaire...) ou bien un effet spécifique impliquant la voie classique du récepteur aux glucocorticoïdes.

La première partie de ma thèse consiste en une étude bibliographique du métabolisme énergétique mitochondrial et ses régulations ainsi que l'analyse des voies d'action des glucocorticoïdes et de leurs effets sur le fonctionnement mitochondrial.

La deuxième partie décrit le matériel et les méthodes que nous avons employés pour la partie expérimentale de ce projet.

La troisième partie expose les travaux que nous avons menés sur le métabolisme cellulaire et mitochondrial des cellules HepG2 (lignée cellulaire issue d'un hépatocarcinome humain) dans deux situations de stress cellulaire touchant plus particulièrement la mitochondrie : le découplage artificiel induit par un composé chimique (le 2,4 dinitrophénol ou DNP) et le traitement par glucocorticoïdes. Dans le premier article, nous avons montré que le découplage mitochondrial était initiateur d'adaptations cellulaires pouvant compenser cette diminution d'efficacité de conversion d'énergie mitochondriale. Nous avons ensuite montré que ce stress induit par les glucocorticoïdes activait graduellement différentes voies de signalisation aboutissant à des effets à court terme (non génomiques) et à long terme (génomiques) sur la mitochondrie. Au cours de ce travail, nous avons identifié le récepteur membranaire aux glucocorticoïdes comme un élément important dans l'initiation des effets rapides de ces hormones sur la mitochondrie (article 2). Le troisième article s'intéresse plus particulièrement aux effets non génomiques des glucocorticoïdes et décrit les voies de signalisation impliquées dans ces effets. L'augmentation intracellulaire de calcium par relargage du calcium des stocks ainsi que l'activation calcium-dépendante de la protéine p38MAPK ont été identifiés comme

des éléments clés de cette cascade conduisant aux effets mitochondriaux rapides des glucocorticoïdes.

Une dernière partie expose un travail complémentaire, effectué sur la lignée HepaRG, une lignée cellulaire présentant des caractéristiques de différenciation proches des hépatocytes primaires (C. Guillouzo, INSERM U522, Rennes). Nous avons analysé le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale de ces cellules en mesurant leurs paramètres respiratoires dans différentes conditions de différenciation. Nous avons également étudié l'impact du traitement par glucocorticoïdes sur ces paramètres. Les premiers résultats montrent que cette lignée réagit différemment au traitement par glucocorticoïdes par rapport aux cellules HepG2. Des études complémentaires devront déterminer les raisons de ces divergences.

# **DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES**

## ***I. Métabolisme énergétique cellulaire.***

Pour assurer toutes ses réactions métaboliques de synthèse et de dégradation ainsi que ses nombreux processus physiologiques, la cellule a besoin de produire sa propre énergie à partir des nutriments apportés par l'alimentation.

Glucides : la glycolyse est une série de réactions enzymatiques, se déroulant dans le cytosol de la cellule, conduisant à la dégradation d'une molécule de glucose pour fournir deux molécules de pyruvate, deux NADH, deux protons et deux molécules d'ATP.

Lipides : les acides gras sont activés en acyl-coA dans le cytosol. Ces derniers pénètrent dans la mitochondrie et servent de substrats à la bêta oxydation. Cette voie métabolique permet la coupure successive du dernier groupement  $\text{CH}_2\text{-CH}_3$  de la molécule d'acyl-coA. Ainsi, à chaque cycle, une molécule de NADH et de  $\text{FADH}_2$  sont produites.

Acides aminés : la dégradation de ces molécules n'apporte que 10% des besoins énergétiques de l'organisme. Ces réactions conduisent à des produits finaux différents selon le statut nutritionnel. En période de jeûne, les acides aminés vont servir de base à la formation de glucose et de corps cétoniques, alors qu'à l'état nourri, ils vont donner des triglycérides qui seront stockés. Ainsi, le catabolisme des acides aminés est au carrefour des voies de la néoglucogénèse, de la céto-génèse et de la lipogénèse.

Ces dégradations primaires, en conditions anaérobies, permettent la production d'une quantité restreinte d'ATP, la forme d'énergie directement utilisable par les cellules. Cependant, lorsque la cellule est en conditions aérobies, les métabolites que ces voies génèrent (acétyl-coA, pyruvate ...) et les équivalents réduits (NADH et  $\text{FADH}_2$ ) peuvent être utilisés par la mitochondrie pour fournir une quantité d'ATP nettement supérieure. En effet, le pyruvate peut entrer dans la mitochondrie et être transformé en acétyl-coA. Cette molécule sert de base aux réactions du cycle de Krebs qui génère à son tour 3 molécules de NADH, 1  $\text{FADH}_2$ , 2  $\text{CO}_2$  et une molécule d'ATP par molécule de pyruvate. Les équivalents réduits formés par les réactions décrites ci-dessus servent de donneurs d'électrons aux complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale permettant ainsi la formation d'environ 32 molécules d'ATP par molécule de glucose consommée.

Dans une cellule eucaryote normale, environ 90 % de l'énergie nécessaire est fournie par la mitochondrie (Rolfe et Brown, 1997). Dans les cellules tumorales en revanche, cet équilibre métabolique peut être modifié. En effet, une augmentation de la glycolyse (par stimulation de la transcription des gènes codant pour les enzymes de cette voie notamment l'isoforme 2 de l'hexokinase et la phosphofructokinase 1) est retrouvée dans la plupart des types cellulaires



cancéreux par rapport au tissu sain. Ainsi, Otto Warburg, en 1930, a observé que les cellules cancéreuses possédaient un métabolisme différent des cellules saines avec une utilisation accrue de la glycolyse pour produire de l'énergie même en présence d'oxygène. Cette caractéristique sera appelée par la suite « l'effet Warburg » (Pedersen 2007). Pour autant, la glycolyse n'est le seul fournisseur d'ATP de ces cellules, en effet, dans certains types de tumeurs, l'apport d'énergie est réalisé de manière égale par la glycolyse et la phosphorylation oxydative (hépatomes de Erlisch et cellules de cancer du sein MCF7 par exemple). Il existe même certaines tumeurs dites oxydatives dans lesquelles l'énergie est fournie majoritairement par la mitochondrie comme les mélanomes ou les oncocytes (Moreno-Sanchez *et al.*, 2007). Ainsi, les cellules tumorales n'ont pas un type métabolique bien défini mais se positionnent plutôt sur une échelle allant d'un métabolisme exclusivement glycolytique à un fonctionnement essentiellement oxydatif.

## **II. Métabolisme énergétique mitochondrial.**

### **A. La mitochondrie : structure.**

La plupart des cellules humaines contiennent entre 500 et 2000 mitochondries, mais ce nombre varie en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. Par exemple, dans le foie les mitochondries représentent 20% du volume cytosolique alors que dans le muscle cardiaque, ce volume peut atteindre 40%. Les globules rouges matures, eux, n'en possèdent pas. Les mitochondries sont en mouvement continu dans la cellule et subissent des phénomènes de fusion et de fission très régulés (Jakobs, 2006). Elles se déplacent également dans les zones très demandeuses en énergie (zone périnucléaire par exemple) au moyen de protéines associées au cytosquelette. Lorsqu'une mitochondrie est sous forme isolée, deux compartiments, délimités par deux membranes, se distinguent (cf. figure 1).

- l'espace intermembranaire : c'est un espace étroit d'environ 100 angströms dont la composition est très proche de celle du cytosol. Il contient une forte concentration en protons qui lui confèrent une charge positive.

- la matrice : compartiment interne de la mitochondrie, elle est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que le cycle de Krebs ou l'oxydation des acides gras et contient donc toutes les enzymes nécessaires à ces deux voies. Elle renferme également l'ADN mitochondrial, des mitoribosomes et des ARN de transfert. L'ADN mitochondrial, une molécule d'environ 16 kilobases, est circulaire et dépourvu d'introns et d'histones. Chaque

mitochondrie possède un nombre variable de copies de cet ADN qui code notamment pour 13 protéines composantes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

- la membrane externe : c'est une bicouche lipidique composée d'environ 50 % de protéines et 50% de lipides. Cette membrane a la propriété d'être perméable grâce à la présence d'une protéine transmembranaire, VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Elle forme un canal qui laisse passer les molécules d'une taille inférieure à 10 kDa (anions, cations, pyruvate, acides gras et nucléotides par exemple). Les molécules de poids moléculaire supérieur à 10 kDa, possédant un signal d'adressage mitochondrial, peuvent traverser la membrane au niveau de complexes d'importation constitués par une zone d'accolement entre la membrane externe et interne. Cette membrane contient des translocases (TOM : Translocase of the Outer Membrane) qui permettent le transport des grosses protéines.

- la membrane interne : sa composition diffère des autres membranes biologiques. Elle contient environ 80 % de protéines et seulement 20 % de phospholipides. A cause de sa composition lipidique particulière (riche en cardiolipine ou diphosphatidylglycérol, qui interagit avec certaines protéines de la chaîne respiratoire et détermine leur bonne orientation et leur activité), elle est très peu perméable aux ions et le passage de molécules à travers cette membrane nécessite la présence de transporteurs. Ainsi, les principaux transporteurs sont l'ANT (qui échange l'ATP mitochondrial en échange d'ADP cytosolique), le cotransporteur de phosphate inorganique/proton, le symport pyruvate/proton, la navette du glycérol-3-phosphate, la navette malate/aspartate, le transporteur du citrate, la carnitine-acylcarnitine translocase. Les protéines sont importées grâce à un système de translocases, les TIM (Translocase of the Inner Membrane). La membrane interne possède de nombreux replis qui forment les crêtes mitochondriales. Des études tomographiques (Dimroth *et al.*, 2000, Hunte *et al.*, 2000) ont permis de montrer que ces crêtes n'ont pas la même composition que la membrane interne. Elles seraient en fait reliées à la membrane interne par des jonctions de crêtes d'environ 30 nm de diamètre (Gilkerson *et al.*, 2003). C'est au niveau de ces crêtes que sont préférentiellement enchâssés les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'ATP synthase, responsable de la production d'ATP.

## **B. La mitochondrie : fonctions.**

La mitochondrie est en effet le principal fournisseur d'ATP dans les cellules eucaryotes. Les réactions de phosphorylations oxydatives réalisées dans la membrane interne mitochondriale

permettent la transformation de l'énergie contenue dans les nutriments en énergie utilisable par la cellule : l'ATP.

Le système de phosphorylation oxydative est composé de la chaîne respiratoire mitochondriale (quatre complexes protéiques, eux-mêmes composés de différentes sous-unités codées soit par le génome nucléaire soit par le génome mitochondrial) et de l'ATP synthase.

### **1. Fonctionnement.**

La dégradation des nutriments permet de fournir à la chaîne respiratoire des équivalents réduits sous forme de  $\text{NADH} + \text{H}^+$  et de  $\text{FADH}_2$ . Ces molécules sont réoxydées par transfert de leurs électrons sur un accepteur final : l'oxygène. Cette étape est réalisée par l'intermédiaire d'une chaîne de transport sur laquelle les électrons vont transiter en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction. Ainsi, le  $\text{NAD}^+$  ayant une faible affinité pour les électrons, sa forme réduite, le  $\text{NADH}$ , peut facilement perdre deux électrons. L'oxygène moléculaire possède une très forte affinité pour les électrons et capture facilement ceux des autres molécules. Il va donc s'établir le long de la chaîne respiratoire un gradient de potentiels d'oxydoréduction et les électrons vont transiter de molécules à faible potentiel (tels que le  $\text{NAD}^+$  qui a un potentiel de  $-320 \text{ mV}$ ) vers des molécules à fort potentiel (tels que l'oxygène qui a un potentiel de  $+816 \text{ mV}$ ) (cf. figure 2). Au niveau des complexes I, III et IV, le transfert des électrons s'accompagne d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, générant ainsi une force protonmotrice qui est la somme du gradient de pH et du potentiel membranaire d'environ  $-150 \text{ mV}$  (négatif du côté matriciel). Ce gradient électrochimique est ensuite utilisé par l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'ATP ainsi formé est alors exporté dans le cytosol grâce à la translocase des nucléotides adényliques (ANT). Ce phénomène est la base de la théorie chimioosmotique émise par Peter Mitchell en 1961. Dans ce processus, l'oxydation des substrats est donc couplée à la synthèse d'ATP par la force protonmotrice. (cf. figure 3).

### **2. Composition.**

Le complexe I : ou  $\text{NADH}$ :ubiquinone oxydoreductase est la première enzyme de la chaîne respiratoire. Il catalyse le transfert de deux électrons du  $\text{NADH}$  à l'ubiquinone, couplé à la translocation de quatre protons au travers de la membrane, ce qui participe à la force protonmotrice (Sazanov, 2007). Cette enzyme est constituée d'environ 45 sous-unités (Carroll *et al.*, 2006), la plupart (38) sont codées par le génome nucléaire, tandis que 7 autres sont

codées par le génome mitochondrial. Avec son poids moléculaire de 980 kDa environ, elle constitue l'un des plus gros complexes protéiques membranaires. Le domaine hydrophile de ce complexe contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide qui est le premier accepteur d'électrons et huit ou neuf centres Fer/Soufre (FeS) constituant le centre catalytique de l'enzyme (Sazanov, 2007). Le système de pompage des protons est quant à lui localisé dans la partie membranaire du complexe (Yagi et Matsuno-Yagi, 2003). Ce complexe étant une source majeure de production d'espèces oxygénées réactives (ou EORs), les mutations le touchant conduisent à diverses pathologies neurodégénératives (Schapira, 1998). De plus, les EORs produits par ce complexe peuvent endommager l'ADN mitochondrial et être une des causes du vieillissement (Balaban *et al.*, 2005).

Le complexe II : ou succinate deshydrogénase joue un rôle important dans la mitochondrie puisqu'il fait à la fois partie de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs (Briere *et al.*, 2005). Il est composé de quatre sous-unités (A à D). Les sous-unités A et B constituent le domaine hydrophile de l'enzyme dépassant dans la matrice tandis que les sous-unités C et D constituent le domaine d'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale. Les quatre gènes codant pour ces quatre sous-unités font partie du génome nucléaire. Ce complexe qui oxyde le succinate en fumarate peut cependant, dans certaines conditions, fonctionner dans le sens inverse. Ce phénomène cause, par exemple, lors de conditions hypoxiques, une augmentation de la production d'EORs dans les vaisseaux pulmonaires (Paddenberg *et al.*, 2003). De plus, dans certains tissus tels que le rein, la quantité de complexes II est particulièrement élevée par rapport à certaines autres enzymes matricielles (la citrate synthase par exemple). Dans ce cas, la succinate deshydrogénase délivre aux ubiquinones une quantité d'électrons supérieure à ce que le cytochrome c peut transporter ce qui favorise une suroxydation des ubiquinones. Ce phénomène peut entraîner un flux réverse d'électrons au travers du complexe I (Briere *et al.*, 2005), entraînant une réduction plus importante de ce complexe, ce qui favorise la production de EORs. Des défauts d'activité de ce complexe ont été corrélés au développement de pathologies neurodégénératives telles que l'ataxie de Friedrich (Rotig *et al.*, 1997), la maladie de Huntington (Butterworth *et al.*, 1985) ou certaines encéphalopathies infantiles rares (Bourgeron *et al.*, 1995). Des mutations de sous-unités du complexe II ont également été décrites à plusieurs reprises comme un facteur important de tumorigénèse (Baysal, 2006). De même, une diminution de l'activité du complexe II a été corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire associée à la formation de tumeurs

(Gimenez-Roqueplo *et al.*, 2001) via l'activation du facteur HIF1 responsable de l'augmentation de la glycolyse et de l'angiogenèse dans les tumeurs.

Le complexe III : ou ubiquinol cytochrome c réductase contient quatre groupes prosthétiques redox actifs : 2 cytochromes b ( $b_L$  et  $b_H$ ), le cytochrome  $c_1$  et un centre Fer/Soufre. Ce complexe est composé de 11 sous-unités protéiques parmi lesquelles les sous-unités III, IV et V constituent les groupes redox, les 8 autres sous-unités ne comportant pas de groupement prosthétique. La majorité de ces sous-unités est codée par le génome nucléaire, seule la sous-unité comprenant les cytochromes b est codée par le génome mitochondrial (Borisov, 2002). Cette enzyme catalyse le transfert de deux électrons de l'ubiquinol au cytochrome c. Cette étape est associée au transfert de 4 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire grâce au cycle Q décrit par Mitchell (1975). Ainsi, des électrons dérivant de l'oxydation de l'ubiquinol sont recyclés par le site ubiquinol réductase de cette enzyme ce qui permet le pompage des protons. Des défauts partiels du complexe III ont été identifiés chez des patients atteints de déficiences hépatiques néonatales et du syndrome de Leigh (Leshinsky-Silver *et al.*, 2003).

Le complexe IV : ou cytochrome c oxydase appartient à la superfamille des oxydases à hème-cuivre. Son isoforme humaine est composée de 13 sous-unités dont trois (COX I, COX II et COX III) sont codées par le génome mitochondrial (Borisov, 2002). Le site actif binucléaire de cette enzyme est composé d'un noyau hème de haut spin (hème  $a_3$ ) associé à un ion cuivre (CuB). En plus de ce centre binucléaire, la cytochrome c oxydase possède un hème de bas spin (hème a) et un autre centre cuivre (CuA). Les électrons cédés par le cytochrome c entrent dans ce complexe protéique par le centre cuivre CuA puis sont transférés successivement à l'hème a puis au site actif binucléaire où s'effectue la liaison de l'oxygène et sa réduction en eau (Abramson *et al.*, 2001). Durant cette étape, 4 protons sont consommés et 4 autres sont transloqués de la matrice vers l'espace intermembranaire (Wikstrom et Verkhovsky, 2007). Des défauts d'activité de cette enzyme ont été associés au développement de différentes myopathies (Holt *et al.*, 1989, Rahman *et al.*, 1999, Zeviani *et al.*, 1991), mais également à des dysfonctionnements hépatiques (Edery *et al.*, 1994) et à plusieurs types d'encéphalopathies telles que le syndrome de Leigh (Adams *et al.*, 1997, Lee, W. T. *et al.*, 1996, Ohno *et al.*, 1990, Savasta *et al.*, 2001).

L'ATP synthase : est composée de deux sous-complexes (figure 4). La partie  $F_0$  est insérée dans la membrane interne mitochondriale et conduit les protons depuis l'espace intermembranaire vers la matrice. Cette partie, chez les mammifère est composée de 5 sous-

unités (A6, b, c, d et Oligomycin Sensitivity Conferral Protein). Le segment F<sub>1</sub> est matriciel, au contact de la membrane interne et utilise le gradient de protons pour convertir l'ADP en ATP et vice versa. Il est composé de 5 sous-unités ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  dans un ratio 3,3,1,1,1). Des protéines accessoires (e, f, g et F6) sont également associées à ce complexe. Le fonctionnement de ce dernier repose sur les sous-unités c (au nombre de 10) de la partie F<sub>0</sub> qui, connectées à la sous-unité  $\gamma$  de F<sub>1</sub>, agissent comme un rotor qui utilise le passage des protons à travers le stator (sous-unités A6, b, d et OSCP) pour fonctionner. La sous-unité  $\gamma$  cause, quant à elle, un changement conformationnel dans le trimère circulaire de sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  de la partie F<sub>1</sub> et permet ainsi successivement la liaison de l'ADP puis la réaction avec le phosphate inorganique pour générer l'ATP et enfin le relargage de l'ATP (Schon *et al.*, 2001). Des mutations dans les gènes codant pour des sous-unités de ce complexe (notamment la sous-unité F6) ont été reliées au développement de pathologies telles que le NARP (neuropathie, ataxie et rétinite pigmentaire, Holt *et al.*, 1989) ou le syndrome de Leigh (Tsao *et al.*, 2001).

Les supercomplexes : les expériences de co-précipitations de complexes, de microscopie électronique et d'électrophorèse sur gel « blue native » ont permis de mettre en évidence l'existence, dans la membrane interne mitochondriale, d'unités fonctionnelles composées de « supercomplexes » regroupant plusieurs complexes de la chaîne respiratoire (Bianchi *et al.*, 2004, Boumans *et al.*, 1998, Dudkina *et al.*, 2005, Schafer *et al.*, 2006). La formation de ces structures est rendue possible grâce à la présence de cardiolipines (Zhang, M. *et al.*, 2005). Quatre associations principales ont été retrouvées :

- dimères d'ATP synthase (Arnold *et al.*, 1998). Les monomères d'ATP synthase interagissent exclusivement au niveau des domaines Fo membranaires. Giraud *et al.* et Paumard *et al.* (2002) ont émis l'hypothèse que cette dimérisation de l'ATP synthase pouvait servir à stabiliser les crêtes mitochondriales puisque des mutations dans des sous-unités concernées par cette dimérisation entraînaient une désorganisation de la structure de la membrane interne mitochondriale.

- supercomplexe III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub> (Cruciat *et al.*, 2000). Le premier modèle structural de ce supercomplexe a été obtenu chez la levure et montre que deux monomères de complexes IV sont associés à un dimère central de complexe III. Il peut également exister des assemblages entre le complexe III et un seul monomère du complexe IV.

- supercomplexe I+III<sub>2</sub> (Dudkina *et al.*, 2005). Dans ce modèle, a été constatée une association latérale entre un dimère de complexes III et la partie membranaire du complexe I.

- supercomplexe I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> (Schafer *et al.*, 2006, Schagger, 2002). Ces complexes représentent le plus grand assemblage de complexes OXPHOS et sont également appelés « respirasomes ». Comme pour le supercomplexe I+III, le complexe III est latéralement associé avec le bras membranaire du complexe I et le complexe IV stabilise l'ensemble en interagissant à la fois avec la partie membranaire du complexe I et en s'associant de manière latérale avec le complexe III.

La formation de ces supercomplexes semble avoir une importance physiologique puisque ces structures pourraient augmenter la vitesse de transfert des électrons, avoir un rôle régulateur sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire, influencer la structure des crêtes de la membrane interne, augmenter la stabilité des complexes et enfin augmenter la capacité d'insertion des protéines dans la membrane interne mitochondriale (Boekema et Braun, 2007). Ces interactions ont cependant été, pour la majorité, identifiées par des expériences de co-immunoprécipitation et la fonctionnalité de ces structures *in vivo* doit encore être démontrée.

La phosphorylation oxydative mitochondriale fait donc intervenir un ensemble de réactions enzymatiques et constitue un processus qui, pour fonctionner de manière optimale, nécessite des régulations fines à différents niveaux.

### ***III. Régulation du fonctionnement de la phosphorylation oxydative mitochondriale.***

Le besoin en ATP des cellules varie en fonction du travail qu'elles doivent fournir (cellules musculaires) et des voies métaboliques activées (néoglucogenèse pour les cellules hépatiques par exemple). Les mitochondries doivent donc fournir des quantités d'ATP variables en fonction du besoin cellulaire. Trois moyens de s'adapter à ces besoins ont été récapitulés par Devin et Rigoulet (2007). Le premier consiste à modifier le fonctionnement global de la chaîne respiratoire. En effet, dans des conditions basales, la chaîne respiratoire ne fonctionne pas à son maximum de capacité et possède donc une réserve lui permettant d'ajuster son fonctionnement au plus proche des besoins de la cellule. Le second moyen consiste à modifier un ou plusieurs des éléments exerçant un contrôle sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (par exemple par des mécanismes de phosphorylation, Kadenbach, 2003). Ainsi, des modifications d'activité des complexes I et/ou IV aboutissent à une modification de l'équilibre de la phosphorylation oxydative. La troisième solution concerne une adaptation à plus long terme qui requiert une modification de la quantité d'enzymes de la

chaîne respiratoire dans la cellule (biogénèse mitochondriale), en gardant constante l'activité de chaque composant. Dans ce cas, la quantité d'enzyme est donc déterminante pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

## A. Variation de la phosphorylation oxydative.

La phosphorylation oxydative peut être régulée à deux niveaux : le taux de synthèse d'ATP (et donc le taux de respiration) et l'efficacité de cette synthèse d'ATP (Kadenbach, 2003).

### 1. Contrôle de la respiration mitochondriale.

Le taux de synthèse d'ATP varie en fonction de son utilisation par un mécanisme de rétrocontrôle nommé « contrôle respiratoire ». Ce phénomène a été défini à l'origine comme la stimulation de la respiration de mitochondries isolées en présence d'ADP (état 3) puis par son inhibition après la conversion d'ADP en ATP (état 4). La théorie chimiosmotique permet de l'expliquer puisque l'ajout d'ADP stimule le fonctionnement de l'ATP synthase, ce qui s'accompagne d'une augmentation de consommation du gradient de protons par cette dernière. La diminution de ce gradient stimule alors le fonctionnement des pompes à protons mitochondriales et donc la respiration (Kadenbach, 2003).

### 2. Contrôle de l'efficacité de synthèse d'ATP.

L'efficacité de la synthèse d'ATP est définie par la quantité d'ATP produite par molécule d'oxygène consommée (rapport ATP/O). Ce paramètre varie soit par modification de la force protonmotrice (découplage extrinsèque) soit par modification de l'efficacité de pompage des protons (découplage intrinsèque).

#### *a. Découplage extrinsèque.*

Le découplage extrinsèque correspond à une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons et aux cations et donc à une diminution du gradient de protons à travers cette membrane. La fuite de protons à l'origine de ce découplage peut être basale, c'est-à-dire influencée par les propriétés physicochimiques de la membrane ou inductible. Dans ce dernier cas, elle dépend alors de la présence de facteurs particuliers (protéines découplantes ou acides gras notamment).

La fuite basale : Dans les mitochondries fonctionnelles, la respiration et la synthèse d'ATP sont couplées par la force protonmotrice. Cependant, ce couplage n'est pas parfait et une partie des protons pompés retourne dans la matrice par simple diffusion au travers de la



membrane interne et ne sert donc pas pour la phosphorylation de l'ADP. L'intensité de cette fuite est variable et les mécanismes à l'origine de cette perméabilité partielle de la membrane interne mitochondriale ne sont pas entièrement élucidés. Ainsi, Brand *et al.* (1992) ont émis l'hypothèse que l'augmentation de la fuite de protons induite par les hormones thyroïdiennes pouvait s'expliquer par une augmentation de la surface de la membrane interne mitochondriale. La composition en acides gras de la membrane semble aussi jouer un rôle dans la fuite de protons. En effet, Bobyleva *et al.* (1997) ont démontré que l'intensité de la fuite de protons est proportionnelle à la quantité de cardiolipines. De plus, Pehowich (1999) a montré que la composition des phospholipides, notamment leur teneur en acides gras de la famille n-6 et n-3 influençait la perméabilité membranaire (plus le rapport n-6/n-3 est haut, plus la fuite de protons est élevée). Cette fuite de protons basale est importante physiologiquement puisqu'elle serait responsable de 33% de la respiration basale dans les hépatocytes (Brand *et al.*, 1994) et représenterait environ 20% du métabolisme de base chez le rat (Rolfe et Brown, 1997).

La fuite inductible : depuis la fin des années 1980, une famille particulière de protéines a été identifiée : les UCP (Uncoupling Proteins). La première isoforme, UCP1 a été découverte dans le tissu adipeux brun et est impliquée dans la thermogénèse (Lin et Klingenberg, 1980). Les isoformes UCP2 à UCP5 ont ensuite été identifiées dans différents tissus sur la base de leur homologies de séquence avec la protéine UCP1 (UCP2 : Fleury *et al.*, 1997, UCP3 : Boss *et al.*, 1997, UCP4 : Mao *et al.*, 1999, UCP5 : Yu *et al.*, 2000) . L'activité découplante d'UCP1 est expliquée par sa capacité à transporter des protons surtout lorsque des molécules d'acides gras se lient à cette protéine. L'activité catalytique de cette protéine n'est pas encore clairement élucidée puisque certains auteurs pensent qu'il s'agit réellement d'un transporteur de protons activé par les acides gras alors que d'autres suggèrent qu'elle permet le retour des acides gras vers l'espace intermembranaire sous forme anionique alors qu'ils ont traversé la membrane sous forme protonée pour atteindre la matrice mitochondriale (mécanisme de flip flop). Une activité de transport de protons a également été identifiée pour les protéines UCP2 et UCP3 (Jaburek *et al.*, 1999) et leur expression dans des cellules de mammifères permet un découplage. Cependant, dans ces expériences, les protéines sont nettement surexprimées par rapport à leur niveau physiologique et la présence de ce mécanisme *in vivo* n'est pas complètement établie. Un rôle dans la limitation de la production d'EORs par la chaîne respiratoire a été proposé pour les protéines UCP2 et UCP3. Ainsi, des souris dont le gène codant soit pour UCP2 soit pour UCP3 a été inactivé présentent une production d'EORs plus

importante que les souris contrôles (Arsenijevic *et al.*, 2000, Vidal-Puig *et al.*, 2000). Brand *et al.* (2004) ont proposé un modèle selon lequel les UCP pourraient répondre à une augmentation de la production matricielle d'ions superoxydes en induisant un découplage modéré (« mild uncoupling ») dans ces cellules. En effet, quand le potentiel de membrane mitochondrial est élevé, à cause d'une augmentation de la force protonmotrice, la production d'ions superoxyde augmente (Turrens, 1997), la dissipation du gradient pourrait donc servir à diminuer la production de ces EORs. Le concept de découplage modéré a été émis par Skulachev (1996) et stipule que ce dernier peut induire une augmentation assez faible de la conductance de la membrane interne mitochondriale aux protons, ce qui a pour effet de diminuer légèrement le potentiel de membrane et de diminuer ainsi la production de EORs. Echtay *et al.* (2002) ont montré que les UCP, ne contrôlaient pas seulement la production des EORs, mais étaient également la cible de ces dernières. Ainsi, les auteurs démontrent que les ions superoxydes sont capables d'activer les protéines UCP1, 2 et 3 par un mécanisme dépendant des acides gras. Une autre cible des UCP serait en effet les acides gras, qui comme les EORs participeraient à l'activité découplante de ces protéines (Garlid *et al.*, 1998, Jezek *et al.*, 2004).

D'autres protéines ont un rôle dans ce découplage extrinsèque. Ainsi, Brand *et al.* (2005) ont montré que des souris chez lesquelles le gène codant pour l'isoforme 1 de l'ANT a été inactivé présentent une conductance membranaire mitochondriale diminuée de 50 % dans le muscle. Ils ont montré également que la surexpression de l'ANT dans les mitochondries de drosophile augmente la perméabilité membranaire aux protons. De même, Shabalina *et al.* (2006) ont montré que l'ANT participait pour une large proportion à la fuite basale dans les mitochondries du tissu adipeux brun et proposent un modèle selon lequel l'ANT1 est responsable de cette fuite basale et que l'ANT2 est plutôt impliquée dans la partie de la fuite induite par les acides gras qui est dépendante de l'ANT. Le transporteur glutamate/aspartate pourrait également intervenir dans la fuite inductible par les acides gras en transportant ces derniers (Wojtczak et Wieckowski, 1999).

Le découplage artificiel par des découplants chimiques : Après la description par Loomis et Lipman, en 1948, des propriétés découplantes du 2,4 dinitrophénol, la capacité de nombreuses autres molécules à induire un découplage a été démontrée. Ainsi, par exemple, les dérivés phénylhydrazone tels que le CCCP (carbonylcyanide-m-chlorophénylhydrazone) ou le FCCP (carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphénylhydrazone) sont de puissants découplants capables d'agir à des concentrations beaucoup plus faibles que le DNP, ce sont les composés

les plus classiquement utilisés pour dissiper, de manière expérimentale, le gradient de protons. Tous ces découplants sont en fait des acides organiques faibles avec une charge négative délocalisée, ce qui leur confère une forte hydrophobicité. Cette charge leur permet de traverser plus facilement les membranes biologiques. La molécule chargée négativement est transloquée au niveau de l'espace intermembranaire (chargé moins négativement que la matrice) où elle capte un proton. Le découplant protoné retourne alors dans la matrice où il relargue son ion  $H^+$  (cf. figure 5). Le gradient électrochimique créé par la chaîne respiratoire est ainsi dissipé et ne sert pas à l'ATP synthase pour la phosphorylation de l'ADP. Il en résulte donc un découplage entre les oxydations et la production d'ATP (Kadenbach, 2003). De même, certains antibiotiques, utilisés comme ionophores (tels que la valinomycine et l'ionomycine) sont capables de dissiper le gradient de protons au niveau de la membrane interne mitochondriale.

#### *b. Découplage intrinsèque.*

Le découplage intrinsèque est défini par une diminution de l'efficacité des pompes à protons, c'est-à-dire une diminution de la stœchiométrie protons/électrons ou protons/ATP. Ce patinage (ou slipping) peut en théorie se produire pour chacune des pompes à protons de la chaîne respiratoire mais en pratique, seuls les patinages au niveau du complexe IV et de l'ATP synthase se sont révélés comme ayant une signification physiologique. Ainsi, la diminution de la stœchiométrie protons/électrons au niveau du complexe IV a été retrouvée par de nombreux auteurs (Babcock et Wikstrom, 1992, Capitanio *et al.*, 1991, Capitanio *et al.*, 1996, Ferguson-Miller, 1996, Murphy, M. P. et Brand, 1987, Papa *et al.*, 1991, Pietrobon *et al.*, 1981). Le mécanisme précis de ce phénomène n'est cependant pas clairement déterminé mais semble impliquer la structure de sortie de protons de cette enzyme (Capitanio *et al.*, 1996, Yoshikawa, 2003). Ainsi, Capitanio *et al.* (1996) émettent l'hypothèse qu'il existe deux voies de transferts des électrons impliquant ou non l'hème a et selon la voie empruntée, la stœchiométrie proton/électron est variable. De même, le pompage des protons par des sites de plus faible potentiel et séparés du site de réduction de l'oxygène semble jouer un rôle dans la diminution de la stœchiométrie protons/électrons (Papa *et al.*, 2006). Ce patinage du complexe IV peut également être influencé selon les isoformes tissus-spécifiques des sous-unités composant cette enzyme (notamment les sous-unités VIa, VIIa et VIII, Huttemann *et al.*, 2000). En ce qui concerne l'ATP synthase, le patinage se produit au niveau de la partie  $F_0$ , lieu de transduction entre l'énergie mécanique du rotor et l'énergie électrochimique (Junge *et al.*, 2001). La quantité de sous-unités c est variable selon les espèces et il semble que ce

nombre de sous-unités influence la stœchiométrie protons/ATP et donc l'efficacité de l'ATP synthase (Kadenbach, 2003).

Outre la stœchiométrie protons/électrons, le fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire peut être influencé par des régulations telles que des phosphorylations/déphosphorylations (Kadenbach, 2003).

### **3. Phosphorylation de sous-unités de complexes de la chaîne respiratoire.**

A ce jour, au moins 25 kinases et 8 phosphatases ont été localisées dans la mitochondrie. Elles représentent à peu près toutes les familles de kinases et phosphatases, ce qui montre la diversité des régulations possibles du fonctionnement mitochondrial (cf. figure 6). Les principales protéines kinases localisées dans la matrice ou dans la membrane interne mitochondriale sont des tyrosines kinases (Src, Lyn, Fyn par exemple, Salvi *et al.*, 2005), PKA, différents isoformes de PKC, AKT (Horbinski et Chu, 2005) et la pyruvate déshydrogénase kinase. Le complexe pyruvate déshydrogénase, même s'il ne fait pas partie, à proprement parler, de la chaîne respiratoire mitochondriale, est important pour le fonctionnement de cette dernière puisqu'il lui fournit une partie des équivalents réduits sous forme de NADH. Ce complexe possède, dans sa sous-unité  $\alpha$ , trois sites de phosphorylation sur des résidus sérine (Dahl *et al.*, 1987). La phosphorylation de ces sites par les pyruvate déshydrogénases kinases (4 isoformes tissus spécifiques) inactive le complexe. Cette modification peut être réversée par des phosphatases (2 isoformes dont l'activité est calcium-dépendante) qui rendent alors le complexe actif (Hansford, 1991).

Parallèlement à la présence de protéines kinases dans les mitochondries, environ 60 phosphoprotéines mitochondriales ont été identifiées (Pagliarini et Dixon, 2006). Parmi celles-ci, 18 sont des sous-unités des quatre complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase (cf. figure 7). La régulation de l'activité des complexes I et IV été la plus étudiée. Scacco *et al.* (2000) puis Papa (2002) ont montré que la sous-unité NDUFS4 du complexe I pouvait être activée par phosphorylation par la protéine PKA et désactivée par déphosphorylation par une phosphatase calcium dépendante. Une autre protéine phosphorylée a été récemment identifiée dans le complexe I de mitochondries de cœur de bœuf, il s'agit de la sous-unité MWFE (Chen, R. *et al.*, 2004) qui présente 80% d'homologies avec la protéine humaine NDUFA-1. Cette protéine joue un rôle important dans l'assemblage des sous-unités du complexe I codées par le génome mitochondrial (Au *et al.*, 1999).

Le complexe IV de la chaîne respiratoire est également la cible de phosphorylations par PKA. Ainsi, Bender et Kadenbach (2000) ont montré que l'inhibition allostérique ATP-dépendante de la cytochrome c oxydase pouvait être activée par phosphorylation et inhibée par déphosphorylation calcium-dépendante. Le résidu sérine en position 441 dans la sous-unité I du complexe IV a été identifié comme le site de phosphorylation/déphosphorylation. En effet, ce résidu étant situé à la face externe de la membrane interne mitochondriale, il peut être atteint par les kinases de l'espace intermembranaire (Lee, I. *et al.*, 2002). Ce processus de phosphorylation du complexe IV pourrait servir à maintenir un potentiel de membrane mitochondrial assez bas pour optimiser le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (Ludwig *et al.*, 2001). Un autre site de phosphorylation par PKA a été identifié dans la sous-unité I du complexe IV sur le résidu tyrosine en position 304 (Lee, I. *et al.*, 2005). Le cytochrome c de cœur de bœuf possède également un site de phosphorylation par les tyrosine kinases qui ressemble très fortement à celui décrit dans le complexe IV (Lee, I. *et al.*, 2006). De plus, Miyazaki *et al.* (2003) ont montré que la protéine kinase src pouvait être localisée dans les mitochondries d'ostéoclastes et qu'elle était capable de phosphoryler la sous-unité II de la cytochrome c oxydase. Dans ces cellules, l'activité du complexe IV est corrélée positivement à l'activité de la kinase src. L'utilisation de fibroblastes de souris où les gènes codant pour les kinases de la famille src ont été inactivés, a permis de montrer qu'une déficience en src entraîne une diminution de l'activité de la cytochrome c oxydase (Miyazaki *et al.*, 2003). Enfin, la cytochrome c oxydase peut également être phosphorylée par la PKC $\epsilon$ . Ogbi et Johnson (2006) ont démontré que dans les myocytes cardiaques de nouveau nés, la phosphorylation de la sous-unité IV du complexe IV par PKC $\epsilon$  augmentait l'activité de cette dernière. Les auteurs relient cette activation à l'effet bénéfique du préconditionnement sur l'ischémie reperfusion et proposent que cette activation permette d'améliorer l'efficacité du transfert d'électrons du cytochrome c à l'oxygène après une période d'ischémie. Cela aurait deux effets bénéfiques : aider à maintenir le gradient de protons mitochondrial et réduire la production d'EORs par les complexes I et III.

L'ATP synthase peut également être la cible de phosphorylation sur différents sites. Ainsi, chez la levure, sept sous-unités de cette enzyme peuvent être phosphorylées (Reinders et al, 2007). Chez l'Homme, Hojlund *et al.* (2003), ont identifié, dans le muscle squelettique, quatre formes phosphorylées différentes de la sous-unité  $\beta$  de la partie F<sub>1</sub> de l'ATP synthase. Lee J. *et al.* (2007) ont également retrouvé une forme phosphorylée de cette sous-unité dans les

plantes et ont montré que cette phosphorylation induit le recrutement de la protéine mitochondriale 14-3-3 qui, en se liant à cette région phosphorylée, inhibe la synthèse d'ATP.

La chaîne respiratoire mitochondriale peut être la cible de modifications post-traductionnelles rapides mais peut également subir des modifications transcriptionnelles à plus long terme.

#### **4. Contrôle transcriptionnel.**

La chaîne respiratoire mitochondriale requiert l'expression de gènes encodés à la fois par le génome nucléaire et le génome mitochondrial (Taanman, 1999). Le nombre de gènes codés par le génome mitochondrial étant restreint et le bon arrangement des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire nécessitant une expression coordonnée, l'intervention de facteurs régulateurs codés par le génome nucléaire s'avère cruciale (Scarpulla, 2006). Ces facteurs transcriptionnels clés peuvent être classés en deux catégories : les facteurs de transcription qui gouvernent l'expression du génome mitochondrial (ARN polymérase mitochondriale, le facteur de transcription et de maintenance de l'ADN mitochondrial : TFAM, des facteurs spécifiques de transcription : TFB1M et TFB2M et un facteur de terminaison de transcription : mTERF) et les facteurs nucléaires qui contrôlent l'expression des gènes de la chaîne respiratoire codés par le génome nucléaire (facteurs de transcription qui se lient sur les promoteurs de gènes cibles et différents coactivateurs tels que PGC-1). Du fait de cette double origine des protéines de la chaîne respiratoire, un stress causé par une altération du fonctionnement de cette dernière va entraîner la mise en place d'un dialogue inter-organites mitochondrie/noyau conduisant à une activation coordonnée de la transcription des deux génomes.

#### **B. Le dialogue mitochondrie/noyau : régulateur important du métabolisme mitochondrial.**

L'expression des gènes codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale est régulée transcriptionnellement par une combinaison de facteurs de transcription spécifiques. Ainsi, l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales et les phénomènes de réplication/transcription de l'ADN mitochondrial sont coordonnés grâce à l'intervention de ces facteurs de transcription. Les principaux facteurs décrits sont :

- Sp1 et YY1: ces facteurs généraux de transcription, exprimés de façon ubiquitaire, appartiennent à la famille des protéines à doigt de zinc et jouent un rôle dans la régulation de l'expression de nombreux gènes dont certains constituants de la chaîne respiratoire. Ainsi par

exemple, le degré de phosphorylation du facteur Sp1 pourrait influencer l'expression de certains gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale (Goffart et Wiesner, 2003, Lenka *et al.*, 1998) mais les effets de la surexpression de ce facteur sur la mitochondrie demeurent controversés et l'implication directe de ce facteur dans la biogénèse mitochondriale reste encore à étudier. Le facteur YY1 joue un rôle dans l'expression de la majorité des sous-unités de la cytochrome c oxydase (Lenka *et al.*, 1998, Lescuyer *et al.*, 2002). Cependant, le rôle de ce facteur semble différent selon les gènes, ainsi, il stimule la transcription de la sous-unité VIIc de la COX (Seelan et Grossman, 1997) mais de manière opposée, il réprime l'expression de la sous-unité Vb de cette même enzyme (Basu *et al.*, 1997).

- NRF1 : ce facteur a été identifié pour la première fois par Evans et Scarpulla (Evans et Scarpulla, 1989) comme le principal activateur transcriptionnel du gène du cytochrome c de rat. Par la suite des éléments de liaison à NRF1 ont été trouvés dans le promoteur de plusieurs gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que dans le promoteur du gène de la delta amino levulinate synthase (une enzyme de la matrice mitochondriale intervenant dans la synthèse de l'hème) et dans le promoteur de gènes impliqués dans la réplication de la transcription de l'ADN mitochondrial (pour revue : Garesse et Vallejo, 2001). Par son large rôle de régulateur transcriptionnel, NRF1 est un élément majeur des processus de biogénèse mitochondriale.

- GABP/NRF2 : ce facteur se fixe sous forme de tétramère sur le promoteur de plusieurs sous-unités de la cytochrome c oxydase et régule ainsi leur transcription (Scarpulla, 2002).

Les facteurs NRF1 et NRF2 régulent en aval deux facteurs impliqués dans la réplication et la transcription mitochondriale : TFAM et MRP, permettant ainsi une expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux afin d'assurer un fonctionnement mitochondrial correct.

En plus de ces facteurs, de nombreux coactivateurs interviennent dans ce dialogue du noyau vers la mitochondrie. Ainsi, par exemple, PGC-1 $\alpha$  (PPAR $\gamma$ -co-activator 1) est un important régulateur de la transcription des facteurs NRF1 et NRF2 et active également certains récepteurs hormonaux tels que le récepteur aux hormones thyroïdiennes ou aux glucocorticoïdes. C'est un facteur essentiel dans la régulation coordonnée du programme de biogénèse mitochondriale et du métabolisme cellulaire (néoglucogénèse lors du jeûne par exemple).

Ainsi, de nombreux facteurs coordonnent l'expression des gènes codés par les deux génomes (nucléaires et mitochondriaux) afin de permettre un assemblage fonctionnel des protéines de la chaîne respiratoire. Cependant, la voie de communication entre le noyau et la mitochondrie n'est pas à sens unique et lors de dysfonctionnements mitochondriaux, un dialogue rétrograde peut être mis en place.

La signalisation rétrograde mitochondriale est une voie de communication initiée par la mitochondrie vers le noyau influençant de nombreuses fonctions cellulaires dans les conditions physiologiques et pathologiques (Butow et Avadhani, 2004). Il s'agit d'un processus adaptatif qui permet d'ajuster le métabolisme cellulaire lors de changements du statut fonctionnel de la mitochondrie. Il a été particulièrement étudié chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où différentes études ont permis d'établir un modèle de régulation impliquant les protéines RTG. La voie rétrograde la plus étudiée fait intervenir le gène CIT2 codant pour une citrate synthase peroxysomale dont l'expression est augmentée 50 à 60 fois suite à un dysfonctionnement mitochondrial (Liao, X. S. *et al.*, 1991). Trois régulateurs positifs (Rtg1p, Rtg2p et Rtg3p, Liao, X. et Butow, 1993) et quatre régulateurs négatifs de cette voie (Mks1 : Dilova *et al.*, 2002, Lst8p : Liu *et al.*, 2001, Bmh1p et Bmh2p : Liu *et al.*, 2003) ont été identifiés par la suite. Brièvement, quand la voie RTG est inactive, Rtg1p et Rtg3p phosphorylé sont séquestrés dans le cytoplasme. Lorsqu'il est activé, Rtg3p est déphosphorylé sous le contrôle de Rtg2p et entre dans le noyau avec Rtg1p où ils s'assemblent sur le promoteur de gènes cibles au niveau d'un site appelé R box (Butow et Avadhani, 2004). Une signalisation mitochondriale a également été mise en évidence dans les cellules de mammifères grâce à l'utilisation des cellules  $\rho^0$  déplétées en ADN mitochondrial. En effet, plusieurs études (Marusich *et al.*, 1997, Wang, H. et Morais, 1997) ont montré que ce modèle présentait une augmentation de la quantité d'ARNm codant pour différentes protéines mitochondriales. Le dialogue rétrograde dans les cellules de mammifères a été initialement décrit dans les rhabdomyoblastes C2C12 (Biswas *et al.*, 1999) puis dans les cellules de cancer du poumon A549 (Amuthan *et al.*, 2002). Ainsi, dans ces études, un stress mitochondrial est généré (soit par dissipation du gradient de protons par le découplant FCCP et la valinomycine, soit par inhibition du fonctionnement de la chaîne respiratoire par ajout d'antimycine ou d'azide soit par déplétion partielle de l'ADN mitochondrial par traitement avec le bromure d'éthidium). Les auteurs montrent que ces traitements induisent une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium et une augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans la signalisation par le calcium telles que le récepteur de la ryanodine du réticulum sarcoplasmique ou la



calcineurine. L'expression de facteurs de transcription tels que NFATc et ATF2 ainsi que l'expression du gène codant pour la sous-unité Vb de la cytochrome c oxydase sont également stimulées (Biswas *et al.*, 1999). Lorsqu'ils utilisent des cellules  $\rho^0$  ayant subi une réversion, c'est-à-dire ayant retrouvé un taux d'ADN mitochondrial à peu près similaire à celui des cellules contrôles, les augmentations d'expression ne sont plus retrouvées. Ces adaptations ont donc bien été mises en place suite au stress appliqué à la mitochondrie. Une diminution de la quantité d'ADN mitochondrial de 20 à 25% étant suffisante pour activer cette voie, l'étude de son implication dans différentes pathologies semble être importante.

D'autres médiateurs ont été proposés pour la mise en place de ce dialogue rétrograde et le rôle des EORs a été notamment étudié par Poyton et McEwen (1996). Ainsi, les auteurs décrivent une augmentation de la production d'EORs suite à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale, ces EORs pouvant par la suite servir de seconds messagers et aller activer différents facteurs de transcription, une telle activation a déjà été décrite pour le facteur NF $\kappa$ B. Les EORs causent en effet la dissociation du dimère formé par NF $\kappa$ B et son inhibiteur I $\kappa$ B. Deux protéines NF $\kappa$ B actives s'organisent alors en dimères et migrent dans le noyau. Les dimères se fixent ensuite sur le promoteur des gènes cibles et activent leur transcription (Baeuerle et Henkel, 1994). De même, Suzuki *et al.* (1998) ont traité des fibroblastes humains par un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire (antimycine) et montrent que le taux de transcrits des gènes codant pour le cytochrome b et  $c_1$  augmente après 24 heures de traitement. Cette stimulation est corrélée à une augmentation de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> au bout de 3 heures dans ces cellules. Ainsi, les auteurs suggèrent que les cellules peuvent répondre à un dysfonctionnement modéré de la chaîne respiratoire en augmentant l'expression des gènes mitochondriaux et nucléaires probablement par un mécanisme impliquant les EORs.

Le monoxyde d'azote (NO) a également été évoqué comme médiateur du dialogue rétrograde (Nisoli et Carruba, 2006). Ainsi, la production de NO par les NOS synthase entraîne une inhibition de la chaîne respiratoire par inhibition compétitive de la cytochrome c oxydase (Cleeter *et al.*, 1994). D'un autre côté, le traitement de cellules par des donneurs de NO entraîne une augmentation de la biogénèse mitochondriale via une augmentation de la transcription d'un coactivateur clé de cette voie : PGC1 $\alpha$  (Kelly et Scarpulla, 2004). Ainsi, cette dualité dans le rôle du monoxyde d'azote en fait un candidat particulièrement intéressant pour l'initiation d'un dialogue mitochondrio-nucléaire.

La signalisation rétrograde active certains gènes marqueurs spécifiques des tumeurs tels que la cathepsine L (une protéase de la matrice extracellulaire), TGF $\beta$  et l'épiréguline (un ligand du récepteur de l'EGF). Cette signalisation induit également des changements dans la structure cellulaire et notamment la formation de structures ressemblant à des pseudopodes qui sont souvent retrouvées dans les tumeurs avec un fort pouvoir invasif. Ces données montrent que le dialogue rétrograde mitochondrie-noyau joue un rôle dans les modifications phénotypiques et dans la progression des cellules tumorales (Butow et Avadhani, 2004).

Si de nombreux médiateurs potentiels de cette signalisation mitochondriale ont été évoqués, le calcium semble jouer un rôle particulièrement important puisque ce second messager permet l'activation de la transcription de nombreux gènes, non seulement ceux impliqués dans la biogénèse mitochondriale mais également ceux jouant un rôle dans d'autres fonctions biologiques dont l'homéostasie calcique (Biswas *et al.*, 1999). De plus, le calcium joue un rôle particulièrement important dans la mitochondrie puisque, outre son rôle de réserve calcique, la mitochondrie possède également plusieurs enzymes dont l'activité est régulée directement ou indirectement par le calcium.

## C. Calcium et mitochondrie.

### 1. Microdomaines calciques mitochondriaux.

La mitochondrie des cellules de mammifères joue un rôle important dans le stockage et l'homéostasie du calcium. Le transport mitochondrial du calcium a été mis en évidence dans les années 1960. Les premières études ont conduit à un paradoxe, à savoir une forte accumulation de calcium dans les mitochondries isolées fonctionnelles associée à une faible affinité des systèmes mitochondriaux de captage du calcium (Dhalla, 1969). La séquestration de cet ion par les mitochondries ne paraissait donc pas possible dans des conditions physiologiques. Cette discordance apparente a cependant été résolue en partie grâce à la mise en évidence de microdomaines de forte concentration en calcium (Rizzuto *et al.*, 1998) qui fournissent ce dernier aux systèmes d'import de calcium qui seront décrits dans le paragraphe suivant. Ces microdomaines calciques semblent se former dans des zones où les mitochondries sont situées à proximité des lieux de relargage du calcium par le réticulum endoplasmique (Csordas *et al.*, 1999). Ces domaines de haute concentration calcique peuvent également être formés par couplage fonctionnel entre le système d'import mitochondrial et les canaux d'entrée du calcium de la membrane plasmique (Rizzuto *et al.*, 1999). Une autre hypothèse a été avancée pour expliquer ce paradoxe : l'import de calcium par les

mitochondries pourrait être modulé par des protéines solubles qui orientent le calcium vers la mitochondrie suite à une stimulation par un agoniste. Cette voie d'action a notamment été démontrée pour certains isoformes de PKC $\delta$  et  $\zeta$  (Pinton *et al.*, 2004) mais les mécanismes précis de ce mode de régulation n'ont pas encore été identifiés.

## **2. Transporteurs calciques mitochondriaux.**

L'accès du calcium cytosolique à la matrice nécessite le passage de deux membranes : la membrane externe et la membrane interne mitochondriale.

### *a. Passage de la membrane externe.*

La membrane externe mitochondriale contient des protéines qui forment de larges pores (les porines) tels que le canal sélectif des anions voltage-dépendant (VDAC). Une étude menée par Rapizzi *et al.*, en 2002 a montré que la surexpression de l'isoforme 1 de la protéine VDAC facilitait le transfert du calcium du réticulum endoplasmique vers la mitochondrie, montrant ainsi une corrélation entre le nombre de porines enchâssées dans la membrane et la séquestration mitochondriale de calcium. De plus, Szabadkai *et al.* (2006) ont démontré en 2006 que la protéine VDAC1 et la membrane externe étaient capables d'interagir avec le récepteur de l'IP<sub>3</sub> du réticulum endoplasmique (IP<sub>3</sub>R) ainsi qu'avec d'autres protéines chaperonnes pour former un complexe de jonction entre ces deux organelles facilitant ainsi le transfert du calcium.

Une fois la membrane externe traversée, les ions calcium s'accumulent dans l'espace intermembranaire. Compte tenu du caractère imperméable de la membrane interne, ces ions doivent emprunter différents systèmes de transports pour atteindre la matrice.

### *b. Mécanismes d'entrée du calcium dans la matrice mitochondriale.*

L'uniport calcique mitochondrial : Le potentiel membranaire mitochondrial négatif généré par la force protonmotrice conduit le calcium à entrer dans la mitochondrie par un transporteur électrogénique, l'uniport localisé dans la membrane interne mitochondriale. Ce transporteur possède un site d'activation ainsi qu'un site de transport (Gunter et Pfeiffer, 1990). La vitesse de transport du calcium requiert un certain seuil de concentration en calcium et en dessous de 200 à 300 nM, le calcium n'est pas transloqué dans la mitochondrie par ce mécanisme. Il transporte les cations avec différentes affinités, soit dans l'ordre décroissant d'affinité : Ca<sup>2+</sup>>Sr<sup>2+</sup>>Mn<sup>2+</sup>>Ba<sup>2+</sup>>Fe<sup>2+</sup>>La<sup>3+</sup> (Vainio *et al.*, 1970). Cet uniport peut être activé à de faibles concentrations en calcium par des concentrations physiologiques de polyamines telles

que la spermine (Nicchitta et Williamson, 1984) mais aussi par la taurine (Palmi *et al.*, 1999). Il est inhibé par les nucléotides triphosphates avec par ordre d'efficacité : ATP>CTP>UTP>GTP (Litsky et Pfeiffer, 1997). Les inhibiteurs pharmacologiques les plus utilisés pour étudier cet uniport sont le ruthénium red, un cation hexavalent qui se lie aux glycoprotéines et les ions lanthanides (Reed et Bygrave, 1974). Même si l'implication de cet uniport dans la séquestration du calcium a été clairement démontrée, les essais pour caractériser les protéines qui le composent sont restés assez infructueux. Une étude récente de Trenker *et al.*, (2007) a néanmoins montré que les protéines UCP2 et UCP3 jouent un rôle dans l'uniport. Ainsi, dans cette étude, les auteurs montrent que la surexpression d'UCP2 et UCP3 dans des cellules endothéliales et les lignées cellulaires HeLa, HEK293 et At20 entraîne une augmentation de la séquestration de calcium suite à la stimulation par l'IP<sub>3</sub>. L'effet inverse a été obtenu dans des cellules ayant été transfectées avec un siRNA dirigé contre UCP2 et UCP3. Pour conforter leur hypothèse, les auteurs ont montré que dans les cellules HeLa, qui n'expriment que l'isoforme 3 de la protéine UCP, l'expression artificielle d'UCP2 prévient la diminution de séquestration de calcium induite par l'inactivation d'UCP3. De plus, dans des souris dont le gène codant pour UCP2 a été inactivé, l'uniport calcique est absent. Enfin, leur dernier argument pour soutenir leur hypothèse concerne les possibles analogies entre les UCPs et l'uniport. Ainsi, ces deux protéines peuvent être activées par les acides gras et inhibées par les nucléotides (Esteves et Brand, 2005, Jezek, 1999, Jezek, 2002, Litsky et Pfeiffer, 1997). Cet uniport ne permet cependant pas à lui seul d'expliquer la totalité des mécanismes d'import du calcium dans la mitochondrie, notamment les situations où le calcium est capté très rapidement pendant les « pulses » calciques. Un autre mode d'import rapide a donc été décrit dans le foie, dans le cerveau et dans le cœur : le mode d'import rapide ou RaM (Gunter *et al.*, 2000).

Le RaM (Rapid Mode) : Sparagna *et al.* (1995) ont généré des « pulses » calciques qui s'apparentent à ceux retrouvés *in vivo* et ont mesuré l'incorporation du calcium dans les mitochondries isolées. Ils ont démontré que les mitochondries peuvent séquestrer le calcium très rapidement, pour une période courte. Ainsi, ce qui différencie le RaM de l'uniport, c'est la vitesse de captation du calcium qui s'effectue très rapidement au début du « pulse » pour le RaM. Pour ce dernier, l'import de calcium est inhibé très rapidement aussi, et après quelques secondes seulement, seul l'import par l'uniport est observé. L'hypothèse a donc été émise que le calcium induit par le « pulse » se lie sur un site externe et inhibe rapidement le RaM. En effet, des « pulses » de 350 nM de calcium pendant 1 à 10 secondes suffisent à inactiver le

RaM et une diminution de la concentration en calcium à 100 nM est nécessaire pour la dissociation du calcium sur le site et la réactivation du RaM. Ce mode rapide d'import de calcium est inhibé par les découplants mitochondriaux qui dissipent le gradient de proton suggérant que, comme l'uniport, le RaM se sert de la force protonmotrice pour fonctionner. De même, le ruthénium red inhibe le RaM dans les mêmes gammes de concentration que l'uniport. Aux vues de toutes ces similitudes entre les deux mécanismes d'import, la question de savoir si le RaM n'est pas seulement une conformation alternative de l'uniport peut être posée. La réponse n'est pas encore claire et seuls l'isolement, la purification, la caractérisation et le séquençage de cet uniport permettront de trancher réellement.

Mode d'entrée insensible au ruthénium red : Trenker et al (2007) grâce à l'utilisation de souris KO pour UCP2, ont mis en évidence un mode d'import du calcium insensible au ruthénium red. Ce mode a également été mis en évidence chez la levure par la même équipe. Cependant, il faut noter que de très fortes concentrations en ruthénium red réussissent à atténuer l'import de calcium par cette voie. La présence d'uniports modifiés pour expliquer ce phénomène n'est donc pas exclue.

### *c. Mécanismes de sortie du calcium hors de la mitochondrie.*

Efflux de calcium sodium-dépendant (NCE) : ce mécanisme est prédominant dans les mitochondries de cœur, de muscle squelettique et de cerveau. Cet échangeur sodium/calcium électrogénique, transporte 3 Na<sup>+</sup> pour 1 Ca<sup>2+</sup> et utilise la force protonmotrice pour fonctionner (Bernardi, 1999). Il existe de nombreux inhibiteurs pour ce transporteur : trifluoropipérazine (Hayat et Crompton, 1985), diltiazem (Rizzuto *et al.*, 1987), vérapamil (Wolkowicz *et al.*, 1983), clonazepam (Chiesi *et al.*, 1987) et amiloride (Jurkowitz *et al.*, 1983).

Efflux de calcium sodium-indépendant (NICE) : ce mécanisme est dominant dans le foie, le rein, le poumon et le muscle lisse. Il transporte les ions Ca<sup>2+</sup>, Sr<sup>2+</sup> ou Mn<sup>2+</sup> depuis la matrice vers l'espace intermembranaire contre le gradient électrochimique calcique. Ce transport est électroneutre mais il n'a pas été mis en évidence de cation spécifique susceptible d'être échangé ni d'anion cotransporté. C'est pour cela qu'il a souvent été caractérisé comme un échangeur actif Ca<sup>2+</sup>/2H<sup>+</sup> qui est saturé à très faible concentration en calcium et qui relargue le calcium extrêmement lentement (Bernardi, 1999). Peu d'inhibiteurs sont connus pour ce transporteur excepté le cyanure (Wingrove et Gunter, 1986) et de très fortes concentrations de ruthénium red (Wingrove et Gunter, 1986).

Le pore de transition de perméabilité (PTP) : le stress oxydant peut permuter le mode d'import de calcium d'un régulateur physiologique vers un signal de mort cellulaire. En effet, lors d'un stress oxydant ou d'une agression mitochondriale, la captation de calcium peut induire l'ouverture d'un large pore dans la membrane interne mitochondriale ; le pore de transition de perméabilité (Duchen, 2000). Ce pore est formé par l'association de différentes protéines concentrées au niveau des sites de contact entre la membrane externe et la membrane interne (cf. figure 8). Les protéines recensées clairement dans ce complexe sont la porine, l'ANT et la cyclophiline D. Les protéines pro apoptotiques Bid, Bax semblent également impliquées (Crompton, 1999). La forte augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ainsi que la déplétion en ATP, le stress oxydant et la forte concentration en phosphate inorganique ont été montrés pour activer l'ouverture de ce pore (Bernardi *et al.*, 1999). En effet, par exemple, le calcium en interagissant avec la cyclophiline D permet l'ouverture du PTP (Basso *et al.*, 2005). Ichas et Mazat (1998) ont identifié la possibilité d'ouverture transitoire du pore permettant le relargage du calcium, la dissipation temporaire du gradient de proton et la dépolarisation mitochondriale. Ces auteurs proposent que le passage d'un état d'ouverture transitoire du pore à un état totalement ouvert soit contrôlé par le calcium et que la liaison du calcium sur le PTP conduise au gonflement mitochondrial.

Les mécanismes d'influx et d'efflux du calcium semblent étroitement liés au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale puisqu'ils utilisent la force protonmotrice qu'elle génère. En retour, le calcium régule en de nombreux points la fonction mitochondriale.

### **3. Rôles du calcium dans le fonctionnement mitochondrial.**

Effets du calcium sur la morphologie mitochondriale : la morphologie et la motilité mitochondriale sont affectées par le calcium. Ainsi, une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium entraîne la translocation de la protéine Drp1 initiant la fission qui résulte en une fragmentation du réseau mitochondrial (Breckenridge *et al.*, 2003).

Effets du calcium sur le métabolisme mitochondrial : la signalisation calcique mitochondriale apparaît comme un élément fondamental dans le contrôle du métabolisme mitochondrial. En effet, cet ion peut moduler l'activité de différents enzymes importantes pour le fonctionnement mitochondrial. Ainsi, McCormack et Denton (1980) ont montré que 3 enzymes du cycle de Krebs pouvaient être activées par le calcium. En effet, la pyruvate déshydrogénase est activée par une étape de déphosphorylation calcium dépendante alors que

la NAD<sup>+</sup>-isocitrate deshydrogénase et la 2-cétoglutarate déshydrogénase sont, quant à elles, activées directement par le calcium. Une augmentation de la concentration matricielle en calcium stimule donc l'activité de ces trois deshydrogénases conduisant à une augmentation de la concentration en NADH qui sera utilisé par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP. Des composants directs du système de phosphorylation oxydative ont également été identifiés comme des cibles du calcium. C'est le cas de l'ATP synthase dans le cœur (Territo *et al.*, 2000), de l'ANT dans le foie (Moreno-Sanchez *et al.*, 1995) et du complexe III de la chaîne respiratoire (Murphy, A. N. *et al.*, 1990). Une régulation à long terme de la synthèse d'ATP mitochondriale par le calcium a été décrite par Jouaville *et al.* (1999). Ces auteurs montrent non seulement qu'une élévation temporaire de la concentration mitochondriale en calcium peut stimuler la production d'ATP mais également que cette stimulation dépend de la disponibilité en substrats et qu'elle perdure jusqu'à une heure après que l'augmentation transitoire de la concentration en calcium ait eu lieu. Les auteurs mettent donc en évidence un mécanisme de mémoire mitochondriale permettant à ces organites de répondre à une demande soutenue en ATP. En outre, Robb-Gaspers *et al.* (1998) ont montré que l'activation de la pyruvate deshydrogénase par le calcium était biphasique et comprenait une première phase d'activation concomitante à l'augmentation de calcium mitochondrial puis une seconde phase beaucoup plus longue. Ces observations laissent penser que la pyruvate deshydrogénase pourrait être un bon candidat pour expliquer le phénomène de mémoire mitochondriale. Jouaville *et al.* (1999) proposent une autre hypothèse pour expliquer ce phénomène et évoquent la possibilité d'activation (ou d'inhibition) calcium dépendante d'une des étapes de la phosphorylation oxydative ; c'est-à-dire que le calcium pourrait induire un changement conformationnel d'une enzyme, ce qui modifierait son activité à long terme. Un tel changement a été démontré dans les mitochondries de cœur où un facteur inhibiteur de l'ATP synthase existe sous forme de dimères. Sous l'influence du calcium, ce dimère se dissocie et ne peut plus inhiber l'ATP synthase, l'augmentation de la concentration mitochondriale en calcium induit donc une levée d'inhibition du fonctionnement de l'ATP synthase d'où une augmentation de la production d'ATP (Harris et Das, 1991). Enfin, le fonctionnement de la chaîne respiratoire est influencé par le volume matriciel. Or, Halestrap (1989) ayant montré que le calcium augmentait ce volume, un lien peut donc être établi dans ce sens entre le calcium et le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Le calcium régule également le fonctionnement de différents transporteurs de la membrane interne mitochondriale qui possèdent des sites de liaison du calcium. Les transporteurs calcium dépendants sont divisés en 2 groupes : les transporteurs aspartate/glutamate et les transporteurs ATP-Mg/Pi. Les

transporteurs « aralar » et « citrine » font partie de la famille des transporteurs aspartate/glutamate composant la navette malate/aspartate. Les transporteurs ATP-Mg/Pi, quant à eux, échangent l'ATP cytosolique contre le phosphate inorganique mitochondrial et sont impliqués dans la régulation du contenu mitochondrial en ATP suite à la stimulation par différentes hormones. Ces transporteurs sont des protéines intégrales de la membrane interne mitochondriale à 6 segments transmembranaires et possèdent tous un site de liaison au calcium situé sur la face externe de la membrane interne mitochondriale (Satrustegui *et al.*, 2007). Le calcium lié sur le transporteur stimule l'activité de ce dernier en favorisant la réaction de transport.

Le calcium est aussi un régulateur avéré de l'activité de différentes protéines kinases et phosphatases. Or, il existe de nombreuses protéines matricielles qui sont susceptibles d'être phosphorylées ou déphosphorylées par ces enzymes. Le calcium pourrait donc aussi réguler le métabolisme mitochondrial indirectement en favorisant l'état de phosphorylation de différentes protéines matricielles.

Effets du calcium sur le phosphoprotéome mitochondrial : Hopper *et al.* (2006) ont identifié par électrophorèse bidimensionnelle de nombreuses phosphoprotéines présentes dans la matrice de mitochondries de cœur de porc en réponse à une stimulation par le calcium. Le phosphoprotéome matriciel comprend des sous-unités de chacun des complexes de la chaîne respiratoire, de l'ATP synthase, des enzymes du cycle de Krebs, de la bêta oxydation des acides gras et du système antioxydant. Ainsi, le calcium module le métabolisme énergétique mitochondrial à tous les niveaux : approvisionnement en substrats par le cycle de Krebs et la bêta oxydation, fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, détoxification des EORs. Pour ce qui est de cette dernière fonction, l'impact du calcium est assez contradictoire selon les études. Certains auteurs rapportent qu'une séquestration excessive de calcium dans la mitochondrie stimule la production d'EORs (Rego et Oliveira, 2003, Reynolds et Hastings, 1995) alors que d'autres pensent que le calcium, en diminuant le potentiel membranaire mitochondrial, entraîne une diminution de la production d'EORs (Starkov *et al.*, 2002, Votyakova et Reynolds, 2001).

De manière réciproque, les EORs peuvent réguler l'homéostasie calcique, ces interactions pouvant à la fois moduler le signal calcique de manière physiologique mais aussi, dans certains cas, conduisant à l'apoptose.



Effets du calcium sur les mécanismes apoptotiques : la mitochondrie joue un rôle central dans l'induction ou l'amplification des processus menant à l'apoptose. Un des éléments clés de cette voie est le relargage du cytochrome c et de l'AIF (apoptosis inducing factor) dans l'espace intermembranaire (Kroemer *et al.*, 1995, Yang, J. *et al.*, 1997). Le cytochrome c ainsi relargué et l'AIF activent alors la caspase 3 soit directement soit indirectement. Le gonflement mitochondrial induit par l'ouverture du pore de transition de perméabilité suite à une surcharge calcique peut entraîner la « fuite » de molécules telles que le cytochrome c hors de la mitochondrie et déclencher ainsi l'apoptose. Le rôle du calcium dans l'ouverture du PTP et dans le déclenchement de l'apoptose est avéré mais les mécanismes qui gouvernent cette action restent encore à définir.

La mitochondrie n'est donc pas simplement l'usine énergétique de la cellule mais aussi un composant actif et finement régulé du métabolisme cellulaire capable d'adapter son fonctionnement à la variation de la demande en ATP non seulement par une modification directe de l'efficacité de conversion énergétique mitochondriale mais également par l'établissement d'un dialogue rétrograde vers le noyau aboutissant à des modifications de la quantité de protéines qui composent la chaîne respiratoire.

La mitochondrie a été montrée comme étant la cible de régulation par de nombreuses hormones parmi lesquelles les hormones glucocorticoïdes qui interviennent dans de nombreux processus cellulaires et métaboliques et aboutissent à la mise en place d'un état hypermétabolique au niveau corps entier. Les voies d'action des glucocorticoïdes sont complexes et requièrent la mise en place séquentielle et coordonnée de différentes voies de signalisation intracellulaire.

#### **IV. Les glucocorticoïdes : définition.**

##### **A. Synthèse des glucocorticoïdes.**

Les glucocorticoïdes sont synthétisés par le cortex surrénalien à partir du cholestérol. Ils sont ensuite sécrétés dans la circulation sanguine et transportés soit sous forme libre soit liés à une molécule d'albumine ou de transcortine également appelée CBG (corticosteroid-binding protein). La production de corticostéroïdes est influencée par l'apport alimentaire, le degré d'activité mais surtout la survenue d'un stress (Ramsey *et al.*, 2000). Elle est sous dépendance de l'axe hypothalamo-hypophysaire et suit un rythme circadien (production maximale le matin). Ainsi, l'hypothalamus secrète du CRF (corticotropin releasing factor) qui stimule la

sécrétion d'ACTH par l'hypophyse antérieure, cette hormone stimulant elle-même la production de corticostéroïdes par les glandes surrénales (Blum et Maser, 2003). Une fois libérés, les corticostéroïdes vont exercer un rétrocontrôle négatif sur leur propre sécrétion en inhibant la production de CRF et d'ACTH (cf. figure 9).

## B. Les 11 $\beta$ HSD.

Chez l'Homme, le cortisol (glucocorticoïde endogène) est le substrat de l'enzyme 11 $\beta$  hydroxystéroïde déshydrogénase (11 $\beta$ HSD). Ces enzymes appartiennent la famille des alcool deshydrogénases à courte chaîne. Elles possèdent quelques régions hautement conservées notamment un domaine d'ancrage responsable de leur localisation microsomiale, un domaine de liaison à différents cofacteurs et un domaine catalytique. Deux isoformes existent et sont responsables de l'interconversion du cortisol (forme active) et de la cortisone (forme inactive) (Krozowski 1999). La 11 $\beta$ HSD<sub>1</sub>, *in vivo*, agit surtout comme une réductase en transformant la cortisone inactive en cortisol actif alors que la 11 $\beta$ HSD<sub>2</sub> possède uniquement une activité deshydrogénase et inactive le cortisol en cortisone. Dans les tissus cibles, ces deux enzymes servent à contrôler finement la quantité de cortisol intracellulaire disponible (Tomlinson et Stewart, 2001, cf. figure 10). L'isoforme 11 $\beta$ HSD<sub>1</sub> est exprimée dans de nombreux tissus tels que le foie, le tissu adipeux, les gonades, les os, les muscles lisses et la peau. La 11 $\beta$ HSD<sub>2</sub> est présente surtout dans les épithéliums tels que le poumon et dans le placenta. Ces enzymes jouent un rôle clé dans la régulation de l'action des glucocorticoïdes et une dérégulation tissu-spécifique de leur activité a été associée au développement de pathologies telles que l'obésité (Desbrières *et al.*, 2006) ou l'hypertension (Hatakeyama *et al.*, 2001).

## C. Les glucocorticoïdes de synthèse.

Des formes synthétiques dérivant des glucocorticoïdes naturels ont été élaborées notamment afin d'augmenter leur durée d'action et leur spécificité. La 9 alpha-fluoro-11 bêta,17 alpha,21-trihydroxy-16 alpha-méthylprégna-1,4-diène-3,20-dione ou dexaméthasone (cf. figure 11) est couramment utilisée en clinique notamment pour ses propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Sa puissance d'action est environ 40 fois supérieure à celle du cortisol.

## V. **Les glucocorticoïdes : effets physiologiques.**

Les glucocorticoïdes interviennent dans le contrôle de nombreux processus physiologiques tels que les réactions inflammatoires et immunitaires, le maintien de l'homéostasie cellulaire et le métabolisme cellulaire.

## A. Rôle immunosuppresseur et anti-inflammatoire.

Les glucocorticoïdes affectent la production des molécules majeures responsables de l'inflammation (les prostaglandines) par trois voies distinctes. Tout d'abord, ils stimulent l'expression de l'annexine-1 dans les neutrophiles. Cette molécule, par son interaction avec la phospholipase  $A_{2\alpha}$  cytosolique, est capable d'inhiber la libération d'acide arachidonique et donc la production de prostaglandines notamment (Kamal *et al.*, 2005). Les glucocorticoïdes activent également la transcription de la MAPK phosphatase-1 (Morand, 2007), un inhibiteur de la Jun N-terminale kinase (JNK). Or, cette kinase est un médiateur important de la réponse inflammatoire, puisqu'une fois stimulée, elle active le facteur de transcription AP-1. Ce dernier se fixe alors sur les éléments de réponse AP-1 situés sur les promoteurs de gènes proinflammatoires et active leur transcription. Les glucocorticoïdes, en inhibant JNK-1 ont donc un rôle inhibiteur sur les gènes proinflammatoires (cytokines, collagénases, molécules d'adhésions, métalloprotéinases ...). Ce mécanisme d'inhibition est décrit comme le principal rôle anti-inflammatoire des hormones glucocorticoïdes (Barnes, 1998). Enfin, ces hormones bloquent à la fois l'activité transcriptionnelle du facteur NF $\kappa$ B et le rendent inactif par interaction protéine/protéine et empêchent ainsi la production de molécules proinflammatoires telles que les cytokines, les chémokines ou la cyclooxygénase 2, une enzyme indispensable pour la production de prostaglandines (cf. figure 12). Les glucocorticoïdes, à des doses physiologiques, ont également un rôle immunomodulateur en intervenant à la fois au niveau de la réponse immunitaire innée et des réponses immunitaires acquises cellulaires et humorales. En effet, les glucocorticoïdes inhibent l'activation des macrophages, la présentation de l'antigène, perturbent l'assemblage du récepteur à la surface des lymphocytes T (TCR) et induisent une réorientation de la réponse immunitaire en inhibant la réponse cellulaire au profit de la réponse humorale. Ces propriétés immunomodulatrices des glucocorticoïdes sont très utilisées en clinique pour le traitement des maladies auto-immunes.

## B. Contrôle de l'homéostasie cellulaire.

Les glucocorticoïdes jouent un rôle important dans la régulation du tonus des vaisseaux, de l'intégrité endothéliale et de la perméabilité capillaire, notamment au cours des situations de stress pour maintenir la vasoconstriction induite par les catécholamines (Yang, S. et Zhang, 2004). De plus, au niveau rénal, les glucocorticoïdes influencent l'équilibre hydrique en accroissant l'excrétion d'eau et en augmentant la rétention du sodium et l'excrétion potassique par levée d'inhibition de l'ADH.

## C. Rôle sur le métabolisme cellulaire.

La régulation du métabolisme énergétique cellulaire est sous la dépendance de nombreuses hormones (insuline, glucagon, hormones thyroïdiennes..) parmi lesquelles les glucocorticoïdes, responsables d'une augmentation de la consommation d'énergie corps entier et d'une élévation du métabolisme de base (Brillon *et al.*, 1995). Ces variations métaboliques induites par les glucocorticoïdes visent à maintenir un stock d'énergie suffisant en favorisant la néosynthèse de glucose dans le foie à partir de précurseurs non glucidiques (lipides, acides aminés ...). Ces hormones contrôlent donc les principales voies métaboliques, anaboliques et cataboliques, dans différents tissus de manière coordonnée.

### 1. Néoglucogénèse.

La néoglucogénèse est le processus de synthèse de glucose *de novo* à partir de précurseurs non glucidiques tels que le lactate, le pyruvate, l'alanine ou le glycérol qui se produit surtout dans le foie et de manière minoritaire au niveau rénal et intestinal. Cette voie métabolique, très importante pour le maintien de concentration plasmatique en glucose lors de situations de stress métabolique (le jeûne par exemple), est sous une forte dépendance hormonale. En effet, outre sa régulation par l'insuline ou le glucagon, elle est la cible des glucocorticoïdes qui exercent à la fois un effet direct et permissif sur cette voie (Jones *et al.*, 1993). Ce second effet se traduit par la modulation glucocorticoïdes-dépendante de la sensibilité hépatique au glucagon et aux catécholamines et par un approvisionnement accru de substrats issus de la protéolyse musculaire et de la lipolyse hépatique. Les effets directs des glucocorticoïdes sur la néoglucogénèse sont surtout des modifications de l'expression de gènes codant pour des enzymes clés de cette voie métabolique. Ainsi, les promoteurs de la phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK), l'enzyme responsable de la transformation de l'oxaloacétate en phosphoénolpyruvate, et de la glucose-6-phosphatase (G6Pase), la dernière enzyme de la voie qui hydrolyse le groupement phosphate du glucose-6-phosphate pour donner le glucose, contiennent une unité de réponse aux glucocorticoïdes (GRU) formée de deux sites de liaison à l'ADN pour le complexe hormone/récepteur aux glucocorticoïdes et des éléments de fixation pour différents cofacteurs (Cassuto *et al.*, 2005). La fixation du complexe glucocorticoïdes/récepteur sur le GRU entraîne une activation de la transcription des gènes codant pour ces enzymes et ainsi une augmentation de la néoglucogénèse. Cependant, le promoteur de la G6Pase contient également un élément négatif de réponse aux glucocorticoïdes (nGRE), qui sous l'effet des glucocorticoïdes inhibe la transcription du gène de la G6Pase (Vander Kooi *et al.*, 2005). La régulation de la néoglucogénèse par les

glucocorticoïdes n'obéit donc pas à la loi du tout ou rien mais constitue plutôt une réponse graduelle et finement régulée. En effet, la présence à la fois d'éléments activateurs et inhibiteurs de la transcription dans le promoteur des gènes de la néoglucogenèse permet ainsi une plus grande flexibilité et une meilleure régulation de la réponse. Les glucocorticoïdes ont également une action stimulatrice sur la pyruvate carboxylase, enzyme de la matrice mitochondriale à activité ligase responsable de la conversion du pyruvate en oxaloacétate et sur la fructose-1,6-bisphosphatase qui déphosphoryle le fructose-1-6 bis phosphate (Jones *et al.*, 1993). Ces deux enzymes sont régulées réciproquement avec deux enzymes de la glycolyse (pyruvate déshydrogénase et phosphofructokinase) et vont être activées ou inhibées selon la concentration en ATP.

En outre, les glucocorticoïdes régulent la glycogénolyse hépatique (Bollen *et al.*, 1998). Sous l'influence de stimuli hormonaux, le glycogène est stocké dans le foie et sert de réserve de glucose pour les autres tissus. Les enzymes du métabolisme du glycogène permettent au foie de détecter les variations de glucose sanguin et ainsi de mobiliser ou stocker le glycogène en fonction des besoins périphériques. Les hormones glucocorticoïdes inhibent la glycogène phosphorylase et activent la glycogène synthase favorisant ainsi le stockage hépatique du glycogène.

## **2. Protéolyse.**

L'effet catabolique des glucocorticoïdes est très marqué au niveau musculaire où ces hormones induisent une diminution de la synthèse protéique et une augmentation de leur dégradation (Tiao *et al.*, 1996), les acides aminés ainsi libérés pouvant alors servir de substrat à la néoglucogenèse hépatique (cf. figure 13). Deux voies principales de dégradation protéique sont décrites dans les cellules animales. La voie majoritaire est celle dépendante du protéasome, elle fait intervenir des enzymes spécifiques, les ubiquitines ligases qui ciblent les protéines pour la dégradation en les conjuguant à une chaîne de poly-ubiquitines. Les protéines ainsi marquées sont alors dégradées par le protéasome 26S qui les clive en petits polypeptides (Argiles *et al.*, 1999). Ce processus ATP dépendant est spécifique et étroitement régulé. Le calcium joue un rôle important dans cette voie car il peut activer des calpaïnes, des cystéine-protéinases intracellulaires capables de dégrader de nombreux substrats (enzymes, protéines de structure et de signalisation). La seconde voie est la dégradation protéique lysosomiale. Elle concerne plus particulièrement les protéines endocytées et membranaires et fait intervenir des enzymes protéolytiques, les cathepsines. Cette voie, peu spécifique, est surtout utilisée pour dégrader les protéines avec une durée de vie longue. Les

glucocorticoïdes ciblent surtout la voie protéasome dépendante en entraînant une augmentation de la transcription de l'ubiquitine et de gènes codant pour des sous-unités du protéasome (Auclair *et al.*, 1997). Cependant, les glucocorticoïdes ayant également un impact sur la concentration intracellulaire en calcium, l'hypothèse d'un rôle de ces hormones dans la protéolyse calcium dépendante a été émise (Hasselgren *et al.*, 2005).

### **3. Lipolyse.**

L'impact des glucocorticoïdes sur le métabolisme lipidique n'est pas clairement établi. En effet, certaines études montrent que les glucocorticoïdes augmentent la lipolyse par des effets directs (augmentation de l'activité de la lipoprotéine lipase) et des effets indirects (en facilitant l'effet lipolytique des catécholamines) dans le tissu adipeux (Pederson *et al.*, 2003). Les acides gras ainsi déstockés seraient alors transportés par voie sanguine jusqu'au foie où ils seraient catabolisés par la bêta-oxydation pour fournir de l'énergie et des équivalents réduits à la néoglucogénèse. L'excédent d'acetyl coA induit par l'augmentation de l'oxydation des acides gras pourrait alors servir de base à la formation de corps cétoniques (Fernandes-Figares, 2004). A l'inverse, d'autres auteurs décrivent une inhibition de la bêta-oxydation des acides gras à courtes chaînes et moyennes chaînes ainsi qu'une diminution de la sécrétion des lipides par les glucocorticoïdes (Letteron *et al.*, 1997, Dolinsky *et al.*, 2004), ces modifications pouvant être impliquées dans le développement de la stéatose hépatique.

Quelles que soient les modifications mises en évidence, les glucocorticoïdes semblent plutôt jouer un rôle plutôt indirect sur le métabolisme lipidique.

### **4. Insulinorésistance.**

Un taux trop élevé de glucocorticoïdes a été corrélé dans de nombreuses études au développement d'une résistance à l'insuline, précédant l'installation du diabète de type II. Plusieurs hypothèses ont été émises quant au mécanisme reliant les glucocorticoïdes et l'insulinorésistance, cependant, les résultats sont souvent discordants et paraissent tissu-dépendants. Il semble que les glucocorticoïdes exercent d'une part des effets inhibiteurs directs sur les kinases des cascades intracellulaires activées par le récepteur à l'insuline (PI 3-kinase et AKT surtout), entraînant ainsi une mauvaise propagation du signal insulinique (Lowenberg *et al.*, 2005) et d'autre part des effets indirects dus à l'augmentation de la néoglucogénèse hépatique qui induit ainsi une hyperglycémie. Cet effet hyperglycémiant des glucocorticoïdes est également un élément important de la programmation fœtale induite par ces hormones. En effet, le traitement par glucocorticoïdes durant la phase fœtale résulte chez

l'adulte en une activation permanente de l'expression de l'enzyme de la néoglucogénèse PEPCCK. La transcription de ce gène est sous dépendance de facteurs de transcription hépatiques de la famille HNF (Hepatic nuclear factor). Or, il existe plusieurs isoformes de HNF exprimées différemment au cours du développement. Ainsi, les isoformes fœtales HNF4A 7/8 laissent peu à peu la place aux HNF4A 1 et 2, les formes retrouvées chez l'adulte. L'exposition fœtale aux glucocorticoïdes entraîne un changement précoce des isoformes fœtales vers celles adultes entraînant ainsi une augmentation de l'expression du gène PEPCCK (Nyirenda *et al.*, 2006).

## **VI. Les glucocorticoïdes : voies d'action au niveau cellulaire.**

Les glucocorticoïdes font partie des hormones stéroïdes. Ces hormones liposolubles sont connus pour influencer la transcription de gènes cibles par une entrée du complexe hormone récepteur dans le noyau. Cependant, ces effets génomiques, nécessitant quelques heures pour se mettre en place ne permettent pas d'expliquer certains des effets des stéroïdes qui apparaissent dans les secondes suivant l'ajout de l'hormone. L'hypothèse d'effets rapides, non génomiques des stéroïdes a donc été évoquée pour expliquer ces effets à court terme (Brann *et al.*, 1995). Il est maintenant admis que les voies d'action cellulaires des stéroïdes sont multiples, tissus dépendantes et conduisent à des effets différents (cf. figure 14).

### **A. Effets génomiques des glucocorticoïdes.**

L'action génomique des glucocorticoïdes repose sur l'interaction entre le complexe récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes/hormone et des séquences spécifiques d'ADN contenues dans le promoteur des gènes cibles (cf. figure 15).

#### **1. Les mécanismes d'action.**

Lorsque le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) n'est pas lié à l'hormone, il réside dans le cytosol sous forme d'un complexe avec les protéines chaperonnes HSP90, HSP70 et des immunophilines telles que FKBP51 (Grad et Picard, 2007). La fixation du ligand sur le site de reconnaissance à l'hormone induit des changements conformationnels du récepteur permettant la dissociation des chaperonnes et dévoilant ainsi un signal de localisation nucléaire (NLS). Sous l'action de protéines de transport telles que le facteur ATP-stimulated translocation promoter (ASTP), (Isohashi et Okamoto, 1993), le complexe hormone/GR est transloqué dans le noyau de la cellule. Les récepteurs, alors regroupés en dimères, peuvent se fixer sur des

régions cis-régulatrices spécifiques (appelées Glucocorticoid Response Element : GRE) situées dans le promoteur des gènes cibles. Le recrutement de coactivateurs, chargés de faire le lien entre le complexe GR lié à l'ADN et les facteurs généraux de transcription, permet l'activation de la transcription des gènes concernés. De nombreux coactivateurs ont été identifiés à ce jour parmi lesquels le facteur SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1, interagissant avec le domaine de liaison du ligand), les facteurs CBP (des protéines qui lient le facteur CREB se fixant sur les éléments de réponse à l'AMPc des gènes cibles, Kamei *et al.*, 1996) ou encore la protéine p300. Ces trois protéines possèdent une activité histone acétyltransférase facilitant l'accès de l'ADN à la machinerie de transcription en décompactant la chromatine (Bannister et Kouzarides, 1996, Ogryzko *et al.*, 1996, Spencer *et al.*, 1997). Il existe également certains gènes dont l'expression est au contraire réprimée par les glucocorticoïdes. Deux mécanismes ont été évoqués pour médier cette répression (Meyer *et al.*, 1997) :

- la liaison du GR sur un nGRE (negative Glucocorticoid Response Element) entraînant le déplacement de liaison à l'ADN de facteurs de transcription actifs par des facteurs de transcription inactifs.

- l'interaction protéine-protéine du GR avec d'autres facteurs de transcription tels que le facteur général de transcription AP-1 (Activated Protein-1), NFκB (Nuclear Factor κB), Smad (Sma and Mad-related Protein) et STAT (Signal Transduction and Activator of Transcription). L'effet anti-inflammatoire des glucocorticoïdes médié par NFκB décrit dans le paragraphe IIA passe surtout par cette voie.

## **2. Le récepteur aux glucocorticoïdes (GR).**

L'ADNc codant pour le GR humain a été cloné pour la première fois en 1985 par Weinberger *et al.* puis identifié ensuite sur le chromosome 5q31-32 (Zhou et Cidlowski, 2005). L'épissage alternatif des transcrits codant pour le GR permet de générer deux isoformes du GR possédant des caractéristiques différentes (Falkenstein *et al.*, 2000) :

- le GRα composé de 777 acides aminés est responsable des effets génomiques classiques des glucocorticoïdes décrits ci-dessus. Il comprend 10 exons qui s'étendent sur 110 kb. Deux motifs en doigt de zinc, codés par les exons 3 et 4, sont impliqués dans la liaison à l'ADN. Deux domaines transactivateurs (AF1 et AF2) sont codés respectivement par les exons 2 et les exons 5, 6, 7, 8 et 9α ou 9β. Les 5 exons codant pour le domaine AF2 comprennent également le domaine de liaison du ligand (LBD). Des sites de liaison à



différents facteurs de transcription ont été retrouvés dans le promoteur de GR $\alpha$  parmi lesquels les facteurs généraux de transcription AP-1, NF-1 (Zong *et al.*, 1990), AP-2 (Nobukuni *et al.*, 1995), Sp1 et les éléments de liaison de facteurs CREB (cAMP Responsive Element Binding Protein, (Zong *et al.*, 1990), YY1 (Ying-Yang 1, Breslin et Vedeckis, 1998) et NF $\kappa$ B (Garside *et al.*, 2004).

- le GR $\beta$  composé de 742 acides aminés diffère de GR $\alpha$  par ses 15 derniers acides aminés c-terminaux. Il ne lie pas les glucocorticoïdes (Hollenberg *et al.*, 1985) et ne module pas la transcription des gènes cibles des glucocorticoïdes (Giguere *et al.*, 1986). Cette isoforme a été associée au développement de résistance aux glucocorticoïdes dans diverses pathologies comme l'asthme ou la polyarthrite rhumatoïde (Chikanza, 2002, Goleva *et al.*, 2006).

D'autres formes tronquées du GR ont été retrouvées dans des cellules de myélome et ont été associées au développement de la résistance aux glucocorticoïdes de ces cellules (de Lange *et al.*, 1999, Sanchez-Vega *et al.*, 2006). Outre ces variations d'épissage, le GR peut subir des modifications post-traductionnelles qui vont moduler son activité (Zhou et Cidlowski, 2005). Ainsi, Bodwell *et al.* (1991) ont identifié 7 sites phosphorylés dans le GR de souris puis 5 sites phosphorylés ont été retrouvés par Ismaili et Garabedian (2004) dans le GR humain. Les principales kinases qui seraient impliquées dans ce phénomène sont les MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases), CDK (Cyclin-Dependent Kinases), GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase-3) et JNK (c-Jun N-terminal Kinase), (Itoh *et al.*, 2002). La phosphorylation du GR serait un processus dynamique en réponse à différents stimuli tels que la liaison du ligand, la phase du cycle cellulaire ou l'état physiologique des cellules (Zhou et Cidlowski, 2005). Une étude de Wang, Z. *et al.* (2002) montre que l'état de phosphorylation du récepteur influence sa localisation subcellulaire (cytosolique ou nucléaire) ainsi que son activité modulatrice de transcription génique. Cependant, ces données sont en discordance avec d'autres études antérieures (Mason et Housley, 1993, Webster *et al.*, 1997, Yudit et Cidlowski, 2001) et l'importance de ces sites de phosphorylation dans l'activité du récepteur n'a pas encore été clairement déterminée.

Wallace et Cidlowski (2001) ont également identifié par bioinformatique des sites potentiels d'ubiquitination dans le GR. Ainsi, la séquence du GR contient un site PEST, reconnu par les enzymes E2 et E3 d'activation de l'ubiquitine (Rogers *et al.*, 1986). Ce site semble être important pour la dégradation du GR en se comportant probablement comme un site accepteur de l'ubiquitine, il reste cependant à déterminer si ce site est recruté *in vivo* lors de la

dégradation effective du GR. Le GR pourrait également subir des sumoylations, un processus proche de l'ubiquitination impliqué dans la régulation de certaines interactions protéines/protéines, de la stabilité protéique et de l'activité transcriptionnelle (Freiman et Tjian, 2003, Muller *et al.*, 2001, Wilson et Rangasamy, 2001). En effet, deux études de Le Drean *et al.* et Tian *et al.* (2002) montrent que le GR peut être sumoylé mais les effets de cette modification sur l'activité du GR montrés dans ces études sont contradictoires.

### **3. Le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR).**

Le récepteur aux minéralocorticoïdes fait partie de la famille des récepteurs aux stéroïdes, il est exprimé préférentiellement dans les épithélia du côlon et du néphron distal (Bastl *et al.*, 1992, Marver, 1984) et dans plusieurs régions du système nerveux central dont l'hippocampe (De Kloet *et al.*, 1998). Le MR possède de nombreuses homologues structurales et fonctionnelles avec le GR. L'aldostérone, minéralocorticoïde, se fixe avec une très forte affinité sur le MR et très faiblement sur le GR. Le cortisol, quant à lui, ligand du GR, peut également se lier au MR avec une affinité comparable voire supérieure à celle du GR. Le taux de cortisol circulant étant nettement supérieur à celui d'aldostérone, le MR pourrait être toujours occupé par les glucocorticoïdes. Il existe cependant un système de « protection » du MR puisque, dans les cellules épithéliales, la 11 $\beta$ HSD2 est exprimée (Krozowski *et al.*, 1999, Wright et Paine, 1995). Elle transforme ainsi le cortisol actif en cortisone inactive et empêche l'activation du MR par les glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes de synthèse, tels que la dexaméthasone possèdent une très forte affinité pour le GR et une très faible affinité pour le MR. Malgré des possibles interactions entre ces deux types de récepteurs, le GR apparaît comme le principal médiateur des effets génomiques des glucocorticoïdes. Grâce à ses nombreux sites de fixation pour des facteurs de transcription ainsi que ses probables modifications posttraductionnelles, le GR exerce des effets variés en fonction des tissus et de différentes conditions physiologiques. Cependant, les effets transcriptionnels des glucocorticoïdes ne permettent pas d'expliquer tous les phénomènes modulés par ces hormones notamment ceux qui se produisent quelques secondes seulement après l'ajout de l'hormone, il existe donc d'autres mécanismes régulateurs notamment des effets non génomiques, à court terme des glucocorticoïdes.

### **B. Effets non génomiques des glucocorticoïdes.**

Contrairement aux effets génomiques des glucocorticoïdes, les effets non génomiques sont caractérisés par une insensibilité aux inhibiteurs de la transcription (actinomycine D) ou de la

traduction et sont mis en place quelques secondes à quelques minutes après l'incubation avec l'hormone. Ces effets ont été très souvent reportés dans la littérature depuis les vingt dernières années, cependant, les mécanismes sous-tendant ces effets sont de différentes natures, mettant en relief l'hétérogénéité de l'action non génomique des glucocorticoïdes. Dans le but de clarifier ces différents effets, une classification a été établie lors du « First Meeting on Rapid Response to Steroid Hormone » à Mannheim en Allemagne en 1998 (Falkenstein *et al.*, 2000). Les effets rapides des stéroïdes ont été divisés en deux catégories :

- A : les effets directs où l'hormone exerce une action propre.
- B : les effets indirects où l'action rapide nécessite le partenariat de l'hormone avec un autre agoniste.

Chacune de ces deux catégories a alors été divisée en deux grands types d'effets :

- les effets non spécifiques dans lesquels aucun récepteur n'est impliqué, ce sont les propriétés physico-chimiques de l'hormone (liposolubilité par exemple) qui sont prises en compte.
- les effets spécifiques où une interaction spécifique ligand/récepteur est mise en jeu. Ces effets spécifiques sont eux-mêmes divisés en deux selon la nature du récepteur impliqué. Il s'agit soit du récepteur stéroïde nucléaire classique soit d'un autre type de récepteur (notamment couplé aux protéines G).

### **1. Les effets rapides, non spécifiques, des glucocorticoïdes.**

Ces effets apparaissent en quelques secondes après l'administration de fortes concentrations d'hormones et semblent résulter d'interactions directes entre les glucocorticoïdes et les membranes biologiques. Par exemple, la méthylprednisolone ainsi que d'autres glucocorticoïdes sont capables d'inhiber des courants cationiques à travers la membrane plasmique. Ainsi, ces hormones peuvent inhiber la réaction immunitaire aiguë en inhibant l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium dans les leucocytes (Buttgereit, 2000). Cependant, ces effets ne permettent pas d'expliquer la tissu-spécificité de l'action des glucocorticoïdes puisque ces hormones peuvent s'insérer dans n'importe quelle membrane biologique.

### **2. Les effets spécifiques rapides des glucocorticoïdes.**

Les récepteurs qui interviennent dans ces effets non génomiques spécifiques des glucocorticoïdes ne sont pas clairement élucidés et l'existence de récepteurs spécifiques pour médier ces effets non génomiques est toujours controversée.

### *a. Effets dépendants du GR intracellulaire classique.*

Certains effets des glucocorticoïdes sont caractérisés par leur insensibilité aux inhibiteurs de la transcription et de la traduction couplée avec une sensibilité aux antagonistes du GR montrant l'implication d'un mécanisme dépendant du GR (Stellato, 2004). Koukouritaki *et al.* (1996) ont montré qu'un tel mécanisme est impliqué dans l'inhibition de la polymérisation de l'actine G induite par 15 minutes de traitement par dexaméthasone (100 nM) dans des cellules d'endomètre humain. Ce mécanisme est inhibé par un antagoniste du GR (RU486) mais pas par un inhibiteur de la transcription (actinomycine D). Les auteurs démontrent également que cet effet est réversé par l'ajout de forskoline, une molécule qui stimule la production d'AMPc. La cascade proposée pour expliquer la diminution de polymérisation de l'actine G par la dexaméthasone implique donc la fixation de la dexaméthasone sur le GR, qui indépendamment de son action transcriptionnelle, diminue la quantité d'AMPc et inhibe ainsi la polymérisation de l'actine.

Un autre exemple de ce mécanisme est donné par Hafezi-Moghadam *et al.* (2002) qui montrent que le traitement de cellules endothéliales humaines avec de la dexaméthasone (100 nM) entraîne une augmentation de l'activité eNOS (NO synthase endothéliale) par un mécanisme non génomique mais dépendant du GR. Cet effet apparaît dès 10 minutes de traitement et augmente jusqu'à 30 à 60 minutes où il atteint un maximum et redescend à une valeur basale en environ 24 heures. Les inhibiteurs du GR (RU486), de la protéine Pi3K (Wortmaninn et LY294002) et de la eNOS (L-NAME) bloquent l'activation de eNOS par la dexaméthasone, alors que l'actinomycine D, est sans effet sur cette activation. Les kinases Akt et GSK-3, situées en aval de Pi3K sont également impliquées dans ce phénomène. Ainsi, la dexaméthasone via sa liaison sur le GR recrute la Pi3K par un mécanisme non identifié mais ne nécessitant pas d'activation de la transcription. La cascade de signalisation impliquant Akt et GSK-3 est alors mise en place et aboutit à la stimulation de l'activité de la eNOS. Il en va de même pour l'expression des récepteurs aux opsonines dans les éosinophiles qui est stimulée par les glucocorticoïdes. La voie d'action décrite par Ten Hove *et al.* (2006) pour expliquer ce phénomène est l'activation de la mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 (MKK2) par le complexe hormone/GR. Cette protéine phosphoryle et active la p38MAPK qui à son tour phosphoryle et augmente l'expression des récepteurs aux opsonines à la surface des éosinophiles. Ces exemples montrent qu'en plus de son action transcriptionnelle, le GR est impliqué dans des effets rapides non génomiques des

glucocorticoïdes. Les voies en aval du GR sont très variées et selon la protéine recrutée ou la voie de signalisation empruntée vont conduire à des effets très différents.

### *b. Effets dépendant d'un récepteur membranaire.*

Grâce à leur caractère liposoluble, les glucocorticoïdes diffusent librement au travers de la membrane plasmique et se fixent sur leurs récepteurs intracellulaires. Cependant, l'utilisation de composés stéroïdes couplés à l'albumine bovine (BSA) qui ne peuvent pas traverser la membrane a permis de mettre en évidence l'existence de récepteurs membranaires aux hormones stéroïdes, parmi lesquels des récepteurs qui lient les glucocorticoïdes. Si l'existence de ces sites est avérée, leur nature et leur rôle précis fait encore l'objet de controverses.

#### α. GR membranaire apparenté au GR cytosolique.

Au début des années 1990, plusieurs équipes ont identifié des sites de liaisons aux glucocorticoïdes sur la membrane plasmique d'hépatocytes de différentes espèces (rats : Allera et Wildt, 1992, Grote *et al.*, 1993, Howell *et al.*, 1989, Lackner *et al.*, 1998, Quelle *et al.*, 1988, Wright et Paine, 1995; souris : Trueba *et al.*, 1989 et cellules d'hépatome humain : Daufeldt *et al.*, 2003). Toutes ces études mettent en évidence une fixation des glucocorticoïdes sur la membrane plasmique, cependant la spécificité ainsi que la fonction de ce récepteur diffèrent selon les études. Ces sites membranaires de fixation aux glucocorticoïdes ont été trouvés dans d'autres tissus notamment dans l'utérus où une première étude de Giannopoulos *et al.* (1983) évoquait cette hypothèse confirmée par Sun *et al.* (1996). Plusieurs études ont également porté sur le GR membranaire (mGR) des cellules immunitaires notamment des lymphocytes dans lesquels Chen, F. *et al.* et Gametchu *et al.* (1999) ont mis en évidence à plusieurs reprises l'existence d'un tel récepteur. Gametchu *et al.* ont caractérisé plus précisément le mGR présent dans les lymphocytes. Grâce à l'utilisation d'anticorps dirigés contre le GR cytosolique (cGR), ils ont démontré que le site de fixation aux glucocorticoïdes situé sur la membrane plasmique des lymphocytes s'apparentait à un cGR modifié. Cependant, les analyses par western blot avec les anticorps anti cGR montrent que le mGR possède plusieurs isoformes dont certaines ont un poids moléculaire beaucoup plus haut que le GR cytosolique. Les auteurs retrouvent de nombreuses homologues entre le cGR et le mGR puisqu'un élément de liaison à l'ADN identique à celui du cGR est présent dans la séquence du mGR (Gametchu *et al.*, 1991) et qu'un site potentiel de phosphorylation a été retrouvé dans la forme membranaire du GR. De même, le mGR peut interagir avec différentes protéines chaperonnes du cGR telles que HSP70 et HSP90 (Powell *et al.*, 1999). Cependant,

l'importance et le rôle de ces caractéristiques dans la fonction du mGR restent à déterminer. La spécificité de ligand du mGR est, en revanche, plus large que celle du cGR, notamment en ce qui concerne la progestérone qui est liée par le mGR avec plus d'affinité que la dexaméthasone. La fonction du mGR est encore peu connue même si la présence du mGR a pu être corrélée dans les lymphocytes à une augmentation de la sensibilité à l'apoptose induite par les glucocorticoïdes.

#### β. GR membranaire différent du GR cytosolique.

L'expression du mGR au niveau du système nerveux central a également fait l'objet de nombreuses études (French-Mullen, 1995, Han *et al.*, 2002, Iwasaki *et al.*, 1997, Lou et Chen, 1998, Qiu *et al.*, 1998). Dans ces études, les effets rapides des glucocorticoïdes observés ont été reliés à l'activation de récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Ainsi l'inhibition de l'activité des protéines G (par utilisation d'un analogue non métabolisable du GTP, le GTP- $\gamma$ -S ou la toxine pertussique) entraîne une disparition de certains effets rapides des glucocorticoïdes (inhibition des canaux calciques activés par le voltage) dans les neurones de l'hippocampe, de la racine dorsale des ganglions et dans les cellules de phéochromocytomes PC12. Le type de protéine G couplée au RCPG varie selon le type cellulaire et peut avoir une action stimulatrice (protéine Gs) ou inhibitrice (protéine Gi).

Une autre hypothèse a été émise par Allera et Wildt (1992) quant à la nature du site de fixation membranaire aux glucocorticoïdes. En effet, ces auteurs ont mis en évidence la présence d'un importeur de glucocorticoïdes sur la membrane plasmique des hépatocytes de rats. Ce complexe protéique serait chargé du transport des glucocorticoïdes bioactifs vers le cytosol. Sa spécificité est beaucoup plus large que celle du cGR puisque des stéroïdes non glucocorticoïdes tels que les estrogènes et la progestérone se lient sur l'importeur alors que ce ne sont pas des ligands du cGR. Ce complexe protéique semble par ailleurs être couplé à deux protéines G de 75 et 52 kDa.

Quel que soit le type de récepteur impliqué, la fixation de l'hormone glucocorticoïde sur la membrane plasmique entraîne l'activation de cascades de signalisation intracellulaire aboutissant, dans la majorité des cas décrits dans les publications, à la modulation des propriétés d'ouverture de canaux ioniques.

#### γ. Voies de signalisation activées par les glucocorticoïdes.

- **PKA** : la protéine kinase A (PKA) est une protéine cytoplasmique composée de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques. Elle fait partie de la cascade de

signalisation intracellulaire induite par la protéine Gs. En effet, la fixation de l'hormone sur un RCPG couplé à une protéine Gs permet l'activation de cette dernière. La sous-unité alpha activée recrute l'adenylate kinase qui catalyse l'hydrolyse de l'ATP en AMPc. L'AMPc ainsi formé se fixe sur les sous-unités régulatrices de la PKA et permet la libération des sous-unités catalytiques et leur activation. Les cibles de phosphorylation par la PKA sont nombreuses et incluent des enzymes de la glycolyse, de la lipolyse et de la néoglucogenèse. Cette protéine a été identifiée comme étant impliquée dans certains effets rapides des glucocorticoïdes. Ainsi, par exemple, la synthèse et la libération rétrograde des endocannabinoïdes induite par les glucocorticoïdes dans les neurones paraventriculaires sont régulées par la voie AMPc/PKA (Malcher-Lopes *et al.*, 2006). De même Han *et al.* (2005) ont montré que PKA participait à l'inhibition rapide de l'influx de calcium ATP dépendant induit par les glucocorticoïdes dans les cellules de neuroblastome.

- **PKC** : cette protéine fait partie de la cascade intracellulaire induite par la protéine Gq. L'activation de cette protéine permet le recrutement de la phospholipase C qui, en hydrolysant le phosphatidyl inositol bisphosphate (PIP<sub>2</sub>), va libérer la diacylglycérol (DAG) et l'inositol triphosphate (IP<sub>3</sub>). Le DAG est responsable de l'activation des protéines kinases C. La famille des protéines kinases C (PKC) est composée de multiples isoformes qui peuvent être divisées en trois sous-groupes :

- les PKC classiques :  $\alpha$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\gamma$

- les PKC nouvelles :  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ,  $\mu$

- les PKC atypiques :  $\zeta$ ,  $\lambda$

Cette classification est basée sur la nécessité de cofacteurs différents pour l'activation de protéines kinases et sur leur localisation tissulaire (Dekker et Parker, 1994). Ainsi, les isoformes conventionnelles de PKC peuvent être activées par le calcium alors que les nouvelles PKC et les PKC atypiques y sont insensibles. Les PKC peuvent jouer un rôle dans la régulation des fonctions membranaires comme la régulation négative de récepteurs, la modulation de canaux ioniques ainsi que l'hydrolyse des phospholipides générant des seconds messagers lipidiques (Harvey *et al.*, 2002). Une étude de Kajita *et al.* (2001) démontre que les isoformes conventionnelles et atypiques de PKC sont impliquées dans la résistance à l'insuline induite par la dexaméthasone dans des adipocytes en culture. En effet, le traitement par dexaméthasone induit une relocalisation de PKC du cytosol vers la membrane plasmique de ces cellules. La protéine PKC membranaire ainsi activée phosphoryle le substrat du récepteur à l'insuline (IRS1) sur les résidus sérine et thréonine et inhibe son activité (Bossenmaier *et al.*, 1997). De même, l'inhibition de la réabsorption du phosphate au niveau

des tubules rénaux proximaux de lapin induite par les glucocorticoïdes implique l'activation de la phospholipase C et de PKC (Park *et al.*, 2001).

- **MAPK** : les protéines de cette famille sont un composant essentiel pour coordonner les signaux générés par de nombreux médiateurs intra- ou extracellulaires. La phosphorylation spécifique des MAPK permet la transmission du signal en aval et l'activation notamment d'autres protéines kinases, de facteurs de transcription ou de protéines du cytosquelette (Cobb *et al.*, 1996). Les glucocorticoïdes sont capables de causer l'activation rapide des MAPK (p38MAPK, JNK et ERK1) dans les neurones de l'hippocampe et les cellules de phéochromocytome PC12 via un mécanisme dépendant de PKC (Li, 2001). Une fois activées, les MAPK peuvent être transloquées dans le noyau et peuvent directement, ou indirectement, par l'intermédiaire d'autres protéines kinases, phosphoryler les facteurs de transcription, des coactivateurs ou des protéines nucléosomales et influencer ainsi l'accessibilité de la chromatine pour le complexe d'initiation de la transcription (Hazzalin et Mahadevan, 2002). L'activation des MAPK par les glucocorticoïdes est un mécanisme non génomique mis en place rapidement, indépendamment du cGR. Cependant, une fois activée, cette protéine peut agir sur la transcription des gènes cibles. La protéine MAPK semble donc au carrefour entre les actions non génomiques et génomiques des glucocorticoïdes, phénomène défini par Chen, Y. Z. et Qiu (2001) comme une conséquence génomique d'effets non génomiques des glucocorticoïdes. Ce concept d'intrication des voies génomiques et non génomiques est retrouvé dans différents modèles.

### C. Interactions entre le récepteur membranaire aux glucocorticoïdes et les effets génomiques.

Des interactions entre les effets non génomiques et génomiques ont été décrites pour de nombreux types de stéroïdes tels que les œstrogènes, la progestérone, la vitamine D et les glucocorticoïdes. Ces observations ont donné naissance au concept de MISS (Membrane-Initiated Steroid Signaling, cf. figure 16). En ce qui concerne les glucocorticoïdes, ce phénomène a été étudié surtout par Daufeldt *et al.* (2003) sur des hépatocytes de rats. Dans ce modèle, les auteurs émettent l'hypothèse que le site de fixation aux glucocorticoïdes situé sur la membrane plasmique sert d'importeur aux glucocorticoïdes (et à d'autres hormones stéroïdes qui ne se fixent pas sur le cGR). Une fois cet import achevé, le cGR serait alors recruté et transloqué dans le noyau (avec ou sans ligand) pour activer la transcription des gènes cibles. Cependant, ils n'excluent pas la possibilité qu'après fixation de l'hormone sur le



site membranaire, ce complexe hormone/importeur soit endocyté en entier et migre en connexion avec le cGR vers le noyau. Des questions subsistent quant à la séquence d'évènements liant la fixation des glucocorticoïdes sur la membrane et l'activation de la transcription, notamment le rôle de deux isoformes de protéines G de 52 et 75 kDa dont l'activité est modulée par les glucocorticoïdes. Les interactions effets génomiques/non génomiques des stéroïdes ont été surtout étudiées avec les œstrogènes. Ainsi Zhang, D. et Trudeau (2006) ont proposé un modèle d'interactions entre les voies d'action initiées par le récepteur membranaire aux œstrogènes (mER) et le récepteur nucléaire (nER). La fixation de l'hormone sur le récepteur membranaire est capable d'induire différents modules de signalisation dont les trois principaux sont Ras-Raf-MEK-MAPK (Driggers et Segars, 2002), Src-Pi3K-Akt-eNOS (Segars et Driggers, 2002) et PLC-PKC-AMPC-PKA (Malyala *et al.*, 2005). Après l'activation de ces différentes voies, des facteurs transcription tels que CREB ou AP-1 sont induits et vont activer la transcription de gènes cibles ne contenant pas nécessairement un site de fixation pour le nER. De plus, le mER exerce un effet modulateur sur le nER en interagissant directement avec ce dernier ou avec ses coactivateurs (Zhang, D. et Trudeau, 2006). Compte tenu de l'existence d'une forme membranaire du récepteur aux œstrogènes et aux glucocorticoïdes ainsi que des nombreuses similitudes entre les voies de signalisation activées par ces deux hormones, la mise en place d'un mécanisme identique à celui décrit par Zhang et Trudeau pour les œstrogènes en réponse aux glucocorticoïdes semble très probable.

Toutes ces voies d'actions des glucocorticoïdes (génomiques et non génomiques) concourent à réguler les grandes fonctions physiologiques décrites dans le paragraphe II. Parmi celles-ci, la régulation du métabolisme semble particulièrement importante puisque ces hormones sont responsables à la fois de l'établissement d'un état hypermétabolique particulièrement observé lors de situations pathologiques entraînant une élévation du taux circulant de glucocorticoïdes tels que le sepsis (Allary et Annane, 2005) ou la cachexie (Morley *et al.*, 2006) et de l'installation d'une insulino-résistance précédant le développement du diabète de type II (Qi et Rodrigues, 2007). Les glucocorticoïdes requièrent donc une augmentation des besoins énergétiques cellulaires (Kellendonk *et al.*, 2002). La mitochondrie, responsable de 90% de la production d'ATP dans les organismes eucaryotes apparaît donc comme une cible privilégiée des glucocorticoïdes.

## **VII. Les glucocorticoïdes : actions sur le métabolisme énergétique mitochondrial.**

L'impact du traitement par glucocorticoïdes a été étudié dans différents types cellulaires. Les résultats obtenus dans les différentes études montrent une variation du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale suite au traitement par glucocorticoïdes mais les effets de ces hormones sont soit stimulateurs soit inhibiteurs de la phosphorylation oxydative selon le tissu étudié, le temps et l'intensité du traitement.

### **A. Effets des glucocorticoïdes sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.**

#### **1. Rats traités par glucocorticoïdes.**

La fonction énergétique mitochondriale de rats traités par glucocorticoïdes a été très étudiée depuis les trente dernières années. La majorité de ces études a été réalisée sur le foie puisque cet organe est le siège de voies métaboliques très influencées par les glucocorticoïdes telles que la néoglucogénèse ou la synthèse des triglycérides. De plus, cet organe contribue à lui seul pour 20 à 30% de la dépense énergétique corps entier chez l'Homme (Ramsey *et al.*, 2000). Bien que divergentes sur les substrats utilisés ainsi que sur la durée de traitement, ces études rapportent une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative (Jani *et al.*, 1991, Kerppola, 1960, Kimberg *et al.*, 1968, Roussel *et al.*, 2003). Ainsi de précédents résultats obtenus dans notre équipe (Roussel *et al.*, 2003) montrent que l'injection de dexaméthasone (1,5 mg par kg et par jour) pendant 5 jours résulte en une augmentation de la fuite de protons d'environ 40% dans les mitochondries de foie. Une étude publiée récemment par Arvier *et al.* (2007) montre que, dans les mitochondries de ces rats traités par dexaméthasone, la quantité d'ANT est augmentée et émet l'hypothèse que ce phénomène participe à l'augmentation de la fuite de protons induite par les glucocorticoïdes.

L'effet découplant des glucocorticoïdes avait déjà été retrouvé dans les thymocytes par Buttgerit *et al.* (1994) où une analyse par top down de thymocytes traités par méthylprednisolone montre que les glucocorticoïdes inhibent fortement les réactions d'oxydation des substrats et augmentent la part de la fuite de protons. Dans cette étude, ils émettent l'hypothèse que ces effets sont non spécifiques et résultent de l'insertion des hormones dans la membrane plasmique perturbant ainsi les propriétés physicochimiques de cette dernière ainsi que l'activité des protéines qui y sont enchâssées. La diminution des

courants sodiques et calciques au travers de la membrane plasmique pourrait donc expliquer la moindre utilisation d'ATP pour maintenir les pompes ioniques et la concentration intracellulaire en calcium. De plus, des effets directs sur la membrane interne mitochondriale pourraient expliquer l'augmentation de la perméabilité aux protons et le découplage partiel de la phosphorylation oxydative qui en découle. Cependant, d'autres études sur des cellules d'hépatome traitées par dexaméthasone, montrent que les glucocorticoïdes possèdent également des effets spécifiques sur la mitochondrie en induisant la transcription de gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale. De même, des récepteurs aux glucocorticoïdes ont été localisés dans ces organites dans plusieurs types cellulaires et pourraient ainsi réguler la transcription des gènes du génome mitochondrial (Scheller et Sekeris, 2003).

## **2. Effets génomiques sur le fonctionnement de la mitochondrie.**

Plusieurs études, réalisées dans différents types cellulaires, ont montré que le traitement par glucocorticoïdes affecte l'expression de certains gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Ainsi, dans le côlon de rat, Rachamim *et al.* (1995) ont montré que la dexaméthasone induit une augmentation des transcrits des gènes mitochondriaux COXI, COXII et COXIII et du génome nucléaire COXIV. Van Itallie a publié en 1992 des travaux réalisés sur des cellules d'hépatome où il trouve que la dexaméthasone augmente de 3 à 4 fois la transcription du gène COXII codé par le génome mitochondrial mais pas celle du gène COXVa codé par le génome nucléaire. Weber *et al.* (2002) ont mené une étude en contradiction avec la précédente en montrant que l'effet de la dexaméthasone sur la transcription des gènes codant pour la chaîne respiratoire est spécifique au muscle squelettique et requière la participation du cGR. Le mécanisme par lequel se produit cette stimulation reste encore peu connu. Cependant, il est clairement établi que certains gènes de la chaîne respiratoire, codés par le génome mitochondrial, possèdent dans leur promoteur une séquence GRE (COXI, COXII et COXIII, Ioannou *et al.*, 1988). De plus, des sites de liaison pour les facteurs de biogénèse mitochondriale NRF-1 et NRF-2 ont été retrouvés dans le promoteur de certains gènes codant pour des sous-unités du complexe II, III, IV et de l'ATP synthase (Scheller et Sekeris, 2003). Pour les hormones thyroïdiennes, une telle stimulation de la transcription par l'intermédiaire de NRF-1 a été démontrée (Weitzel *et al.*, 2003), en revanche pour les glucocorticoïdes, aucune réponse précise n'a été apportée à ce jour.

## B. Présence de récepteurs aux glucocorticoïdes dans la mitochondrie.

Plusieurs études ont décrit la présence d'un récepteur aux glucocorticoïdes situé dans les mitochondries de différents types cellulaires (foie de rat : Demonacos *et al.*, 1993, cerveau de rat : Moutsatsou *et al.*, 2000, cellules de gliome de rat : Koufali *et al.*, 2003, cellules d'ostéosarcome, de cancer du col de l'utérus et d'hépatocarcinome humains : Psarra, A. M. *et al.*, 2005). Koufali *et al.* (2003) ont étudié la localisation dynamique du GR dans les différents compartiments intracellulaires de cellules de gliome de rat suite à la stimulation par la dexaméthasone. Dans des conditions basales, le GR est situé essentiellement dans le cytosol et le noyau et environ 10 % du contenu en GR des cellules est localisé dans les mitochondries. Suite à la stimulation par l'agoniste (dexaméthasone), il s'ensuit une diminution d'environ 50 % de la quantité de GR cytosolique. Ce phénomène est accompagné d'une augmentation similaire de la quantité de GR nucléaire montrant bien la translocation du récepteur suite à l'ajout de l'hormone, ce phénomène est observable après 3 minutes de traitement. Les GR contenus dans la mitochondrie effectuent aussi une migration vers le noyau suite à l'ajout de dexaméthasone mais ce phénomène est plus lent que la translocation cytosolique et demande environ 20 minutes. Les auteurs montrent également que ce phénomène nécessite d'avoir un environnement cellulaire intact puisque le traitement de mitochondries isolées par dexaméthasone n'entraîne pas une telle translocation. Ce phénomène de migration du GR de la mitochondrie vers le noyau ne semble pas s'accompagner de perturbations de la perméabilité membranaire mitochondriale. En revanche, ce phénomène induit des modifications de la transcription de gènes codés par le génome mitochondrial puisque le nombre de transcrits du gène COXI est augmenté suite au traitement par dexaméthasone. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un rôle répresseur de la transcription du GR lorsqu'il n'est pas lié à l'hormone. Une fois activé, sa translocation permettrait alors la transcription des gènes mitochondriaux contenant l'élément de réponse aux glucocorticoïdes. L'autre hypothèse pour expliquer cet effet serait que le GR existe à l'état inactif dans les mitochondries et qu'une fois activé, il puisse interagir avec le promoteur des gènes mitochondriaux. Cette augmentation de la transcription des gènes mitochondriaux s'accompagnerait d'une stimulation de la respiration à l'état 3 sur mitochondries isolées. Des études menées par Psarra *et al.* (2005 et 2006) sur les cellules d'ostéosarcome SaOS2 et d'hépatocarcinome HepG2 ont montré qu'en plus de sa localisation cytosolique et nucléaire, le GR $\alpha$  était présent dans les mitochondries de ces deux types cellulaires. Le GR $\beta$  n'est en revanche pas retrouvé dans cet organite. Dans ces études, les auteurs proposent plutôt une translocation du GR $\alpha$  dans la mitochondrie suite à la liaison de l'hormone et une activation de la transcription des gènes mitochondriaux après

fixation du complexe hormone/récepteur sur le promoteur de ces gènes. Les mécanismes seraient donc identiques à ceux employés dans le noyau avec fixation de facteurs de transcription servant de coactivateurs puisque des sites potentiels de fixation pour des facteurs généraux de transcription et d'autres intervenant dans les processus d'inflammation, de prolifération cellulaire ou de biogénèse mitochondriale ont été retrouvés dans le génome mitochondrial (Solakidi et Sekeris, 2003). De plus, les facteurs AP-1, CREB, NF- $\kappa$ B et p53 ont déjà été localisés dans la mitochondrie (Psarra, G. *et al.*, 2006). Les processus de régulation de la transcription nucléaire et mitochondriale de gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire suite au traitement par glucocorticoïdes sont coordonnés temporellement et spatialement. Ces résultats laissent en effet penser que la transcription des gènes codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire puisse être régulée directement par l'action des GR sur le génome nucléaire et mitochondrial et en parallèle par l'induction de facteurs de transcription mitochondriaux qui ne vont affecter que secondairement la transcription mitochondriale.

### ***VIII. Position de la problématique du travail de thèse.***

La mitochondrie, afin d'adapter son fonctionnement à la demande en énergie de la cellule, subit des ajustements fins. Ainsi, le gradient de protons est l'un de ces éléments régulés en fonction des besoins énergétiques cellulaires et de l'environnement hormonal. Mais ce paramètre est également initiateur de signaux conduisant la cellule à s'adapter à certains dysfonctionnements mitochondriaux. Nous avons donc choisi d'aller plus loin dans l'étude de cette dualité d'effets du gradient de protons, et pour cela, nous avons développé deux modèles :

- le découplage artificiel par dinitrophénol (DNP) permettant de déterminer les adaptations cellulaires découlant d'une dissipation du gradient de protons mitochondrial
- le traitement par les hormones glucocorticoïdes, un exemple de régulation hormonale du gradient de protons, afin d'étudier les mécanismes mis en jeu lors de ce phénomène.

La mesure des paramètres fonctionnels mitochondriaux (respiration cellulaire, mesure de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire), l'étude de la régulation transcriptionnelle des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire ainsi que la détermination des éléments clés de signalisation intracellulaire aboutissant à ces effets mitochondriaux ont permis ainsi de confirmer l'importance du gradient de protons dans la réponse cellulaire à un stress mitochondrial.

# **MATERIEL ET METHODES**

## ***I. Matériel biologique et réactifs.***

### **A. Cellules.**

*Cellules HepG2* : La lignée HepG2 a été obtenue à partir d'un hépatocarcinome humain (ATCC HB 8065). Elle est cultivée en milieu RPMI 1640 (PAA, Les Mureaux, France) supplémenté avec 10% de SVF (Institut de biotechnologies Jacques Boy, Reims, France), 1% de glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 0,25 µg/ml d'amphotéricine B (Institut de biotechnologies Jacques Boy, Reims, France). Les cellules sont cultivées dans des flasks de 25 ou 75 cm<sup>2</sup> et sont utilisées pour expériences lorsqu'elles atteignent environ 75 % de confluence.

*Cellules 143 B* : La lignée 143 B dérive d'un ostéosarcome humain (ATCC CRL 8303). Les cellules sont cultivées et utilisées dans les mêmes conditions que les cellules HepG2 excepté le milieu RPMI 1640 qui est remplacé par le DMEM F-12 (Institut de biotechnologies Jacques Boy, Reims, France).

*Cellules HepaRG* : La lignée cellulaire HepaRG a été établie à partir de cellules d'hépatocarcinome prélevées chez une patiente atteinte de l'hépatite C (Gripou *et al.*, 2002). Elle nous a été fournie par l'équipe INSERM U522 de Rennes (Madame Guguen-Guillouzo). Ces cellules sont pluripotentes et prolifèrent jusqu'à confluence, après quoi elles se différencient en hépatocytes et cellules biliaires. Elles sont cultivées en milieu de prolifération composé du milieu William's E (Gibco, Invitrogen, Paisley, Angleterre) supplémenté avec 10% de SVF (Fetaclone II, Hyclone, Perbio Science, Brebière, France), 1% de glutamine, 100U/ml de pénicilline et 100 µg/ml de streptomycine (PAA, Les Mureaux, France). 5µg/ml d'insuline de pancréas bovin et 50 nM d'hydrocortisone hemisuccinate (Sigma Aldrich, Lyon France) sont également ajoutés dans le milieu de culture. Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence (environ deux semaines), le milieu étant renouvelé tous les deux jours. Lorsque la confluence est atteinte, au milieu de prolifération est ajouté 2% de DMSO (milieu de différenciation afin de favoriser au maximum la différenciation de ces cellules). Ces cellules sont cultivées pendant quinze jours, et atteignent ainsi une différenciation optimale en s'organisant en hépatocytes, cellules et canaux biliaires.

## B. Réactifs pour incuber avec les cellules en culture.

### 2,4 Dinitrophenol (*Sigma Aldrich, Lyon France*).

Une solution à 50 mM est préparée en dissolvant 9,20 mg de 2,4 dinitrophenol dans 1 ml d'éthanol absolu. Cette solution est ensuite filtrée grâce à un filtre de 0,2 µm (Corning, Shiphol-Rijk, Pays-Bas) afin de la rendre stérile, elle se conserve pendant 1 mois à -20°C. Le jour de traitement, cette solution est diluée au 1/1000<sup>e</sup> dans le milieu de culture des cellules.

### Dexaméthasone-21-phosphate (*Merck, Lyon, France*).

La solution stock est fournie sous forme d'ampoules à 4 mg/ml soit 78 mM. Extemporément, 20 µl de cette solution sont ajoutés à 760 µl de PBS pour obtenir une concentration de 2 mM. Une dilution au ¼ puis au 1/1000<sup>e</sup> est effectuée dans le milieu de culture avant le traitement. La solution stock se conserve pendant 3 mois à 4°C.

### Dexaméthasone-hemisuccinate-BSA (*Steraloids, Rhode Island, Etats-Unis*).

Dix milligrammes de dexaméthasone-BSA sont dissous dans 308 µl de DMSO de manière à obtenir une solution à 500 µM qui se conserve en aliquots pendant 6 mois à -20°C. Le mélange est longuement vortexé jusqu'à dissolution complète de la poudre. Cette solution est diluée au 1/1000<sup>e</sup> dans le milieu de culture.

### Dexaméthasone-21-Mesylate (*Steraloids, Rhode Island, Etats-Unis*).

Une solution à 50 mM est préparée en dissolvant 12 mg dans 513 µl de DMSO. Elle peut être conservée pendant six mois à -20°C. Cette solution mère est ensuite diluée au 1/100<sup>e</sup> puis au 1/1000<sup>e</sup> dans le milieu de culture au moment du traitement des cellules.

### Mifépristone (*Sigma Aldrich, Lyon France*).

Afin d'inhiber de manière efficace le récepteur aux glucocorticoïdes, la mifépristone doit être dix fois plus concentrée que la dexaméthasone. Une solution de 5 mM de mifépristone est donc utilisée. Pour ce faire, 2 mg sont dissous dans 931 µl d'éthanol absolu. Cette solution est stable pendant 3 mois à -20°C. Au moment du traitement, la mifépristone est diluée au 1/1000<sup>e</sup> dans le milieu de culture.



Actinomycine D (Calbiochem, Merck chemicals, Nottingham, Angleterre).

Une solution mère à 5mg/ml est préparée en dissolvant 5 mg dans 1 ml de DMSO. La solution ainsi préparée est diluée au 1/5<sup>e</sup> afin d'obtenir la solution à 1 mg/ml utilisée pour le traitement des cellules. La solution mère peut être conservée en aliquots pendant 3 mois à -20°C.

In solution<sup>TM</sup> Bisindolylmaleimide I (Calbiochem, Merck chemicals, Nottingham, Angleterre).

La solution est fournie à une concentration de 1 mg/ml. Cette solution est diluée au 1/800<sup>e</sup> dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration finale de 3 µM. La solution commerciale de bisindolylmaleimide se conserve 6 mois à -20°C une fois aliquotée.

Protein kinase A inhibitor 14-22 amide (Calbiochem, Merck chemicals, Nottingham, Angleterre).

Deux milligrammes de cet inhibiteur sont repris 1,20 ml de milieu de culture. Cette solution est diluée au 1/10<sup>e</sup> (concentration de 50 µM) puis au 1/1000<sup>e</sup> dans la boîte de culture de manière à obtenir une concentration finale de 50 nM. La solution mère se conserve 3 mois à -20°C en aliquots.

U73122 (Calbiochem, Merck chemicals, Nottingham, Angleterre).

Cinq milligrammes sont dissous dans 1,09 ml d'éthanol absolu de manière à obtenir une concentration de 10 mM. Cinquante microlitres de cette solution sont dilués dans 950 µl d'éthanol absolu (concentration de 500 µM). La solution fille ainsi préparée est diluée au 1/1000<sup>e</sup> dans le milieu de culture au moment du traitement. La solution concentrée se conserve pendant 6 mois à -20°C.

GDPβS (Calbiochem, Merck chemicals, Nottingham, Angleterre).

Afin d'obtenir une solution à 20 mM, 10 mg de GDPβS sont dissous dans 1,05 ml de milieu, cette solution est stable 6 mois à -20°C en aliquots. Une dilution au 1/1000<sup>e</sup> dans le milieu de culture est effectuée juste avant le traitement.

SB202190 (Sigma Aldrich, Lyon France).

Une solution mère à 10 mM est préparée en dissolvant 3 mg de SB202190 dans 900 µl de DMSO puis est diluée au 1/1000<sup>e</sup> dans le milieu de culture servant à l'incubation de cet inhibiteur. La solution stock est stable pendant 6 mois lorsqu'elle est conservée à -20°C.

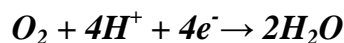
## **II. Mesure de la respiration cellulaire sur cellules entières non perméabilisées.**

### **A. Principe de la technique.**

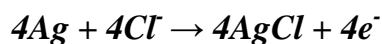
La respiration mitochondriale des cellules est mesurée par polarographie avec une électrode à oxygène type « Clark » (Rank Brothers Ltd, Cambridge, Angleterre) sur des cellules intactes utilisant leurs substrats endogènes et ceux contenus dans le milieu de culture pour respirer.

#### Principe de l'électrode de Clark :

Elle est constituée d'une cathode en platinium et d'une anode en argent. Lorsqu'une différence de potentiel de -0,6 V est appliquée, l'électrode de platinium se charge négativement par rapport à celle en argent et chaque molécule d'oxygène dissoute dans le milieu diffuse à travers la membrane de Téflon perméable aux gaz, et est réduite à la cathode selon la réaction suivante :



Une oxydation se produit de manière concomitante à l'anode :



L'équation bilan de la réaction peut donc se résumer sous la forme :



Le courant ainsi généré est proportionnel à la concentration en oxygène dissous.

Les résultats sont visualisés sur une table traçante sous forme de tracés de décroissance du courant en fonction du temps. La constante de saturation de l'oxygène (406 nmoles/ml) permet de transformer ces résultats en consommation en oxygène/minute.

La consommation d'oxygène peut être déterminée à différents états :

- **routine** : respiration basale de la cellule.
- **oligomycine** : respiration insensible à l'ajout d'oligomycine (inhibiteur de l'ATP synthase), il s'agit donc d'une respiration en conditions non phosphorylantes, qui n'est pas couplée à la synthèse d'ATP.
- **FCCP** : le gradient de protons est dissipé pas à pas par un protonophore (le FCCP). La respiration ainsi mesurée est contrôlée par le système d'oxydation et reflète donc la

capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire dans des conditions découplées.

La mesure de ces différents paramètres permet le calcul de deux rapports de contrôle respiratoire. Le RCR est le quotient de la capacité respiratoire maximale (FCCP) et de la respiration non couplée à la synthèse d'ATP (oligomycine). Il traduit la part de la capacité maximale de la chaîne respiratoire nécessaire pour compenser la fuite de protons. Le RCRp ou RCR phosphorylant est obtenu en soustrayant la respiration oligomycine de la respiration de routine et en divisant ce résultat par la respiration FCCP. Il représente la part de la capacité de la chaîne respiratoire utilisée pour synthétiser de l'ATP dans des conditions de fonctionnement normales de la chaîne.

$$RCR = \text{Oligomycine}/FCCP$$

$$RCRp = (\text{Routine} - \text{Oligomycine})/FCCP$$

## B. Réactifs.

### Milieu + 5% SVF + 2mM glutamine

Réactif	Concentration finale	Volume
Milieu de culture		94 ml
SVF	5%	5 ml
Glutamine à 200 mM	2 mM	1 ml

### Milieu + 2mM glutamine

Réactif	Concentration finale	Volume
Milieu de culture		99 ml
Glutamine à 200 mM	2 mM	1 ml

### Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Une solution à 6 mg/ml est préparée en dissolvant 3 mg d'oligomycine dans 500 µl d'éthanol absolu. Cette solution est stable pendant un mois à -20°C.

**FCCP** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Quatre milligrammes de mClCCP sont dissous dans 978  $\mu$ l d'éthanol absolu. La solution à 20 mM ainsi préparée est diluée au 1/10<sup>e</sup> dans l'éthanol absolu et peut être conservée pendant un mois à -20°C.

**Antimycine A** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Deux milligrammes d'antimycine A sont repris par 1 ml d'eau distillée. Cette solution à 2mg/ml est stable pendant un mois à -20°C.

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Une flask de 75 cm<sup>2</sup> à 75% de confluence (environ 30 millions de cellules) de cellules est trypsinée. Les cellules sont reprises par 10 ml de milieu + 5% SVF + 2mM glutamine. Un comptage cellulaire est effectué en triplicat sur cellule de Mallassez. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 900 rpm puis le culot cellulaire est repris par 10 ml de milieu + glutamine 2 mM. Un volume correspondant à 5 millions de cellules est prélevé et mis dans un tube à centrifuger. Le reste servira à faire des culots secs pour les manipulations pouvant être effectuées sur cellules congelées. L'aliquot de 5 millions de cellules est centrifugé pendant 5 minutes à 900 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est repris par 500  $\mu$ l de milieu + glutamine 2 mM.

### 2. Mesure de la respiration par polarographie.

Avant la première mesure, l'électrode est calibrée afin d'obtenir des valeurs de 100% et 0% d'oxygène. Pour le 100%, la consommation d'oxygène est mesurée sous agitation, cuve ouverte avec du milieu + glutamine. Lorsque le tracé est bien stable, le 100 % d'oxygène est réglé sur l'appareil. Le 0% oxygène est réalisé par l'ajout de 2mg de sulfite de sodium, un agent réducteur qui va peu à peu consommer l'oxygène contenu dans le milieu et donner la valeur du 0% d'oxygène. Après cet étalonnage, la cuve de mesure est rincée trois fois à l'eau distillée et les 500  $\mu$ l de suspension cellulaire préparée précédemment y sont introduits. Le bouchon est fixé sur la cuve et la consommation d'oxygène est mesurée. Lorsque la pente est régulière (environ 3 à 5 minutes), 1 $\mu$ l de la solution d'oligomycine à 6mg/ml est ajoutée. Un autre ajout d'1  $\mu$ l d'oligomycine permet de s'assurer que ce réactif est bien en concentration saturante. Ensuite, des ajouts successifs de 0,5  $\mu$ l de FCCP permettent d'effectuer une titration. En effet, il convient de déterminer la concentration optimale en FCCP nécessaire

pour stimuler de manière maximale la chaîne respiratoire. Au-delà d'une certaine concentration, le FCCP a un effet toxique sur les cellules et inhibe la respiration. Une fois cette concentration optimale dépassée (souvent après ajout de 600 à 800 nM), 2 µl d'antimycine A à 2 mg/ml sont ajoutés. Ce réactif est inhibiteur du complexe III permettant de mesurer la consommation d'oxygène qui n'est pas due à la chaîne respiratoire mitochondriale. La valeur de cette respiration en présence d'antimycine A sera retranchée à toutes les autres mesures afin d'exprimer spécifiquement la respiration mitochondriale.

### **3. Dosage de la concentration en protéines dans les échantillons.**

Après la mesure de la respiration en présence d'antimycine A, 400 µl de la suspension cellulaire sont prélevés dans la cuve et centrifugés pendant 5 minutes à 1500 rpm. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans 400 µl de NaCl. Un aliquot de 20 µl de cette solution est prélevé et ajouté à 80 µl de NaCl (dilution à 1/5<sup>e</sup>). Deux fois 30 µl de cette solution diluée sont prélevés et placés dans deux tubes à hémolyse. Une méthode colorimétrique utilisant l'acide bicinchoninique est utilisée pour doser les protéines dans ces échantillons.

Le principe de ce dosage est similaire à la méthode de Lowry et repose sur la formation d'ions  $\text{Cu}^+$  à partir d'ions  $\text{Cu}^{2+}$  par les liaisons peptidiques des protéines. Les ions  $\text{Cu}^+$  forment un complexe violet avec l'acide bicinchoninique en conditions alcalines, ce qui permet de suivre directement la réduction des ions  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$  par les protéines par lecture de l'absorbance à 562 nm en spectrophotométrie. La concentration protéique de l'échantillon est calculée à l'aide d'une courbe étalon obtenue avec des concentrations connues d'albumine bovine (0,25 et 0,50 mg/ml).

Pour chaque échantillon, 600 µl de mélange de solution A + B (1 volume de B pour 49 volumes de A) sont ajoutés aux 30 µl de suspension cellulaire diluée précédemment.

La solution A est composée d'acide bicinchoninique et la solution B contient du sulfate de cuivre. Pour la gamme étalon, deux tubes contenant 30 µl de solution d'albumine bovine à 0,25 mg/ml et 600 µl du mélange A + B et deux tubes avec 30 µl d'albumine bovine à 0,50 mg/ml et 600 µl de mélange A + B sont préparés. Les échantillons et la gamme sont mis à incuber pendant 30 minutes à 37°C puis sont transférés dans des microcuves à usage unique (*CML, Nemours, France*). Les cuves sont placées dans le spectrophotomètre (*Thermo Scientific, Perbio, Brebières, France*) et l'absorbance est lue à 562 nm.

La détermination de la concentration en protéines dans les échantillons permet d'exprimer les résultats de polarographie en nmoles d'O<sub>2</sub>/minutes/milligrammes de protéines.

### **III. Mesure du potentiel membranaire mitochondrial par cytométrie en flux.**

#### **A. Principe de la technique.**

Les cellules sont incubées en présence de DiOC<sub>6</sub>(3) (3, 3'-dihexiloxacarbocyanine iodide). Ce fluorochrome est un cation lipophile, sensible au voltage, qui s'accumule sélectivement dans les mitochondries lorsqu'il est utilisé à faible concentration. La fluorescence des cellules est lue par cytométrie en flux et les cellules mortes sont exclues par marquage à l'iodure de propidium. La fluorescence obtenue est proportionnelle au potentiel membranaire mitochondrial, plus ce dernier est élevé, plus la sonde va s'accumuler dans la mitochondrie.

#### **B. Réactifs.**

##### **Tampon PBS, 5% SVF, KCl 50 mM**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
PBS 1X		95 ml
SVF	5%	5 ml
KCl	50 mM	372,5 mg

##### **Sonde DiOC<sub>6</sub>(3) (Calbiochem, Nottingham, Angleterre).**

Cinquante milligrammes de sonde sont repris par 1 ml d'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 87,3 mM, cette solution peut être conservée trois à quatre mois à -20°C.

Le jour même, 2 µl de cette solution mère sont ajoutés à 2,18 ml de PBS, 5%SVF, KCl 50 mM, la concentration en DiOC<sub>6</sub> est alors de 80 µM. Une autre dilution au 1/800<sup>e</sup> dans le PBS, 5% SVF, KCl 50 mM est effectuée en début de manipulation de manière à obtenir une solution de DiOC<sub>6</sub> à 100 nM.

##### **Oligomycine (Sigma Aldrich, Lyon, France).**

Une solution mère d'oligomycine à 5 mg/ml est préparée en dissolvant 2,5 mg d'oligomycine dans 500 µl d'éthanol absolu. Cette solution est stable pendant un mois à -20°C.

En début de manipulation, cette solution mère est diluée au 1/500<sup>e</sup> dans le PBS, 5% SVF, KCl 50 mM.

**mCICCP** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Quatre milligrammes de mCICCP sont dissous dans 978 µl d'éthanol absolu. La solution à 20 mM ainsi préparée peut être conservée pendant un mois à -20°C.

Extemporaneément, cette solution mère est diluée au 1/100<sup>e</sup> dans le PBS, 5% SVF, KCl 50 mM pour donner une solution de mCICCP à 200 µM.

**Iodure de propidium** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Deux milligrammes d'iodure de propidium sont repris par 400 µl d'eau distillée. Cette solution à 5mg/ml est stable pendant six mois à -20°C. Une dilution au 1/10<sup>e</sup> dans de l'eau distillée est effectuée à chaque début de manipulation.

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Une flask de 25 cm<sup>2</sup> à 75% de confluence (environ 15 millions de cellules) de cellules HepG2 est trypsinée. Les cellules sont reprises par 10 ml de PBS, SVF 5%, KCl 50 mM. Le KCl utilisé dans ces expériences est nécessaire pour dépolariser la membrane plasmique et accentuer ainsi la spécificité du fluorochrome pour la mitochondrie. Un comptage cellulaire est effectué en triplicat sur cellule de Mallassez. Les cellules sont centrifugées pendant 5 minutes à 900 rpm puis le culot cellulaire est repris par 1ml/million de cellules de PBS, 5% SVF, KCl 50 mM.

Cent microlitres de cette suspension cellulaire (c'est-à-dire 0,1 million de cellules) sont déposés dans les puits d'une plaque 96 puits.

### 2. Incubation avec les réactifs.

Après dépôt des 100 µl de suspension cellulaire, la microplaque est centrifugée pendant 5 minutes à 1500 rpm. Le surnageant est éliminé par renversement de la microplaque. Le culot cellulaire est incubé en présence des réactifs selon les conditions suivantes :

#### a. *cellules seules* :

Les cellules sont incubées seulement en présence de 100 µl de PBS, 5% SVF, KCl 50 mM sans fluorochrome afin de détecter l'autofluorescence des cellules.

*b. cellules + DiOC<sub>6</sub> :*

Les cellules sont incubées en présence de 25 nM de DiOC<sub>6</sub> (25 µl de la solution à 100 nM) et 75 µl de PBS, 5% SVF, KCl 50 mM. Cette condition expérimentale a pour but de détecter spécifiquement la fluorescence de la sonde DiOC<sub>6</sub>.

*c. cellules + DiOC<sub>6</sub> + oligomycine :*

Les cellules sont incubées en présence de 25 nM de DiOC<sub>6</sub> et de 5 µg/ml d'oligomycine (50 µl de la solution à 10 µg/ml) qsp 100 µl de PBS, 5% SVF, KCl 50 mM. L'oligomycine permet d'inhiber l'ATP synthase et permet ainsi de détecter le potentiel membranaire mitochondrial nécessaire pour compenser la fuite de protons au travers de la membrane interne mitochondriale.

*d. cellules + DiOC<sub>6</sub> + mClCCP :*

Les cellules sont incubées en présence de 25 nM de DiOC<sub>6</sub> et de 10 µM de mClCCP (20 µl de la solution à 200 µM) qsp 100 µl de PBS, 5% SVF, KCl 50 mM. L'ajout du protonophore mClCCP permet de dissiper le gradient de protons de la membrane interne mitochondriale et donne ainsi un reflet de l'incorporation non spécifique du fluorochrome dans d'autres compartiments cellulaires.

La microplaque ainsi préparée est incubée pendant 30 minutes à 37°C. Elle est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 1500 rpm et le surnageant est éliminé par renversement. Deux rinçages par 100 µl de PBS, 5% SVF, KCl 50 mM sont effectués. La suspension cellulaire est transvasée dans des tubes de transfert (*Dominique Dutscher, Brumath, France*). Trois microlitres d'iodure de propidium à 0,5 mg/ml sont ajoutés dans chacun des tubes sauf ceux destinés à lire l'autofluorescence des cellules (condition cellules seules). Les tubes sont conservés dans l'obscurité et la fluorescence est lue immédiatement par cytométrie en flux (*FACScan, Becton-Dickinson, Le Pont-De-Claix, France*).

### **3. Lecture de la fluorescence par cytométrie en flux.**

Dans le tube contenant les cellules est placée une aiguille qui aspire la suspension cellulaire. Cette dernière traverse une source d'excitation lumineuse et diffracte la lumière selon plusieurs axes. La lumière diffractée dans l'axe (angle inférieur à 12°) est proportionnelle à la taille de la cellule (FSC : forward scatter). Celle qui est diffractée à 90° est un reflet du contenu cytoplasmique de la cellule (granulosité, SSC : Side scatter). Ces signaux optiques sont alors intégrés par le logiciel d'analyse (*Cell Quest Software.*) et un graphique de FSC en fonction de SSC est tracé où chaque cellule est représentée par un point.



La sonde DiOC<sub>6</sub> est excitée à une longueur d'onde de 488 nm par un laser argon et la fluorescence est collectée à 511 nm. L'intensité de fluorescence de chaque cellule est ensuite représentée en fonction de sa taille sur un graphique.

Un histogramme monoparamétrique de la fluorescence est ensuite réalisé et permet d'obtenir la fluorescence moyenne de chaque population de cellules.

La fluorescence de l'iodure de propidium est collectée à 610 nm et toutes les cellules mortes qui fluorescent à cette longueur d'onde sont écartées de l'étude.

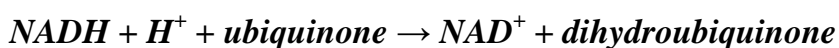
La fluorescence obtenue en présence de DiOC<sub>6</sub> + mClCCP est retranchée à celle du DiOC<sub>6</sub> seul ou de DiOC<sub>6</sub> + oligomycine. Les résultats obtenus sont alors un reflet du potentiel membranaire mitochondrial en conditions phosphorylantes (DiOC<sub>6</sub> seul) ou non phosphorylantes (DiOC<sub>6</sub> + oligomycine). En conditions non phosphorylantes, le gradient de protons est seulement utilisé pour compenser la fuite de protons, le potentiel membranaire mitochondrial est donc supérieur à celui obtenu en conditions phosphorylantes. La fluorescence en présence d'oligomycine doit donc être supérieure à celle en présence de DiOC<sub>6</sub> seul.

#### ***IV. Dosage de l'activité de la NADH ubiquinone réductase (complexe I) sur cellules.***

##### **A. Principe de la technique.**

La technique de mesure de l'activité du complexe I est adaptée à partir de celle décrite par Kuznetsov et Gnaiger (Mitochondrial Physiology Network 8.15 (2003)).

La réaction enzymatique catalysée par le complexe I est la suivante :



Lors de cette réaction, le NADH, qui absorbe la lumière à 340 nm, est oxydé en NAD<sup>+</sup>, un composé qui n'absorbe pas la lumière à cette longueur d'onde.

Lors de la mesure spectrophotométrique, la diminution d'absorbance du NADH à 340 nm est donc suivie et sera proportionnelle à l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire.

## B. Réactifs.

**Tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 7,4** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

**Ubiquinone-1** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Dix milligrammes d'ubiquinone-1 sont repris par 1 ml d'éthanol absolu et constituent une solution stock à 39,9 mM. Avant chaque expérience, 100  $\mu\text{l}$  de cette solution sont ajoutés à 1,398 ml d'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 2,5 mM. La solution stock est stable pendant un mois à  $-20^\circ\text{C}$  mais doit être protégée de la lumière.

**NADH** (*Roche, Rosny-sous-bois, France*).

Une solution à 15 mM de NADH doit être préparée extemporanément en dissolvant 11,5 mg de NADH dans 1ml d'eau distillée. La solution doit être conservée sur glace et protégée de la lumière.

**Azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ )** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Cet inhibiteur inhibe spécifiquement le complexe IV de la chaîne respiratoire. Soixante cinq milligrammes d'azide de sodium ( $\text{NaN}_3$ ) sont dissous dans 1 ml d'eau distillée. La solution à 1M ainsi préparée se conserve pendant 6 mois à  $-20^\circ\text{C}$  en aliquots.

**Roténone** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Cet inhibiteur est spécifique du complexe I. Une solution de roténone à 0,5 mM est préparée en reprenant 1,97 mg de roténone par 10 ml d'un mélange 50% éthanol/50% DMSO. Une fois aliquotée, cette solution peut être conservée pendant 1 mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

**Cyanure de potassium (KCN)** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Cet inhibiteur est spécifique du complexe IV de la chaîne respiratoire. Vingt-six milligrammes de cyanure de potassium sont dissous dans 800  $\mu\text{l}$  d'eau distillée pour obtenir une concentration de 0,5 M. La solution se conserve pendant un mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

**Tampon A (tampon de reprise des cellules)**

Ce tampon est commun au dosage de tous les complexes de la chaîne respiratoire.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Saccharose	250 mM	8,56 g
Tris base	20 mM	242,28 mg
EDTA	2 mM	58,45 mg
BSA	1 mg/ml	100 mg

qsp 100 ml d'eau distillée

pH 7,2 avec HCl 5 N

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Ce protocole est réalisé à partir de culots secs de cellules (au moins 2 millions de cellules) conservés à -80°C. Le culot, une fois décongelé, est repris par 50 µl par million de cellules de tampon A et placé pendant 3 minutes dans l'azote liquide. Le culot est ensuite rapidement décongelé au bain-marie à 37°C. Cette étape permet d'éclater les cellules. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes et le culot est repris par du tampon A (250 µl par million de cellules). Les cellules sont transvasées dans un tube Kimble en verre lui-même placé dans un bécher contenant de la glace. La sonde du sonicateur est introduite dans le tube jusqu'au centre du liquide en prenant garde à ne pas toucher les bords du tube. La suspension cellulaire est alors soumise à un cycle de sonication de 6 x 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque cycle afin de rendre le complexe I de la chaîne respiratoire plus accessible.

### 2. Mesure de l'activité du complexe I par spectrophotométrie.

Le dosage de l'activité du complexe I doit être réalisé juste après sonication des cellules.

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactif	Volume	Concentration finale
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM	815 µl	80 mM
Ubiquinone-1	40 µl	0,1 mM
Azide de sodium	2 µl	2 mM
KCN	2 µl	1 mM

Chaque dosage est effectué en duplicat. Ce mélange est incubé pendant 5 minutes à 37°C. Cent vingt-cinq microlitres de la suspension cellulaire (soit 0,5 million de cellules) sont

ajoutés puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 20 µl de NADH 15 mM. Le mélange est ensuite rapidement transvasé dans des microcuvettes à usage unique (*CML, Nemours, France*). Les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) thermostaté à 37°C et la cinétique de diminution de l'absorbance à 340 nm est suivie pendant 2 minutes. Sans stopper la lecture, 4 µl de roténone sont ajoutés dans chaque cuvette et après homogénéisation avec le cône, l'absorbance est suivie à nouveau pendant deux minutes. Au bout de ce temps, un nouvel ajout de 2 µl de roténone est effectué et la réaction est suivie pendant deux minutes. La lecture est ensuite arrêtée et les pentes de décroissance sont notées :

- la pente initiale avant l'ajout de roténone
- la pente après le premier ajout de roténone
- la pente après le second ajout de roténone

### 3. Calcul de l'activité du complexe I.

L'activité du complexe I est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS(\text{cell}) = \frac{\Delta DO(-R) - \Delta DO(+R)}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times S_{\text{n}}\text{NADH}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta DO(-R)$  : delta DO par minute mesurée avant addition de Roténone

$\Delta DO(+R)$  : delta DO par minute mesurée après une des additions de roténone en prenant l'inhibition la plus forte (delta DO la plus faible)

$l$  : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{\text{NADH}}$  : coefficient d'extinction du NADH à 340 nm et pH 7,4, en  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , soit 6,22

$S_{\text{n}}\text{NADH}$  : nombre stoechiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

$q_{\text{cellules}}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel soit : 0,5 million

Les résultats ainsi obtenus sont exprimés en nmoles/min/million de cellules.

## **V. Dosage de l'activité de la succinate ubiquinone réductase (complexe II) sur cellules.**

### **A. Principe de la technique.**

La technique de mesure de l'activité du complexe II est adaptée à partir de celle décrite par James *et al.* (Biochem J., 1996).

La réaction enzymatique catalysée par le complexe II est la suivante :



Lors de cette réaction, le succinate réduit l'ubiquinone en ubiquinol. Le dosage fait intervenir une seconde réaction impliquant un composé chimique de couleur bleue, le DCPIP (dichlorophenolindophenol) qui absorbe la lumière à 600 nm. Ce dernier va être réduit par l'ubiquinol-2 formé lors de la réaction précédente. Le DCPIP perd alors sa couleur bleue et n'absorbe plus de lumière. La réaction pour doser le complexe II va donc consister à suivre la diminution de l'absorbance du DCPIP à 600 nm, celle-ci étant proportionnelle à l'ubiquinol formé.

### **B. Réactifs.**

**Tampon  $KH_2PO_4$  100 mM, pH 7,5** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

1,36 g de  $KH_2PO_4$  sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,5 avec du KOH 5N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois à  $-20^\circ C$ .

**Ubiquinone-1** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Dix milligrammes d'ubiquinone-1 sont repris par 1 ml d'éthanol absolu et constituent une solution stock à 39,9 mM. Avant chaque expérience, 100  $\mu l$  de cette solution sont ajoutés à 1,398 ml d'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 2,5 mM. La solution stock est stable pendant un mois à  $-20^\circ C$  mais doit être protégée de la lumière.

**Acide succinique** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Une solution à 500 mM est préparée en dissolvant 29,5mg d'acide succinique d'abord dans 1 ml d'eau distillée puis, après ajustement du pH à 7 avec du KOH 5M, 1 ml d'eau distillée est ajouté. La solution se conserve en aliquots pendant 1 mois à  $-20^\circ C$ .

**EDTA** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Pour préparer la solution d'EDTA à 20 mM, 14,89 mg d'EDTA sont d'abord dissous dans 1 ml d'eau distillée puis le pH est ajusté à 7 avec du KOH 5M et enfin 1 ml d'eau distillée est ajouté pour compléter. La solution est stable pendant 6 mois à -20°C.

**Cyanure de potassium (KCN)** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Cet inhibiteur est spécifique du complexe IV. Une solution à 10 mM est préparée en reprenant 6,4 mg de cyanure de potassium par 10 ml d'eau distillée. Une fois aliquotée, cette solution peut être conservée pendant 1 mois à -20°C.

**Albumine bovine sans acides gras libres** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Deux cent cinquante milligrammes d'albumine bovine sont dilués dans 5 ml d'eau distillée. La solution à 50 mg/ml ainsi préparée est stable pendant 6 mois à -20°C.

**Dichlorophenolindophenol (DCPIP)** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Le jour même, 5,80 mg de DCPIP sont repris par 5 ml d'eau distillée et la solution à 4 mM est placée à 37°C jusqu'à utilisation.

**Triton X100** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Le triton est conservé à 4°C. La veille des manipulations, il est placé à température ambiante. Puis, une solution à 10% est préparée en diluant 1 ml de triton X100 dans 9 ml d'eau distillée. Ce réactif se conserve pendant 6 mois à -20°C.

**Antimycine A** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Il s'agit d'un inhibiteur du complexe III. Le contenu du flacon (10 mg) est dissous dans 1 ml d'éthanol absolu et peut être conservé pendant 1 mois à -20°C. Une solution diluée à 1mg/ml est préparée en prélevant 100 µl de cette solution mère et en les ajoutant à 900 µl d'éthanol absolu.

**Rotenone** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Ce réactif est un inhibiteur du complexe I. Deux milligrammes de rotenone sont repris par 2ml d'un mélange volume à volume d'éthanol absolu et DMSO. Cette solution à 2,5 mM se conserve 1 mois à -20°C en aliquots.

**Thénoltrifluoroacétone** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Une solution à 40 mM est préparée en dissolvant 8,8 mg de thénoltrifluoroacétone dans 1 ml d'éthanol absolu, elle peut être utilisée pendant 3 mois après stockage à -20°C.

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Ce protocole est réalisé à partir de culots secs de cellules (au moins 2 millions de cellules) conservés à -80°C. Le culot, une fois décongelé, est repris par 50 µl par million de cellules de tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I) et placé pendant 3 minutes dans l'azote liquide. Le culot est ensuite rapidement décongelé au bain marie à 37°C. Cette étape permet d'éclater les cellules. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes et le culot est repris par 50 µl de tampon A par million de cellules.

### 2. Mesure de l'activité du complexe II par spectrophotométrie.

Le dosage de l'activité du complexe II doit être réalisé juste après préparation des cellules.

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactif	Volume	Concentration finale
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM	500 µl	50 mM
Eau distillée	160 µl	
EDTA	5 µl	0,1 mM
Albumine bovine	20 µl	1 mg/ml
Cyanure de potassium	200 µl	2 mM
Roténone	4 µl	10 µM
Antimycine A	4 µl	2 µM
Acide succinique	40 µl	20 mM
DCPIP	16 µl	64 µM
Triton 10X	2 µl	0,02 %

Chaque dosage est effectué en duplicat. Ce mélange est incubé pendant 2 minutes à 37°C. Vingt cinq microlitres de la suspension cellulaire (soit 0,5 millions de cellules) sont ajoutés puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 20 µl d'ubiquinone-1 à 2,5 mM. Le mélange est

ensuite rapidement transvasé dans des microcuvettes à usage unique (*CML, Nemours, France*). Les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) thermostaté à 37°C et la cinétique de diminution de l'absorbance du DCPIP à 600 nm est suivie pendant 1 minute 30. Sans stopper la lecture, 5µl de thénoltrifluoroacétone sont ajoutés dans chaque cuvette et après homogénéisation avec le cône, l'absorbance est suivie à nouveau pendant 1 minute 30. La lecture est ensuite arrêtée et les pentes de décroissance sont notées :

- la pente initiale avant l'ajout de thénoltrifluoroacétone
- la pente après ajout de thénoltrifluoroacétone

### 3. Calcul de l'activité du complexe II.

L'activité du complexe II est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS(\text{cell}) = \frac{\Delta DO(-T) - \Delta DO(+T)}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_n DCPIP} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

- $\Delta DO(-T)$  : delta DO par minute mesurée avant addition de thénoltrifluoroacétone  
 $\Delta DO(+T)$  : delta DO par minute mesurée après addition de thénoltrifluoroacétone  
 $l$  : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1  
 $\epsilon_{DCPIP}$  : coefficient d'extinction du NADH à 600 nm et pH 7,5, en  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , soit 19,1  
 $S_n DCPIP$  : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1  
 $q_{\text{cellules}}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel soit : 0,5 million

Les résultats ainsi obtenus sont exprimés en nmoles/min/million de cellules.

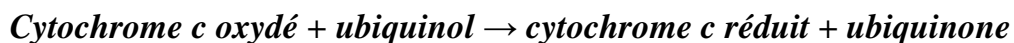
## VI. Dosage de l'activité de l'ubiquinol cytochrome c réductase (complexe III) sur cellules.

### A. Principe de la technique.

La technique de mesure de l'activité du complexe III est adaptée à partir de celle décrite par Rustin *et al.* (1993).



La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :



Le dosage consiste à suivre la réduction du cytochrome c oxydé à 550 nm. En effet, le cytochrome c réduit absorbe la lumière à 550 nm, donc l'apparition de la forme réduite du cytochrome c entraînera une augmentation de l'absorbance à 550 nm qui sera proportionnelle à l'activité du complexe III.

## **B. Réactifs.**

**Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,8** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

272,2 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,8 avec du KOH 5N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois à -20°C.

**EDTA** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Pour préparer la solution d'EDTA à 20 mM, 14,89 mg d'EDTA sont d'abord dissous dans 1 ml d'eau distillée puis le pH est ajusté à 7 avec du KOH 5M et enfin 1 ml d'eau distillée est ajouté pour compléter. La solution est stable pendant 6 mois à -20°C.

**Cyanure de potassium (KCN)** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Cet inhibiteur est spécifique du complexe IV. Une solution à 10 mM est préparée en reprenant 6,4 mg de cyanure de potassium par 10 ml d'eau distillée. Une fois aliquotée, cette solution peut être conservée pendant 1 mois à -20°C.

**Albumine bovine sans acides gras libres** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Deux cent cinquante milligrammes d'albumine bovine sont dilués dans 5 ml d'eau distillée. La solution à 50 mg/ml ainsi préparée est stable pendant 6 mois à -20°C.

**Antimycine A** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Il s'agit d'un inhibiteur du complexe III. Le contenu du flacon (10 mg) est dissous dans 1 ml d'éthanol absolu et peut être conservé pendant 1 mois à -20°C. Une solution diluée à 1mg/ml est préparée en prélevant 100 µl de cette solution mère et en les ajoutant à 900 µl d'éthanol absolu.

**Rotenone** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Il s'agit du'n inhibiteur du complexe I. Deux milligrammes de roténone sont repris par 2ml d'un mélange volume à volume d'éthanol absolu et DMSO. Cette solution à 2,5 mM se conserve 1 mois à -20°C en aliquots.

**Cytochrome c oxydé** (*Acros Organics, Halluin, France*).

Une solution à 1mM est préparée en dissolvant 13 mg de cytochrome c dans 1 ml d'eau distillée. Cette solution doit être préparée le jour même et conservée sur glace.

**Décylubiquinol.**

Le décylubiquinol est préparé à partir de décylubiquinone, un analogue de l'ubiquinone.

Pour cela, 20 mg de décylubiquinone (*Tébu-bio, La Perray-en-Yvelines, France*) sont dissous dans 4,77 ml d'éthanol absolu pour obtenir une concentration de 23 mM. Le spectre de l'ubiquinone oxydée est réalisé en diluant 10 µl d'ubiquinone dans 1 ml d'éthanol et en lisant l'absorbance entre 250 et 350 nm. Un pic à 275 nm doit apparaître avec une absorbance d'environ 2,6.

A partir de ce moment, toutes les étapes doivent être réalisées en plaçant la solution de décylubiquinone à l'obscurité dans un tube entouré de papier d'aluminium.

La solution de décylubiquinone est réduite par quelques cristaux de borohydrure de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) puis 30 µl d'acide chlorhydrique fumant (à 37%) sont ajoutés. Le tube est bouché avec un parafilm percé d'un trou pour permettre aux gaz produits par la réaction de s'échapper. Lorsque la solution est totalement décolorée, elle est centrifugée pendant 15 minutes à 4000 rpm. Le surnageant est réparti dans deux tubes en verre et dans chacun sont ajoutés 2,5 ml de tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM / Sorbitol 250 mM pH 7,4 et 1 ml de cyclohexane. Le tube est bouché avec un parafilm percé d'un trou et agité fortement. Les deux solutions sont regroupées dans un même tube et centrifugées pendant 10 minutes à 1000g. La phase supérieure (organique) est recueillie dans un tube et mise à l'obscurité. L'extraction de la phase inférieure est répétée deux fois par reprise par 1 ml de cyclohexane et centrifugation à 1000g pendant 10 minutes. Les phases organiques sont regroupées et évaporées sous azote. Le tube contenant l'extrait sec est pesé sur une balance de précision puis repris par 2 ml de cyclohexane et aliquoté par 50 µl dans des tubes « microvials » (*Agilent Technologies, Massy, France*). Les tubes sont alors mis à évaporer sous azote puis bouchés rapidement et mis à l'obscurité à -80°C. Le tube ayant contenu l'extrait sec est pesé à nouveau et son poids est

retranché à celui en présence de l'extrait sec, ce calcul permet de déduire la masse de décylubiquinol contenu dans chaque microvial. Le décylubiquinol ainsi préparé peut être conservé pendant 3 mois.

Le jour de la manipulation, reprendre un microvial par de l'éthanol absolu. Le volume d'éthanol sera calculé en fonction de la masse de décylubiquinol contenu dans les vials de manière à obtenir une concentration de 25 mM.

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Ce protocole est réalisé à partir de culots secs de cellules (au moins 2 millions de cellules) conservés à -80°C. Le culot, une fois décongelé, est repris par 50 µl par million de cellules de tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I) et placé pendant 3 minutes dans l'azote liquide. Le culot est ensuite rapidement décongelé au bain marie à 37°C. Cette étape permet d'éclater les cellules. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée à 16000 g pendant 30 secondes et le culot est repris par 50 µl de tampon A par million de cellules.

### 2. Mesure de l'activité du complexe III par spectrophotométrie.

Le dosage de l'activité du complexe III doit être réalisé juste après préparation des cellules.

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactif	Volume	Concentration finale
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM	500 µl	10 mM
Eau distillée	307 µl	
EDTA	100 µl	2 mM
Albumine bovine	20 µl	1 mg/ml
Cyanure de potassium	24 µl	240 µM
Roténone	2 µl	5 µM
Cytochrome c oxydé	40 µl	40 µM

Pour chaque échantillon, deux séries de tubes en duplicat sont préparées. Une série est incubée telle quelle et dans l'autre, 4 µl d'Antimycine A à 1mg/ml sont ajoutés. Ce mélange est incubé pendant 2 minutes à 37°C. Cinq microlitres de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 2 µl de

décylubiquinol à 25 mM. Le mélange est ensuite rapidement transvasé dans des microcuvettes à usage unique (*CML, Nemours, France*). Les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) thermostaté à 37°C et la cinétique d'augmentation de l'absorbance du cytochrome c réduit à 550 nm est suivie pendant 66 secondes. La lecture est ensuite arrêtée et les pentes sont notées :

- la pente des tubes sans Antimycine A
- la pente des tubes avec Antimycine A

### 3. Calcul de l'activité du complexe III.

L'activité du complexe III est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS(\text{cell}) = \frac{\Delta DO(-A) - \Delta DO(+A)}{l \times \epsilon_{\text{cytc}} \times S_{\text{ncytc}}} \times \frac{10^3}{Q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta DO(-T)$  : delta DO par minute mesurée sur les tubes sans antimycine A

$\Delta DO(+T)$  : delta DO par minute mesurée sur les tubes avec antimycine A

$l$  : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{\text{cytc}}$  : coefficient d'extinction du cytochrome c réduit à 550 nm et pH 7,8, en  $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , soit 18,5

$S_{\text{ncytc}}$  : nombre stoechiométrique du cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit : 1

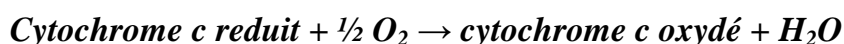
$Q_{\text{cellules}}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel soit : 0,1 million

Les résultats ainsi obtenus sont exprimés en nmoles/min/million de cellules.

## VII. Dosage de l'activité de la cytochrome c oxydase (complexe IV) sur cellules.

### A. Principe de la technique.

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



Le dosage consiste à suivre l'oxydation du cytochrome c réduit à 550 nm. En effet, le cytochrome c réduit absorbe la lumière à 550 nm, donc la disparition de la forme réduite du

cytochrome c entraînera une diminution de l'absorbance à 550 nm qui sera proportionnelle à l'activité du complexe IV.

## B. Réactifs.

**Tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM, pH 6,5** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

1,36 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 6,5 avec du KOH 5N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

**Albumine bovine sans acides gras libres** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Deux cent cinquante milligrammes d'albumine bovine sont dilués dans 5 ml d'eau distillée. La solution à 50 mg/ml ainsi préparée est stable pendant 6 mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

**Laurylmaltoside** (*Fluka, Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Pour préparer une solution à 125 mM, 63,83 mg de laurylmaltoside sont dissous dans 1 ml d'eau distillée. Une fois aliquotée, cette solution est stable pendant 1 mois à  $-20^\circ\text{C}$ .

**Cytochrome c oxydé** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*)

Une solution à 1mM est préparée en dissolvant 3,72 mg de cytochrome c dans 300  $\mu\text{l}$  de tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM pH 6,5. Cette solution doit être préparée le jour même et conservée sur glace.

### **Cytochrome c réduit.**

Ce dernier est préparé à partir de la solution de cytochrome c oxydé décrite ci-dessus. Pour ce faire, 250  $\mu\text{l}$  de cytochrome c oxydé 1 mM sont dilués dans 4,75 ml de tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM pH 6,5.

Deux cuvettes contenant 1 ml de cette solution sont préparées. Dans une deux cuvettes, 5 mg de cristaux de ferricyanure de potassium sont ajoutés pour obtenir une solution 0% réduite. Dans l'autre cuvette, 5 mg de sulfite de sodium sont ajoutés, une solution de cytochrome c 100 % réduit est ainsi obtenue.

Les densités optiques de ces deux solutions sont lues à 550 et 560 nm. Le rapport 550/560 nm doit être proche de 1,16 pour la solution 0% de réduction et compris entre 7,1 et 10 pour la solution 100% de réduction. Si tel est le cas, une fourchette de  $\text{DO}_{550\text{ nm}}$  pour obtenir 92 à 97% de réduction est calculée selon la formule suivante :

- 92% de réduction :  $((\text{DO}_{550\text{nm red}} - \text{DO}_{550\text{nm ox}}) \times 0,92) + \text{DO}_{550\text{nm ox}}$

- 97% de réduction :  $((DO_{550nm\ red} - DO_{550nm\ ox}) \times 0,97) + DO_{550nm\ ox}$
- Vingt microlitres de solution 100% réduite sont ajoutés à la solution de cytochrome c oxydé diluée et la DO est lue à 550 nm. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une DO comprise dans la fourchette déterminée ci-dessus. Si la valeur de DO est supérieure à celle de 97% de réduction, il faut recommencer la préparation du cytochrome c réduit.

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Ce protocole est réalisé à partir de culots secs de cellules (au moins 2 millions de cellules) conservés à -80°C. Le culot, une fois décongelé, est repris par 50 µl par million de cellules de tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I).

### 2. Mesure de l'activité du complexe IV par spectrophotométrie.

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en plastique :

Réactif	Volume	Concentration finale
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 100 mM	200 µl	20 mM
Eau distillée	455 µl	
Albumine bovine	20 µl	1 mg/ml
Cytochrome c réduit	300 µl	15 µM

Pour chaque échantillon, les mesures sont effectuées en duplicat. Ce mélange est incubé pendant 3 minutes à 37°C. Cinq microlitres de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés puis la réaction est déclenchée par l'ajout de 20 µl de laurylmaltoside à 125 mM. Le mélange est ensuite rapidement transvasé dans des microcuvettes à usage unique (*CML, Nemours, France*). Les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) thermostaté à 37°C et la cinétique de diminution de l'absorbance du cytochrome c réduit à 550 nm est suivie pendant 90 secondes. La lecture est ensuite arrêtée et la pente est notée.

### 3. Calcul de l'activité du complexe IV.

L'activité du complexe IV est calculée en utilisant la formule suivante :

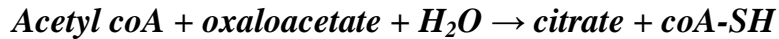
$$AS(\text{cell}) = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{cytc}} \times S_{\text{ncytc}}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta DO$	: delta DO par minute mesurée pendant 90 secondes
$l$	: longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1
$\epsilon_{\text{cytc}}$	: coefficient d'extinction du cytochrome c réduit à 550 nm et pH 7,8, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , soit 18,5
$S_{\text{ncytc}}$	: nombre stoechiométrique du cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit : 1
$q_{\text{cellules}}$	: quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel soit : 0,1 million

## VIII. Dosage de l'activité citrate synthase (CS) sur cellules.

### A. Principe de la technique.

La citrate synthase est la première enzyme du cycle de Krebs, elle catalyse la réaction suivante :



Le dosage fait intervenir l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le DTNB réagit avec les groupements thiols (SH) du coA-SH formé dans la réaction ci-dessus et forme du coATNB et du TNB. Ce dernier est un composé jaune qui absorbe la lumière à 412 nm. Le dosage consiste à suivre la formation de TNB à 412 nm. L'augmentation de l'absorbance à 412 nm sera donc proportionnelle à l'activité de la citrate synthase.

### B. Réactifs.

**Tampon Tris 1M pH 8,1** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

12,1 g de Tris-base sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 8,1 avec de l'HCl 5N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve pendant 6 mois à -20°C.

**Acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB)** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Deux milligrammes de DTNB sont dilués dans 5 ml de tampon Tris 1M. La solution à 1mM ainsi préparée n'est utilisable que pendant une demi-journée et se conserve à l'abri de la lumière.

**Acétyl CoA** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Pour préparer une solution à 30 mM, les 25 mg du flacon d'acetyl coA sont dissous dans 1,03 ml d'eau distillée. Cette solution est stable pendant 1 mois à -20°C. Le jour de la manipulation, cette solution est diluée au 1/3 en ajoutant 1 ml de la solution mère à 2ml d'eau distillée.

**Oxaloacétate** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*)

Avant chaque manipulation, 6,6 mg d'oxaloacetate sont dilués dans 5 ml d'eau distillée afin d'obtenir une solution à 10 mM.

**Triton X100** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Le triton est conservé à 4°C. La veille des manipulations, il est placé à température ambiante. Puis, une solution à 10% est préparée en diluant 1 ml de triton X100 dans 9 ml d'eau distillée. Ce réactif se conserve pendant 6 mois à -20°C.

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Ce protocole est réalisé à partir de culots secs de cellules (au moins 2 millions de cellules) conservés à -80°C. Le culot, une fois décongelé est repris par 50 µl par million de cellules de tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I).

### 2. Mesure de l'activité de la citrate synthase par spectrophotométrie.

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en plastique :

Réactif	Volume	Concentration finale
DTNB	150 µl	150 mM
Eau distillée	755 µl	
Acétyl coA	30 µl	300 µM
Oxaloacétate	50 µl	500 µM
Triton 10X	10 µl	0,1 %

Pour chaque échantillon, les mesures sont réalisées en duplicat. Ce mélange est incubé pendant 2 minutes à 37°C. Cinq microlitres de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés pour déclencher la réaction. Le mélange est ensuite rapidement transvasé dans des microcuvettes à usage unique (*CML, Nemours, France*). Les cuvettes sont



placées dans le spectrophotomètre (*Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France*) thermostaté à 37°C et la cinétique d'augmentation de l'absorbance du TNB à 412 nm est suivie pendant 60 secondes. La lecture est ensuite arrêtée et la pente est notée.

### 3. Calcul de l'activité de la citrate synthase.

L'activité de la citrate synthase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$AS(\text{cell}) = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{TNB}} \times S_{\text{nTNBc}}} \times \frac{10^3}{Q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta DO$	: delta DO par minute mesurée pendant 90 secondes
$l$	: longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1
$\epsilon_{\text{TNB}}$	: coefficient d'extinction du DTNB réduit à 550 nm et pH6,5, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ , soit 13,6
$S_{\text{nTNBc}}$	: nombre stoechiométrique du cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit : 1
$Q_{\text{cellules}}$	: quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel soit : 0,1 million

Les résultats ainsi obtenus sont exprimés en nmoles/min/million de cellules.

## ***IX. Préparation de membranes plasmiques à partir de cellules HepG2 et incubation en présence de dexaméthasone-FITC.***

### A. Principe de la technique.

Cette technique consiste en l'isolement de membrane par partition en deux phases aqueuses. Elle repose sur des centrifugations successives avec des milieux de densités différentes.

### B. Réactifs.

#### **PBS-EDTA 5 mM.**

Une masse de 146,12 mg d'EDTA est dissoute dans 100 ml de PBS 1X. Le pH est ajusté à 7,4. La solution ainsi préparée est filtrée avec un filtre de 0,2  $\mu\text{M}$  sous hotte à flux laminaire afin de rendre cette solution stérile.

**Tampon 1.**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Hepes KOH	10 mM	238,3 mg
KCl	15 mM	111,8 mg
Mg-Acetate	1,5 mM	21,3 mg
Dithiothréitol	1 mM	15,4 mg

qsp 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,5

**Tampon 2.**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Hepes KOH	80 mM	953,2 mg
KCl	135 mM	503,2 mg
Mg-Acetate	8,5 mM	60,5 mg
Dithiothréitol	1 mM	7,7 mg

qsp 50 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,5

**Tampon 3.**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	200 mM	1,3606 g

qsp 50 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,2

**Tampon 4.**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 mM	64,1 mg
Sucrose	250 mM	8,5570 g
DEAE-Dextran	6,6 % (w/w)	6,0110 g
Percoll	20 % (v/v)	20 ml

qsp 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,2

**Tampon 5.**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1mM	8,4 mg

qsp 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,2

Ces cinq tampons peuvent être conservés pendant un mois à 4°C.

**Dexaméthasone-FITC** (*Molecular Probes, Invitrogen Cergy-Pontoise, France*).

Ce composé est extrêmement sensible à la lumière, toute manipulation doit être réalisée dans l'obscurité.

Une solution mère à 5 mM est préparée en dissolvant le flacon de 5 mg dans 1,19 ml de DMSO. Extemporaneément, cette solution est diluée au 1/100<sup>e</sup> afin d'obtenir une concentration de 500 µM. Une dilution au 1/100<sup>e</sup> sera ensuite réalisée dans la boîte de culture.

## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Afin de réaliser ces manipulations, trois cents millions de cellules HepG2 sont nécessaires.

Les cellules sont donc cultivées dans des flasks de 175 cm<sup>2</sup> jusqu'à atteindre 80 % de confluence. Deux flasks environ sont nécessaires pour obtenir cette quantité de cellules.

Les cellules ne sont pas trypsinées afin de ne pas risquer de cliver le récepteur membranaire avec la trypsine. Elles sont seulement décollées de leur support par une incubation en PBS-EDTA 5% pendant 20 minutes. Elles sont ensuite récoltées et centrifugées à 3000 rppm pendant 10 minutes. Le surnageant est jeté et le culot cellulaire est placé sur glace avant de procéder à la purification des membranes.

### 2. Purification des membranes.

Le culot cellulaire préparé précédemment est resuspendu dans 15 ml de tampon 1 et placé sur glace pendant 10 minutes afin de lyser les cellules. Le lysat est ensuite centrifugé pendant 10 minutes à 3000 rpm à 4°C. Le culot est repris par 2 ml de tampon 1 puis potterisé avec un potter verre/verre (2 fois 20 allers-retours). Deux millilitres de tampon 2 sont ajoutés et l'homogénat est centrifugé à 1000 rpm pendant 10 minutes à 4°C afin d'éliminer le noyau et les cellules non broyées. Le surnageant est prélevé et centrifugé pendant 30 minutes à 10000 g à 4°C. Le culot est resuspendu dans 2 ml de tampon 3. Deux tubes sont préparés et placés sur glace : un contenant 14 ml de tampon 4 et 2 ml de tampon 2 (deux phases se forment) et un autre contenant 14 ml de tampon 4 et 2 ml de l'extrait préparé ci-dessus. Les 2 phases sont homogénéisées par 40 inversements de tube puis centrifugées pendant 5 minutes à 750 g (4°C) en utilisant un rotor à godets libres. La phase supérieure est récoltée et la phase inférieure est réextraite deux fois avec 2 ml de tampon 3. Finalement, les trois phases supérieures sont regroupées, diluées dans 5 ml de tampon 5 et centrifugées pendant 30

minutes à 10000 g à 4°C. Le culot obtenu contient les membranes purifiées. Les membranes peuvent se conserver une journée à 4°C.

### **3. Incubation avec la dexaméthasone-FITC.**

Les membranes purifiées obtenues ci-dessus sont reprises dans 1 ml de tampon 5 et sont distribuées par 100 µl dans des tubes eppendorf. Un microlitre de dexaméthasone-FITC est ajoutée dans les tubes à l'obscurité. Afin de vérifier que la dexaméthasone-FITC se fixait bien sur les mêmes sites que la dexaméthasone, une incubation avec 500 nM de dexaméthasone non fluorescente et 500 nM de dexaméthasone-FITC a été réalisée. De plus, pour montrer que la dexaméthasone-FITC se fixait sur des sites spécifiques (et ne s'intercalait pas seulement dans la membrane), des essais de déplacements de fluorescence ont été réalisés en coincubant la dexaméthasone-FITC avec 500 nM de dexaméthasone-BSA ou en préincubant pendant 10 minutes avec 500 nM de dexaméthasone-mesylate.

Une gamme de dexaméthasone-FITC a été réalisée en incubant des membranes avec différentes concentrations de dexaméthasone-FITC (de 50 nM à 50 µM).

Les extraits membranaires sont incubés pendant 10 minutes sous agitation avec ces réactifs puis les tubes sont centrifugés pendant 30 minutes à 10000 g à 4°C.

Le surnageant est placé dans les puits d'une microplaque 96 puits noire adaptée pour la lecture en fluorescence. Le culot membranaire, repris par 100 µl de tampon 5 y est également placé. La fluorescence est lue dans chaque puits grâce au lecteur de fluorescence Mithras 640 (*Berthold Technologies*). La sonde FITC est excitée à 490 nm et la fluorescence est lue à 520 nm.

La fluorescence due à la liaison de la dexaméthasone sur des sites membranaires est calculée de la manière suivante :  $F = \text{fluorescence culot} / (\text{fluorescence surnageant} + \text{fluorescence culot})$ .

## **X. Extraction des ARN totaux à partir de cellules.**

### **A. Principe de la technique.**

Cette technique repose sur l'accrochage sélectif des ARN totaux sur une colonne de silice. L'utilisation d'un tampon fortement concentré en sels permet l'accrochage de plus de 100 µg d'ARN d'une taille pouvant atteindre 200 bases. Une première étape consiste à lyser

mécaniquement les cellules puis à inhiber les RNases dans un tampon de guanidine thiocyanate très dénaturant. Les lysats sont alors déposés sur colonne de silice et les ARN sont retenus alors que les contaminants sont élués. Enfin, les ARN sont décrochés de la colonne et élués (cf. figure 17).

## **B. Protocole.**

### **1. Lyse des cellules.**

Les cellules sont conservées en aliquots de 5 millions en culots secs à -80°C. Le culot, après décongélation, est repris par 600 µl de tampon RLT contenant du thiocyanate de guanidium. Le mélange est homogénéisé en vortexant les tubes. Le lysat est ensuite transféré dans les colonnes QIAshredder afin d'éliminer les agrégats et les débris cellulaires. Pour cela, les colonnes sont placées sur un tube collecteur et sont centrifugées pendant deux minutes à 10000 g.

### **2. Extraction des ARN totaux.**

Six cent microlitres d'éthanol à 70% sont ajoutés au lysat et cette préparation est transférée sur des colonnes RNeasy placés sur des tubes collecteurs et centrifugés à 10000 g pendant 15 secondes. L'éluat est jeté et après ajout de 700 µl de tampon RW1 (contenant une petite quantité de thiocyanate de guanidium) au dessus de la colonne, une nouvelle centrifugation de 15 secondes à 10000 g est effectuée pour laver la colonne. Deux lavages avec centrifugation sont ensuite effectués avec le tampon RPE pour éliminer les contaminants. Une dernière centrifugation est effectuée à vide, sans tampon pour laver totalement l'excès de tampon RPE.

### **3. Elution des ARN totaux.**

Les ARN totaux retenus dans la colonne sont élués par 50 µl d'eau RNase-free par centrifugation à 10000 g pendant 1 minute. Les ARN totaux ainsi élués sont aliquotés et conservés à -80°C.

### **4. Mesure de la concentration en ARN.**

La densité optique des échantillons est lue à 260 nm (longueur d'ondes d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) afin de s'assurer de la pureté des échantillons.

Sachant qu'une unité de densité optique correspond à 40 µg d'ARN simple brin, la concentration en ARN contenue dans les échantillons peut être calculée à partir de leur absorbance à 260 nm.

## ***XI. Reverse transcription.***

### **A. Principe de la technique.**

La reverse transcription consiste à synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Cette étape est réalisée grâce à l'enzyme rétrovirale reverse transcriptase (MMLV : Moloney-Murine Leukemia Virus). Cette technique est réalisée grâce au kit Advantage® RT-for-PCR Kit (Clontech, Saint-Germain-en-Lay, France).

### **B. Protocole.**

Un volume correspondant à 1 µg d'ARN est utilisé. De l'eau DEPC est ajoutée pour obtenir un volume de 12,5 µl. Un microlitre d'amorces hexamères est ajouté et le mélange est chauffé à 70°C pendant 2 minutes. Les tubes sont immédiatement placés sur glace pour stopper la réaction. Un mélange réactionnel est ensuite préparé comme suit :

#### ***Pour un tube : - Tampon de réaction 5X : 4 µl***

- Mélange de dNTP (10 mM de chaque) : 1 µl
- Inhibiteur de RNases recombinantes : 0,5 µl
- Reverse transcriptase MMLV : 1 µl

Le tampon de réaction est un tampon Tris-HCl 50 mM, pH8,3 contenant 75 mM de KCl et 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, cofacteur indispensable à la réaction de transcription.

Le volume réactionnel est donc de 6,5 µl, le volume nécessaire doit être calculé pour n+1 tubes.

Ce mélange est ajouté dans chacun des tubes et la réaction de reverse transcription est réalisée en incubant les tubes pendant 1 heure à 42°C. La réaction est ensuite stoppée par 5 minutes de chauffage à 94°C. Cette étape permet également d'inhiber les éventuelles DNases. Les échantillons sont ensuite dilués au 1/50<sup>e</sup> en ajoutant 80 µl d'eau DEPC. Après homogénéisation, les ADNc ainsi synthétisés sont congelés à -80°C en aliquots.

Une PCR avec les amorces G3PDH fournies dans le kit peut-être réalisée pour vérifier la qualité des ADNc synthétisés.

## ***XII. RT PCR quantitative.***

### **A. Principe de la technique.**

Cette technique permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. La sonde fluorescente utilisée lors de ces manipulations est le SYBR green 1 qui se lie à toutes les molécules d'ADN double brin en émettant une fluorescence détectable à 521 nm. La fluorescence émise, détectée par un spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé. Cette technique permet une détection assez sensible et rapide mais comme la sonde se fixe de manière non spécifique à tous les fragments d'ADN double brin, les dimères d'amorces peuvent également être détectés et conduire à une surestimation de la quantité de l'ADN cible (cf. figure 18).

### **B. Protocole.**

#### **1. Préparation des standards.**

Afin de pouvoir analyser de manière quantitative l'amplification du gène d'intérêt, il est nécessaire d'établir au préalable une gamme de nombre de copies connues d'amplicons du gène cible. Pour cela, une PCR classique est réalisée : 2 µl d'ADNc sont ajoutés à 15 µl d'un mélange d'amorces (2µl d'amorces sens et antisens à 20 mM chacune et 11 µl d'eau) et à 23 µl du mélange de PCR (4 µl de tampon 10X, 2,5 µl de MgCl<sub>2</sub> à 25 mM, 4µl de dNTP à 2 mM, 12 µl d'eau DEPC et 0,5 µl de l'enzyme Taq polymerase). Les ADNc sont d'abord dénaturés à 94°C pendant 3 minutes puis 35 cycles de dénaturation 94°C 30 secondes, hybridation au T<sub>m</sub> du couple d'amorces 30 secondes, élongation à 72°C pendant 30 secondes et enfin 72°C pendant 10 minutes. Les ADN amplifiés sont purifiés sur colonne (*High Pure Product Purification kit, Boeringher*) et sont quantifiés à la fois par lecture de la densité optique des ADN double brins à 260 nm et par quantification sur gel d'agarose à 2,5%.

Le nombre de copies dans les échantillons est calculé grâce à la formule suivante :

1 µg d'ADN de 1000 paires de bases correspond à  $9,4 \times 10^{11}$  copies.

Les échantillons sont dilués pour obtenir  $10^{10}$  copies/ $\mu\text{l}$ . La gamme est ensuite réalisée par dilutions successives de cet échantillon.

## **2. PCR quantitative.**

Le mélange réactionnel est préparé pour n+1 tubes. Il comprend 9  $\mu\text{l}$  d'eau DEPC, 4  $\mu\text{l}$  de master mix 5X (composé d'ADN polymérase et de la sonde SYBR Green 1) et 2  $\mu\text{l}$  d'amorces sens et antisens à 10 mM chacune. Ce mélange est transféré dans les capillaires de verre Light-cycler® préalablement refroidis à 4°C. Deux microlitres d'ADNc y sont ajoutés et les tubes sont placés dans le carrousel du Light-cycler®. Le programme consiste en une étape de préincubation de 95°C pendant 5 minutes puis 45 cycles d'amplification (composés chacun d'une phase de dénaturation à 95°C pendant 1 seconde puis d'une phase d'hybridation aux  $T_m$  des amorces 10 secondes puis d'une phase d'élongation à 72°C pendant 10 secondes). La fluorescence est mesurée de manière ponctuelle à la fin de l'étape d'élongation de chaque cycle d'amplification. Elle permet ainsi d'établir une courbe de quantification représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles.

Afin de s'assurer de la spécificité des produits de PCR amplifiés, une courbe de fusion est réalisée après la phase d'amplification. Elle consiste en une étape de dénaturation ponctuelle à 95°C puis une hybridation à 65°C pendant 60 secondes et enfin une étape de fusion avec élévation progressive de la température jusqu'à 95°C par incrément de 0,1°C par seconde. La fluorescence est lue en continu pendant cette dernière phase de fusion. L'établissement de la courbe de fusion (fluorescence en fonction de la température) permet de discriminer les dimères d'amorces et les produits de PCR spécifiques.

Pour chaque manipulation, un témoin négatif (ne contenant pas d'ADNc mais de l'eau) est effectué pour s'assurer de l'amplification sélective du gène d'intérêt. La quantification est faite grâce au rapport du nombre de copies du gène cible sur le nombre de copies d'un gène de référence dont le nombre de copie est connu pour varier peu en fonction des conditions expérimentales (ici l'ARP : Acidic Ribosomal Protein).

## **3. Vérification des produits d'amplification par migration sur gel d'agarose.**

Afin de s'assurer que les produits amplifiés correspondent bien au gène d'intérêt, les capillaires sont placés à l'envers dans des tubes eppendorf et centrifugés à 5000 rpm pendant une minute. Les échantillons sont ensuite déposés sur gel d'agarose à 2,5% dans un tampon TBE 1X pH 8,3. La taille des bandes obtenues par électrophorèse est comparée à celle du



marqueur Phi X. La présence d'une seule bande à la taille attendue confirme bien la spécificité d'amplification du gène d'intérêt par Light-cycler®.

### ***XIII. Western blot.***

#### **A. Principe de la technique.**

Cette technique permet de déterminer la présence ainsi que la quantité d'une protéine contenue dans un échantillon. Elle est basée sur la reconnaissance d'un motif antigénique d'une protéine par un anticorps primaire (monoclonal ou polyclonal). Cet anticorps est à son tour reconnu par un anticorps secondaire (IgG non spécifique) couplé à la peroxydase. La révélation du complexe antigène/anticorps primaire/anticorps secondaire se fait par chimioluminescence.

#### **B. Réactifs.**

##### **Tampon A.**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
NaCl	134 mM	783,1 mg
KCl	5 mM	37,3 mg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,7 mM	9,9 mg
Tris base	2,5 mM	30,3 mg

qsp 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,5

##### **Tampon B.**

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
NaCl	10 mM	58,4 mg
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	11,2 mg
Tris base	10 mM	121,1 mg

qsp 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,5

### Tampon C.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Sucrose	2 M	68,4600 g
EDTA	35 mM	1,2284 g
Tris base	50 mM	605,7 mg

qsp 100 ml H<sub>2</sub>O, pH 7,5

### Tampon Tris-SDS pH 8,8

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tris-base	1 M	12,12 g
SDS	30 mM	0,86 g

qsp 100 ml d'eau distillée

pH 8,8 avec de l'HCl 5N

### Tampon Tris-SDS pH 6,8

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tris-base	300 mM	3,63 g
SDS	30 mM	0,86 g

qsp 100 ml d'eau distillée

pH 6,8 avec de l'HCl 5N

### Tampon d'échantillon

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tampon Tris-SDS pH 6,8	25 %	25 ml
SDS	70 mM	2 g
Glycérol	10 %	10 ml
Bleu de bromophénol 1 %	0,1 %	0,1 ml
2βMercapto Ethanol	5 %	5 ml

qsp 100 ml d'eau distillée

### Tampon d'électrophorèse 10 X

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tris-base	272 mM	32,95 g

Glycine	1,92 M	144,09 g
SDS	35 mM	10,09 g

qsp 1000 ml d'eau distillée

pH 8,3 avec de l'HCl 5N

Diluer au 1/10<sup>e</sup> juste avant utilisation

#### Tampon de transfert

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tris-base	20 mM	2,40 g
Glycine	150 mM	11,21 g
Ethanol	20 %	200ml

qsp 1000 ml d'eau distillée

pH 8,3 avec de l'HCl 5N

#### Solution de coloration des gels

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Acide acétique glacial	10 %	100 ml
Ethanol	50 %	500ml

qsp 1000 ml d'eau distillée

#### Solution de décoloration des gels

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Acide acétique glacial	10 %	100 ml
Ethanol	30 %	300ml

qsp 1000 ml d'eau distillée

#### Tampon TBS 10X

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
NaCl	1,37 M	80,06 g
KCl	2,7 mM	0,20 g
Tris-base	25 mM	3,02 g

qsp 1000 ml d'eau distillée

pH 7,4 avec de l'HCl 5N

A diluer au 1/10<sup>e</sup> juste avant utilisation

Ajouter 1 ml de Tween 20 (Sigma Aldrich, Lyon, France)

### C. Anticorps.

Nom	Fournisseur	Concentration finale
ANT	Mitosciences	1/1000 <sup>e</sup>
COX I	Mitosciences	1/1000 <sup>e</sup>
COX IV	Mitosciences	1/2000 <sup>e</sup>
VDAC	Mitosciences	1/1500 <sup>e</sup>

### D. Protocole.

#### 1. Préparation des échantillons.

Une quantité de 100 millions de cellules est nécessaire pour réaliser l'extraction des mitochondries. Les cellules sont trypsinées et reprises dans 10 ml de PBS-10% SVF puis sont centrifugées à 900 rpm pendant 5 minutes. Le culot cellulaire est repris par 20 ml de tampon A et la suspension cellulaire est centrifugée pendant 5 minutes à 2500 rpm à 4°C. Le culot est resuspendu dans 12 ml de tampon B, un tampon hypotonique et laissé pendant 10 minutes sur glace. Les cellules sont ensuite lysées par potterisation avec un potter verre/verre (40 allers/retours) puis 2 ml de tampon C sont ajoutés au lysat. Après centrifugation à 2500 rpm pendant 4 minutes à 4°C, le surnageant est conservé et le culot est repris par 12 ml de tampon B et 2 ml de tampon C puis à nouveau centrifugé (2500 rpm, 4 minutes, 4°C). Les surnageants sont regroupés et centrifugés à 14 000 rpm pendant 20 minutes, les culots cellulaires obtenus sont enrichis en mitochondries.

Pour le western blot, les mitochondries sont reprises dans 96µl d'eau additionnée de 4 µl d'antiprotéases 25 X (*Complete<sup>TM</sup> Protease inhibitor cocktail tablets, Roche, Mannheim, Allemagne*).

La concentration en protéines est alors dosée sur l'échantillon selon la méthode utilisant l'acide bicinchoninique (*BC Assay protein quantification kit, Uptima, Interchim, Montluçon, France*). Pour cette technique, l'échantillon est dilué au 1/10<sup>ème</sup> puis 30 µl sont prélevés et ajoutés à 600 µl du mélange acide bicinchoninique/sulfate de cuivre. Des standards d'albumine bovine à 0,25 et 0,50 mg/ml sont préparés de la même manière et serviront d'étalon. Chaque dosage est effectué en duplicat. Après 30 minutes d'incubation à 37°C, la densité optique de chaque tube est lue à 562 nm.

Un volume équivalent à 30 µg de protéines mitochondriales est alors prélevé dans l'échantillon et de l'eau distillée est ajoutée afin d'obtenir un volume final de 14 µl (volume maximal pouvant être déposé dans un puits). Ce mélange est dilué au demi par ajout de 14 µl de tampon d'échantillon.

Afin de dénaturer les interactions protéiques, le mélange est ensuite chauffé à 100°C pendant 10 minutes puis conservé sur glace à 4°C jusqu'au dépôt sur gel (sauf lorsque l'on veut détecter la protéine COXI car cette dernière est sensible à la chaleur, dans ce cas, l'échantillon ne doit pas être chauffé à plus de 40°C).

## **2. Préparation du gel d'acrylamide.**

La concentration d'acrylamide à utiliser dans le gel varie selon la taille des protéines d'intérêt. Dans nos expériences, le poids moléculaire des protéines à étudier allant de 19 à 35 kDa, un gel de séparation à 12,5 % d'acrylamide a été utilisé. Pour deux gels, 12,5 ml de tampon Tris-SDS pH 8,8 ont été ajoutés à 10,4 ml d'acrylamide stock à 30% (*Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis*) et à 2 ml d'eau distillée. La polymérisation de l'acrylamide est alors déclenchée par ajout de 250 µl de persulfate d'ammonium à 10% et de 12,5 µl de TEMED (*Eurobio, Les Ulis, France*). Le gel est alors immédiatement coulé entre deux plaques de verre et la surface de chaque gel est lissée par ajout d'1ml d'isopropanol. Pendant la polymérisation, le gel de concentration (à 3% d'acrylamide) est préparé. Pour cela, 5 ml de tampon Tris-SDS pH 6,8 et 1 ml d'acrylamide stock sont mélangés à 4 ml d'eau distillée. Après polymérisation du gel de séparation (environ 30 min), l'isopropanol est retiré par renversement du système de coulage des gels. Cent microlitres de persulfate d'ammonium et 10 µl de TEMED sont ajoutés au mélange du gel de concentration et ce dernier est immédiatement coulé au dessus du gel de séparation et les peignes sont mis en place. Après 30 minutes de polymérisation, le système de coulage est démonté et les gels sont placés dans la cuve d'électrophorèse. Cinq cents millilitres de tampon d'électrophorèse sont ajoutés entre et autour des deux gels et les peignes sont retirés.

## **3. Dépôt des échantillons et migration.**

Cette étape a pour but de séparer les protéines des échantillons selon leur poids moléculaire. Après dénaturation, les 14 µl d'échantillon sont déposés dans les puits. Un marqueur de poids moléculaire est utilisé comme référence pour suivre la migration (*PageBlue™ Protein Staining Solution, Euromedex, Souffelweyersheim, France*). La cuve d'électrophorèse (*Mini Protean 3 system, Bio-Rad, Hercules, Etats-Unis*) est fermée et reliée au générateur. Une

première migration de 20 minutes à 100V est alors réalisée afin de concentrer les échantillons dans le gel de concentration. Cette étape est suivie par une seconde migration d'1h30 à 140V afin de permettre une bonne séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Lorsque le front de migration atteint le bas du gel, la migration est stoppée.

#### **4. Transfert sur membrane de nylon.**

Cette étape permet le transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane de nylon. La membrane (*Hybond<sup>TM</sup> – P Membrane Optimized for Protein Transfert, Amersham Biosciences, Bucks, Angleterre*) est placée pendant 15 secondes dans un bain d'éthanol absolu afin d'être ionisée puis rincée 5 minutes dans de l'eau distillée puis équilibrée 30 secondes dans le tampon de transfert. Pendant ce temps, le gel est démoulé et placé dans l'appareil de transfert (Owl Separation system, Portsmouth, Angleterre) sur 3 épaisseurs de papier buvard (Whatman, Maidstone, Angleterre) imbibé de tampon de transfert. La membrane est déposée délicatement sur le gel et à son tour recouverte de deux épaisseurs de papier buvard. Le transfert des protéines sur les membranes est alors réalisé par application d'un courant de 260 mA pendant 55 minutes. Après ce temps, l'efficacité de transfert est vérifiée par la coloration des protéines restées sur le gel grâce à deux bains successifs dans une solution de coloration puis de décoloration. La disparition sur le gel des bandes des protéines de faible poids moléculaire dans le marqueur révèle également un transfert efficace.

#### **5. Saturation des membranes.**

Afin de saturer les sites de fixation non spécifiques, la membrane est placée dans une solution de saturation (TBS-0,1% Tween-5% lait écrémé) sous agitation pendant une nuit à 4°C.

#### **6. Incubation avec l'anticorps primaire.**

La membrane est rincée 3 fois 5 minutes dans un bain de TBS-Tween 0,1% puis placée dans une poche à hybridation. Sept millilitres de TBS-Tween 0,1%-Lait 1% contenant l'anticorps primaire dilué à la concentration voulue sont ajoutés et la pochette à hybridation est thermosoudée et placée sous agitation pendant 3 h à température ambiante.

Si l'anticorps primaire utilisé est celui anti-ANT, le lait est remplacé par 1% de BSA car les protéines du lait inhibent la fixation de l'anticorps sur sa protéine cible.

#### **7. Incubation avec l'anticorps secondaire.**

Après trois rinçages de 5 minutes en TBS-Tween 0,1%, la membrane est incubée en présence de l'anticorps secondaire dirigé contre les IgG de l'anticorps primaire et couplé à la

peroxydase. Cet anticorps est dilué au 1/20000<sup>e</sup> dans une solution de TBS-Tween 0,1%-lait 1%. La membrane est placée sous agitation à température ambiante pendant 2h.

## **8. Révélation.**

L'hybridation des anticorps sur la membrane a été révélée par chimioluminescence avec le kit ECL Plus (*Amersham*). Après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est rincée 2 fois dans le tampon TBS-Tween 0,1% et 1 fois en présence de TBS seul, le tween pouvant inhiber la révélation. Un mélange contenant 5 ml de la solution 1 du kit ECL Plus et 50 µl de la solution 2 est déposé uniformément sur la membrane. Après 5 minutes d'incubation, l'excès de réactif est retiré de la membrane et la membrane est placée dans l'appareil de détection biorad (ref). Différents temps d'exposition sont réalisés jusqu'à obtention de bandes d'intensité satisfaisante mais pas saturante.

## **9. Quantification.**

L'intensité des différentes bandes est quantifiée grâce au logiciel quantity one (ref). Les résultats concernant la protéine d'intérêt sont normalisés par rapport à la quantité d'une protéine de référence (ici VDAC).

## ***XIV. Mesure de la concentration intracellulaire en calcium par microfluorométrie.***

### **A. Principe de la technique.**

Cette technique repose sur la mesure de la fluorescence émise par une sonde sensible au calcium. La sonde utilisée pour ces expériences est le FURA-2/AM (*Sigma Aldrich, Lyon, France*), un dérivé de l'EGTA, un chélateur de calcium. Il s'agit d'une sonde ratiométrique qui possède deux longueurs d'ondes d'absorption selon qu'elle est libre ou fixée au calcium (380 nm pour la sonde libre et 340 nm pour la sonde liée au calcium). Par contre, le FURA-2/AM émet à une seule longueur d'onde: 510 nm (cf. figure 19). La sonde utilisée est sous forme acétométhylester, ce groupement permet à la sonde de diffuser librement à travers la membrane plasmique. Cependant, sous cette forme, la sonde est insensible au calcium et il faut que ce groupement soit clivé par les estérases présentes dans le cytoplasme pour que la sonde puisse se lier au calcium (cf. figure 20). Le calcul du ratio de fluorescence émise à 510

nm suite à une excitation à 340 et 380 nm permet de déterminer les variations de concentrations intracellulaires en calcium en fonction du réactif ajouté.

## B. Réactifs.

### Tampon PSS 2 mM Ca

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
NaCl	140 mM	8,180 g
KCl	4 mM	0,300 g
MgCl <sub>2</sub>	1 mM	0,095 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,33 mM	0,040 g
Hepes	10 mM	2,380 g
Glucose	11,1 mM	2,000 g
CaCl <sub>2</sub>	2 mM	0,294 g

qsp 1000 ml d'eau distillée

pH 7,4 avec du NaOH 1M

### Tampon PSS 0 mM Ca

Ce tampon est préparé de façon identique au PSS 2 mM Ca sauf qu'il n'y a pas de CaCl<sub>2</sub>.

**Thapsigargine** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Une solution stock de thapsigargine à 1 mM est préparée en reprenant 5 mg de thapsigargine par 1,53 ml d'éthanol et aliquotée par 10 µl à -20°C. Cette solution est stable pendant 3 mois. Avant chaque manipulation, un aliquot est dilué au 1/1000<sup>e</sup> dans du PSS.

**Ionomycine** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Un milligramme d'ionomycine est dissous dans 714 µl de DMSO de manière à obtenir une solution à 10 mM. Cette dernière est diluée au 1/1000<sup>e</sup> dans le PSS extemporanément. La solution stock se conserve pendant 1 an à 4°C.

**FURA-2/AM** (*Sigma Aldrich, Lyon, France*).

Cette sonde étant sensible à la lumière, toutes les étapes seront réalisées dans le noir.

Un milligramme de sonde est repris par 900 µl de DMSO, ce qui constitue une solution stock à 1mM. Cette dernière est aliquotée par 10 µl et stockée à l'obscurité à -20°C où elle peut se conserver pendant 1 à 2 mois. Avant chaque manipulation, un aliquot de FURA-2/AM est repris par 1 ml de PSS pour obtenir une concentration finale de 10 µM.



## C. Protocole.

### 1. Préparation des cellules.

Deux jours avant la manipulation, les cellules sont ensemencées dans des cupules à fond en verre de 35 mm de diamètre (Fluorodishes, Word Precision Instruments, Stevenage, Angleterre) à une densité de 0,05 million de cellules par cupule et placées dans l'étuve à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Après deux jours, le milieu est retiré et les cellules sont incubées à température ambiante, dans l'obscurité, pendant 45 min en présence de 1 ml de FURA-2/AM à 10 µM. Pour enlever la sonde en excès, les cellules sont rincées par 1 ml de PSS et laissées pendant 20 minutes à l'obscurité pour permettre la complète déestérification de la sonde.

### 2. Mesure de la fluorescence des cellules.

La cupule est placée sur la platine du microscope inversé (*Nikon Eclipse TE2000-5, Nikon, Champigny-sur-Marne, France*). Après mise au point, une cellule isolée est sélectionnée en diminuant l'ouverture du diaphragme de champ. Durant la période d'expérimentation, un système de perfusion et d'aspiration, amené juste à côté de la cellule sélectionnée, permet de renouveler en continu le milieu et d'apporter différents inhibiteurs. Une lampe 75 W à arc de Xénon couplé à un monochromateur (*Cairn Optoscan, Cairn Research, Faversham, Angleterre*) permet d'exciter alternativement la cellule à 340 et 380 nm pendant 50 ms toutes les 8 secondes. Cette lumière d'excitation est dirigée à travers un objectif à immersion à huile d'ouverture numérique 1,4 (*Nikon Plan Apo, Nikon, Champigny-sur-Marne, France*). La fluorescence émise par la cellule est redirigée à travers un filtre 510 ± 20 nm par un système de miroirs dichroïdes et collectée par le tube photomultiplicateur. Le signal analogique ainsi généré est transformé en signal digital par un convertisseur (*Digidata 1322A, Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, Etats-Unis*) piloté par le logiciel Clampex 9.2 (*Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, Etats-Unis*) (cf. figure 21).

Le bruit de fond est déterminé à la fin de chaque expérience en mesurant la fluorescence sur un champ dépourvu de cellules, les valeurs ainsi obtenues seront retranchées à celles précédemment mesurées sur la cellule. De même, afin de s'assurer que la dexaméthasone ajoutée dans la solution de perfusion n'entraînait pas une modification de la fluorescence, un enregistrement a été effectué sur des cellules non chargées avec le FURA-2/AM. La fluorescence étant alors identique au bruit de fond, la dexaméthasone ne modifie pas en elle-même la fluorescence de la cellule. Une fois les mesures achevées, les données sont analysées sur le logiciel Clampfit 9.2 (*Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, Etats-Unis*).

# **RESULTATS ET DISCUSSION**

## Article n°1

### ***Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells.***

*Valérie Desquiret, Dominique Loiseau, Caroline Jacques, Olivier Douay, Yves Malthièry, Patrick Ritz et Damien Roussel.*

*Biochimica and Biophysica Acta-Bioenergetics.*

*2006 Jan, 1757(1) : 21-30*

## **Introduction de l'article n°1.**

Un des sujets du laboratoire est l'étude de la régulation de la conversion énergétique mitochondriale dans des situations de perte de poids volontaires et involontaires parmi lesquelles le modèle d'hypercatabolisme chez le rat traité par dexaméthasone. Les premiers résultats ont montré que 5 jours de traitement par dexaméthasone entraînaient une diminution d'efficacité de conversion énergétique mitochondriale associée à une augmentation significative de la fuite de protons dans les mitochondries de foie de rat (Dumas *et al.*, 2003, Roussel *et al.*, 2003).

La fuite de protons apparaît comme un élément central de régulation de l'homéostasie métabolique cellulaire. Il semble en effet, que ce phénomène ait un caractère bénéfique en diminuant la production d'espèces réactives de l'oxygène (EORs) notamment dans le foie où l'ajout d'un découplant entraîne une diminution de la production de peroxyde d'hydrogène (Ganote et Armstrong, 2003, Okuda *et al.*, 2002). La fuite de protons pourrait ainsi constituer une stratégie cytoprotective (notamment dans le cœur et le cerveau) au cours de situations de stress oxydant comme lors du diabète (Nishikawa et Araki, 2007), de l'ischémie reperfusion (Ganote et Armstrong, 2003) ou de l'athérosclérose (Blanc *et al.*, 2003). Cependant dans d'autres modèles cellulaires tels que les fibroblastes, il a été montré que le traitement par un agent découplant (FCCP) inhibe la prolifération cellulaire et induit une sénescence cellulaire prématurée observée dès douze jours après le début du traitement. Ce vieillissement précoce semble être lié à une augmentation de la production d'EORs. Il apparaît donc que l'impact de la fuite de protons est dépendant du tissu considéré ainsi que de l'intensité de cette fuite. Lorsque la fuite de protons est trop importante et que l'augmentation de la respiration mitochondriale ne peut plus compenser le retour des protons dans la matrice mitochondriale, le potentiel membranaire mitochondrial s'effondre, phénomène très délétère pour la cellule. Cette dissipation du potentiel membranaire mitochondrial a été montrée comme impliquée dans les stades précoces de l'apoptose, dans certains modèles comme l'apoptose induite par le resveratrol dans les cellules de colon (Mahyar-Roemer *et al.*, 2001) ou par l'antigène T du virus SV40 dans les embryons de rat (Vayssiere *et al.*, 1994). Dans certains systèmes, la diminution drastique du potentiel membranaire mitochondrial a été associée au relargage du cytochrome c (Mignotte et Vayssiere, 1998) ainsi qu'à l'activation du facteur proapoptotique AIF (Larochette *et al.*, 1999, Pardo *et al.*, 2001). Le potentiel membranaire mitochondrial est donc un paramètre qui doit être hautement régulé afin d'éviter la survenue de l'apoptose. Lorsque la mitochondrie est soumise à un stress métabolique, elle peut initier une voie de

signalisation rétrograde vers le noyau permettant alors la transcription de différents gènes nucléaires dont certains codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale et à plus long terme entraîner une biogenèse mitochondriale (Biswas *et al.*, 1999). Les éléments constitutifs de cette voie ont été très étudiés dans des modèles de levures mais, dans les cellules eucaryotes, de nombreux facteurs de cette voie n'ont pas encore été identifiés, bien que la voie calcium/calmoduline ait été clairement montrée comme importante pour ce dialogue.

Aux vues de ces données, il nous est apparu intéressant d'étudier l'impact d'une augmentation artificielle de la fuite de proton (découplage modéré induit par le 2,4 dinitrophénol) sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et le métabolisme cellulaire dans deux lignées cellulaires possédant des orientations métaboliques différentes. Pour ce faire, nous avons traité les cellules HepG2 (cellules d'hépatocarcinome possédant un métabolisme plutôt oxydatif) et les cellules 143 B TK<sup>-</sup> (cellules d'ostéosarcome à métabolisme plus glycolytique) par différentes doses de 2,4 dinitrophénol (DNP). Nous avons montré que trois jours de découplage mitochondrial dans les cellules HepG2 induisaient une augmentation de la capacité oxydative ainsi qu'une augmentation de la transcription de COXIV et ANT3, deux gènes nucléaires codant deux protéines mitochondriales impliquées dans la phosphorylation oxydative et le transport de l'ATP. La consommation de glucose et la production de lactate restaient inchangées montrant que les adaptations des cellules HepG2 à un découplage chronique permettaient une production efficace et continue d'ATP par la mitochondrie sans besoin de stimuler la glycolyse. Dans les cellules 143B en revanche, le découplage ne modifiait pas la capacité oxydative mais augmentait la consommation de glucose ainsi que la production de lactate et de pyruvate. Dans ces cellules, malgré une forte stimulation du métabolisme glycolytique, la croissance cellulaire était fortement ralentie par le découplage. Nous montrons ainsi que les adaptations cellulaires à un découplage mitochondrial diffèrent selon le type de métabolisme prédominant dans les cellules et nous mettons en évidence qu'une augmentation de la fuite de protons peut constituer un signal bioénergétique interne pouvant initier, de manière coordonnée, une activation des gènes nucléaires et mitochondriaux codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire, ce qui permet aux mitochondries de ces cellules de s'adapter à un tel stress métabolique.



## Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells

Valérie Desquret, Dominique Loiseau, Caroline Jacques, Olivier Douay, Yves Malthièry, Patrick Ritz, Damien Roussel\*

*Department of Biochemistry and Molecular Biology, INSERM UMR-694, 4 rue Larrey, F-49033 Angers cedex, France*

Received 2 June 2005; received in revised form 7 October 2005; accepted 9 November 2005

Available online 6 December 2005

### Abstract

Here, we show that 3 days of mitochondrial uncoupling, induced by low concentrations of dinitrophenol (10 and 50  $\mu\text{M}$ ) in cultured human HepG2 cells, triggers cellular metabolic adaptation towards oxidative metabolism. Chronic respiratory uncoupling of HepG2 cells induced an increase in cellular oxygen consumption, oxidative capacity and cytochrome *c* oxidase activity. This was associated with an upregulation of COXIV and ANT3 gene expression, two nuclear genes that encode mitochondrial proteins involved in oxidative phosphorylation. Glucose consumption, lactate and pyruvate production and growth rate were unaffected, indicating that metabolic adaptation of HepG2 cells undergoing chronic respiratory uncoupling allows continuous and efficient mitochondrial ATP production without the need to increase glycolytic activity. In contrast, 3 days of dinitrophenol treatment did not change the oxidative capacity of human 143B.TK<sup>-</sup> cells, but it increased glucose consumption, lactate and pyruvate production. Despite a large increase in glycolytic metabolism, the growth rate of 143B.TK<sup>-</sup> cells was significantly reduced by dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling. We propose that chronic respiratory uncoupling may constitute an internal bioenergetic signal, which would initiate a coordinated increase in nuclear respiratory gene expression, which ultimately drives mitochondrial metabolic adaptation within cells.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

*Keywords:* Human cell line; Mitochondria; Energy metabolism; Cytochrome-*c* oxidase; Glycolysis

### 1. Introduction

Mitochondrial oxidative phosphorylation produces most of the energy in aerobic living system by coupling respiration with the production of ATP. Respiration refers to the transfer of electrons from substrates to oxygen, a process that creates an electrochemical proton gradient across the inner mitochondrial membrane. The energy stored in this proton motive

force is then used either by ATP synthase to synthesize ATP or by other proteins to drive ion and substrate transport. In addition, the electrochemical proton gradient can also be dissipated by proton leak reactions through either basal or inducible proton conductance pathways [1]. Inner mitochondrial membrane proton leakage is an ubiquitous phenomenon that diverts energy from ATP synthesis to thermogenesis, thereby modulating the yield of ATP synthesis in the mitochondria. It has been estimated that proton conductance accounts for a high proportion of cellular metabolic rate [1–3], causing up to 20% of standard metabolic rate in rats [2]. Accordingly, increased energy expenditure through increased mitochondrial proton leak has been proved to represent a treatment for obesity [4]. Mitochondrial proton conductance may also represent a mechanism for the regulation of mitochondrial reactive oxygen species production [5–8], mediators of oxidative cell damage. In association with this function, it has been suggested that mitochondrial proton leak

*Abbreviations:* ANT, adenine nucleotide translocator; ARP, acidic ribosomal phosphoprotein; COX, cytochrome *c* oxidase; DNP, 2,3-dinitrophenol; FBS, fetal bovine serum; FCCP, carbonyl cyanide-*p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; NRF1, nuclear respiratory factor-1

\* Corresponding author. Laboratoire de Physiologie Intégrative, Cellulaire et Moléculaire, CNRS UMR 5123, Université Claude Bernard Lyon 1, 43 Bld 11 Novembre 1918, F-69622 Villeurbanne cedex, France. Tel.: +33 472 43 16 64; fax: +33 472 43 11 72.

*E-mail address:* [damroussel@yahoo.fr](mailto:damroussel@yahoo.fr) (D. Roussel).

might play a protective role in atherosclerosis [9,10] and in the pathophysiology of diabetic complications [11]. Several other studies also support the role for mitochondrial uncoupling in the regulation of numerous other cellular metabolic functions such as calcium signaling [12,13], lipid/glucose metabolism [14–17] and beta cell glucose sensing [18]. These findings therefore suggest that mitochondrial proton leak might play a role in cellular metabolic homeostasis, which includes, but is not restricted to, the regulation of oxidative phosphorylation efficiency and heat production.

Recently, some independent studies have provided data, although scarce, suggesting that mitochondrial uncoupling constitutes an internal metabolic signal triggering mitochondrial biogenesis that could culminate in an adaptation of metabolic cell characteristics [19–21]. The aim of this work was to further characterize the role of chronic mitochondrial uncoupling in regulating cellular oxidative capacity and the possible cross-talk with the nuclear transcription factor and respiratory gene expression. We investigated the effect of 3 days of mitochondrial uncoupling induced by 2,4-dinitrophenol (DNP) on substrate metabolism, respiratory capacity, mitochondrial membrane potential and on the expression of nuclear respiratory factor-1 (NRF1) and the nuclear genes that encode mitochondrial proteins (COXIV, ANT2 and ANT3) in human HepG2 and 143B.TK<sup>-</sup> cell lines. These two human cell lines were chosen as they differ in their energetic background, with HepG2 cells being more oxidative and thereby being less dependent on glycolytic ATP as a source of energy compared to 143B.TK<sup>-</sup> cells. We found that uncoupling induced increased oxidative capacity in HepG2 cells, but not in 143B.TK<sup>-</sup> cells. This was associated with an upregulation of HepG2 nuclear gene encoding COXIV and ANT3 proteins. The intracellular signaling pathways potentially involved in the reported causal link between mitochondrial uncoupling and adaptive changes in cellular respiratory function are discussed.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell lines and growth conditions

The HepG2 human hepatoma cell line was grown in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, penicillin G (100 U/ml), streptomycin (2 mM) and amphotericin B (0.25 µg/ml). The osteosarcoma-derived cell line (143B.TK<sup>-</sup>) was grown in DMEM F12 with 10% FBS, 2 mM L-glutamine and the same antibiotics as used for HepG2 cells. Cells were seeded at a density of 15,000 cells per ml in a 20 ml flask were grown at 37 °C in a humidified atmosphere (5% CO<sub>2</sub>–95% air) for 7 days in medium only (control) or in medium containing either 10 µM or 50 µM DNP. As DNP was made in ethanol solution, we used an experimental control condition, in which cells were grown in medium supplemented with ethanol (108 mM) only. Every 24 h (from J1 to J7), cells were collected by trypsinization and resuspended in PBS containing 5% FBS. An aliquot of each flask (control, ethanol, DNP 10 µM and DNP 50 µM) was colored using erythrosine to test cell viability. Then, three independent countings were done for each experimental culture condition. No differences in cell viability were found between DNP-treated and control cells, reinforcing the fact that the two concentrations of DNP used in the present work were not toxic towards HepG2 and 143B.TK<sup>-</sup> cell lines [22].

Doubling time was determined for each culture condition (control, ethanol, DNP 10 µM and DNP 50 µM) using the exponential phase of the proliferation curve [ $\log(\text{cell number})=f(\text{day of culture})$ ] as follows:

$$\text{Doubling Time} = (T_2 - T_1) / [\ln(\text{cell number at } T_2 / \text{cell number at } T_1) / \ln(2)]$$

where  $(T_2 - T_1)$  is the duration of the exponential phase.

### 2.2. Measurement of oxygen consumption and FCCP titration of respiration in intact cells

After 3 days of culture, control and DNP-treated HepG2 and 143B.TK<sup>-</sup> cells were collected by trypsinization and washed once in RPMI (HepG2) or DMEM (143B.TK<sup>-</sup>) containing 5% FBS and 2 mM L-glutamine. Two aliquots of each experimental condition were removed for cell counting. Then, the remaining cell suspensions were centrifuged (110 g for 5 min) and the pellet resuspended at a final concentration of  $10 \times 10^6$  cells per ml (HepG2) or  $5 \times 10^6$  cells per ml (143B.TK<sup>-</sup>) in 500 µl of the same medium supplemented with 2 mM L-glutamine (without FBS, DNP or ethanol) and previously air-equilibrated at 37 °C. The supernatants were collected and stored at -80 °C until assayed. The suspension was immediately transferred to the 1 ml chamber of a Clarke-type oxygen electrode (Rank Brothers Ltd.) maintained at 37 °C using a recirculating water bath and connected to a BD12E recorder model (Kipp and Zonen). Basal endogenous coupled respiration rate of cells was determined by measuring the linear rate of oxygen consumption, then oligomycin (12 µg/ml) was added and the non-phosphorylating respiration rate recorded. After recording the non-phosphorylating respiration rate, FCCP was added sequentially at different concentrations (ranging from 100 to 1000 nM for HepG2 cells and from 50 to 600 nM for 143B.TK<sup>-</sup>), and the uncoupled respiration rates measured. This titration was done because the uncoupling activity of FCCP in intact cells is biphasic, as shown in Fig. 1 for both hepatoma HepG2 and osteosarcoma 143B.TK<sup>-</sup> cell lines. Therefore, we systematically achieved such a titration in order to determine the optimal FCCP concentration that gives maximal uncoupled respiration rate for each experimental condition.

Finally, myxothiazol (10 µM) was added to allow the measurement of non-mitochondrial oxygen consumption rate in cells. Myxothiazol inhibited rates were equally low in both untreated cell lines ( $6 \pm 2\%$  of basal). In other words, mitochondria accounted for  $94 \pm 2\%$  of basal respiration in both untreated HepG2 and 143B.TK<sup>-</sup> cell lines, and its contribution to total cell respiration rate was not significantly affected by DNP treatment ( $93 \pm 2\%$  in 10 µM DNP-treated and  $92 \pm 2\%$  in 50 µM DNP-treated cells compared with  $90 \pm 3\%$  of control ethanol cells), excluding the possibility that non-mitochondrial oxygen consumption rates differed between experimental conditions. The oxygen solubility of the media was assumed to be 406 nmol O/ml. After recording the respiration rates, 400 µl of cell suspensions were collected from the chamber for total protein determination using the bicinchoninic acid procedure, with bovine serum albumin used as standard (BC Assay kit®, Montluçon, France).

Mitochondrial respiratory control ratio of cells was calculated as the ratio of oxygen consumed by mitochondria in the presence of FCCP to that in the presence of oligomycin, taking into account the myxothiazol rate  $[(V_{\text{FCCP}} - V_{\text{myxo}}) / (V_{\text{oligo}} - V_{\text{myxo}})]$ . To determine the respiratory activity of mitochondria in intact cells, we expressed the basal endogenous respiration rate of mitochondria as a fraction of their maximal respiration  $[(V_{\text{basal}} - V_{\text{myxo}}) / (V_{\text{FCCP}} - V_{\text{myxo}})]$ .

### 2.3. Measurement of mitochondrial membrane potential in intact cells

Cells were grown as already described for the oxygen consumption experiments. Three days after seeding, cells were collected by trypsinization and washed in PBS with 10% FBS. The cells were then resuspended in PBS, FBS 5%, 50 mM KCl and incubated with 20 nM cationic fluorescent dye DiOC6(3) in a 96-well plate (100,000 cells per well) for 30 min. In some wells, oligomycin (5 µg/ml) or mClCCCP (10 µM) was added before incubation, either to inhibit ATP synthesis or to dissipate the proton gradient. After washing, the cells were set in tubes containing propidium iodide (8 µg/ml) to check membrane integrity. The fluorescent intensity was read using a flow cytometer (Becton-Dickinson). Laser excitation of DiOC6(3) was at 484 nm and emission was read at 511 nm.

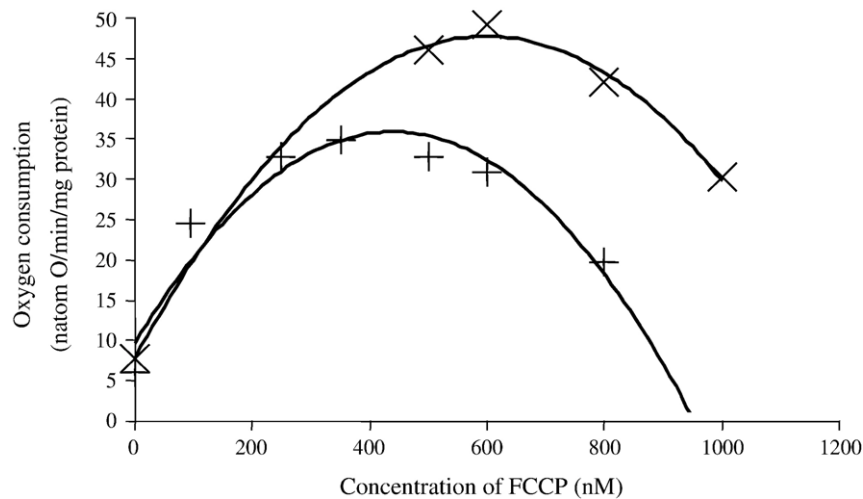


Fig. 1. Representative FCCP titration curves of non-phosphorylating oxygen consumption rate in HepG2 (x) and 143 B.TK<sup>-</sup> cells (+). After endogenous respiration rate measurement and the addition of oligomycin (12 µg/ml), small amounts of FCCP were sequentially added in the polarographic chamber and a titration curve was drawn. See Materials and methods for further details.

Propidium iodide fluorescence was detected at 610 nm. Fluorescence analysis was performed using Cell Quest software.

#### 2.4. Mitochondrial enzyme activities

Cytochrome *c* oxidase and citrate synthase activities were measured using standard spectrophotometric techniques [23]. The measurement of cytochrome *c* oxidase activity was performed in cells following three freezing/thawing cycles, by measuring decrease in absorbance resulting from the oxidation of reduced cytochrome *c* at 550 nm. Citrate synthase activity was measured in the same cells following the change in optical density of 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) at 412 nm. The activity of complex I (NADH:Ubiquinone oxidoreductase) was determined by monitoring the oxidation of NADH at 340 nm as described by Kuznetsov and Gnaiger [24]. Briefly, a pellet of  $5 \times 10^6$  cells was resuspended in 250 µl PBS, froze in liquid nitrogen for 3 min. Then, frozen suspension was thawed and centrifuged at  $16,000 \times g$  for 30 s. The pellet was resuspended in PBS at a final concentration of  $1 \times 10^6$  cells per ml and sonicated on ice. An aliquot of the resultant suspension was added to a K-phosphate buffer containing 0.3 mM NADH, 0.1 mM Ubiquinone-1, 1 mM KCN and 2 mM NaN<sub>3</sub>, pH 7.4 and the change in optical density of NADH was followed at 340 nm. After 120 s, rotenone (1 µM) was added to measure rotenone-insensitive activity of the preparation. Complex I activity was calculated as the total complex I activity minus the rotenone-insensitive activity.

#### 2.5. RNA analysis and quantitative real-time RT PCR

Total RNA was extracted from frozen pellets of cells cultured for polarographic measurements (as described above) using the RNeasy Kit (Quiagen). Reverse transcription of 1 µg total RNA was performed in a total 20 µl volume. First, RNA was denatured at 70 °C for 2 min with oligo dT (20 pmol). Then, 5× reaction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl and 3 mM MgCl<sub>2</sub>), dNTPs mix (0.5 mM each), recombinant RNase inhibitor (1 U/µl) and MMLV reverse transcriptase (200 units/mg RNA) was added.

Samples were finally incubated at 37 °C for 1 h and 5 min at 94 °C. 30 µl of DEPC (treated with diethyl pyrocarbonate and autoclaved) water was added to the reaction mixture to obtain a final 50 µl reaction volume (RT for PCR kit, Clontech). cDNA previously synthesized were purified using the High Pure PCR Product Purification Kit (Boehringer, Mannheim, Germany). Amplification products were then separated by gel (2.5% agarose) electrophoresis, stained with ethidium bromide, visualized and quantified using an integrating camera and analysis software (Molecular Analyst). Simultaneously, spectrophotometrical quantification was done by measuring optical density of samples at 260 nm (double strand DNA absorbancy wavelength) and 280 nm.

The levels of transcripts for adenine nucleotide translocator 2 (ANT2), ANT3, cytochrome *c* oxidase subunit IV (COXIV) and NRF1 were evaluated by quantitative real time RT PCR, using LightCycler™ (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) and LightCycler-RNA Amplification Kit SYBR Green I (Roche). Standard PCR products were generated by amplifying cDNA templates. Amplified fragments were then electrophoresed on agarose gels to confirm their expected size. Transcript levels were expressed in relation to that of acidic ribosomal phosphoprotein (ARP). PCR was performed using the following primers: ARP: 5'-CGA CCT GGA AGT CCA ACT AC-3' (forward) and 5'-ATC TGC TGC ATC TGC TTG-3' (reverse), ANT2: 5'-GCT TGT GTA TGA TGA AA-3' (forward) and 5'-AGA AAA CTG GTC AGA TGA AA-3' (reverse), ANT3: 5'-TCG AGA AAT TCC AGT TGT CTT T-3' (forward) and 5'-AGA ACA CGA CTT GGC TCC TAC A-3' (reverse), COXIV: 5'-TTG GCA AGC GAG CAA CC-3' (forward) and 5'-TTC TCC TTC TTC AAT GC-3' (reverse), NRF1: 5'-ATC TAT CCG GAA GAG GCA AC-3' (forward) and 5'-GTG TTC TGC CAG AGC AGA CT-3' (reverse).

#### 2.6. Western blot analysis

Cells were grown, collected and counted as described above for the oxygen consumption experiments. Pellets of  $5 \times 10^6$  cells were stored at -80 °C until used for western blot analysis. Frozen cells were lysated by an hypoosmotic shock (resuspension of the pellet in 96 µl of DEPC water and 4 µl of antiproteases). Protein concentration was determined by the Bio-Rad DC protein Assay kit (BioRad, Hercules, CA, USA). Whole-cell lysates were boiled for 10 min at 100 °C. Twenty micrograms of total protein were separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and electroblotted to a PVDF membrane (Amersham Biosciences, UK). Membranes were saturated with 5% non fat milk dissolved in TBS-Tween 0.1% (pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tris 23 mM, Tween 20 0.1%) for 1 h at room temperature and incubated overnight at room temperature with monoclonal mouse anti-COXIV (1:5000 Interchim, Montluçon, France) and anti-VDAC (1:2500 Calbiochem, San Diego, USA). Membranes were then washed three times in TBS-Tween 0.1% and incubated with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (1:10,000) for 1 h at room temperature. The immunoreactive proteins were visualized with enhanced chemiluminescence (ECL Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, UK). Band intensities were quantified with Quantity One software (Bio-Rad).

#### 2.7. Analysis of glucose, lactate and pyruvate

Glucose and lactate concentrations in the culture media were determined by spectrophotometry, using appropriate enzymatic kits (Boehringer, Mannheim,



Germany) on a Hitachi-Roche apparatus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Pyruvate concentration was determined by measuring NADH concentration decrease in presence of the lactate dehydrogenase enzyme using spectrophotometry at a fixed wavelength of 340 nm. Glucose consumption and lactate and pyruvate production were normalized to total cellular protein content, as determined by the bicinchoninic acid assay kit (Uptima, Interchim, Montluçon, France) with bovine serum albumin as standard.

### 2.8. Statistical analysis

Statistics were performed by a one-way analysis of variance (ANOVA). A Scheffe's *F* test was subsequently used to test for differences between means. Statistical significance was recognized at  $P < 0.05$ . Values are presented as means  $\pm$  S.E.M.

## 3. Results

### 3.1. Determination of cell growth

Fig. 2A shows that the total number of cells harvested after 7 days of culture did not differ between each experimental growth condition, suggesting that the proliferation rate of the HepG2 cell line remained unaffected by DNP treatment. This is confirmed by the fact that the doubling time of DNP-treated cells was similar to that of control cells (Fig. 2A, inset). Nevertheless, cells incubated in the presence of 50  $\mu$ M DNP split up more slowly than control cells until 3 days after seeding, however, they then recovered the same proliferation rate as the control. Contrary to the HepG2 cell line, osteosarcoma-derived human cell line (143B.TK<sup>-</sup>) proliferation was inhibited by DNP treatment (Fig. 2B). The doubling time (Fig. 2B, inset) further indicated that the more DNP-induced mitochondrial uncoupling, the less 143B.TK<sup>-</sup> grew. Thus, unlike HepG2 cells, 143B.TK<sup>-</sup> cells were not able to recover normal growth when incubated in the presence of DNP. However, it is important to note that this inhibitory effect of DNP on 143B.TK<sup>-</sup> cell proliferation was reversible, and when uncoupled cells were seeded again, without DNP, they grew at a rate similar to control cells (data not shown).

### 3.2. Glucose, lactate and pyruvate metabolism

Fig. 3 shows the effects of DNP treatment on glucose (panels A and B), lactate (panels C and D) and pyruvate (panels E and F) metabolism in both HepG2 (panels A, C and E) and 143B.TK<sup>-</sup> cells (panels B, D and F). In HepG2 cell line, glucose consumption (Fig. 3A), lactate (Fig. 3C) and pyruvate production (Fig. 3E) were not significantly different between control and uncoupled cells. In 143B TK<sup>-</sup> cells, contrary to the HepG2 cell line, glucose consumption ( $R = 0.79$ ,  $P < 0.0001$ ) and lactate production ( $R = 0.91$ ,  $P < 0.0001$ ) increased linearly with the intensity of DNP-induced mitochondrial uncoupling, reaching +150% more in 50  $\mu$ M DNP-treated 143B TK<sup>-</sup> cells than in ethanol control cells, for both glucose consumption ( $P < 0.05$ , Fig. 3B) and lactate production ( $P < 0.05$ , Fig. 3D). Lactate production was also significantly and linearly related to glucose consumption ( $R = 0.96$ ,  $P < 0.0001$ ). The slope of the regression line was 1.73, which means that 87% of the glucose consumed was converted to lactate by glycolysis. This is calculated from the ideal maximal value of 2 for the ratio of lactate production/

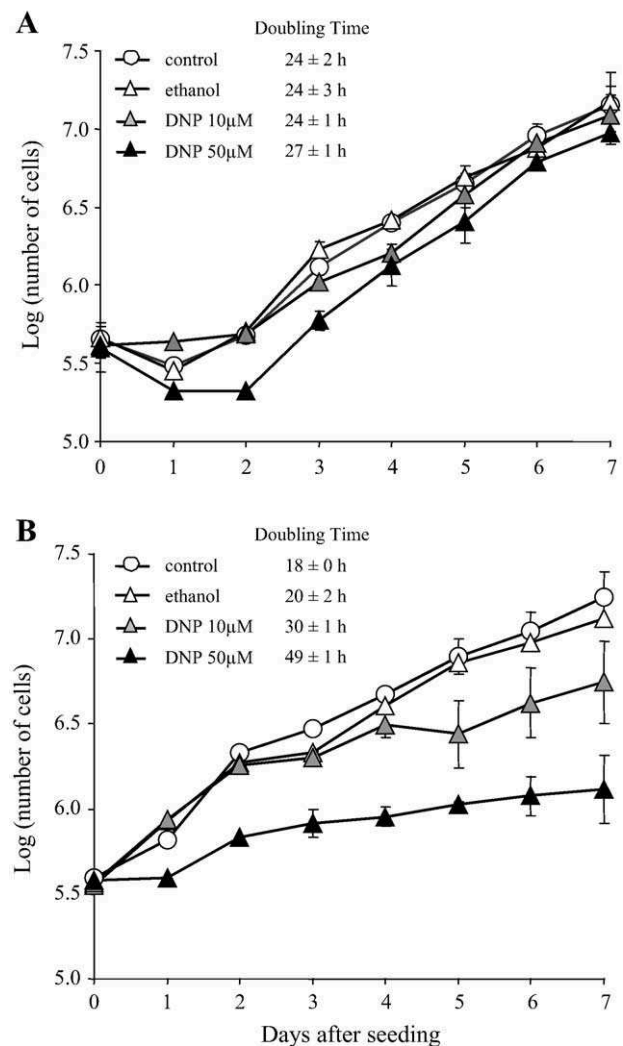


Fig. 2. Determination of cell growth. Cells were cultured for 7 days in control conditions (open circles), or in the presence of ethanol (open triangles), or treated with 10  $\mu$ M DNP (gray triangles) or 50  $\mu$ M DNP (black triangles). Every day, one flask was counted three times for each culture condition. After 7 days, a proliferation curve was drawn for HepG2 cells (A) and 143B TK<sup>-</sup> cells (B) and the doubling time determined for each culture condition with the exponential phase of the curve. Values are expressed as means  $\pm$  S.E.M. for  $n = 2$  independent cell preparations.

glucose consumption, as in glycolysis 1 mol of glucose is converted into 2 mol of lactate. Finally, pyruvate was consumed by 143B.TK<sup>-</sup> cells, except for cells incubated with DNP 50  $\mu$ M, in which case pyruvate was produced in large amounts (Fig. 3F).

### 3.3. Mitochondrial membrane potential

The results shown in Fig. 4 are expressed as the percentage of cell fluorescence in relation to the fluorescence of ethanol control cells. In the two cells lines, mitochondrial membrane potential significantly decreased after cells were grown with DNP 10  $\mu$ M for 3 days (-37% in HepG2 cell line and -23% in 143B TK<sup>-</sup> cell line). When cells were grown in the presence of DNP 50  $\mu$ M, a slight but not statistically significant 24% depolarization was noted in HepG2 cells ( $P = 0.08$ ), whereas a significant 11% increase in fluorescence signal was found in

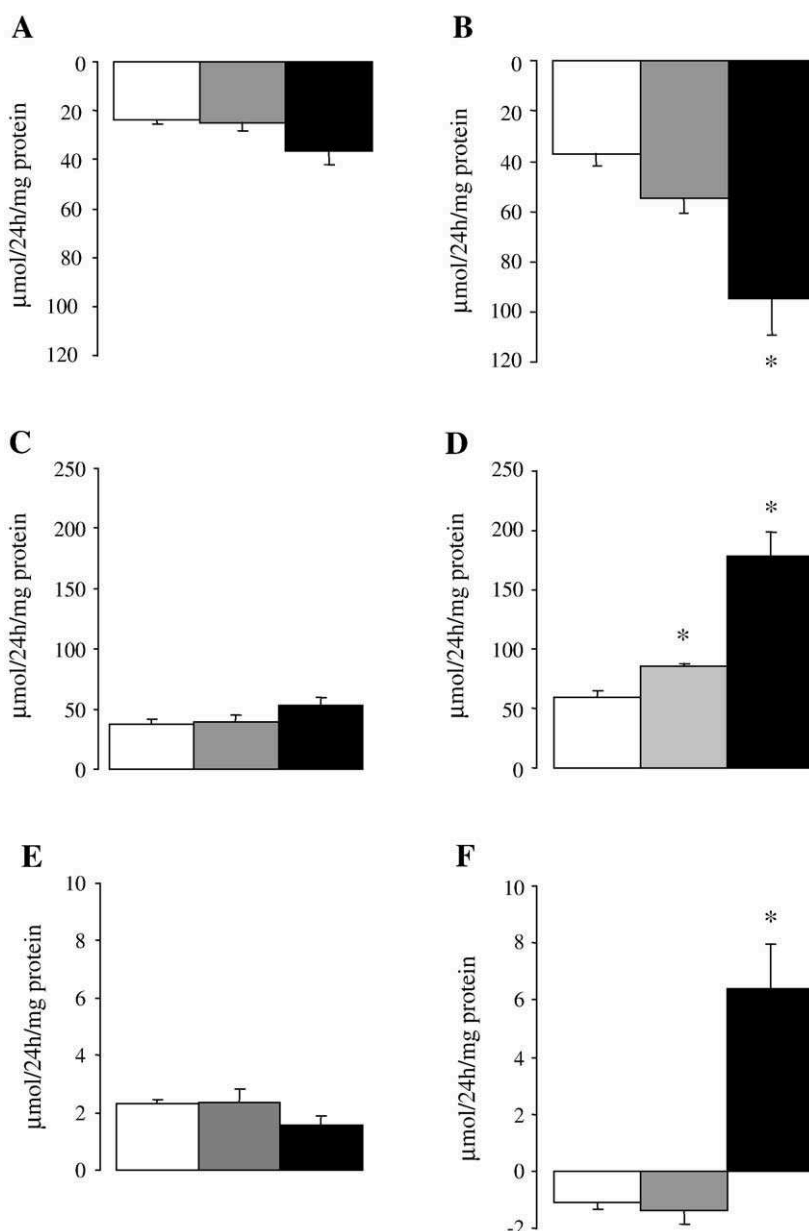


Fig. 3. Measurement of glucose, lactate and pyruvate concentrations. Three days after seeding, supernatant of cells in culture was removed and glucose (panels A and B), lactate (panels C and D) and pyruvate concentrations in media (panels E and F) were measured in both HepG2 (panels A, C and E) and 143B.TK<sup>-</sup> (panels B, D and F) for ethanol control cells (white bars), and for cells cultured in the presence of 10 μM DNP (gray bars) or 50 μM DNP (black bars). Values are expressed as means ± S.E.M.,  $n=5$  per group. \* $P<0.05$  compared with control ethanol.

143B.TK<sup>-</sup> cells ( $P<0.05$ ), suggesting a hyperpolarization of the membrane potential within cells.

#### 3.4. Respiratory parameters of intact cells

The rates of basal endogenous respiration and FCCP-induced maximal respiration were approximately 50% and 75% higher in untreated HepG2 cells than in untreated 143B.TK<sup>-</sup> cells ( $18.0 \pm 1.6$  and  $35.6 \pm 3.5$  natom O/min mg protein in HepG2 cells versus  $12.1 \pm 0.8$  and  $20.3 \pm 1.5$  natom O/min mg protein in 143B.TK<sup>-</sup> cells, respectively). We also noted a higher oligomycin-insensitive respiration rate in HepG2 ( $7.4 \pm 0.8$  natom O/min mg protein,  $P<0.05$ ) than in 143B.TK<sup>-</sup> cells

( $5.3 \pm 0.5$  natom O/min mg protein). However, respiratory control ratio of HepG2 cells was not significantly different from that of 143B.TK<sup>-</sup>, and in the basal state, mitochondria of both cell lines operated at an average of  $56 \pm 4\%$  of maximal respiration.

Table 1 shows the effects of DNP treatment on the rates of basal endogenous respiration, oligomycin-insensitive respiration and FCCP-induced maximal respiration in both HepG2 and 143B TK<sup>-</sup> cell lines. The rate of basal endogenous respiration was significantly increased by approximately 30% in HepG2 cells treated with 50 μM DNP, an effect that was linearly correlated with DNP concentrations ( $R=0.49$ ,  $P<0.05$ ). Similarly, FCCP-induced maximal respiration rates significantly

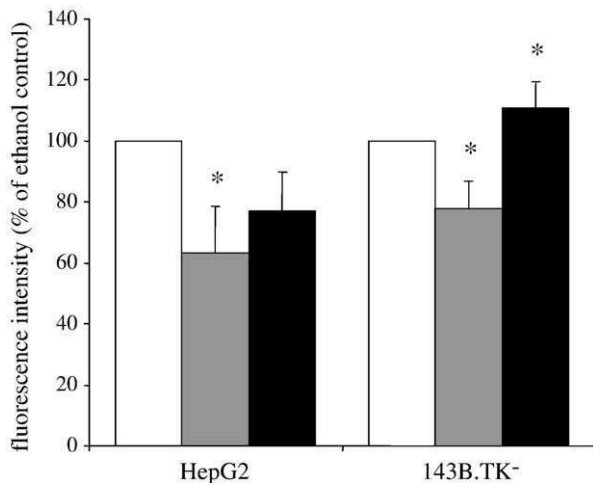


Fig. 4. Determination of mitochondrial membrane potential. Fluorescence of ethanol control (empty bars), DNP 10  $\mu$ M (gray bars) and DNP 50  $\mu$ M (black bars) cells pre-stained with DiOC6 (3) (20 nM) was determined by flow cytometry. Residual fluorescence emitted in the presence of 10  $\mu$ M mCICCP was subtracted from the fluorescence of cells incubated with DiOC6(3) (20 nM) and oligomycin (5  $\mu$ g/ml). Data is expressed as the percentage of fluorescence intensity of ethanol control values and expressed as means $\pm$ S.E.M. for  $n=3$  independent cell preparations measured in duplicate. \* $P<0.05$  compared with ethanol control.

increased in HepG2 cells following 3 days of DNP treatment regardless of the concentration used, suggesting an overall stimulation of HepG2 respiratory capacity in response to DNP-induced mitochondrial uncoupling. Finally, DNP treatment did not significantly increase either the oligomycin-insensitive respiration rate of HepG2 cells nor any of the oxygen consumption rates (basal, oligomycin or FCCP) in 143B.TK<sup>-</sup> cells. In fact, FCCP-uncoupled respiration rate of 143B.TK<sup>-</sup> cells was rather decreased following 3 days of culture with DNP 50  $\mu$ M, at least when compared with cell grown in the presence of 10  $\mu$ M of DNP ( $-38\%$ ,  $P<0.05$ ). Consequently, the respiratory control ratio of 143B.TK<sup>-</sup> cells was lower following

Table 1  
Oxygen consumption rates of control ethanol and dinitrophenol(DNP)-treated cells

Cell lines	Respiratory parameters	Treatments		
		Ethanol	DNP 10 $\mu$ M	DNP 50 $\mu$ M
HepG2	Basal respiration	15.1 $\pm$ 0.7	16.9 $\pm$ 0.7	20.3 $\pm$ 1.5 *
	+oligomycin	6.5 $\pm$ 0.6	7.9 $\pm$ 0.8	8.1 $\pm$ 0.8
	+FCCP	26.6 $\pm$ 2.4	41.4 $\pm$ 3.2 *	44.5 $\pm$ 2.8 *
	RCR	4.9 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 1.0	5.9 $\pm$ 0.5
143B.TK <sup>-</sup>	Basal respiration	9.7 $\pm$ 0.6	11.7 $\pm$ 1.1	10.4 $\pm$ 0.6
	+oligomycin	5.0 $\pm$ 0.4	6.5 $\pm$ 0.7	6.2 $\pm$ 0.3
	+FCCP	21.7 $\pm$ 1.7	30.0 $\pm$ 3.6	17.4 $\pm$ 1.7
	RCR	5.5 $\pm$ 0.9	5.1 $\pm$ 0.7	3.2 $\pm$ 0.4

Oxygen consumption rates were measured by polarography in the basal condition, in the presence of oligomycin (+oligomycin), and after the addition of FCCP (+FCCP). Respiration rates are expressed in natom of oxygen/min mg of protein. Respiratory control ratios (RCR) were calculated as the ratio between FCCP and oligomycin respiration rates, taking into account the myxothiazol rate. For more details see Materials and methods. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. for  $n=5$  independent cell preparations measured in duplicate.

\*  $P<0.05$  compared with ethanol control treatment.

3 days of treatment with DNP 50  $\mu$ M compared with either ethanol control ( $-42\%$ ,  $P<0.05$ ) or 10  $\mu$ M DNP treated cells ( $-37\%$ ,  $P=0.07$ ) (Table 1). In the basal state, we calculated that mitochondria of 143B.TK<sup>-</sup> cells treated with 50  $\mu$ M of DNP operated at  $60\pm 6\%$  of maximal respiration, a mitochondrial respiratory activity slightly higher than that observed in ethanol control ( $43\pm 5\%$ ,  $P=0.07$ ) or 10  $\mu$ M DNP-treated cells ( $42\pm 6\%$ ,  $P=0.05$ ). In contrast, DNP treatment did not significantly alter respiratory control ratios of HepG2 cells (Table 1) nor the proportion of maximal respiratory activity used by mitochondria in intact cells ( $55\pm 3\%$  in ethanol control,  $43\pm 5\%$  in 10  $\mu$ M DNP-treated,  $45\pm 4\%$  in 50  $\mu$ M DNP-treated cells).

It must be emphasized here that all the respiratory parameters above were obtained in the absence of DNP, as cells were harvested and washed with incubation medium without DNP before experimental data were recorded. Hence, these results do reflect a true metabolic adaptation of cells to DNP-induced chronic mitochondrial uncoupling which is distinct from an acute effect of DNP on cell respiration.

### 3.5. Mitochondrial enzyme activities

Table 2 reports the enzymatic activities of citrate synthase and cytochrome *c* oxidase of HepG2 and 143B.TK<sup>-</sup> cells for each experimental condition. Both mitochondrial enzyme activities were not affected by experimental conditions regardless of the cell line used, except for the enzymatic activity of COX, which was significantly increased in HepG2 cells cultured with DNP 50  $\mu$ M ( $P<0.05$ ). Table 2 also shows that the enzymatic activity of complex I in HepG2 cells was unaffected by the experimental conditions.

### 3.6. Expression of ANT3, COXIV, ANT2 and NRF1 genes

In HepG2 cells, 3 days of DNP treatment at 50  $\mu$ M resulted in a marked induction of ANT3 and COXIV expression, whereas no significant change in both ANT2 and NRF1 mRNA levels was detected. Interestingly, a significant increase in COXIV mRNA levels was also detected in HepG2 cells after 3 days of incubation with only 10  $\mu$ M DNP. In 143B.TK<sup>-</sup> cells, none of the expression of the four genes considered was significantly affected following 3 days of DNP treatment, regardless of the concentration used (Table 3).

Table 2  
Enzymatic measurements of cytochrome *c* oxidase, citrate synthase and complex I activities

Cell lines	Enzymes	Treatments		
		Ethanol	DNP 10 $\mu$ M	DNP 50 $\mu$ M
HepG2	Cytochrome <i>c</i> oxidase	37.3 $\pm$ 6.9	38.1 $\pm$ 6.9	51.4 $\pm$ 3.3 *
	Citrate synthase	305.4 $\pm$ 14.4	294.2 $\pm$ 17.8	319.2 $\pm$ 32.2
	Complex I	11.0 $\pm$ 3.2	5.3 $\pm$ 0.6	6.2 $\pm$ 2.5
143B.TK <sup>-</sup>	Cytochrome <i>c</i> oxidase	20.2 $\pm$ 4.2	26.1 $\pm$ 2.3	21.6 $\pm$ 1.4
	Citrate synthase	200.7 $\pm$ 36.1	238.0 $\pm$ 20.7	160.6 $\pm$ 23.3

Cytochrome *c* oxidase, citrate synthase and complex I activities were determined by enzymatic measurements. Results are expressed in nmol/min mg of protein.

\*  $P<0.05$  compared with ethanol control treatment.

Table 3  
Quantification of *COXIV*, *ANT3*, *ANT2* and *NRF1* transcript levels

Cell lines	Genes	Treatments		
		Ethanol	DNP 10 $\mu$ M	DNP 50 $\mu$ M
HepG2	<i>COXIV</i>	0.09 $\pm$ 0.02	0.19 $\pm$ 0.02 *	0.18 $\pm$ 0.04 *
	<i>ANT3</i>	0.27 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.06 *
	<i>ANT2</i>	0.29 $\pm$ 0.01	0.29 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.01
	<i>NRF1</i>	0.0031 $\pm$ 0.0002	0.0050 $\pm$ 0.0003	0.0020 $\pm$ 0.0010
143B.TK <sup>-</sup>	<i>COXIV</i>	0.08 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.01	0.08 $\pm$ 0.0
	<i>ANT3</i>	0.06 $\pm$ 0.00	0.06 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
	<i>ANT2</i>	0.63 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.02
	<i>NRF1</i>	0.0062 $\pm$ 0.0010	0.0053 $\pm$ 0.0021	0.0041 $\pm$ 0.0022

Total RNA was extracted from cells following 3 days of culture in the presence of ethanol, 10  $\mu$ M DNP or 50  $\mu$ M DNP. After reverse transcription, quantitative RT PCR was performed to determine the level of gene transcripts as described in Materials and methods. Transcript levels were standardized with mRNA level of *ARP* gene. Values are expressed as means $\pm$ S.E.M. for  $n=3$  independent cell preparations measured in duplicate.

\*  $P<0.05$  compared with ethanol control.

### 3.7. Expression of *COXIV* protein

In HepG2 cells, the level of *COXIV* protein was significantly increased in HepG2 cells cultured with DNP 50  $\mu$ M but not with DNP 10  $\mu$ M (Fig. 5). In contrast, DNP treatment (10 or 50  $\mu$ M) did not succeed in elevating *COX* protein level in 143B.TK<sup>-</sup> cells (data not shown).

## 4. Discussion

The current work provides evidence that chronic mitochondrial uncoupling may constitute an internal bioenergetic signal that ultimately drives metabolic adaptation of HepG2 cells towards oxidative metabolism.

Indeed, we found that 3 days of DNP-induced mitochondrial uncoupling in HepG2 induced an increase in the rates of basal endogenous and FCCP-induced maximal oxygen consumption (Table 1), and in cytochrome *c* oxidase activity (Table 2). Additionally, the unchanged activity of citrate synthase suggests that the increased respiratory activity of uncoupled HepG2 cells did not result from an increased mitochondrial content, as the change in the activity of this marker enzyme of the citric acid cycle is widely accepted as being reliable and a valid indicator of changes in mitochondrial volume density [25]. This increased oxidative activity was associated with an upregulation of *COXIV* and *ANT3* gene expression (Table 3), two nuclear genes that encode mitochondrial proteins involved in oxidative phosphorylation processes. Interestingly, the *COXIV* transcript level has been previously reported to increase in 3T3-L1 adipocytes after 10 h of incubation with 150  $\mu$ M DNP or in mature adipocytes from transgenic mice expressing UCP1 in their white adipose tissue [20]. Furthermore, the increased *COXIV* transcript levels reported herein was associated with an increased *COXIV* protein expression (Fig. 5) showing that the reported increase in cytochrome *c* oxidase activity involves increased enzyme content. Villani et al. [26] have shown that there is a low reserve of *COX* activity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types, including HepG2 cells.

This suggests that the in vivo control of respiration by *COX* is much tighter than has been assumed on the basis of experiments carried out on isolated mitochondria. In this regard, the present increase in the activity of *COX* has some significance for the overall capacity of mitochondrial oxidative phosphorylation in uncoupled HepG2 cells. Furthermore, the increase in the rate of FCCP-induced maximal oxygen consumption strongly suggests that other mitochondrial sites within the substrate oxidation pathways (e.g., respiratory chain complexes other than complex I (see Table 2), substrate dehydrogenases, substrate transport systems) are involved in DNP-induced metabolic adaptation of HepG2 cells. All these data clearly demonstrates that HepG2 cells develop their mitochondrial oxidative capacity in response to chronic mitochondrial uncoupling, a metabolic adaptation that allows HepG2 cells to produce energy efficiently to keep on growing (Fig. 2A), without the need to increase glycolytic activity (Fig. 3A and C).

As mentioned above, glucose consumption was not significantly changed in HepG2 cells following 3 days of DNP-induced mitochondrial uncoupling. However, mitochondrial membrane potential was depressed in uncoupled cells (Fig. 4), a situation where mitochondria, and by extension cells, should increase their substrate consumption. This relative discrepancy results from our choice to focus the present study on the effects of respiratory uncoupling upon glucose and glycolytic byproducts (lactate and pyruvate) rather than on oxidative substrate, namely glutamine that was also present in the culture media (see Materials and methods section). For this reason, the possibility cannot be excluded that glutamine, for instance, was indeed preferentially oxidized by uncoupled cells. This would be in line with previous observations showing that overexpression of uncoupling protein in cultured cells favours oxidative substrate (e.g. fatty acid) versus glucose oxidation [14,15]. Although we cannot substantiate this hypothesis, it should be noted that the present study clearly shows that chronic respiratory uncoupling

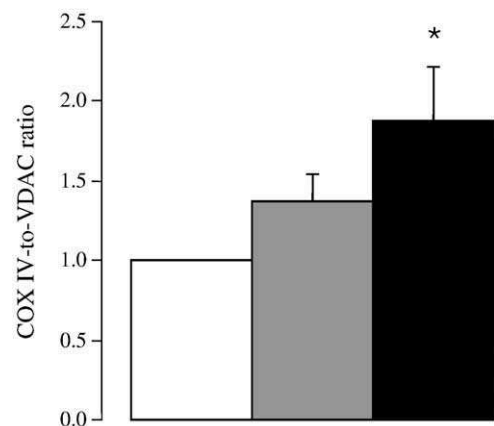


Fig. 5. Expression of *COXIV* protein in HepG2 cells. HepG2 cells were cultured in the presence of ethanol (white bar), 10  $\mu$ M DNP (gray bar) or 50  $\mu$ M DNP (black bar) for 3 days. Cellular extracts were subjected to Western blotting using *VDAC* and *COXIV* antibodies followed by densitometric quantitation of both proteins. Values are expressed relative to ethanol control ratio as means $\pm$ S.E.M. for  $n=4$  independent cell preparations measured in duplicate. \* $P<0.05$  compared with ethanol control.

of HepG2 cells by dinitrophenol leads to compensatory up-regulation of mitochondrial oxidative capacity.

Contrary to HepG2 cells, 3 days of DNP treatment did not change the oxidative capacity of 143B.TK<sup>-</sup> cells, instead it increased their glycolytic metabolism. Thus, in 143B.TK<sup>-</sup> cell lines, DNP treatment significantly increased glucose consumption (Fig. 3B) and lactate production (Fig. 3D) in a dose dependent manner. The strong positive correlation between glucose consumption and lactate production with a ratio lactate/glucose of almost 2:1 (measured by the slope of the regression line equation), indicating that most of the glucose uptake into uncoupled 143B.TK<sup>-</sup> cells is reduced down the glycolytic pathway to produce energy. Nevertheless, despite this stimulation of glycolytic metabolism, the growth rate of 143B.TK<sup>-</sup> cells was very sensitive to mitochondrial uncoupling, being significantly reduced by DNP treatment (Fig. 2B). Interestingly, treatment of 143B.TK<sup>-</sup> cells with 50  $\mu$ M DNP induced a slight but significant increase in the mitochondrial membrane potential which corresponded with a large stimulation of glycolysis and a drastic slow proliferation rate downwards. These results would be consistent with the fact that glycolytic ATP, the principal source of energy in 143B TK<sup>-</sup> cells, may supply the energy for maintaining mitochondrial membrane potential and cell proliferation [27]. In the presence of 50  $\mu$ M DNP, glycolysis may therefore not succeed in producing enough ATP to allow 143B.TK<sup>-</sup> cells to grow efficiently while maintaining their mitochondrial membrane potential. Compared to HepG2 cell, our results show that the high

sensitivity to DNP-induced uncoupling in 143B.TK<sup>-</sup> cells may be linked to their inability to develop mitochondrial energetic pathway to synthesize ATP.

The dual genomic organization of the mitochondrial oxidative phosphorylation complexes, which includes cytochrome *c* oxidase, implies that any adaptive change in mitochondrial characteristics must involve the coordinated expression of genes originating from both nuclear and mitochondrial genomes [28]. Therefore, the reported adaptive increase in mitochondrial oxidative activity of HepG2 in response to chronic respiratory uncoupling strongly suggests that a signaling pathway must originate from mitochondria, followed by the triggering of specialized transcription factors that initiate a coordinated increase in nuclear respiratory gene expressions (Fig. 6). Among the transcription factors, nuclear receptors and coactivators that regulate the expression of nuclear genes encoding mitochondrial proteins, NRF1 is the only one for which expression had been studied in response to respiratory uncoupling so far [19,20]. These studies reported that respiratory uncoupling increased the expression of NRF1 in HeLa cells 16 h after inducible expression of UCP1 [19] or in 3T3-L1 adipocytes incubated for 10 h with 150  $\mu$ M DNP [20]. However, no significant change on NRF1 mRNA levels was observed in mature adipocytes isolated from 7-month-old transgenic mice expressing ectopic UCP1 in their white fat [20]. As far as our study is concerned, the levels of NRF1 mRNA were not significantly changed in HepG2 cells incubated for 3 days with either 10  $\mu$ M or 50  $\mu$ M DNP, despite an adaptive

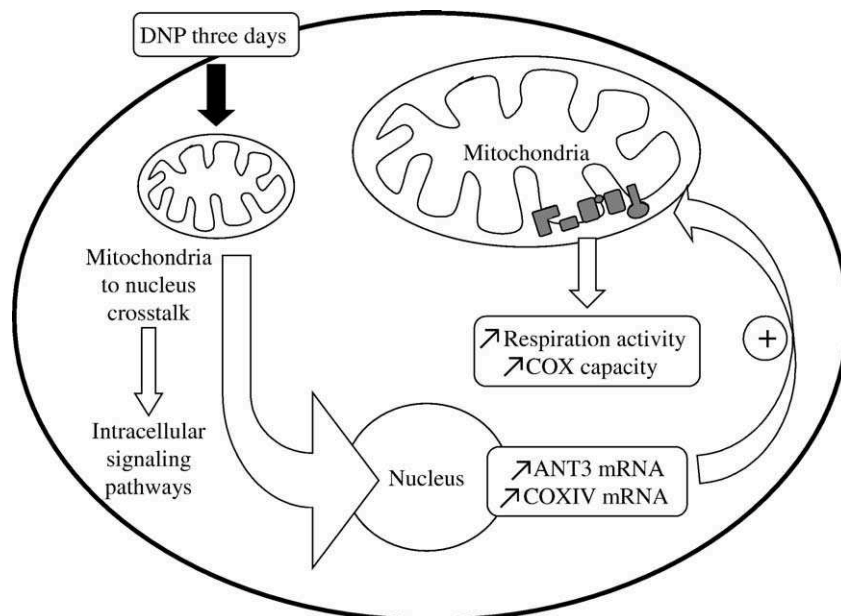


Fig. 6. Schematic diagram of the effect of chronic respiratory uncoupling on HepG2 cell metabolism. Three days of respiratory uncoupling induced by dinitrophenol (DNP) upregulates the expression of *COXIV* and *ANT3* genes and *COXIV* protein leading to increased mitochondrial oxidative activity in HepG2 cells. This metabolic adaptation of uncoupled HepG2 cells results from mitochondrial cross-talk with the expression of nuclear respiratory genes, implies that intracellular signaling pathway(s), followed by activation of specialized transcription factors initiates a coordinated expression of nuclear respiratory genes. At the onset of respiratory uncoupling, at least two rapid events have been described that could form part of the initial signaling process leading to activation of various transcription pathways: (1) lower cellular energy charge and the attendant increase in cytosolic AMP/ATP ratio [31,32] and (2) an increase in cytosolic calcium concentration [12,33]. The former event is known to activate AMP-activated protein kinase [31,34,35], and the second event can activate a number of kinases (e.g. calcium/calmodulin-dependent protein kinases, conventional protein kinase C) and phosphatases (e.g., calcineurine). These events would ultimately alter the expression of transcription factors and nuclear coactivators toward an adjustment in mitochondrial metabolism within cells [36–38].

increase in mitochondrial respiratory capacity (present study). The relative discrepancy between these studies may simply reveal the early molecular event that leads to mitochondrial differentiation or proliferation in response to changes in cellular bioenergetics. The hypothesis postulates that respiratory uncoupling triggers the immediate expression of NRF1 (within a few hours), followed by the up-regulation of NRF1-sensitive genes, such as  $\alpha$ -aminolevulinatase synthase [19], cytochrome *c* and other nuclear genes required for respiratory chain expression and function [29]. This would contribute to the cellular energy metabolism adaptation and subsequent normalization of the initial signaling event that had induced NRF1 expression. Additionally, the increased COXIV transcript levels found in uncoupled cells (present study, see also [20]), a gene that is not sensitive to NRF1 [29,30], further suggests that other transcription factors, in particular NRF2 in this case, are likely to be involved in the stimulation of mitochondrial differentiation by respiratory uncoupling. We are currently working on this hypothesis in order to clarify whether the mitochondrial respiratory adaptation reported herein could be related to the early expression of NRF1 and other transcriptional activators (NRF2, mtTFA) and coactivators (PGC1, PRC). Finally, the present study provides evidence that modifications in mitochondrial bioenergetics influences the expression of nuclear genes which would in turn regulate mitochondrial characteristics and therefore cellular metabolism, at least in HepG2 (Fig. 6).

### Acknowledgements

V.D. was supported by a grant from “Angers agglomération”. D.R. was supported by a grant from “conseil général de Maine et Loire”. We thank Jocelyne Hodbert for technical assistance, and Miriam Ryan for reviewing the English manuscript.

### References

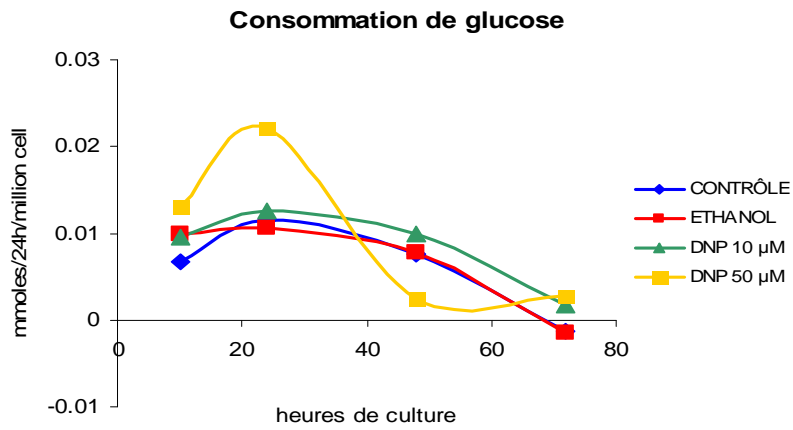
- [1] J.A. Stuart, S. Cadenas, M.B. Jekabsons, D. Roussel, M.D. Brand, Mitochondrial proton leak and the uncoupling protein 1 homologues, *Biochim. Biophys. Acta* 1504 (2001) 144–158.
- [2] D.F.S. Rolfe, J.M.B. Newman, J.A. Buckingham, M.G. Clark, M.D. Brand, Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR, *Am. J. Physiol.* 276 (1999) C692–C699.
- [3] S. Krauss, C.Y. Zhang, B.B. Lowell, A significant portion of mitochondrial proton leak in intact thymocytes depends on expression of UCP2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99 (2002) 118–122.
- [4] J.A. Harper, K. Dickinson, M.D. Brand, Mitochondrial uncoupling as a target for drug development for the treatment of obesity, *Obes. Rev.* 2 (2001) 255–265.
- [5] K.S. Echtay, D. Roussel, J. St-Pierre, M.B. Jekabsons, S. Cadenas, J.A. Stuart, J.A. Harper, S.J. Roebuck, A. Morrison, S. Pickering, J.C. Clapham, M.D. Brand, Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins, *Nature* 415 (2002) 96–99.
- [6] A. Nègre-Salvayre, C. Hirtz, G. Carrera, R. Cazenave, M. Trolly, R. Salvayre, L. Pénicaud, L. Casteilla, A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation, *FASEB J.* 11 (1997) 809–815.
- [7] A.J. Vidal-Puig, D. Grujic, C.Y. Zhang, T. Hagen, O. Boss, Y. Ido, A. Szczepanik, J. Wade, V. Mootha, R. Cortright, D.M. Muoio, B.B. Lowell, Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 16258–16266.
- [8] D. Arsenijevic, H. Onuma, C. Pecqueur, S. Raimbault, B.S. Manning, B. Miroux, E. Couplan, M.C. Alves-Guerra, M. Goubern, R. Surwit, F. Bouillaud, D. Richard, S. Collins, D. Ricquier, Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production, *Nat. Genet.* 26 (2000) 435–439.
- [9] C. Bernal-Mizrachi, S. Weng, B. Li, L.A. Nolte, C. Feng, T. Coleman, J.O. Holloszy, C.F. Semenkovich, Respiratory uncoupling lowers blood pressure through a leptin-dependent mechanism in genetically obese mice, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 22 (2002) 961–968.
- [10] J. Blanc, M.C. Alves-Guerra, B. Esposito, S. Rousset, P. Gourdy, D. Ricquier, A. Tedgui, B. Miroux, Z. Mallat, Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis, *Circulation* 107 (2003) 388–390.
- [11] M. Brownlee, Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature* 414 (2001) 813–820.
- [12] D. Hudman, R.D. Rainbow, C.L. Lawrence, N.B. Standen, The origin of calcium overload in rat cardiac myocytes following metabolic inhibition with 2,4-dinitrophenol, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34 (2002) 859–871.
- [13] Z.A. Khayat, T. Tsakiridis, A. Ueyama, R. Somwar, Y. Ebina, A. Klip, Rapid stimulation of glucose transport by mitochondrial uncoupling depends in part on cytosolic  $Ca^{2+}$  and cPKC, *Am. J. Physiol.* 275 (1998) C1487–C1497.
- [14] C. Garcia-Martinez, B. Sibille, G. Solanes, C. Darimont, K. Macé, F. Villarroya, A.M. Gomez-Foix, Overexpression of UCP3 in cultured human muscle lowers mitochondrial membrane potential, raises ATP/ADP ratio, and favors fatty acid vs. glucose oxidation, *FASEB J.* 15 (2001) 2033–2035.
- [15] Y. Hong, B.D. Fink, J.S. Dillon, W.I. Sivitz, Effects of adenoviral overexpression of uncoupling protein-2 and -3 on mitochondrial respiration in insulinoma cells, *Endocrinology* 142 (2001) 249–256.
- [16] M. Rossmesl, I. Syrový, F. Baumruk, P. Flachs, P. Janovska, J. Kopecky, Decreased fatty acid synthesis due to mitochondrial uncoupling in adipose tissue, *FASEB J.* 14 (2000) 1793–1800.
- [17] C. Huppertz, B.M. Fischer, Y.B. Kim, K. Kotani, A. Vidal-Puig, L.J. Sliker, K.W. Sloop, B.B. Lowell, B.B. Kahn, Uncoupling protein 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 12520–12529.
- [18] C.Y. Zhang, G. Baffy, P. Perret, S. Krauss, O. Peroni, D. Grujic, T. Hagen, A.J. Vidal-Puig, O. Boss, Y.B. Kim, X.X. Zheng, M.B. Wheeler, G.I. Shulman, C.B. Chan, B.B. Lowell, Uncoupling protein-2 negatively regulates insulin secretion and is a major link between obesity, beta cell dysfunction, and type 2 diabetes, *Cell* 105 (2001) 745–755.
- [19] B. Li, J.O. Holloszy, C.F. Semenkovich, Respiratory uncoupling induces  $\alpha$ -aminolevulinatase synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells, *J. Biol. Chem.* 274 (1999) 17534–17540.
- [20] M. Rossmesl, G. Barbatelli, P. Flachs, P. Brauner, M.C. Zingaretti, M. Marelli, P. Janovska, M. Horakova, I. Syrový, S. Cinti, J. Kopecky, Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo, *Eur. J. Biochem.* 269 (2002) 19–28.
- [21] E. Couplan, C. Gelly, M. Goubern, C. Fleury, B. Quesson, M. Silberberg, E. Thiaudière, P. Mateo, M. Lonchamp, N. Levens, C. de Montrion, S. Ortmann, S. Klaus, M. Gonzalez-Barroso, A.M. Cassard-Doulcier, D. Ricquier, A.X. Bigard, P. Dolez, F. Bouillaud, High level of uncoupling protein 1 expression in muscle of transgenic mice selectively affects muscles at rest and decreases their IIB fiber content, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 43079–43088.
- [22] M.Y. Moridani, A. Siraki, P.J. O’Brien, Quantitative structure toxicity relationships for phenols in isolated rat hepatocytes, *Chem.-Biol. Interact.* 145 (2003) 213–223.
- [23] S. Horie, M. Morrison, Cytochrome c oxidase components. I. Purification and properties, *J. Biol. Chem.* 238 (1963) 1855–1860.
- [24] A.V. Kuznetsov, E. Gnaiger, Laboratory Protocol. Complex I (NADH: Ubiquinone oxidoreductase, EC 1.6.5.3) mitochondrial membrane enzyme, *MitNet* 8.15 (2003) 1–8.
- [25] J.O. Holloszy, E.F. Coyle, Adaptations of skeletal muscle to endurance

- exercise and their metabolic consequences, *J. Appl. Physiol.* 56 (1984) 831–838.
- [26] G. Villani, M. Greco, S. Papa, G. Attardi, Low reserve of cytochrome *c* oxidase capacity in vivo in the respiratory chain of a variety of human cell types, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 31829–31836.
- [27] A. Chevrollier, D. Loiseau, F. Gautier, Y. Malthiery, G. Stepien, ANT2 expression under hypoxic conditions produces opposite cell-cycle behavior in 143B and HepG2 cancer cells, *Mol. Carcinog.* 42 (2005) 1–8.
- [28] C.D. Moyes, D.A. Hood, Origins and consequences of mitochondrial variation in vertebrate muscle, *Annu. Rev. Physiol.* 65 (2003) 177–201.
- [29] R.C. Scarpulla, Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis, *Biochim. Biophys. Acta* 1576 (2002) 1–14.
- [30] K. Baar, Z. Song, C.F. Semenkovich, T.E. Jones, D.H. Han, L.A. Nolte, E. O. Ojuka, M. Chen, J.O. Holloszy, Skeletal muscle overexpression of nuclear respiratory factor 1 increases glucose transport capacity, *FASEB J.* 17 (2003) 1666–1673.
- [31] O. Matejkova, K.J. Mustard, J. Sponarova, P. Flachs, M. Rossmeisl, I. Miksik, M. Thomason-Hughes, D.G. Hardie, J. Kopecky, Possible involvement of AMP-activated protein kinase in obesity resistance induced by respiratory uncoupling in white fat, *FEBS Lett.* 569 (2004) 245–248.
- [32] G. Cheng, C.C. Polito, J.K. Haines, S.F. Shafizadeh, R.N. Fiorini, X. Zhou, M.G. Schmidt, K.D. Chavin, Decrease of intracellular ATP content downregulated UCP2 expression in mouse hepatocytes, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308 (2003) 573–580.
- [33] C.J. Lynch, R.C. Deth, Release of a common source of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  by alpha-adrenergic agonists and dinitrophenol in rat liver slices, *Pharmacology* 28 (1984) 74–85.
- [34] T. Hayashi, M.F. Hirshman, N. Fujii, S.A. Habinowski, L.A. Witters, L.J. Goodyear, Metabolic stress and altered glucose transport activation of AMP-activated protein kinase as a unifying coupling mechanism, *Diabetes* 49 (2000) 527–531.
- [35] N. Patel, Z.A. Khayat, N.B. Ruderman, A. Klip, Dissociation of 5( AMP-activated protein kinase activation and glucose uptake stimulation by mitochondrial uncoupling and hyperosmolar stress : differential sensitivities to intracellular calcium and protein kinase C inhibition, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 (2001) 1066–1070.
- [36] W.W. Winder, Energy-sensing and signaling by AMP-activated protein kinase in skeletal muscle, *J. Appl. Physiol.* 91 (2001) 1017–1028.
- [37] E.O. Ojuka, T.E. Jones, D.H. Han, M. Chen, J.O. Holloszy, Raising  $\text{Ca}^{2+}$  in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle, *FASEB J.* 17 (2003) 675–681.
- [38] D. Freyssenet, I. Irrcher, M.K. Connor, M. Di Cario, D.A. Hood, Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells, *Am. J. Physiol.* 286 (2004) C1053–C1061.

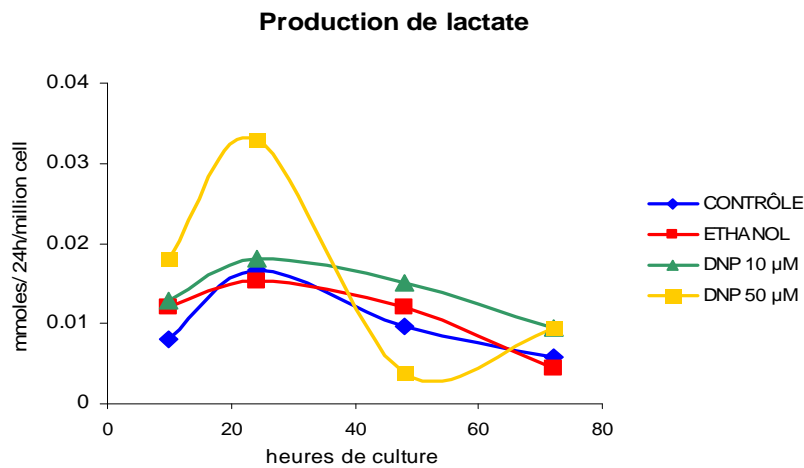
## Résultats complémentaires de l'article 1.

Figure 22.

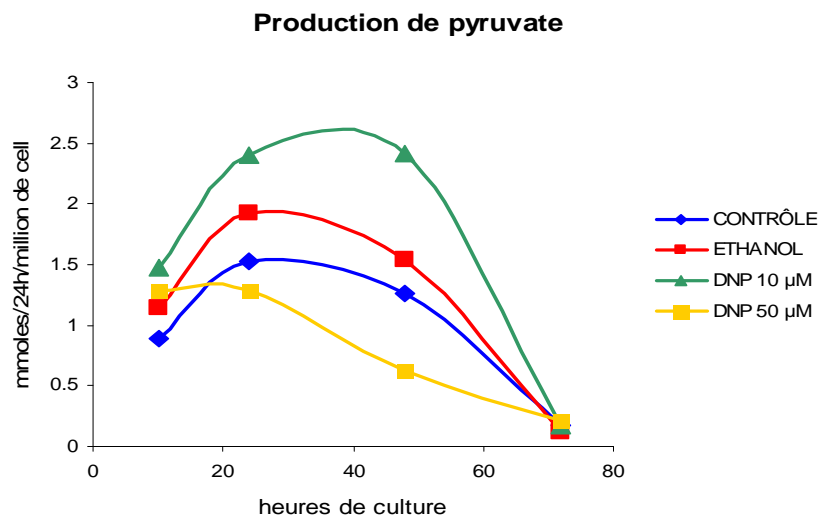
A.



B.



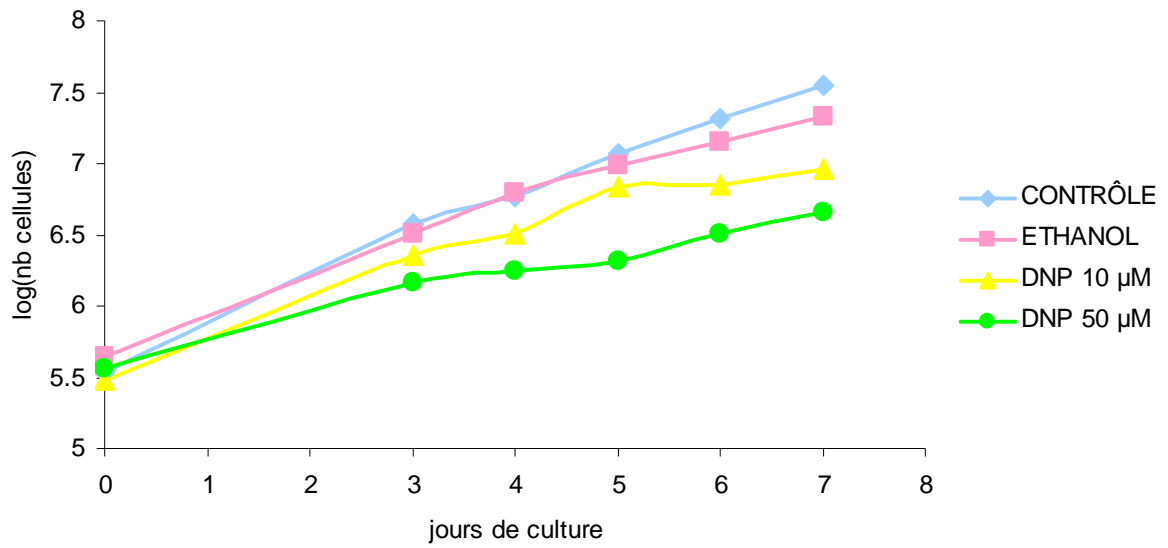
C.



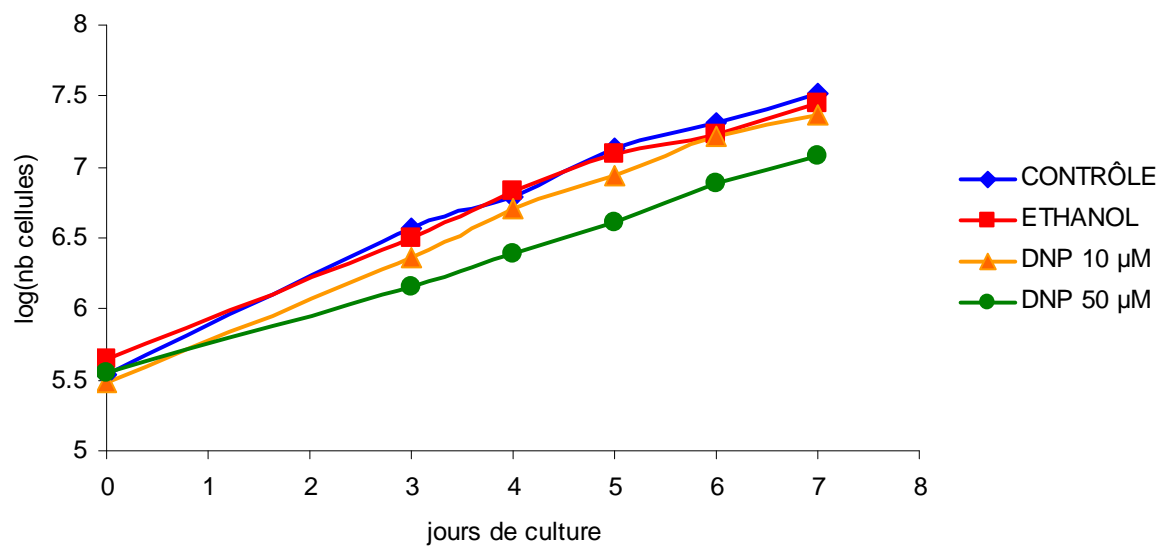


**Figure 23.**

**A.**



**B.**



**C.**

temps de doublement	avec DNP	sans DNP
CONTRÔLE	22.83	22.83
ETHANOL	22.79	22.79
DNP 10 µM	32.35	21.50
DNP 50 µM	46.69	23.51

## **Résultats complémentaires de l'article n°1.**

**Figure 22: Consommation de glucose, production de lactate et de pyruvate dans les cellules HepG2 après 10 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures de traitement par 10 ou 50  $\mu$ M de DNP.**

Les concentrations en glucose et en lactate ont été dosées dans le milieu de culture des cellules HepG2 traitées par DNP (10 et 50  $\mu$ M) pendant différents temps (10 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures) par spectrophotométrie en utilisant les kits de dosages commercialisés par *Boeringher, Mannheim, Allemagne*. La concentration en pyruvate a été dosée en mesurant la consommation en NADH dans l'échantillon par l'enzyme lactate deshydrogénase. Pour cela, l'absorbance des échantillons a été lue à 340 nm (longueur d'ondes d'absorption du NADH). Les résultats ont été rapportés à la quantité de cellules présentes dans les boîtes de culture ainsi qu'au temps de culture.

**Figure 23 : Courbes de croissance et temps de doublement des cellules 143B cultivées en présence de 10 et 50  $\mu$ M de DNP.**

Les cellules 143B ont étéensemencées à J0 à une concentration de 0,3 million de cellules par flask de 75 cm<sup>2</sup>. De J0 à J3, les cellules ont été cultivées en milieu contrôle ou avec de l'éthanol (solvant du DNP) ou présence de différentes concentrations de DNP. A J3, soit le milieu est remplacé par le même milieu que de J0 à J3 (figure A : contrôle, éthanol, DNP 10  $\mu$ M ou DNP 50  $\mu$ M) ou par du milieu contrôle (figure B). De J4 à J7, les milieux sont renouvelés chaque jour. Les temps de doublement ont été calculés conformément à la méthode décrite dans la partie matériel et méthodes de l'article. Chaque jour, trois comptages indépendants ont été réalisés pour chaque condition de culture.

## **Résultats et discussion de l'article n°1.**

Dans cette étude, nous montrons que les cellules HepG2, soumises à un stress mitochondrial (découplage chronique par 50  $\mu$ M de DNP), développent leur métabolisme oxydatif mitochondrial pour pallier la diminution d'efficacité de synthèse d'ATP induit par le découplage sans stimulation visible de la glycolyse après 72 heures de culture (consommation de glucose et production de lactate identique aux cellules contrôles). Il faut noter cependant que lorsqu'on mesure ces paramètres en cinétique, après 10 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures de culture en présence de DNP (figure 22), on observe un pic de consommation de glucose et de production de lactate après 24 heures de découplage mitochondrial dans les cellules HepG2, la production de pyruvate est, quant à elle, inférieure dans les cellules traitées par 50  $\mu$ M de DNP par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats nous laissent penser que la glycolyse est stimulée de manière précoce dans les cellules HepG2 traitées par 50  $\mu$ M de DNP. Après 3 jours de traitement, une stimulation de la capacité respiratoire mitochondriale semble se produire via une activation de la transcription de gènes nucléaires codant pour des protéines importantes pour le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale (ANT3 et COXIV). Cette augmentation des transcrits COXIV est corrélée, pour les cellules traitées par la plus forte dose de DNP avec une augmentation de la quantité de protéine COXIV ainsi qu'avec une augmentation de l'activité de la COX. Pour 10  $\mu$ M de DNP en revanche, bien que la quantité de transcrits COXIV soit significativement augmentée par rapport aux cellules contrôles, le taux de protéines COXIV n'est que faiblement augmenté (non significatif,  $p=0.08$ ) et l'activité COX est inchangée par rapport aux cellules contrôles. En outre, dans les cellules HepG2 traitées par 10  $\mu$ M de DNP, le potentiel membranaire mitochondrial est inférieur à celui des cellules contrôles, ce qui tend à prouver que la stimulation du métabolisme oxydatif dans ces cellules ne parvient pas à compenser totalement le découplage induit par le DNP. De même, la glycolyse n'est pas stimulée par 10  $\mu$ M de DNP dans les cellules HepG2. Les cellules traitées par une dose plus forte de DNP (50  $\mu$ M) sont, quant à elle, capables de compenser totalement le découplage mitochondrial par une stimulation de l'activité ainsi que de la quantité de la cytochrome c oxydase ainsi que de l'ANT3. Nous émettons donc l'hypothèse que, dans ces cellules, le dysfonctionnement mitochondrial induit par le traitement chronique par DNP entraîne la mise en place d'un dialogue rétrograde entre la mitochondrie et le noyau ayant pour but d'activer la transcription de gènes OXPHOS codés par le génome nucléaire permettant le développement du métabolisme oxydatif.

Lorsque cette étude a été réalisée, les facteurs du dialogue rétrograde mitochondrie/noyau étaient très peu connus ((Biswas *et al.*, 1999, Butow et Avadhani, 2004, Erol, 2005,

Giannattasio *et al.*, 2005). Depuis, ce dialogue a été très étudié (Lim *et al.*, 2006, Liu et Butow, 2006, Park *et al.*, 2006, Rohas *et al.*, 2007, Schieke et Finkel, 2006, Schroeder *et al.*, 2007) et plusieurs protéines y participant ont été identifiées. Ainsi, Rohas *et al.* (2007) ont récemment étudié l'impact du traitement par FCCP (50  $\mu$ M et 200  $\mu$ M) pendant différents temps (16 heures, 24 heures et 72 heures) sur le métabolisme de fibroblastes en culture. Les auteurs ont démontré que suite à un découplage chronique mitochondrial, un mécanisme compensateur impliquant PGC-1 $\alpha$  est mis en place et permet ainsi de limiter la toxicité du découplage. Ainsi, après 16h de découplage, les transcrits des gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (COX<sub>II</sub>, F<sub>1</sub> $\beta$ ATPase et cytochrome c) ainsi que le facteur de biogénèse mitochondrial NRF1 étaient augmentés dans les cellules découplées. L'induction de la transcription de ces gènes nécessite la mise en place d'un signal de dysfonctionnement initié par la mitochondrie entraînant une sortie de calcium du réticulum endoplasmique. Cette augmentation de la concentration cytosolique en calcium est indispensable à la cascade de signalisation et permet à la fois l'activation de la voie CREB/TORC (Transducer of Regulated CREB Proteins) ainsi que de l'AMPK, ces deux voies aboutissant à l'augmentation de la transcription de PGC-1 $\alpha$  et de ses cibles en aval de la cascade. Le découplage mitochondrial aboutit donc dans ce modèle à une stimulation de la biogénèse mitochondriale dès 16 heures de traitement par FCCP.

Dans notre modèle, le découplage induit pendant 3 jours par 10 à 50  $\mu$ M de DNP sur les cellules HepG2 ne semble pas entraîner d'augmentation de la masse mitochondriale. En effet, nous n'avons pas observé d'augmentation de la transcription de NRF1, un facteur important impliqué dans la stimulation de la biogénèse mitochondriale ni de variation de l'activité enzymatique de la citrate synthase, une enzyme matricielle souvent utilisée comme marqueur de la masse mitochondriale. De même, nous n'avons pas observé de variation de la quantité de VDAC (porine), protéine mitochondriale. Un mécanisme tel que celui évoqué par Rohas *et al.* impliquant PGC-1 $\alpha$  ne semble donc pas intervenir dans notre modèle. D'autres études ont montré une augmentation de transcription du facteur NRF1 suite à l'induction d'un découplage mitochondrial (Li, B. *et al.*, 1999, Rossmesl *et al.*, 2002). Cependant, dans toutes ces études, le temps de découplage ne dépasse pas 16 heures, nous ne pouvons donc pas exclure, dans notre modèle, une augmentation précoce de la transcription de NRF1 qui n'apparaît plus après trois jours de culture, la stimulation des gènes en aval (tels que les gènes OXPHOS) ayant déjà eu lieu. De plus, la transcription du gène nucléaire COX<sub>IV</sub> (que nous trouvons stimulée dans notre modèle) est sous dépendance, non pas de NRF1 mais de NRF2 (GABP), un autre facteur de biogénèse mitochondriale possédant des sites de fixation dans le

promoteur de différents gènes OXPHOS (COX IV, COXVb ou ATP synthase  $\beta$  par exemple). Dans notre système, il ne semble pas se produire une activation de la biogénèse mitochondriale globale (comme retrouvé dans les études de Li, B. *et al.*, 1999, Rossmeis *et al.*, 2002 et Rohas *et al.*, 2007) mais plutôt une stimulation spécifique des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire (COXIV et ANT3) afin de compenser le dysfonctionnement mitochondrial induit par le DNP. Cette différence peut peut-être s'expliquer par le fait que les doses de DNP utilisées dans notre modèle reflètent un découplage modéré (mild uncoupling) alors que les doses utilisées dans ces études sont supérieures à toutes les doses décrites comme dissipant totalement le gradient de protons (souvent 1 à 5  $\mu$ M de FCCP, Johnson-Cadwell *et al.*, 2007, Palmeira *et al.*, 1996).

Une augmentation de l'expression de l'ANT a déjà été identifiée dans les muscles de patients atteints de MERRF ou de MELAS présentant des défauts au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (Heddi *et al.*, 1993), les auteurs proposent que cette augmentation de l'expression de différents gènes important pour le métabolisme oxydatif mitochondrial (dont ANT1) soit un mécanisme compensateur du dysfonctionnement mitochondrial retrouvé dans ces deux pathologies. De même, plusieurs publications (Behan *et al.*, 2005, Li, K. *et al.*, 1995) ont montré que dans des cellules déplétées en ADN mitochondrial ( $\text{Rho}^\circ$ ) possédant donc une chaîne respiratoire déficiente, la transcription des gènes COXIV et ANT est stimulée par rapport aux cellules contrôles. Ces résultats vont donc dans le sens de notre modèle où un dysfonctionnement de la phosphorylation oxydative mitochondriale entraîne une augmentation de la transcription des gènes OXPHOS pour compenser ce déficit.

Le mécanisme moléculaire permettant d'expliquer cette stimulation de la transcription des gènes OXPHOS par un mécanisme autre que la voie classique de biogénèse mitochondriale n'a pas encore été élucidé. Plusieurs classes de facteurs de transcription peuvent influencer l'expression des gènes OXPHOS : les facteurs généraux YY1 (Lenka *et al.*, 1998), Sp1 (Zaid *et al.*, 1999) et MEF2 (Ojuka *et al.*, 2002) ou encore les éléments OXBOX (présents uniquement dans les cellules musculaires) et REBOX (ubiquitaires, sensibles au statut redox des cellules, Chung *et al.*, 1992). Cependant, aucun d'entre eux n'a clairement été identifié dans la mise en place du dialogue rétrograde entre la mitochondrie et le noyau. Le facteur Sp1 retient cependant plus particulièrement notre attention car différentes études ont montré son implication dans la modulation de la transcription des gènes ANT et COX (dont COXIV). Or, nous avons montré que ces gènes étaient surexprimés suite au traitement par DNP dans les cellules HepG2. L'état de phosphorylation de ce facteur semble être déterminant pour son rôle d'activateur transcriptionnel (Goffart et Wiesner, 2003) ainsi il semble activé par

phosphorylation par certaines isoformes de PKC ou par p38MAPK (D'Addario *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006). Or, le découplage par DNP a été décrit comme un élément activateur de p38MAPK notamment dans le muscle squelettique (Taha *et al.*, 1997) et dans les cardiomyocytes (Pelletier *et al.*, 2005). Bien qu'il n'y ait pas encore de données sur l'activation de p38MAPK par le découplage dans le foie, ces éléments nous permettent de postuler que l'activation de la cascade p38MAPK suite au découplage mitochondrial permet la phosphorylation de différents facteurs dont Sp1 qui active ensuite la transcription de ses gènes cibles parmi lesquels certains gènes importants pour le métabolisme oxydatif mitochondrial (ANT et COX par exemple). Parmi les éléments intervenant dans le dialogue rétrograde mitochondrie/noyau, l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium semble jouer un rôle clé (Arnould *et al.*, 2002, Biswas *et al.*, 1999, Butow et Avadhani, 2004, Erol, 2005, Rohas *et al.*, 2007). Biswas *et al.* (1999) notamment ont montré que l'induction d'un découplage dans les cellules musculaires C2C12 entraînait une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ainsi qu'une activation de la calcineurine. Cette phosphatase calcium-dépendante ainsi activée peut alors activer NFAT (un facteur de transcription connu pour contrôler l'expression des gènes des cytokines dans les lymphocytes mais pouvant aussi moduler l'expression de gènes dans d'autres tissus tels que le muscle ou le tissu adipeux) qui sera transloqué dans le noyau et exercera sa fonction d'activateur transcriptionnel. Or, Santini *et al.* (2001) ont montré que NFAT, une fois dans le noyau peut s'associer avec le facteur Sp1 et induire la transcription des gènes cibles. Une telle cascade d'activation pourrait ainsi relier la mise en place d'un dialogue rétrograde (entre la mitochondrie et le noyau) et l'augmentation de la transcription des gènes COXIV et ANT3 que nous retrouvons dans notre modèle. Ces différentes voies sont résumées sur la figure 24. Les éléments en bleu sont ceux que nous avons étudiés dans notre article. Les éléments en rouge et vert sont les deux hypothèses que nous émettons pour expliquer l'augmentation de l'expression d'ANT3 et COXIV que nous trouvons dans notre modèle.

Afin de tester ces hypothèses, il serait intéressant dans un premier temps de quantifier l'expression de Sp1 ainsi que son état de phosphorylation suite au traitement des cellules HepG2 par le DNP. Si l'activation de ce facteur est démontrée dans notre modèle, il pourrait être intéressant d'inhiber les protéines PKC, calcineurine et p38MAPK (respectivement par l'ajout de bisindolylmaleimide, de deltaméthrine et de SB202190 dans le milieu de culture en plus du DNP) afin d'étudier leur implication dans l'activation de Sp1. Ces mesures devront être réalisées à plusieurs temps après l'ajout de DNP afin de déterminer le temps nécessaire à

la mise en place de ce dialogue (les temps choisis sont 10 heures, 24 heures, 48 heures et 72 heures).

Dans les cellules 143B, à métabolisme plus glycolytique que les cellules HepG2, le découplage mitochondrial s'accompagne d'une forte stimulation de la glycolyse représentée dans nos résultats par une augmentation de 2 fois de la consommation de glucose et une production de lactate multipliée par 4. En outre, dans ces cellules, le découplage n'induit aucune variation du métabolisme oxydatif mitochondrial (pas de variation de la respiration cellulaire ni de l'expression des gènes OXPHOS). Cette forte stimulation de la glycolyse dans les cellules 143B découplées s'accompagne d'une diminution drastique de la prolifération cellulaire (temps de doublement deux fois supérieur aux cellules contrôles). Cependant, il faut noter que cette inhibition est réversible (figure 23) car si on replace les cellules 143 B traitées pendant trois jours par DNP dans un milieu contrôle, elles retrouvent un temps de doublement identique aux cellules contrôles. Nous avons donc émis l'hypothèse que la stimulation du métabolisme glycolytique induit par le découplage dans ces cellules ne suffit pas à pallier le manque de synthèse d'ATP par la chaîne respiratoire mitochondriale et est donc délétère pour la croissance cellulaire. Un phénomène similaire est retrouvé dans les cellules Rho<sup>o</sup> dont la production d'ATP repose uniquement sur la glycolyse et qui possèdent une croissance nettement ralentie par rapport aux cellules contrôles (King et Attardi, 1989, Piechota *et al.*, 2006). En plus de la quantité d'ATP produite trop faible pour maintenir le taux de croissance, la diminution de prolifération dans les cellules déplétées en ADN mitochondriale a été corrélée, dans d'autres modèles, à la stimulation de la phosphorylation du facteur CREB par la calmodulin-dépendent kinase IV (CAMKIV), une kinase induite suite à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. L'inhibition de la prolifération par CREB passerait par la phosphorylation, et donc l'activation des protéines p53 et, en aval, p21 qui inhibe l'activité des kinases cyclines dépendantes (CDK) et induit un arrêt du cycle cellulaire en phase G1 (Piechota *et al.*, 2006). Plusieurs publications ont montré une augmentation de la transcription du facteur CREB lors d'un découplage mitochondrial (Biswas *et al.*, 2005, Piechota *et al.*, 2006, Rohas *et al.*, 2007) mais Rohas *et al.* ont relié son activation à une augmentation de la biogénèse mitochondriale. Dans les cellules 143B, nous ne retrouvons aucune variation des transcrits des gènes OXPHOS, il semble donc peu probable que le facteur CREB soit impliqué dans l'inhibition de prolifération de ces cellules lorsqu'elles sont découplées. La seule production d'ATP d'origine glycolytique ne suffit pas à assurer la croissance cellulaire d'autant qu'une partie des molécules de glucose est sans doute dérivée vers la voie des pentose phosphates pour produire des nucléotides.

Une des questions que soulèvent ces résultats est de savoir pourquoi les cellules 143B ne sont pas capables d'induire une augmentation de la transcription des gènes OXPHOS pour compenser le dysfonctionnement mitochondrial induit par le DNP ? L'hypothèse que nous émettons est qu'un des facteurs de transcription que nous avons cités dans le paragraphe concernant les cellules HepG2 est manquant ou non actif dans les cellules 143B. Une étude publiée par Duborjal *et al.* en 2002 a montré que, dans les cellules 143B déplétées totalement en ADN mitochondrial, la quantité de transcrits des gènes OXPHOS codés par le génome nucléaire n'était pas différent des cellules parentales (Duborjal *et al.*, 2002). Nos résultats vont dans ce sens puisque aucune variation de la transcription de COXIV et ANT3 n'est observée dans les cellules traitées par DNP. Ainsi, un défaut de coordination entre la transcription nucléaire et mitochondriale peut peut-être expliquer l'absence de stimulation du métabolisme oxydatif suite à un dysfonctionnement mitochondrial dans ces cellules. De plus, certaines études (Szczepanowska *et al.*, 2004, von Kleist-Retzow *et al.*, 2007) ont identifié des défauts de l'homéostasie calcique mitochondriale dans les cellules 143B. Ainsi, les auteurs montrent que dans ces cellules, les mitochondries ne participent que très peu à l'homéostasie calcique intracellulaire, incorporant et relarguant des quantités très faibles de calcium. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ayant été décrite comme un élément clé de la voie de signalisation rétrograde permettant à la mitochondrie, lorsqu'elle est soumise à un stress métabolique, de stimuler l'expression des gènes OXPHOS codés par le génome nucléaire, les défauts d'homéostasie calcique mitochondriale décrits dans les cellules 143B pourraient expliquer la non-adaptation de ces cellules au découplage.



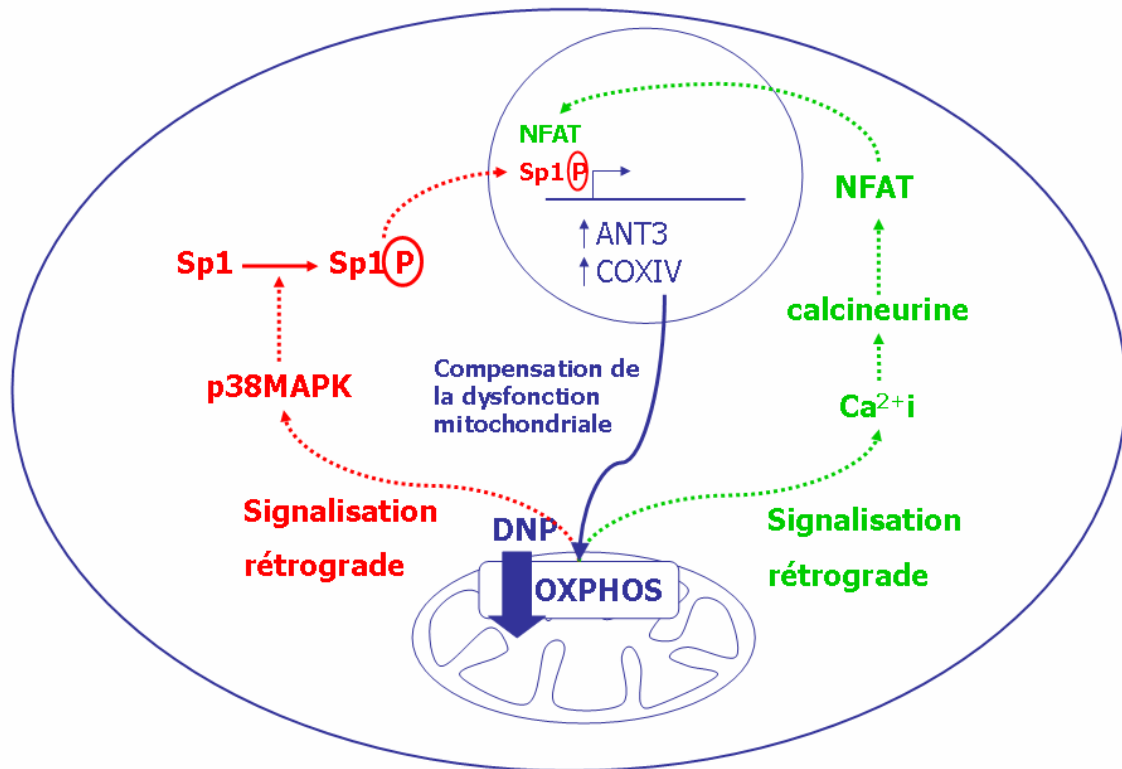


Figure 24 : Schéma récapitulatif des résultats obtenus dans l'article n°1 (flèches pleines) ainsi que des voies possibles de dialogue rétrograde mis en place dans ces cellules (flèches en pointillés).

## **Articles n°2 et 3**

## **Introduction des articles n°2 et 3.**

Les résultats précédents obtenus sur les cellules traitées par DNP ont permis de montrer que les cellules HepG2 soumises à un stress mitochondrial pendant trois jours sont capables de mettre en place des adaptations afin de développer leur métabolisme oxydatif.

Le but du travail présenté dans ce deuxième article était initialement d'étudier, sur cette même lignée cellulaire, les conséquences mitochondriales d'un autre stress métabolique reconnu, le traitement par glucocorticoïdes. En effet, plusieurs études ont montré que le traitement par glucocorticoïdes induit un état d'hypermétabolisme (élévation du métabolisme de base, Brillon *et al.*, 1995, Minet-Quinard *et al.*, 2000). Ces variations métaboliques induites par les glucocorticoïdes visent à maintenir un stock d'énergie suffisant en stimulant notamment la protéolyse musculaire et la néoglucogenèse hépatique (Jones *et al.*, 1993, Tiao *et al.*, 1996). De plus, les glucocorticoïdes modifient le métabolisme oxydatif mitochondrial (notamment au niveau hépatique). En effet, de nombreuses études montrent une diminution de l'efficacité de la phosphorylation hépatique dans les mitochondries de foie de rats traités par ces hormones (Jani *et al.*, 1991, Kerppola, 1960, Kimberg *et al.*, 1968, Roussel *et al.*, 2003). Outre leur rôle régulateur dans ces processus, les glucocorticoïdes influencent également la sensibilité à l'insuline (Qi et Rodrigues, 2007) et la production d'autres hormones dont la leptine (Lerario *et al.*, 2001) et la triiodothyronine (T3) (Reyns *et al.*, 2005). La T3, notamment, a été identifiée comme un régulateur important du métabolisme oxydatif mitochondrial, stimulant la respiration mitochondriale à court et à long terme (Wrutniak-Cabello *et al.*, 2000, Wrutniak-Cabello *et al.*, 2001) et augmentant la fuite de protons dans les mitochondries hépatiques (Harper *et al.*, 1993). On peut se demander si l'effet découplant des glucocorticoïdes observé sur les mitochondries isolées de foie de rats traités par glucocorticoïdes est dû aux glucocorticoïdes eux-mêmes ou à leur effet stimulateur sur un autre élément (par exemple la production de T3), lui-même régulateur du métabolisme énergétique mitochondrial. Afin de déterminer si les glucocorticoïdes ont une action propre sur le fonctionnement mitochondrial, nous avons traité les cellules HepG2 par différentes doses de dexaméthasone et nous avons mesuré la respiration cellulaire, le potentiel membranaire mitochondrial ainsi que la quantité de protéines COXIV et ANT. Nos résultats (cf figure 25 et 26) montrent que cinq jours de traitement par 500 nM de dexaméthasone entraînent une augmentation de la respiration de routine (respiration endogène), de la respiration insensible à l'oligomycine (respiration non couplée à la synthèse d'ATP) ainsi que de la respiration découplée (capacité maximale de la chaîne respiratoire). En outre, le

potentiel membranaire mitochondrial en conditions non phosphorylantes (en présence d'oligomycine) est diminué dans les cellules traitées par dexaméthasone. Enfin, comme lors du traitement par DNP, la quantité de COXIV et ANT est augmentée dans les cellules incubées en présence de dexaméthasone. Afin de s'assurer de la spécificité de ces effets, nous avons traité les cellules HepG2 à la fois par 500 nM de dexaméthasone et 5  $\mu$ M de mifépristone (ou RU486) un inhibiteur du récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes. Les résultats montrent que la stimulation de la capacité respiratoire des cellules (respiration découplée) est bien dépendante du récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes (cGR) mais, de manière surprenante, l'augmentation de la respiration de routine et de celle insensible à l'oligomycine restait supérieure à celle des cellules contrôles. Dans le but d'expliquer ces effets non cGR dépendants, nous nous sommes intéressés aux autres voies d'actions des glucocorticoïdes et notamment à celles passant par un récepteur aux glucocorticoïdes dans la membrane plasmique. Ce récepteur a été identifié dans différents tissus (dont les reins, le cerveau, le foie ainsi que les lymphocytes (Gametchu *et al.*, 1999, Guo *et al.*, 1995, Howell *et al.*, 1989, Quelle *et al.*, 1988) et est surtout décrit comme impliqué dans les effets non génomiques à court terme des glucocorticoïdes (Tasker *et al.*, 2006). Cependant, bien qu'encore soumis à controverse, son rôle dans les effets génomiques des glucocorticoïdes a été mis en évidence dans différents modèles (Daufeldt *et al.*, 2003, Trueba *et al.*, 1989). De nombreux points d'interrogation subsistent quant à la nature de ce récepteur (identique au cGR, récepteur couplé aux protéines G ...) ainsi que sa spécificité de substrats (certains auteurs ont montré que le mGR pouvait lier non seulement des glucocorticoïdes mais aussi certains dérivés de la progestérone et des œstrogènes (Daufeldt *et al.*, 2003, Trueba *et al.*, 1989). Ces éléments rendent ainsi plus difficile sa mise en évidence dans les effets des glucocorticoïdes. Son implication est souvent démontrée par des moyens indirects tels que l'utilisation de dérivés stéroïdes couplés à la BSA (qui ne peuvent pas traverser librement la membrane plasmique). Aux vues de ces données, nous avons choisi de nous focaliser plus particulièrement sur les voies impliquées dans les effets mitochondriaux du traitement par glucocorticoïdes. Pour cela, nous avons traité les cellules HepG2 avec 500 nM de dexaméthasone pendant 10 minutes (pour étudier les effets à court terme) et 8 heures (effets à plus long terme). Grâce à l'utilisation de différents inhibiteurs et dérivés de la dexaméthasone, nous avons pu montrer que la mitochondrie était à la fois la cible d'effets à court terme, non génomiques et mGR dépendants, de la dexaméthasone ainsi que d'effets génomiques à long terme médiés pour partie par le mGR et par le cGR.

Pour la suite de notre travail, présenté dans l'article n°3, nous nous sommes focalisés sur les effets non génomiques des glucocorticoïdes et nous avons voulu déterminer plus en détail les éléments clés de la signalisation en aval du récepteur couplé aux protéines G conduisant aux effets sur la mitochondrie.

Parmi les effets rapides des glucocorticoïdes décrits dans la littérature, une modification de la concentration intracellulaire en calcium est très souvent rapportée (Han *et al.*, 2005, Loechner *et al.*, 1999, Namba *et al.*, 2002, Priceman *et al.*, 2006, Takahashi *et al.*, 2002, Tong *et al.*, 2004, Yao *et al.*, 2007). Or, ce second messager étant très largement utilisé dans les cellules pour la transduction du signal à partir des récepteurs membranaires, nous nous sommes, dans un premier temps, intéressés à l'activation de la voie protéine Gq/phospholipase qui aboutit à l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Nous avons montré que le traitement des cellules HepG2 par 500 nM de dexaméthasone pendant dix minutes induisait une activation de cette voie qui entraîne une augmentation de 80% de la concentration intracellulaire en calcium par rapport aux cellules contrôles.



Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



**IJBCB**

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology xxx (2008) xxx–xxx

[www.elsevier.com/locate/biociel](http://www.elsevier.com/locate/biociel)

## Mitochondrial effects of dexamethasone imply both membrane and cytosolic-initiated pathways in HepG2 cells

Valérie Desquiret<sup>a</sup>, Naïg Gueguen<sup>b</sup>, Yves Malthièry<sup>a,b,c</sup>,  
Patrick Ritz<sup>a,c,d</sup>, Gilles Simard<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> Inserm, U694, Angers F-49033, France

<sup>b</sup> CHU Angers, Département de Biochimie et Génétique, Angers F-49033, France

<sup>c</sup> Université d'Angers, Angers F-49035, France

<sup>d</sup> CHU Angers, Pôle Maladies Métaboliques et Médecine Interne, Angers F-49033, France

Received 11 October 2007; received in revised form 19 December 2007; accepted 20 December 2007

### Abstract

Glucocorticoid treatment is often linked to increased whole-body energy expenditure and hypermetabolism. Glucocorticoids affect mitochondrial energy production, notably in the liver, where they lead to mitochondrial uncoupling reducing the efficacy of oxidative phosphorylation. However, the signaling pathways involved in these phenomena are poorly understood. Here we treated HepG2 cells with dexamethasone for different times and, by using different combinations of inhibitors, we showed that dexamethasone treatment leads to recruitment of two main signaling pathways. The first one involves a G-protein coupled membrane glucocorticoid binding site and rapidly decreases complexes I and II activities while complex III activity is upregulated in a p38MAPK dependent mechanism. The second one implies the classical cytosolic glucocorticoid receptor and triggers long-term transcriptional increases of respiration rates and of complex IV activity and quantity. We concluded that mitochondria are the target of multiple dexamethasone-induced regulatory pathways that are set up gradually after the beginning of hormone exposure and that durably influence mitochondrial oxidative phosphorylation.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Glucocorticoid signaling; Oxidative phosphorylation; Membrane glucocorticoid receptor; Liver; Mitochondria

### 1. Introduction

It has been thought for a long time that thyroid hormones are the main regulator of mitochondrial energy production (Menezes-Ferreira & Torresani, 1983). Recent findings show that others hormones (steroids, leptin, insulin) may also regulate the efficiency of mitochondrial oxidative metabolism. Among them, glucocorticoids have been shown to interfere with mitochondrial energy production because of their modulating role in many physiological processes requiring increase in energy expenditure (immune function, homeostasis,

*Abbreviations:* actino, actinomycin D; cGR, cytosolic glucocorticoid receptor; dexa, dexamethasone; dexa-BSA, dexamethasone coupled to BSA; dexa-mesyl, dexamethasone coupled to mesylate; GC, glucocorticoid; mGR, membrane-bound glucocorticoid receptor; mif, mifepristone; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PKA, protein kinase A; PKC, protein kinase C; RCRp, phosphorylating respiratory control ratio.

\* Corresponding author at: CHU Angers, Département de Biochimie et Génétique, F-49033 Angers Cedex 01, France. Tel.: +33 241355796; fax: +33 241354017.

E-mail address: [gisimard@chu-angers.fr](mailto:gisimard@chu-angers.fr) (G. Simard).

1357-2725/\$ – see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.biociel.2007.12.010

Please cite this article in press as: Desquiret, V., et al., Mitochondrial effects of dexamethasone imply both membrane and cytosolic-initiated pathways in HepG2 cells, *Int J Biochem Cell Biol* (2008), doi:10.1016/j.biociel.2007.12.010

stress response and cellular differentiation, Scheller & Sekeris, 2003). In liver (which contributes to 20–30% of resting energy expenditure in humans, Ramsey, Harper, & Weindruch, 2000), a 5 days treatment of rats with a synthetic glucocorticoid (dexamethasone) has been shown to induce energy wastage in isolated liver mitochondria (Arvier et al., 2007; Dumas et al., 2003; Roussel et al., 2003). Moreover, glucocorticoid can steadily modify respiratory chain activity by increasing transcription of nuclear and/or mitochondrial-encoded oxidative phosphorylation genes (Kadowaki & Kitagawa, 1988; Van Itallie, 1992).

Taken together, this accumulating evidence supports the idea that glucocorticoids are key regulators of energy metabolism, influencing directly mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation.

Despite its importance, the cellular mechanism leading to mitochondrial effect of glucocorticoid remains poorly understood. According to the classical model of steroid action, glucocorticoids enter the cell passively by diffusion through the lipid membrane and are bound to the cytosolic glucocorticoid receptor (cGR). This induces allosteric modifications enabling the hormone/receptor complex to bind to the glucocorticoid response element (GRE) of target genes and to modulate their transcription (Mangelsdorf et al., 1995). However, some steroid responses (such as rapid feedback of neuroendocrine function, Di, Malcher-Lopes, Marcheselli, Bazan, & Tasker, 2005) do not fit this classical genomic model of steroid action in particular the short-term effects that occur immediately after glucocorticoid administration. It has been proposed that an additional membrane receptor might initiate non-genomic phenomena.

Glucocorticoids have been shown to bind to hepatocyte membrane suggesting the existence of a specific membrane located glucocorticoids receptors. Moreover, it has been proposed that the receptor (mGR) may participate in various non-genomic actions of glucocorticoids and also plays a role in nuclear transcription as the initiating element of membrane-initiated steroid signaling (Trueba, Ibarrola, Ogiza, Marino, & Macarulla, 1991).

We recently reported that dexamethasone treatment specifically affects mitochondrial energy metabolism in the liver (Arvier et al., 2007; Dumas et al., 2003; Roussel et al., 2003). Here, we aimed at discriminating the involvement of those two types of binding sites in mitochondrial effects of glucocorticoids. For this purpose, we observed the functioning of respiratory chain after a short time (10 min) and a longer dexamethasone treatment (8 h) on HepG2 cells. Our results show that a G protein-coupled membrane receptor is involved

in rapid effects of glucocorticoid on HepG2 mitochondrial oxidative metabolism but also that the response to dexamethasone is more complex and leads to the coordinated activation of mGR and cGR for long-term effects.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

RPMI 1640, L-glutamine and antibiotics were obtained from Gibco, Cergy-Pontoise, France; FBS from Biochrom, Berlin, Germany; dexamethasone from Merck, Lyon, France; dexamethasone-BSA and dexamethasone-mesylate from Steraloids, London, England. Mifepristone and actinomycin D were bought from Sigma–Aldrich, Lyon, France.

### 2.2. Methods

#### 2.2.1. Cell line and growth conditions

The HepG2 human hepatocarcinoma cell line was grown in the RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, penicillin G (100 U/ml), streptomycin (2 mM) and amphotericin B (0.25 µg/ml). Cells were grown in a 75 cm<sup>2</sup> flask either in a control medium or in a medium supplemented with 500 nM of dexamethasone, for 10 min or 8 h at 37 °C in a humidified atmosphere (5%CO<sub>2</sub>–95% air).

To test whether the addition of dexamethasone in the culture media triggers a change in HepG2 cell growth, a growth curve was constructed over a 5-day period. No difference was observed between dexamethasone-treated cells and controls proving the non-toxicity of the quantities of dexamethasone used in this study (data not shown).

Before the experiments, we performed respiration rates measurements with different concentrations of dexamethasone (50 nM, 500 nM and 5 µM). We chose to use 500 nM of dexamethasone because it was the minimal concentration inducing mitochondrial effects.

#### 2.3. Incubation with mifepristone, actinomycin D, dexamethasone-BSA and dexamethasone-mesylate

Cells were grown for 4 days in the culture media (medium was renewed every 2 days); on the 5th day, medium was replaced either with control medium or with medium supplemented with 500 nM of dexamethasone or 500 nM of dexamethasone-BSA. For the latter experiments, control medium used was supplemented with DMSO (vehicle of dexamethasone-BSA). To determine pathways involved in mitochondrial effects

of dexamethasone, we used the GR-antagonist mifepristone (5  $\mu\text{M}$ ) and the transcription inhibitor actinomycin D (1  $\mu\text{g/ml}$ ). Inhibitors concentration used in those experiments were chosen according to the literature. A concentration of 10  $\mu\text{M}$  of mifepristone has been shown to have no intrinsic agonist activity in hepatoma cells and to inhibit completely the transactivating action of dexamethasone. The authors concluded that a 10-fold excess of mifepristone over dexamethasone was sufficient to antagonize glucocorticoid-induced transactivation (Honer et al., 2003). In our experiments, we respected the 1–10 ratio and we used 5  $\mu\text{M}$  of mifepristone to antagonize the effect of 500 nM of dexamethasone. The concentration of actinomycin D was chosen to fully inhibit transcription but not to induce an increase in cell apoptosis.

Another dexamethasone derivative coupled with a mersalyl group (dexamethasone-mesylyate) was used in our model to inhibit both membrane and cytosolic glucocorticoid binding sites. This compound reacted with thiol thanks to its methylsulfonate-group and bound covalently to glucocorticoid receptors. Thus, by inhibiting the reversibility of the interaction between dexamethasone and its receptor, dexamethasone-mesylyate exerted antiglucocorticoid activity (Daufeldt, Klein, Wildt, & Allera, 2006).

#### 2.4. Detection of a glucocorticoid membrane binding site in HepG2 cells

Plasma membranes were isolated following the method of aqueous two-phase partition described by Navas, Nowack, and Morre (1989) on a pool of 300 millions of HepG2 cells.

Membranes collected by centrifugation (10 000 g, 30 min), were diluted in 1 mM  $\text{NaHCO}_3$  buffer, divided into 100  $\mu\text{l}$  in microcentrifuge tubes and incubated with dexamethasone-FITC. To ensure the specificity of dexamethasone-FITC binding, incubation with dexamethasone-mesylyate was performed 10-min before adding dexamethasone-FITC to enable dexamethasone-mesylyate irreversible binding on glucocorticoid receptors. A range of dexamethasone-mesylyate (from 50 nM to 10  $\mu\text{M}$ ) was performed to determine the concentration which abolish the maximum of dexamethasone-FITC binding.

All incubations were performed in the dark. Tubes were centrifuged (10 000 g, 30 min). Supernatant was kept on ice and the pellet was resuspended in 1 mM  $\text{NaCO}_3$  buffer. Samples were transferred in black 96-well microplates for fluorescence measurement (Nunc, Wiesbaden, Germany).

Dexamethasone-FITC was excited at 490 nM and fluorescence was read at 520 nM with a fluorescence reader (Mithras LB940 Reader, Berthold, Thoiry, France).

Autofluorescence of all reagents and of membranes was determined and subtracted to dexamethasone-FITC fluorescence when necessary.

Specific membrane binding of dexamethasone-FITC was calculated as a ratio of the fluorescence contained in membrane pellet and the total fluorescence of the sample (pellet + supernatant).

Dexamethasone-FITC fluorescence ( $0.31 \pm 0.03$ ) can be displaced by non-fluorescent dexamethasone ( $0.22 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ ) and by the non-permeant dexamethasone derivative dexamethasone-BSA ( $0.17 \pm 0.04$ ,  $p < 0.05$ ). Dexamethasone-mesylyate significantly inhibits the binding of dexamethasone-FITC ( $0.20 \pm 0.04$ ,  $p < 0.05$ ) which clearly suggest the presence of a glucocorticoid binding site in HepG2 plasma membrane. As Dexa-mesylyate is known to inhibit membrane and cytosolic glucocorticoid receptors, residual fluorescence found in Dexa-mesylyate + Dexa-FITC cells cannot be due to presence of cytosolic glucocorticoid receptors contaminants and can be explained by non-specific dexamethasone-FITC binding with plasma membrane. Moreover, the role of the classical cytosolic glucocorticoid receptor (cGR) on dexamethasone binding on plasma membrane can be excluded as mifepristone (a cGR inhibitor) does not decrease the amount of dexamethasone-FITC bound to plasma membrane ( $0.28 \pm 0.02$ ). Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. of six experiments performed in duplicate. Dexamethasone-FITC, dexamethasone, dexamethasone-BSA and dexamethasone-mesylyate were used at 500 nM and mifepristone at 5  $\mu\text{M}$ .

#### 2.5. Incubation with dexamethasone and inhibitors

HepG2 cells were cultured as described herein. Before dexamethasone treatment, hepG2 cells were incubated during 30 min with the following inhibitors—p38MAPK inhibitor: SB202190 (10  $\mu\text{M}$ ), PKC inhibitor: bisindolylmaleimide I (BIM, 3  $\mu\text{M}$ ) and PKA inhibitor 14-22 amide (PKAi, 50 nM). SB202190 were from Sigma–Aldrich, Lyon, France. Bisindolylmaleimide I and PKA inhibitor 14-22 amide were bought from Calbiochem (Merck chemicals, Nottingham, UK).

#### 2.6. Measurement of oxygen consumption and FCCP titration of respiration in intact cells

Respiration rates were measured in intact HepG2 cells. The cells were collected by trypsinization, washed



once in RPMI containing 5% FBS and 2 mM L-glutamine, and centrifuged ( $110 \times g$  for 5 min). The pellet was resuspended at a final concentration of  $10 \times 10^6$  cells per ml in 500  $\mu$ l of RPMI supplemented with 2 mM L-glutamine (without FBS) after air-equilibration at 37 °C. The suspension was immediately transferred to the 1-ml chamber of a Clarke-type oxygen electrode (Rank Brothers, Cambridge, England) maintained at 37 °C. Respiration rates were measured as described elsewhere (Desquiret et al., 2006). The routine respiration rate of cells was determined by measuring the linear rate of oxygen consumption, which reflects the aerobic metabolic activity of cells with physiological substrates in culture media. Oligomycin (12  $\mu$ g/ml) was then added to determine the non-phosphorylating respiration rate. The uncoupling respiration rate was also recorded by stepwise addition of FCCP (100–700 nM) up to the optimal concentration representing the maximal capacity of the respiratory chain. Finally, the non-mitochondrial oxygen consumption rate was determined by adding antimycin A (4  $\mu$ g/ml). The total protein content was determined using bicinchoninic acid, with bovine serum albumin used as the standard (BC Assay kit<sup>®</sup>, Montluçon, France). Phosphorylating control ratios were calculated using the expression:  $RCR_p = (\text{Routine-Oligo})/\text{FCCP}$ , which represents the fraction of the respiration rate used to synthesize ATP (Hutter et al., 2004).

### 2.7. Determination of enzymatic activities

All assays were performed on cell lysates, thermostatically maintained at 37 °C, using a Beckman spectrophotometer. All cells were resuspended in the cell buffer containing 250 mM saccharose, Tris 20 mM, EDTA 2 mM, BSA 1 mg/ml, pH 7.2 (50  $\mu$ l/10<sup>6</sup> cells).

To measure the activity of respiratory complexes I and II, the cells were first disrupted by freezing in liquid nitrogen, followed by rapid thawing at 37 °C. The cells were then centrifuged (2 min,  $800 \times g$ ), resuspended in the cell buffer (250  $\mu$ l/10<sup>6</sup> cells). For complex I measurement, an additional sonication step is required (6  $\times$  5 s with an MSE sonicator). Complex I activity was immediately assayed on cell lysate ( $0.5 \times 10^6$  cells) in a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  buffer (100 mM, pH 7.4), containing 1 mM KCN, 2 mM  $\text{NaN}_3$ , and 0.1 mM ubiquinone-1. After incubation for 5 min, the reaction was started by adding 0.3 mM NADH and the rate of disappearance of NADH was monitored at 340 nm. Rotenone (5  $\mu$ M) was then added to determine the background rate, and the activity was calculated using the value:  $\varepsilon_{\text{NADH}} = 6.22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Complex II (succinate ubiquinone reductase) activity was measured as

described elsewhere (James, Wei, Pang, & Murphy, 1996), excepting that the background rate was measured by the addition of thenoyltrifluoroacetone (200  $\mu$ M). Complex III was measured after the frozen-thawing cycle as described in (Rustin, Chretien, et al., 1994). Complex IV (cytochrome c oxidase) activity and citrate synthase (CS) activity were assayed following (Rustin, Lebidois, et al., 1994).

### 2.8. Western blot

Cells were grown as described above for the oxygen consumption experiments. Five days after seeding, the cells were treated by dexamethasone (500 nM) and mifepristone (5  $\mu$ M) and actinomycin D (1 ng/ml), collected by trypsinization and counted. Then, 100 millions cells aliquots were centrifuged (800 rpm, 5 min). Mitochondria were isolated as described by Cui, Yoon, Schinazi, and Sommadossi (1995).

Isolated mitochondria were resuspended in buffer containing 10 mM NaCl, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris, pH 7.5 and antiproteases cocktail was added. Protein concentration was determined by the Bio-Rad DC protein Assay (BioRad, Hercules, CA, USA). Ten micrograms of protein was electrophoretically size separated on a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and then transferred onto a PVDF membrane (Amersham Biosciences, UK) by placing the gel in a blotting buffer (pH 8.3, Tris 20 mM, glycine 150 mM, ethanol 20%) and applying a 260 mA current for 1 h. Membranes were saturated with 5% non-fat milk dissolved in TBS-Tween 0.1% (pH 7.4, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Tris 23 mM, Tween 20 0.1%) at 4 °C overnight and incubated with diluted monoclonal mouse anti-COXI and anti-COX IV (1:1000 and 1:5000, Mitosciences, Montluçon, France) and anti-VDAC (1:2000 Calbiochem, Merck Chemicals, Nottingham, United Kingdom) antibodies at room temperature for 2 h. Membranes were then washed three times in TBS-Tween 0.1% and incubated with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse secondary antibody (1:20,000) for 2 h at room temperature. Finally, after three washes in TBS-Tween 0.1% and one in TBS, the immunoreactive proteins were visualized with enhanced chemiluminescence.

### 2.9. Statistical analysis

A non-parametric Mann–Whitney test was used to compare the treated groups and the controls. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ . Results are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.

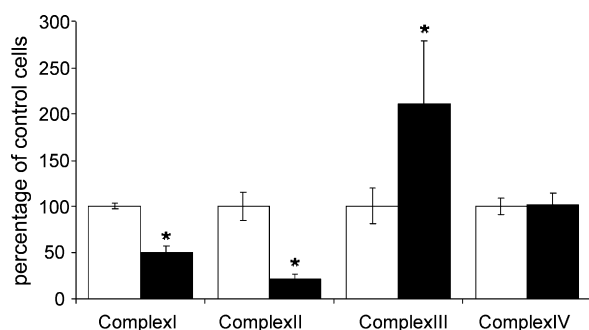


Fig. 1. Enzymatic activities of the respiratory chain complexes of cells treated by dexamethasone. The activities of complexes were measured on frozen pellets of control cells (open bars) and 10-min dexamethasone-treated cells (black bars) after a freezing/thawing cycle for complexes II and III and an additional sonication for complex I. The activities of complex IV and of citrate synthase were measured immediately after resuspension of the centrifugation pellet in the cell buffer. Results are the ratio of complex activity and citrate synthase activity. They are expressed in percentage of activity of control cells.  $n=4$  in duplicate. \* $p<0.05$  compared with control cells.

### 3. Results

#### 3.1. Rapid, non-genomic effects of dexamethasone

##### 3.1.1. Effects of 10 min of dexamethasone treatment on the enzymes of the respiratory chain

Fig. 1 shows enzymatic activities of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I), succinate dehydrogenase (complex II), ubiquinone:cytochrome *c* oxidoreductase (complex III) and cytochrome *c* oxidase (complex IV) of HepG2 cells after a 10 min dexamethasone treatment.

These results are presented after normalisation with citrate synthase (CS) activity, a marker of mitochondrial quantity, measured on the same cell samples. CS activity was identical in control and 10-min dexamethasone-treated cells (data not shown).

Short time dexamethasone treatment induced a drastic decrease in complex I (–60% compared to control cells) and complex II (–75%) maximal activities. On the contrary, complex III activity was enhanced by dexamethasone treatment (+100%). Activity of complex IV was not modified by the 10-min dexamethasone incubation.

Some rapid effects of glucocorticoid have been correlated with binding of hormone to a membrane-bound form of glucocorticoid receptor and downstream activation of a G protein-coupled receptor (GPCR). To investigate if dexamethasone-induced changes of respiratory chain complexes activities were mediated by such a pathway, we preincubated HepG2 cells with a non-metabolizable GDP analogue (GDP $\beta$ S) for 20 min and we added 500 nM of dexamethasone for a 10 min addi-

tional incubation. Control cells used in this study were HepG2 cells incubated only with the inhibitor GDP $\beta$ S. There was no significant difference between activities of control and control + GDP $\beta$ S cells. We found that inhibition of G protein activation prevented the decrease of complexes I and II activities and the increase in complex III activity triggered by dexamethasone short-term treatment (Fig. 2).

Downstream of G protein activation, activation of different protein kinases families have been described in mediating rapid glucocorticoid effects. Therefore, we tested the involvement of p38MAPK, PKC and PKA in rapid dexamethasone effects on the respiratory chain. Bisindolylmaleimide I (PKC inhibitor) fully prevent complex I decrease and complex III increase triggered by dexamethasone but only partially prevent the drop in complex II activity (Fig. 3B,  $p=0.08$  compared with control + BIM treated cells). Inhibition of p38MAPK prevented the inhibitory effects of dexamethasone on complexes I and II activity and the stimulation of complex III (Fig. 3). By contrast; complexes II and III activities were still modified by dexamethasone in PKA inhibitor treated cells and, although not statistically significant, complex I activity tended to be decreased in dexamethasone + PKA inhibitor cells ( $p=0.07$ ).

##### 3.1.2. Respiration rates of 10 min dexamethasone-treated cells

Fig. 4 shows respiration rates of HepG2 dexamethasone-treated cells. Short time incubation of cells with dexamethasone did not modify routine respiration rate.

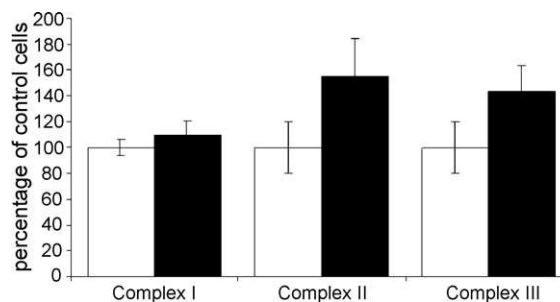


Fig. 2. Enzymatic activities of the respiratory chain complexes of cells treated with dexamethasone plus GDP $\beta$ S. After a 20 min preincubation with GDP $\beta$ S, cells were treated during 10 min with 10  $\mu$ M of GDP $\beta$ S alone (open bars) or with 500 nM of dexamethasone plus 10  $\mu$ M GDP $\beta$ S (black bars). Complexes II and III activities were measured on cell lysate after a freezing/thaw cycle. For complex I activity a sonication step was necessary before enzymatic measurement. Citrate synthase activity was measured immediately on cell suspension. Results are expressed in percentage of activity of control cells. For dexa + GDP $\beta$ S condition (black bars), the control was cells treated with the same amount of GDP $\beta$ S but without dexamethasone (open bars).  $n=4$  in duplicate. \* $p<0.05$  compared with control cells.

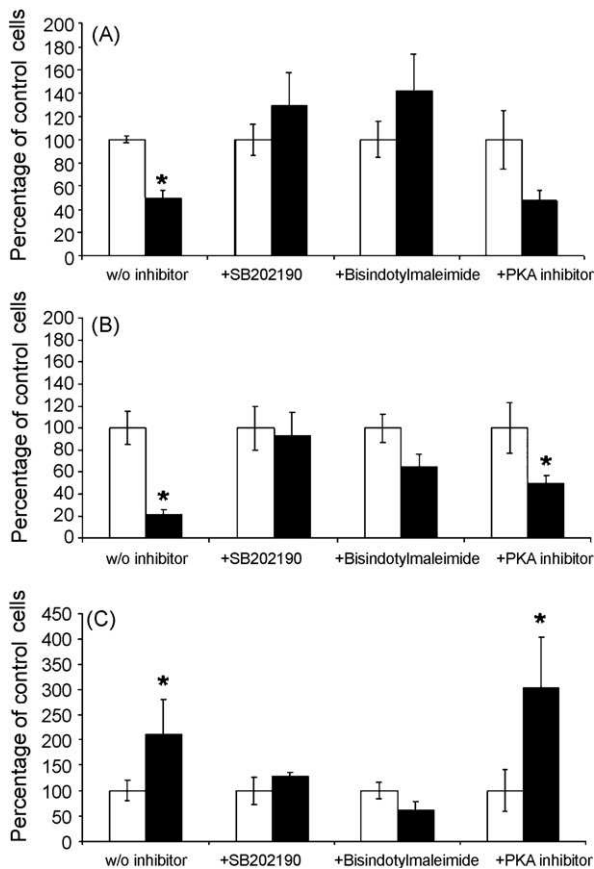


Fig. 3. Activity of complexes of the respiratory chain after addition of kinase inhibitors. HepG2 cells were first cultured during 10 min with 10  $\mu$ M of SB202190 (p38MAPK inhibitor) or with 3  $\mu$ M of Bisindotylmaleimide (PKC inhibitor) or 50 nM of PKA inhibitor 14–22 amide. After this incubation half of the flasks were treated for 10 min with dexamethasone (black bars on the graph) and the other half were left with the inhibitor only (control cells: open bars on the graph). Activities of complexes I (panel A), II (panel B) and III (panel C) were measured on frozen pellets and normalized with citrate synthase activity. Results are expressed as percentage of control + inhibitor cells.  $n = 4$  in duplicate,  $*p < 0.05$  compared with control + inhibitor cells.

Oligomycin-insensitive respiration of dexamethasone-treated cells was slightly decreased compared with control cells whereas the capacity of the respiratory chain (uncoupled) respiration was significantly increased.

### 3.2. Long-term effects of dexamethasone

#### 3.2.1. Effects of 8 h dexamethasone treatment on the enzymes of the respiratory chain

To test the involvement of membrane and cytosolic glucocorticoid binding sites in mitochondrial dexamethasone effects, we incubated HepG2 cells with a cGR inhibitor (mifepristone), or with a dexamethasone derivative specific of mGR (dexamethasone-BSA) or

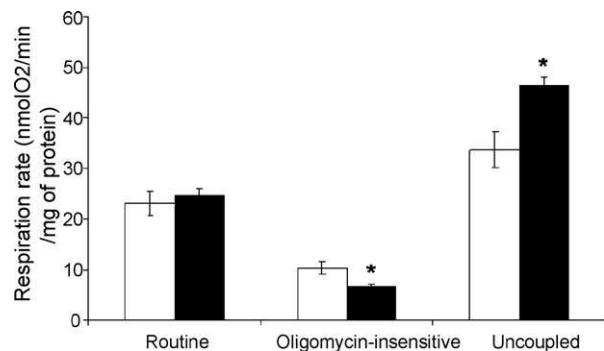


Fig. 4. Respiration rates of HepG2 cells incubated for 10 min with dexamethasone. Cells were incubated for 10 min with 500 nM of dexamethasone and routine, oligomycin insensitive and uncoupled respirations were measured on a 5 million cells suspension. Respiration rates (dexamethasone-treated cells: black bars) are expressed as percentage of control cells (open bars).  $n = 6$ .  $*p < 0.05$  compared with control cells.

with dexamethasone-mesylate which impedes dexamethasone binding on GR. Respiratory chain complexes activities were then measured on frozen pellets of HepG2 treated cells.

The drastic decreases in complexes I and II activities observed after a 10-min dexamethasone incubation were maintained after 8 h of treatment. The membrane-impermeant derivative dexamethasone-BSA also triggered decreases in complexes I and II activities (Fig. 5, panels A and B, respectively). Inhibition of cytosolic glucocorticoid receptor with mifepristone did not prevent decreases in complexes I and II activities. The increase in complex III activity which was present after a 10-min dexamethasone treatment disappeared in 8-h dexamethasone-treated cells (Fig. 5C). Dexamethasone-BSA tended to increase complex III activity however this increase was not statistically significant. Incubation with both dexamethasone and mifepristone did not modify activity of complex III. Complex IV maximal activity was increased in dexamethasone-treated cells (+70% compared with control cells, Fig. 5D). This increase was not retrieved when a membrane-impermeant form of dexamethasone (dexamethasone-BSA) was used. Moreover, this increase was sensitive to inhibition of cytosolic GR since when cells were cultured with dexamethasone and mifepristone, complex IV activity was similar to control cells. When incubated with dexamethasone and actinomycin D, an inhibitor of transcription, the increase in complex IV activity was abolished (data not shown).

To confirm the involvement of protein synthesis in the increase of complex IV activity after dexamethasone treatment, we performed a western blot analysis of both a nuclear encoded (COXIV) and a mitochondrially

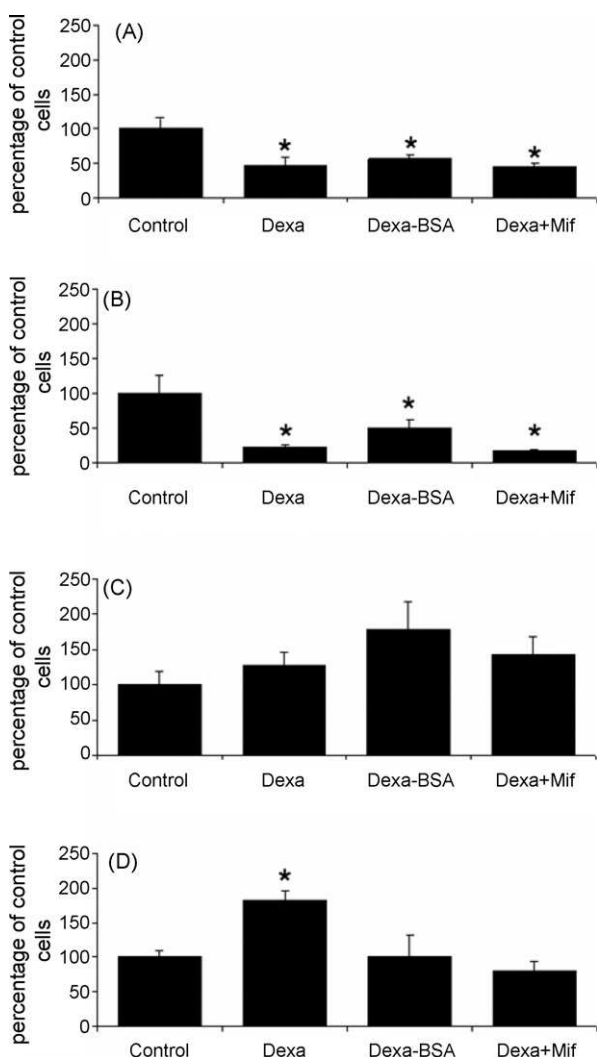


Fig. 5. Enzymatic activities of the respiratory chain complexes of cells treated for 8 h by dexamethasone derivatives or dexamethasone plus inhibitors. Cells were incubated during 8 h with 500 nM of dexamethasone alone or with 500 nM of dexamethasone coupled to BSA or with 500 nM of dexamethasone plus 5  $\mu$ M of mifepristone. The activities of complex I (panel A) and complexes II and III (panels B and C) were measured on frozen/thawed cell suspension. The activities of complex IV (panel D) and of citrate synthase were measured immediately after resuspension of the centrifugation pellet in the cell buffer. Results are the ratio of complex activity and citrate synthase activity. They are expressed in percentage of activity of control cells.  $n = 4$  in duplicate. \* $p < 0.05$  compared with control cells.

encoded (COXI) complex IV subunits. Dexamethasone treatment triggered a 70% increase in COXIV quantity. It was inhibited by mifepristone and actinomycin D treatment emphasizing the necessity of cGR recruitment for this transcriptional effect of dexamethasone. COXI (a mitochondrially encoded COX subunit) was slightly but not significantly modified by dexamethasone (Fig. 6).

### 3.2.2. Effects of 8 h dexamethasone treatment on the respiration rates of HepG2 cells

Fig. 7A shows respiration rates of control and dexamethasone-treated HepG2 cells. Routine, oligomycin-insensitive and uncoupled respiration were increased after long term dexamethasone treatment ( $p < 0.05$  compared with control cells). Incubation with dexa-BSA also increased routine and oligomycin insensitive respiration rates but not uncoupled respiration (Fig. 7B). Results of dexamethasone-BSA treated cells were compared with control cells treated with DMSO (the vehicle used to dissolve dexa-BSA). This solvent induced a slight decrease of all respiration rates ( $-10\%$  compared with untreated control cells). Dexa-BSA is a component which cannot passively cross the plasma membrane, so to exert its intracellular effect; this compound needs to interact with a membrane-bound protein.

To ensure that the effect of dexa-BSA on the respiration rates was not due to residual free molecules of dexamethasone, we used a mersalyl-coupled dexamethasone derivative (dexa-mesylate) which irreversibly bound with glucocorticoid receptors and severely impeded their activities. We observed that membrane glucocorticoid receptor inhibition with dexa-mesylate prevented increases in respiration rates obtained after dexa-BSA treatment (Fig. 7B, hatched bars).

In HepG2 cells coincubated with dexamethasone and mifepristone, the stimulation of routine and oligomycin-insensitive oxygen uptake persisted ( $p < 0.05$  compared with control cells treated with mifepristone, Fig. 7C). Mifepristone alone did not modify respiration rates (data not shown). However, these stimulations were totally abolished when transcription was inhibited with 1  $\mu$ g/ml of actinomycin D (routine respiration was even slightly decreased). Control condition was represented by the respiration rates of control cells treated only with actinomycin D (Fig. 7D).

These modifications affected the respiratory fraction dedicated to ATP synthesis. Thus, the phosphorylating respiratory control ratio (RCRp), which represents the fraction of the respiratory chain capacity used for ATP synthesis, was decreased only in dexamethasone-treated cells compared with control cells ( $-40\%$ , Fig. 8) but was not affected when cGR was inhibited by mifepristone or when actinomycin D was added.

## 4. Discussion

Here, we highlight the double origin of mitochondrial effects of dexamethasone. We found that a short time dexamethasone treatment (10 min) decreases activities of complexes I, II and increases activity of complex III

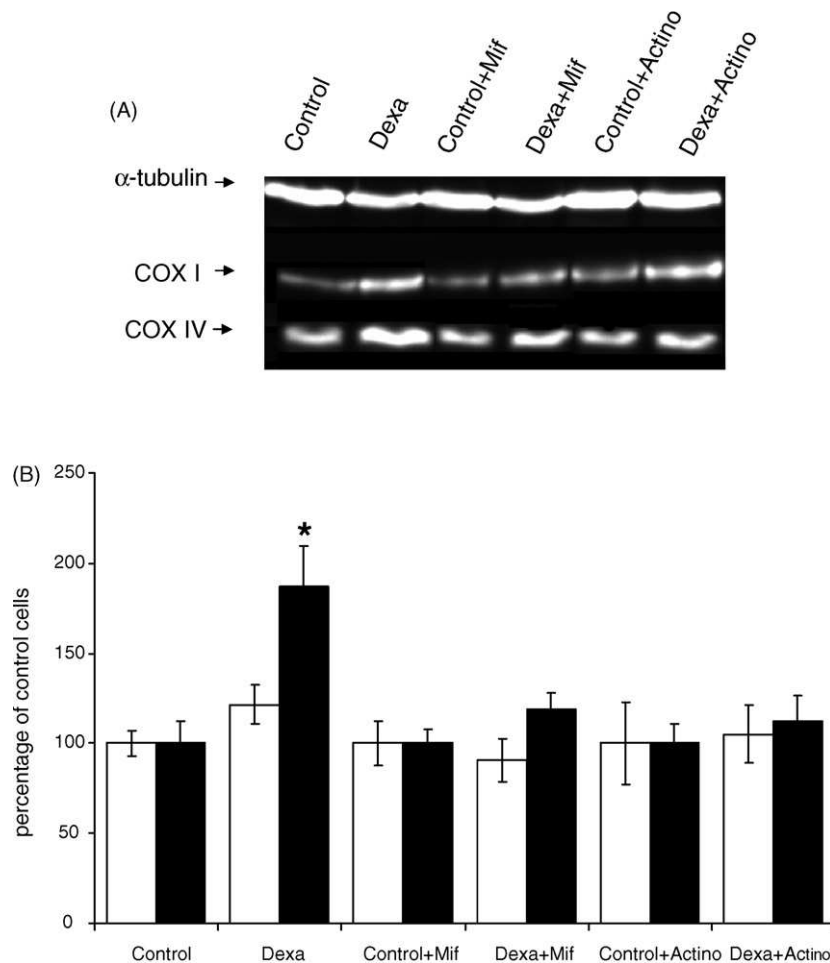


Fig. 6. Quantification of COXI and COXIV proteins after dexamethasone treatment. Western blotting was performed on mitochondria isolated from HepG2 cells treated with 500 nM of dexamethasone (8 h), mifepristone (5  $\mu$ M) and actinomycin D (1 ng/ml). Primary monoclonal antibodies were used to detected COXI (35 kDa), a mitochondrially encoded subunit of cytochrome c oxidase, COX IV (18 kDa, nuclear-encoded) and  $\alpha$ -Tubulin (60 kDa) as reference protein. COXI and COXIV quantities were normalized with  $\alpha$ -Tubulin quantity. (A) Representative blot, (B) Bar graph of  $n=4$  experiments in duplicate, open bars represent COXI/tubulin ratio and black bars COXIV/tubulin ratio. Results are expressed as percentage of control cells treated with the same amount of inhibitor than dexamethasone treated cells. \* $p < 0.05$  compared with control cells.

of the respiratory chain. A longer treatment (8 h) induces an increase in mitochondrial respiratory chain capacity (increase in complex IV activity and quantity) associated with a decrease in oxidative phosphorylation efficiency. To go further, we studied the different pathways that could mediate the mitochondrial effects of dexamethasone.

#### 4.1. Short-term non-genomic dexamethasone effects

In our model, we observed rapid effects of dexamethasone on respiratory chain enzymes activities which were present as soon as 10 min of dexamethasone treatment (Fig. 1). Indeed, short term dexamethasone treatment induced a drop in complexes I and II activities and an

increase in complex III activity. The decrease in the activities of complexes I and II after synthetic glucocorticoid treatment has already been retrieved (Martens, Peterson, & Lee, 1991) and it was proposed that dexamethasone acted on the iron–sulfur center between complex I and coenzyme Q, decreasing the maximal activity of complex I, and on succinate transport, thereby inhibiting complex II. However, those hypotheses described a direct unspecific effect of the hormone. It did not fit with our model since rapid dexamethasone effects were inhibited by the pan  $G_{\alpha}$  protein antagonist GDP $\beta$ S underlying the involvement of a membrane glucocorticoid receptor G-protein coupled in those effects (Fig. 2). To ensure that GDP $\beta$ S entered in cells, we preincubated HepG2 cells with this inhibitor before dexamethasone

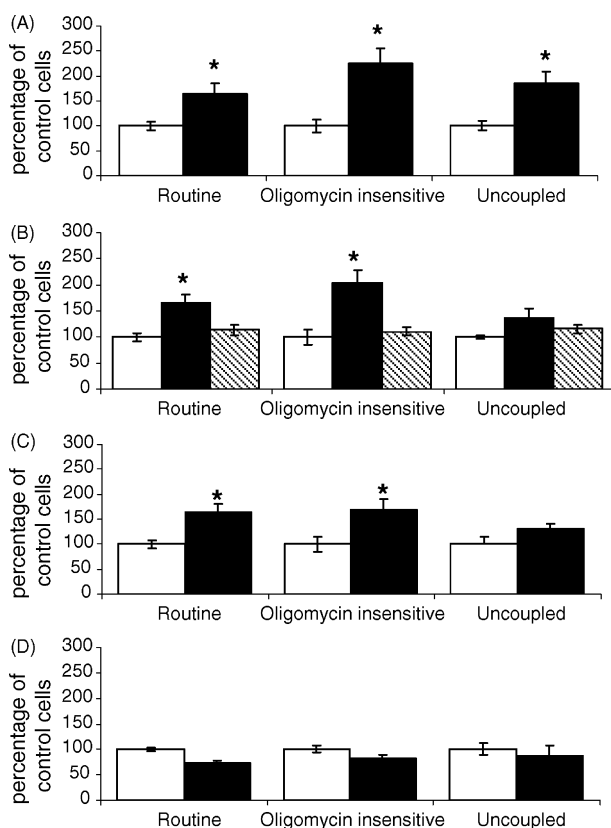


Fig. 7. Respiration rates of cells treated for 8 h by dexamethasone derivatives or by inhibitors (mifepristone or actinomycin D). (A) Cells were incubated for 8 h with 500 nM of dexamethasone (black bars) or in control condition (open bars). Results are expressed as percentage from control cells  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ .  $*p < 0.05$  compared with control cells. (B) Cells were incubated for 8 h with 500 nM of dexamethasone-BSA (black bars) or with DMSO, the solvent of dexamethasone-BSA (open bars). Hatched bars represent cells incubated first during 20 min with 500 nM of dexamethasone-mesylate and then during 8 h with dexamethasone-BSA. Results are expressed as percentage from control cells treated by the same amount of DMSO  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ .  $*p < 0.05$  compared with control cells + DMSO.  $n = 6$ . (C) Cells were incubated for 8 h with 500 nM of dexamethasone and 5  $\mu$ M of mifepristone (black bars) or only with mifepristone (open bars). Results are expressed as percentage from mifepristone-treated cells  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ .  $*p < 0.05$  compared with mifepristone-treated cells. (D) Cells were incubated for 8 h with 500 nM of dexamethasone and 1 ng/ml of actinomycin D (black bars) or only with 1 ng/ml of actinomycin D (open bars). Results are expressed as percentage from actinomycin D-treated cells  $\pm$  S.E.M.  $n = 6$ .  $*p < 0.05$  compared with actinomycin D-treated cells.

treatment as described in other studies (Frangos, Huang, & Clark, 1996; Lewerenz, Letz, & Methner, 2003; Pietrobon, Soria, Dominguez, Monclus Mde, & Fornes, 2005; Qi, Qiu, Xiao, & Chen, 2005). Evidences of membrane binding sites have been identified for the majority of steroid hormones but the nature of this site varied with studies (a non-nuclear location of the classical receptor, an unknown receptor or other receptors

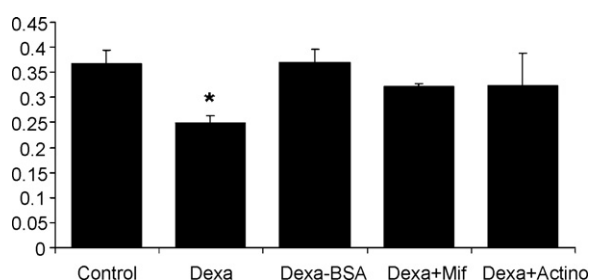


Fig. 8. Phosphorylating respiratory control ratio (RCRp) of dexamethasone-treated HepG2 cells. RCRp was calculated as the ratio of (Routine-Oligo)/FCCP; it represents the fraction of the respiration rate used to synthesize ATP.  $n = 6$ .  $*p < 0.05$  compared with control cells.

like receptor kinases or G-protein coupled receptors, for reviews Wehling & Losel, 2006; Zhang & Trudeau, 2006). For glucocorticoid hormones, as for other steroid hormones, the nature of the membrane-bound form of GR remains controversial since some authors suggest that mGR is more or less cGR bound to the plasma membrane (Bartholome et al., 2004; Gametchu, Chen, Sackey, Powell, & Watson, 1999; Gametchu, Watson, & Wu, 1993; Spies et al., 2007), whereas others claim that cGR and mGR do not share the same ligand specificity and are structurally different (Evans, Murray, & Moore, 2000; Guo, Chen, Xu, & Fu, 1995; Orchinik, Matthews, & Gasser, 2000). There is increasing evidence that some rapid effects of glucocorticoid are mediated by GPCR and subsequent activation of intracellular second messengers and protein kinases (Maier et al., 2005; Moore, Orchinik, & Lowry, 1995). In the liver, a membrane-glucocorticoid receptor has been retrieved and two G-protein isoforms (75 and 52 kDa) have been demonstrated to be involved in function of this receptor (Daufeldt et al., 2006). Although second messengers and downstream kinases activated by binding of glucocorticoid on this membrane site are numerous and seem to vary with the tissue and the function considered, PKC, PKA and p38MAPK are the main classes of kinases described as involved in glucocorticoid rapid effects (Han, Lin, & Chen, 2005; Park, Taub, & Han, 2001; Qi et al., 2005). In our study, we demonstrate that PKC and especially p38MAPK are important intracellular mediators of those effects on mitochondrial metabolism (Fig. 3). Those results are in accordance with Li (2001) who showed that treatment of PC12 cells with corticosterone resulted in a rapid activation of p38 and JNK protein kinases involving a membrane receptor and PKC-dependent. Such proteins can directly influence mitochondrial respiratory chain functioning. Indeed, all those kinases have been found in mitochondria where they can participate

in the regulation of oxidative metabolism and in the initiation of apoptotic processes (Gomel et al., 2007; Pagliarini & Dixon, 2006). PKA is present both on the outer membrane and in the inner compartment of rat cardiomyocytes mitochondria (Sardanelli et al., 2006) and, in the later, it is responsible for an increase in the oxidation of FAD and a decrease in mitochondrial membrane potential by increasing ROS production (Nagasaka et al., 2007). PKC can be translocated to mitochondria (Wang, Biswas, Prabu, & Avadhani, 2006) and, once activated, decreases the activity of NADH-ubiquinone oxidoreductase. p38MAPK has also recently been found in cardiac mitochondria (Baines et al., 2002; Wall et al., 2006) and seems to decrease oxidative phosphorylation and ROS generation in heart mitochondria (Wall et al., 2006). In our model, p38MAPK seems to be in the center of the regulatory pathway leading to modification of mitochondrial respiratory chain activity after short-term dexamethasone treatment.

Surprisingly, despite of the drop in maximal activities of complexes I and II, the overall functioning of the respiratory chain was not affected by since maximal respiration rate tented to be increased after 10 min of dexamethasone treatment (Fig. 4). However, it has been shown (Rossignol et al., 2003) that it exist a threshold effect below which the complex defect is not traduced in functional defect. For example, James et al. (1996) showed on various cell lines that mitochondrial respiration was impaired only when the inhibition of complex I was greater than 85%. We hypothesize that the increase in complex III activity could be a compensatory mechanism set up to cope with the decrease in complexes I and II activities.

#### 4.2. Long-term genomic dexamethasone effects

Mitochondria respiratory chain was also the target of long-term genomic glucocorticoid effects as shown by the increases in routine, oligomycin-insensitive and FCCP respiration rates (Fig. 7). Indeed, those increases were inhibited by actinomycin D underlying that those effects were transcriptional. Although those effects were all genomic, the initiating mechanism seems to differ.

##### 4.2.1. Membrane initiated genomic effects

Routine and oligomycin-insensitive respiration rates were similarly increased in cells treated either with free dexamethasone or with dexamethasone-BSA (Fig. 7). To ensure that, in our model, the membrane initiated effects that we found were not mediated by non-specific side effects of dexamethasone-BSA; we performed a first 10-min dexamethasone-BSA incubation in order to impede both membrane

and cytosolic glucocorticoid receptor functioning before adding dexamethasone-BSA. As preincubation with dexamethasone-BSA totally prevent dexamethasone-BSA effects, we can conclude that dexamethasone-BSA effects on respiratory chain were GR mediated. Moreover, we can exclude a possible binding of dexamethasone-BSA on cGR because, when coincubation with dexamethasone-BSA and cGR antagonist mifepristone was performed, dexamethasone-BSA-induced respiration rates stimulations were still present.

Mechanisms underlying those membrane-initiated genomic effects are not well defined. On the one hand, possible internalization of the mGR has been evocated (Daufeldt et al., 2006) and in other hand some studies reported that mGR can activate downstream kinases which interact with transcription factors (Li, 2001; Qi et al., 2005) suggesting that it can participate in the genomic effects of glucocorticoid in parallel with the classical cytosolic receptor (Chen & Qiu, 2001). A study of Kino et al. (2005), demonstrates that intracellular GR can interact with the G protein  $\beta$  and co-migrate either in the nucleus where it suppress the transcriptional activity of GR or in plasma membrane where it could modulate the G protein-dependent downstream effectors. On light of those elements and of results presented in this article, membrane-initiated glucocorticoid signaling and genomic effects are not totally independent events but rather components of interdependent signaling pathways leading to intracellular modifications set up gradually after glucocorticoid exposure.

##### 4.2.2. Cytosolic glucocorticoid receptor dependent effects

The stimulation of the respiratory chain overall capacity (respiration FCCP) was present only when the cytosolic GR was activated by the free dexamethasone. This latter can be related to the increase in complex IV enzymatic activity which was also cytosolic GR dependent. It appears that this enzyme is the key regulator of respiratory chain activity in HepG2 cells. It has been shown in HepG2 cells, by Piccoli, Scrima, Boffoli, & Capitanio (2006) that, in uncoupled conditions, complex IV possesses a low capacity of reserve but exerts a large control on endogenous respiration rate. The fact that, in our model, the part of phosphorylating respiration was decreased (Fig. 8) could explain this increase in complex IV activity in order to compensate the decrease in oxidative phosphorylation efficiency. Complex IV activity increase is a transcriptional mechanism inhibited by actinomycin D treatment. This implies a coordinated stimulation of transcription of both nuclear and mitochondrial genomes. Glucocorticoid has already been found to activate the transcription

of genes encoding subunits of the respiratory chain complexes (Kadowaki & Kitagawa, 1988; Rachamim et al., 1995; Van Itallie, 1992; Weber et al., 2002) but results varied with the treatment duration, the glucocorticoid used and the tissue considered. Molecular mechanism involved in those effects is poorly understood. In our model, the quantity of cytochrome *c* oxidase subunit IV protein, which is encoded by the nuclear genome, was significantly increased in dexamethasone-treated HepG2 cells (Fig. 6).

It has been established that several mitochondrial-encoded cytochrome *c* oxidase subunits genes (COX I, COX II and COX III) contain in their promoter sequences showing strong similarities with glucocorticoid response element (GRE) (Ioannou, Tsawdaroglou, & Sekeris, 1988). Moreover, Psarra et al. (2005) have identified the  $\alpha$  isoform of the glucocorticoid receptor in mitochondria of HepG2 cells. However, in our model, although slightly increased, COXI quantity was not significantly increased by dexamethasone treatment.

As COXIV subunit has recently been reported to play an important role in cytochrome *c* oxidase assembly and in the control of oxidative phosphorylation (Li, Park, Deng, & Bai, 2006), we could hypothesize that, in HepG2 cells, the increase in COXIV quantity after dexamethasone treatment could account for the increase in respiratory chain capacity after dexamethasone treatment.

The results presented in this paper extend our knowledge on the molecular mechanisms of glucocorticoids action on mitochondrial energy production of HepG2 cells. They point out that rapid glucocorticoid actions on mitochondria are mediated via membrane-associated receptors and that some transcriptional effects of GC may require transport of the hormone across the plasma membrane also by a membrane receptor. It remains to be determined whether the membrane associated signaling mechanisms are mediated by one or more membrane associated receptors and how the membrane initiated actions of glucocorticoids may provide an additional mechanism for the regulation of gene transcription in HepG2 cells. Daufeldt et al. (2006) have proposed that, in hepatocytes, the interaction of glucocorticoid with a membrane receptor initiates signal transduction via the nuclear receptor but a precise description of cellular events linking mGR and the cGR is still missing.

Data have emerged from several laboratories to suggest that acute physiological effects of glucocorticoids are mediated by actions associated with the plasma membrane. Here we demonstrated that one of the major functions of glucocorticoids, the regulation of energy metabolism also involved membrane asso-

ciated glucocorticoid receptors coupled to downstream G protein-dependent signaling cascades in hepatocarcinoma cells. Since mitochondria are the principal source for ATP production with glycolysis, the physiological function of this regulation has to be clarified. In the immune system, a correlation between the quantity of the membrane bound receptors and the ability to induce lymphocytolysis has been reported leading to consider the process as a mechanism of negative feed-back regulation (Tryc et al., 2006). In the liver, membrane glucocorticoid binding sites have been described both in primary rat hepatocytes (Daufeldt, Lanz, & Allera, 2003) and in hepatoma cells Hep3B, (Jain, Li, Kumar, & Sehgal, 2005) but, in this tissue, the functional relevance of the pathway needs to be investigated in details.

### Acknowledgments

Valérie Desquret was supported by a grant from Angers Loire Metropole (France). Authors thank Jocelyne Hodbert for technical assistance in cell culture and Céline Wetterwald and Anaïs Planconneau for their precious help in enzymatic measurements.

### References

- Arvier, M., Lagoutte, L., Johnson, G., Dumas, J. F., Sion, B., Grizard, G., et al. (2007). Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 293(5), E1320–E1324.
- Baines, C. P., Zhang, J., Wang, G. W., Zheng, Y. T., Xiu, J. X., Cardwell, E. M., et al. (2002). Mitochondrial PKCepsilon and MAPK form signaling modules in the murine heart: enhanced mitochondrial PKCepsilon-MAPK interactions and differential MAPK activation in PKCepsilon-induced cardioprotection. *Circ. Res.*, 90, 390–397.
- Bartholome, B., Spies, C. M., Gaber, T., Schuchmann, S., Berki, T., Kunkel, D., et al. (2004). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) are expressed in normal human peripheral blood mononuclear cells and up-regulated after in vitro stimulation and in patients with rheumatoid arthritis. *FASEB J.*, 18, 70–80.
- Chen, Y. Z., & Qiu, J. (2001). Possible genomic consequence of nongenomic action of glucocorticoids in neural cells. *News Physiol. Sci.*, 16, 292–296.
- Cui, L., Yoon, S., Schinazi, R. F., & Sommadossi, J. P. (1995). Cellular and molecular events leading to mitochondrial toxicity of 1-(2-deoxy-2-fluoro-1-beta-D-arabinofuranosyl)-5-iodouracil in human liver cells. *J. Clin. Invest.*, 95, 555–563.
- Daufeldt, S., Lanz, R., & Allera, A. (2003). Membrane-initiated steroid signaling (MISS): genomic steroid action starts at the plasma membrane. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 85, 9–23.
- Daufeldt, S., Klein, R., Wildt, L., & Allera, A. (2006). Membrane initiated steroid signaling (MISS): computational, in vitro and in vivo evidence for a plasma membrane protein initially involved in genomic steroid hormone effects. *Mol. Cell Endocrinol.*, 246, 42–52.



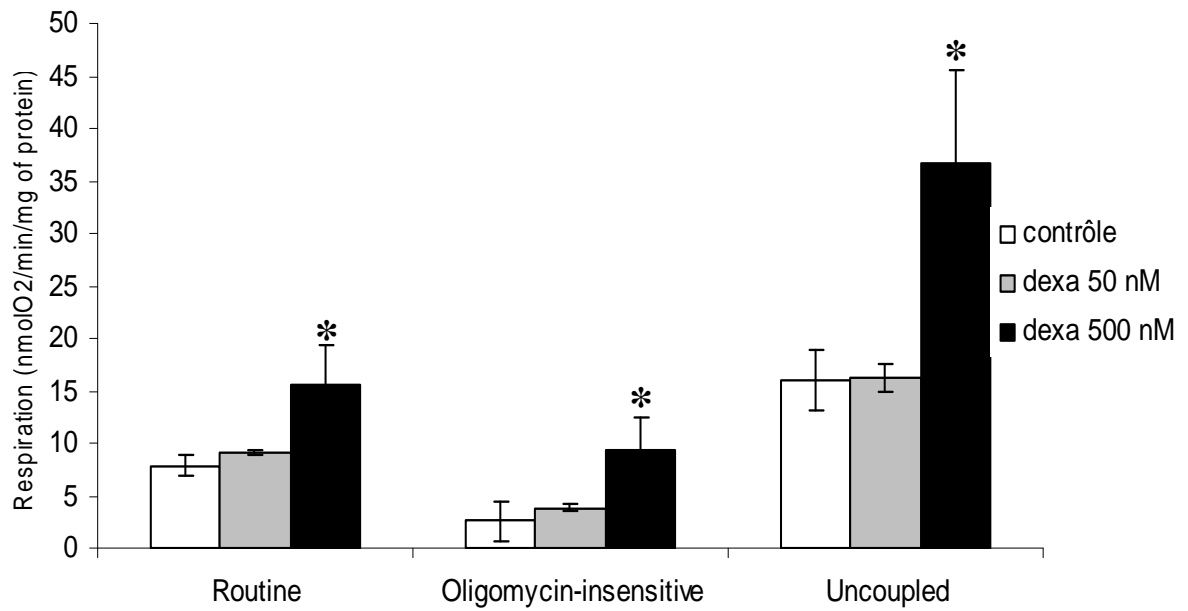
- Desquret, V., Loiseau, D., Jacques, C., Douay, O., Malthiery, Y., Ritz, P., et al. (2006). Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells. *Biochim. Biophys. Acta*, *1757*, 21–30.
- Di, S., Malcher-Lopes, R., Marcheselli, V. L., Bazan, N. G., & Tasker, J. G. (2005). Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and opposing regulation of glutamate and gamma-aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology*, *146*, 4292–4301.
- Dumas, J. F., Simard, G., Roussel, D., Douay, O., Foussard, F., Malthiery, Y., et al. (2003). Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone. *Br. J. Nutr.*, *90*, 969–977.
- Evans, S. J., Murray, T. F., & Moore, F. L. (2000). Partial purification and biochemical characterization of a membrane glucocorticoid receptor from an amphibian brain. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, *72*, 209–221.
- Frangos, J. A., Huang, T. Y., & Clark, C. B. (1996). Steady shear and step changes in shear stimulate endothelium via independent mechanisms—superposition of transient and sustained nitric oxide production. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *224*, 660–665.
- Gametchu, B., Watson, C. S., & Wu, S. (1993). Use of receptor antibodies to demonstrate membrane glucocorticoid receptor in cells from human leukemic patients. *FASEB J.*, *7*, 1283–1292.
- Gametchu, B., Chen, F., Sackey, F., Powell, C., & Watson, C. S. (1999). Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models. *Steroids*, *64*, 107–119.
- Gomel, R., Xiang, C., Finniss, S., Lee, H. K., Lu, W., Okhrimenko, H., et al. (2007). The localization of protein kinase Cdelta in different subcellular sites affects its proapoptotic and antiapoptotic functions and the activation of distinct downstream signaling pathways. *Mol. Cancer Res.*, *5*, 627–639.
- Guo, Z., Chen, Y. Z., Xu, R. B., & Fu, H. (1995). Binding characteristics of glucocorticoid receptor in synaptic plasma membrane from rat brain. *Funct. Neurol.*, *10*, 183–194.
- Han, J. Z., Lin, W., & Chen, Y. Z. (2005). Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids: involvement of protein kinase A. *Acta Pharmacol. Sin.*, *26*, 199–204.
- Honer, C., Nam, K., Fink, C., Marshall, P., Ksander, G., Chatelain, R. E., et al. (2003). Glucocorticoid receptor antagonism by cyproterone acetate and RU486. *Mol. Pharmacol.*, *63*, 1012–1020.
- Hutter, E., Renner, K., Pfister, G., Stockl, P., Jansen-Durr, P., & Gnaiger, E. (2004). Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts. *Biochem. J.*, *380*, 919–928.
- Ioannou, I. M., Tsawdaroglou, N., & Sekeris, C. E. (1988). Presence of glucocorticoid responsive elements in the mitochondrial genome. *Anticancer Res.*, *8*, 1405–1409.
- Jain, S., Li, Y., Kumar, A., & Sehgal, P. B. (2005). Transcriptional signaling from membrane raft-associated glucocorticoid receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, *336*, 3–8.
- James, A. M., Wei, Y. H., Pang, C. Y., & Murphy, M. P. (1996). Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem. J.*, *318*(Part 2), 401–407.
- Kadowaki, T., & Kitagawa, Y. (1988). Enhanced transcription of mitochondrial genes after growth stimulation and glucocorticoid treatment of Reuber hepatoma H-35. *FEBS Lett.*, *233*, 51–56.
- Kino, T., Tiulpakov, A., Ichijo, T., Chheng, L., Kozasa, T., & Chrousos, G. P. (2005). G protein beta interacts with the glucocorticoid receptor and suppresses its transcriptional activity in the nucleus. *J. Cell Biol.*, *169*, 885–896.
- Lewerenz, J., Letz, J., & Methner, A. (2003). Activation of stimulatory heterotrimeric G proteins increases glutathione and protects neuronal cells against oxidative stress. *J. Neurochem.*, *87*, 522–531.
- Li, X. Y. (2001). Rapid activation of p38 mitogen-activated protein kinase by corticosterone in PC12 cells. *Sheng Li Xue Bao*, *53*, 414–418.
- Li, Y., Park, J. S., Deng, J. H., & Bai, Y. (2006). Cytochrome c oxidase subunit IV is essential for assembly and respiratory function of the enzyme complex. *J. Bioenerg. Biomembr.*, *38*, 283–291.
- Maier, C., Runzler, D., Schindelar, J., Grabner, G., Waldhausl, W., Kohler, G., et al. (2005). G-protein-coupled glucocorticoid receptors on the pituitary cell membrane. *J. Cell Sci.*, *118*, 3353–3361.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, *83*, 835–839.
- Martens, M. E., Peterson, P. L., & Lee, C. P. (1991). In vitro effects of glucocorticoid on mitochondrial energy metabolism. *Biochim. Biophys. Acta*, *1058*, 152–160.
- Menezes-Ferreira, M. M., & Torresani, J. (1983). Mechanism of action of thyroid hormones at the cellular level. *Ann. Endocrinol. (Paris)*, *44*, 205–216.
- Moore, F. L., Orchinik, M., & Lowry, C. (1995). Functional studies of corticosterone receptors in neuronal membranes. *Receptor*, *5*, 21–28.
- Nagasaka, S., Katoh, H., Niu, C. F., Matsui, S., Urushida, T., Satoh, H., et al. (2007). Protein kinase A catalytic subunit alters cardiac mitochondrial redox state and membrane potential via the formation of reactive oxygen species. *Circ. J.*, *71*, 429–436.
- Navas, P., Nowack, D. D., & Morre, D. J. (1989). Isolation of purified plasma membranes from cultured cells and hepatomas by two-phase partition and preparative free-flow electrophoresis. *Cancer Res.*, *49*, 2147–2156.
- Orchinik, M., Matthews, L., & Gasser, P. J. (2000). Distinct specificity for corticosteroid binding sites in amphibian cytosol, neuronal membranes, and plasma. *Gen. Comp. Endocrinol.*, *118*, 284–301.
- Pagliarini, D. J., & Dixon, J. E. (2006). Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem. Sci.*, *31*, 26–34.
- Park, S., Taub, M., & Han, H. (2001). Regulation of phosphate uptake in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells by glucocorticoids: evidence for nongenomic as well as genomic mechanisms. *Endocrinology*, *142*, 710–720.
- Piccoli, C., Scrima, R., Boffoli, D., & Capitanio, N. (2006). Control by cytochrome c oxidase of the cellular oxidative phosphorylation system depends on the mitochondrial energy state. *Biochem. J.*, *396*, 573–583.
- Pietrobon, E. O., Soria, M., Dominguez, L. A., Monclus Mde, L., & Fornes, M. W. (2005). Simultaneous activation of PLA2 and PLC are required to promote acrosomal reaction stimulated by progesterone via G-proteins. *Mol. Reprod. Dev.*, *70*, 58–63.
- Psarra, A. M., Solakidi, S., Trougakos, I. P., Margaritis, L. H., Spyrou, G., & Sekeris, C. E. (2005). Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, *37*, 2544–2558.
- Qi, A. Q., Qiu, J., Xiao, L., & Chen, Y. Z. (2005). Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells. *J. Neurosci. Res.*, *80*, 510–517.
- Rachamim, N., Latter, H., Malinin, N., Asher, C., Wald, H., & Garty, H. (1995). Dexamethasone enhances expression of mitochondrial

- oxidative phosphorylation genes in rat distal colon. *Am. J. Physiol.*, 269, C1305–C1310.
- Ramsey, J. J., Harper, M. E., & Weindruch, R. (2000). Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging. *Free Radic. Biol. Med.*, 29, 946–968.
- Roussignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J. P., & Letellier, T. (2003). Mitochondrial threshold effects. *Biochem. J.*, 370, 751–762.
- Roussel, D., Dumas, J. F., Augeraud, A., Douay, O., Foussard, F., Malthiery, Y., et al. (2003). Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria. *FEBS Lett.*, 541, 75–79.
- Rustin, P., Chretien, D., Bourgeron, T., Gerard, B., Rotig, A., Saudubray, J. M., et al. (1994). Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta*, 228, 35–51.
- Rustin, P., Lebedois, J., Chretien, D., Bourgeron, T., Piechaud, J. F., Rotig, A., et al. (1994). Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies. *J. Pediatr.*, 124, 224–228.
- Sardanelli, A. M., Signorile, A., Nuzzi, R., Rasmø, D. D., Technikova-Dobrova, Z., Drahotova, Z., et al. (2006). Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMP-dependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.*, 580, 5690–5696.
- Scheller, K., & Sekeris, C. E. (2003). The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation. *Exp. Physiol.*, 88, 129–140.
- Spies, C. M., Bartholome, B., Berki, T., Burmester, G. R., Radbruch, A., Scheffold, A., et al. (2007). Membrane glucocorticoid receptors (mGCR) on monocytes are up-regulated after vaccination. *Rheumatology (Oxford)*, 46, 364–365.
- Trueba, M., Ibarrola, I., Ogiza, K., Marino, A., & Macarulla, J. M. (1991). Specific binding sites for corticosterone in isolated cells and plasma membrane from rat liver. *J. Membr. Biol.*, 120, 115–124.
- Tryc, A. B., Spies, C. M., Schneider, U., Kunkel, D., Berki, T., Sieper, J., et al. (2006). Membrane glucocorticoid receptor expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis. *J. Rheumatol.*, 33, 2249–2253.
- Van Itallie, C. M. (1992). Dexamethasone treatment increases mitochondrial RNA synthesis in a rat hepatoma cell line. *Endocrinology*, 130, 567–576.
- Wall, J. A., Wei, J., Ly, M., Belmont, P., Martindale, J. J., Tran, D., et al. (2006). Alterations in oxidative phosphorylation complex proteins in the hearts of transgenic mice that overexpress the p38 MAP kinase activator MAP kinase kinase 6. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 291, H2462–H2472.
- Wang, Y., Biswas, G., Prabu, S. K., & Avadhani, N. G. (2006). Modulation of mitochondrial metabolic function by phorbol 12-myristate 13-acetate through increased mitochondrial translocation of protein kinase Calpha in C2C12 myocytes. *Biochem. Pharmacol.*, 72, 881–892.
- Weber, K., Bruck, P., Mikes, Z., Kupper, J. H., Klingenspor, M., & Wiesner, R. J. (2002). Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle. *Endocrinology*, 143, 177–184.
- Wehling, M., & Losel, R. (2006). Non-genomic steroid hormone effects: membrane or intracellular receptors? *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 102, 180–183.
- Zhang, D., & Trudeau, V. L. (2006). Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.*, 144, 306–315.

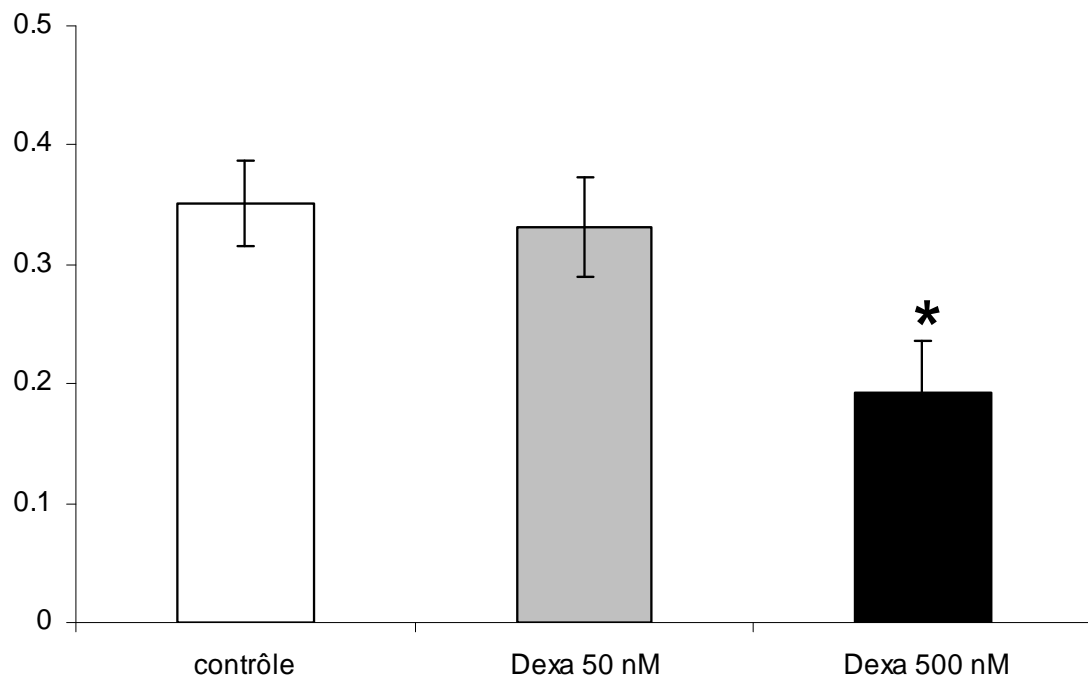
## Résultats complémentaires de l'article n°2.

Figure 25.

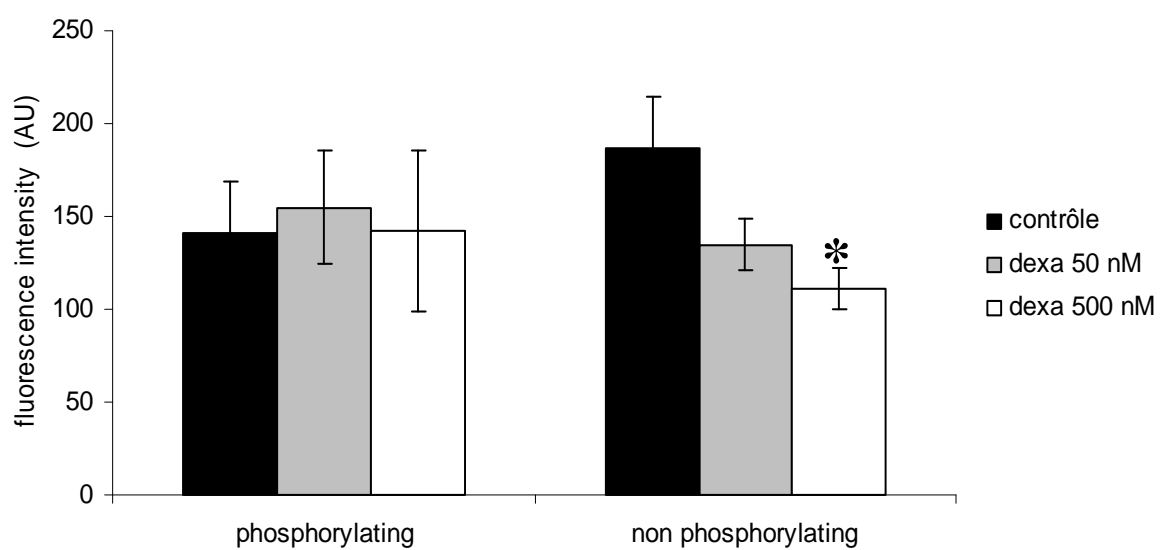
A



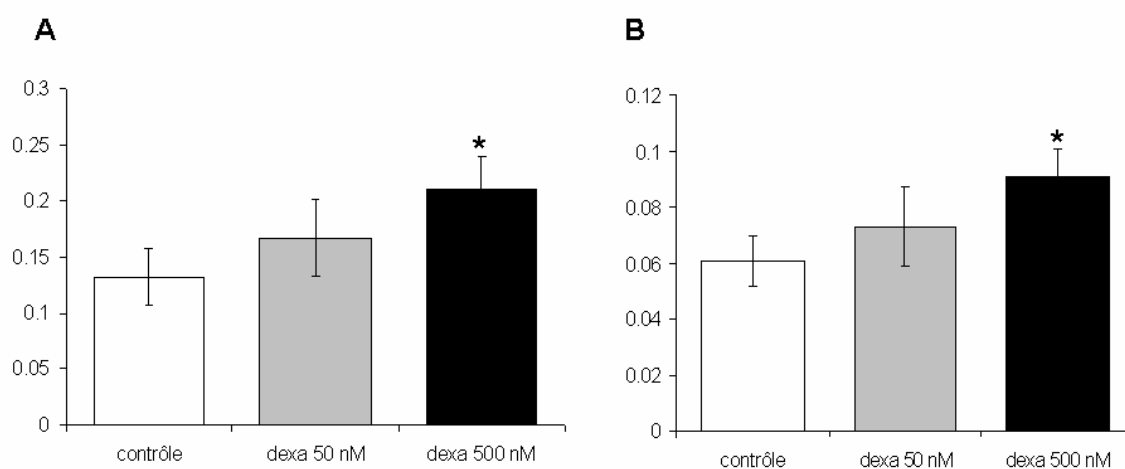
B



**Figure 26.**



**Figure 27.**



## **Légendes des figures des résultats complémentaires de l'article n°2.**

### **Figure 25: paramètres respiratoire des cellules HepG2 traitées pendant 5 jours par 50 ou 500 nM de dexaméthasone.**

Les cellules HepG2 ont été traitées pendant 5 jours par 50 (barres grises) ou 500 nM (barres noires) de dexaméthasone. A : les respirations de routine (endogène), insensible à l'oligomycine (non couplée à la synthèse d'ATP) et découplée (capacité maximale de la chaîne respiratoire) sont mesurées sur cellules entières non perméabilisées. n=6 en duplicate, \* :p<0.05 par rapport aux cellules contrôle (barres blanches). B : rapport de contrôle respiratoire en conditions phosphorylantes. Il exprime la part de la capacité maximale de la chaîne respiratoire utilisée pour synthétiser de l'ATP. Il est calculé en retranchant la respiration non phosphorylante de la respiration de routine (ce qui donne la part de la respiration de routine couplée à la synthèse d'ATP) et en divisant ce résultat par la respiration découplée. n=6 en duplicate, \* :p<0.05 par rapport aux cellules contrôles.

### **Figure 26: potentiel membranaire mitochondrial des cellules HepG2 traitées pendant 5 jours par 50 ou 500 nM de dexaméthasone.**

Les cellules HepG2 ont été traitées pendant 5 jours par 50 (barres grises) ou 500 nM (barres noires) de dexaméthasone. Les cellules ont été incubées ensuite en présence du fluorochrome DiOC6(3), un cation lipophile dont l'intensité de fluorescence est proportionnelle au potentiel membranaire mitochondrial. L'intensité de fluorescence de cette sonde est ensuite lue par cytométrie en flux. n=4 en duplicate, \* : p<0.05 par rapport aux cellules contrôles (barres blanches).

### **Figure 27: quantité de protéines COXIV et ANT dans les cellules traitées pendant 5 jours par 50 ou 500 nM de dexaméthasone.**

Les cellules HepG2 ont été traitées pendant 5 jours par 50 (barres grises) ou 500 nM (barres noires) de dexaméthasone. La quantité de protéines COXIV et ANT a été déterminée par Western blot (Anticorps monoclonaux Mitosciences, Eugene, Etats-Unis). A : quantification de COXIV par rapport à VDAC, B : quantification d'ANT par rapport à  $\alpha$  tubuline. n=6, \* :p<0.05 par rapport aux cellules contrôles (barres blanches).

## **Article n°3**

### ***Calcium and p38MAPK are key mediators of rapid effects of dexamethasone on mitochondrial oxidative metabolism in HepG2 cells.***

*Valérie Desquiret, Naïg Gueguen, Yves Malthièry, Patrick Ritz, Jean-Yves Le Guennec et Gilles Simard.*

*Soumis à FEBS Journal.*

**CALCIUM AND p38MAPK ARE KEY MEDIATORS OF RAPID EFFECTS OF  
DEXAMETHASONE ON MITOCHONDRIAL OXIDATIVE METABOLISM  
OF HEPG2 CELLS.**

**Valérie Desquiret<sup>1</sup>, Naïg Gueguen<sup>2</sup>, Yves Malthièry<sup>1,2,3</sup>, Patrick Ritz<sup>1,3,4</sup>, Jean Yves Le Guennec<sup>5</sup> and Gilles Simard<sup>1,2,3</sup>**

<sup>1</sup>Inserm, U694, Angers, F-49033 France; <sup>2</sup>CHU Angers, Département de Biochimie et Génétique, Angers, F-49033 France ; <sup>3</sup>Université d'Angers, Angers, F-49035 France; <sup>4</sup>CHU Angers, Pôle Maladies Métaboliques et Médecine Interne, Angers, F-49033 France ; <sup>5</sup>INSERM, U921, Tours, F-37000, France.

**Running title** : p38MAPK mediates rapid effects of dexamethasone.

**Subdivision** : Biochemistry of the living cell.

**Corresponding author** : Dr. Gilles Simard, CHU Angers, Département de Biochimie et Génétique, F-49033 ANGERS Cedex 01, France, Phone : +33-241355796, Fax: +33-241354017, E-mail: [gisimard@chu-angers.fr](mailto:gisimard@chu-angers.fr)

**Abbreviations** : BIM, bisindolylmaleimide I; cGR, cytosolic glucocorticoid receptor; CRAC, calcium release activated channel; ER, endoplasmic reticulum; GPCR, G protein-coupled receptor; GRE, glucocorticoid response element; IP1, inositol monophosphate; IP3, inositol triphosphate; mGR, membrane glucocorticoid receptor; NLS, nuclear localization signal; PLC, phospholipase C; PTP, permeability transition pore; ROS, reactive oxygen species.

**Keywords** : Glucocorticoid, calcium, mitochondria, hepatocarcinoma cells, non genomic effects.

***SUMMARY.***

Over the last years, a growing number of studies have focused on rapid non genomic effects of glucocorticoids. Although the involvement of a membrane glucocorticoid receptor has been shown for many of those effects, the exact nature of this receptor and signaling pathways activated differ with the studies and the tissue considered. Here, we have focused on rapid mitochondrial effects of the synthetic glucocorticoid dexamethasone. We show that those effects are mediated by a Gq protein-coupled receptor and that downstream increase of intracellular calcium concentration and p38MAPK activation are required for mitochondrial rapid effects of dexamethasone.



## ***1. INTRODUCTION.***

Glucocorticoids play a regulating role in various pathways including immune function, homeostasis, stress response and cellular differentiation [1]. According to the classical model of steroid action, glucocorticoids enter the cell passively by diffusion through the lipid membrane and bind to the cytosolic glucocorticoid receptor (cGR). This triggers dissociation of chaperon proteins revealing the nuclear localization signal (NLS). The hormone/receptor complex is translocated to the nucleus where, after binding to the glucocorticoid response elements (GRE) on target genes, it modulates their transcription [2]. However, some glucocorticoids effects appear within seconds after hormone administration and cannot be explained by transcriptional modifications. Although discrepancies appear in described pathways, many studies report the involvement of additional membrane glucocorticoids binding sites which might initiate nongenomic phenomena by activation of different intracellular kinases [3-6].

Such a binding site has been described on the plasma membrane of hepatic cells (isolated hepatocytes and hepatoma cell lines) [7-10]. The exact nature of the “receptor” is not clearly established, several studies reporting that it is an isoform of the cytosolic glucocorticoid receptor [11,12] while others favor the hypothesis of a G Protein Coupled Receptor (GPCR) [13-17]. We have recently shown that mitochondrial respiratory chain of HepG2 cells is the target of such non genomic effects that imply a GPCR [18]. Downstream of this membrane glucocorticoid binding site, different intracellular signaling pathways have been described such as cAMP/PKA [19], phospholipase C/PKC [20] and p38MAPK [21]. In this work, we aimed at determining which of these pathways are involved in rapid effects of dexamethasone in the mitochondria of HepG2 cells. We show that dexamethasone-induced rapid modifications of respiratory chain complexes activities are mediated by a calcium/p38MAPK-dependent pathway.

## **2. RESULTS.**

### **a. Dexamethasone activates a Gq protein dependent signaling.**

We have previously shown the involvement of a GPCR-coupled glucocorticoid binding site in short term mitochondrial effects of dexamethasone. To go further on the characterisation of this membrane site, we measured Gq protein activation after 10 minutes of dexamethasone treatment. Figure 1 shows that IP1 concentration (which was the reflect of Gq protein activation) was increased of 57% in HepG2 cells treated with 500 nM of dexamethasone compared with control cells ( $p < 0.05$ ).

### **b. Dexamethasone increases intracellular calcium concentration.**

Gq protein activation has often been linked to increase in intracellular calcium concentration via IP3 dependent intracellular calcium release. We therefore measured the intracellular calcium concentration after treatment of HepG2 cells with dexamethasone. As shown on figure 2 (panel A), during dexamethasone perfusion, intracellular calcium increased progressively during 6 minutes, reached a maximum value (170 % of control cells infused only with PSS) and stayed high for the rest of the measure. Addition of GDP $\beta$ S, to inhibit G protein activity (panel B), of U73122 to inhibit PLC activity (panel C) or bisindolylmaleimide to inhibit PKC activity (panel D) in dexamethasone perfusion prevented the increase in intracellular calcium concentration underlying a role for G protein-coupled receptor, phospholipase C and PKC in this stimulation. It should be noticed that for G protein inhibition, cells were preincubated twenty minutes with GDP $\beta$ S before the experiment.

### **c. Dexamethasone-induced intracellular calcium increase involves intracellular calcium stores release.**

To determine the origin of intracellular calcium increase triggered by dexamethasone, we incubated HepG2 cells in a calcium free medium supplemented with dexamethasone. In those cells, dexamethasone still induced an intracellular calcium increase showing that calcium release of intracellular stores was involved (figure 3). Moreover, depletion of endoplasmic

reticulum (ER) stores by addition of 1  $\mu$ M of thapsigargin 8 minutes before and during addition of dexamethasone resulted in a rapid increase of intracellular calcium after dexamethasone addition but this increase was transient and returned to basal level within 3 minutes. Those results show that dexamethasone-induced calcium increase is a biphasic mechanism: a first rapid “ER-independent” increase and then a long -lasting “ER-dependent” increase (figure 3).

d. Mitochondrial effects of dexamethasone are calcium and p38MAPK dependent.

To test the involvement of the intracellular calcium increase in dexamethasone-induced changes in respiratory chain complexes activities, HepG2 cells were incubated either with chelator of calcium alone (1  $\mu$ M of BAPTA-AM) or inhibitor of P38MAPK (10  $\mu$ M SB202190) or both with inhibitor/chelator and dexamethasone. Results presented table 1 showed that treatment with BAPTA-AM modified complex I activity. Indeed, chelation of intracellular calcium significantly increased the activity of complex I (+31% compared with control cells,  $p < 0.05$ ). p38MAPK inhibitor did not modify complexes activities. The incubation of HepG2 cells once with dexamethasone and BAPTA-AM or SB202190 prevented all dexamethasone-induced variations in complexes activities (table 2).

e. p38MAPK is a downstream effector of the intracellular calcium increase induced by dexamethasone.

Figure 4 shows that dexamethasone treatment increases the phosphorylated form of p38MAPK ( $p < 0.05$  compared with control cells). This increase was prevented by incubation with p38MAPK inhibitor SB202190 validating the specificity of this inhibitor. Treatment with BAPTA-AM or BIM (PKC inhibitor) totally abolished the activation of p38MAPK emphasizing the role of the increase in intracellular calcium increase triggered by dexamethasone in p38MAPK activation.

### **3. DISCUSSION.**

In a previous study, we have shown that a ten-minute dexamethasone exposure of HepG2 cells induced activation of a GPCR-initiated pathway leading to modifications of mitochondrial respiratory chain complexes activities [18]. The present study enables to go further on intracellular pathways involved on those mitochondrial dexamethasone effects. We showed that Gq protein activation triggered an increase of the intracellular calcium concentration within five minutes after the addition of hormone (figure 2). Calcium has previously been described as an important mediator of rapid GC effects in brain-derived and lymphoblastic cells but studies reported either a decrease [22] or an increase [19,23] in intracellular calcium concentration after GC treatment. In our model, dexamethasone induced a biphasic intracellular calcium stores release: firstly a rapid ER-independent intracellular calcium release and secondly a prolonged ER calcium release (figure 3). We can exclude that the first calcium increase was due to incomplete thapsigargin-induced ER-emptying since a preliminary eight-minute incubation in absence of external calcium was performed with thapsigargin alone to empty ER calcium store and the reintroduction of calcium outside the cells induced an influx of calcium through CRAC (data not shown). Moreover, the fact that this increase was transient and of high amplitude confirmed that this increase was ER-independent.

Apart from the ER, involvement of other organites in intracellular calcium homeostasis has been described [24]. Indeed, Xu *et al.* have shown that outer nuclear membrane contained calcium pumps that were related to the sarcoplasmic/endoplasmic calcium ATPase (SERCA) family [25]. As, in liver, the calcium pumps are quite similar as the ER one [26], we can hypothesize that thapsigargin also inhibit nuclear envelope calcium pumps excluding a role of this organite in the ER-independent calcium increase. Golgi apparatus, which contained both SERCA-type and golgi-specific thapsigargin-insensitive type of calcium pumps [27,28], and mitochondria also play an important physiological role in intracellular calcium homeostasis [29]. In our model, the intracellular calcium increase was involved in dexamethasone-induced

mitochondrial respiratory chain defects thus the hypothesis of an implication of mitochondria in the ER-independent calcium increase was privileged. Moreover, as ER-mitochondria interactions have been described as pivotal in the control of calcium signaling notably in the control of ER calcium release [30], this early mitochondrial calcium release could be involved in the activation of the long lasting ER calcium mobilization. However, we can not exclude that golgi apparatus plays a role in initial calcium release and further studies using specific organelle-targeted calcium-probes would be necessary to determine the exact origin of calcium. Calcium ions are important modulators of the mitochondrial oxidative metabolism since they have been identified as activators of three Krebs cycle enzymes (pyruvate dehydrogenase, 2-oxoglutarate dehydrogenase and  $\text{NAD}^+$  isocitrate dehydrogenase) [29] and by this way increased the amount of NADH supply for the respiratory chain. This second messenger can also directly modulate respiratory chain functioning by activating mitochondrial kinases and phosphatases which targets are mitochondrial respiratory chain complexes subunits [31]. On the contrary, few studies report the impact of mitochondrial calcium release in oxidative metabolism and this event has often been linked to the outcome of apoptosis [32]. Indeed, mitochondrial permeability transition pore (PTP) can release large amounts of calcium leading to cell death. However, PTP opening can also be transient and allow diffusion of small molecules such as calcium ions and protons [33]. This transient PTP opening has been thought to participate in the modulation of calcium-sensitive ion channels such as the IP3 receptor (IP3R) of the ER [34]. Mitochondrial calcium release could therefore constitute the initiating signal of the ER calcium release. Moreover, it has been shown that decreased levels of mitochondrial calcium can be involved in mitochondrial dysfunctions. For example, defects in mitochondrial calcium homeostasis have been found in several mitochondrial disorders including complex I deficiency [35]. However, in our model, calcium does not seem to be directly involved in mitochondrial effects of dexamethasone but rather appears as the initiating event of the intracellular cascade since inhibition of downstream

p38MAPK totally inhibits the modifications of respiratory chain complexes activities induced by dexamethasone. Studies have yet reported a pivotal role for calcium in p38MAPK activation and a link with mitochondrial metabolism. Wright *et al.* have shown that raising intracellular calcium concentration in rat epitrochlearis muscles results in activation of the calcium/calmodulin protein kinase CAMK2 which activates p38MAPK [36]. This protein kinase downstream interacts with PGC-1 $\alpha$  and promotes mitochondrial biogenesis. This study emphasizes the determinant role of p38MAPK in the regulation of energetic metabolism. p38MAPK and PKC have also been shown to be involved in the control mitochondrial calcium uptake [37]. Furthermore, p38MAPK seems to directly influence mitochondrial respiratory chain functioning since this protein has recently been found in cardiac mitochondria and seems to decrease oxidative phosphorylation and ROS generation [38]. Altogether, those elements point p38MAPK as the key mediator of short term mitochondrial effects of dexamethasone (figure 4), at the crossroads of calcium signaling and of mitochondrial functioning.

Those results are in accordance with a previous study of Li et al [39] which showed that treatment of PC12 cells with corticosterone resulted in a rapid activation of p38 and JNK protein kinases involving a membrane receptor and PKC-dependent.

The exact mechanism of p38MAPK-dependent variation of respiratory chain complexes activities (direct phosphorylation of complexes sub-units, conformational changes of enzymes ...) remains to be determined.

Taken together, the results presented in this study enable to further show the critical role of the intracellular calcium and p38MAPK signaling in short time mitochondrial dexamethasone-induced effects.

#### **4. MATERIAL AND METHODS.**

##### **Material.**

RPMI 1640, L-glutamine and antibiotics were obtained from Gibco, Cergy-Pontoise, France; FBS from Biochrom, Berlin, Germany and dexamethasone from Merck, Lyon, France. FURA-2/AM and SB202190 were from Sigma-Aldrich, Lyon, France. IP1-ELISA kit was from Cisbio, Bedford, USA. Bisindolylmaleimide I, PKA inhibitor 14-22 amide, GDP $\beta$ S and U73122 were bought from Calbiochem (Merck chemicals, Nottingham, UK).

## **Methods.**

### *Cell line and growth conditions.*

The HepG2 human hepatocarcinoma cell line was grown as described in [18]. Medium was renewed every two days. On the fifth day, medium was removed and cells were treated with 500 nM of dexamethasone for 10 minutes. Cells were then harvested, counted and frozen on pellets until enzymatic measurements.

### *Protein Gq activation measurement.*

Protein Gq activation was measured using IP1-ELISA kit from Cisbio. This kit is based on the detection of IP1, one of the major products of phosphatidyl inositol cascade which concentration is tightly correlated with Gq protein activation by agonist. Briefly, HepG2 cells were seeded in a 24-wells plate at one million by well. The next day, medium was removed and was replaced by stimulation buffer supplemented or not with 500 nM of dexamethasone. This buffer contained lithium chloride salts to prevent IP1 degradation in samples. Cells were incubated during one hour at 37°C and were then lysed for 30 minutes at 37°C with 50  $\mu$ l of 2.5% lysis buffer provided in the kit. Fifty microliters of cell lysate were transferred to ELISA microplate wells and incubated during 3 hours with primary IP1 antibody and HRP-coupled secondary antibody. HRP substrate TMB was added after a wash step and a 30 minutes incubation was performed in the dark. One hundred microliters of stop solution were added in each well and optical density was read with a plate reader (Mithras LB940 Reader, Thoiry, France) at 450 nm with a background correction at 620 nm to correct imperfections of the

plate. An exponential titration curve was drawn to determine IP1 concentration in the samples.

*Measurement of  $[Ca^{2+}]_{cyt}$  using FURA-2/AM.*

HepG2 cells were seeded in 35 mm of diameter glass coverslips (Fluorodishes, Word Precision Instruments, Stevenage, England) at a density of 50.000 cells per dish and were grown in the RPMI 1640 medium, supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2mM L-glutamine, penicillin G (100 U/ml), streptomycin (2mM) and amphotericin B (0.25  $\mu$ g/ml). The day of the experiment, cells were loaded with 10  $\mu$ M of Fura-2/AM at room temperature for 45 minutes in PSS buffer (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM  $MgCl_2$ , 330  $\mu$ M  $NaH_2PO_4$ , 2 mM  $CaCl_2$ , 10 mM HEPES, 11.1 mM glucose, pH 7.4). Cells were washed once with 1 ml of PSS to remove the excess of FURA-2/AM, washed twice with PSS and incubated 20 minutes to allow the complete de-esterification of the dye. Fluorescence intensity of FURA-2/AM was measured as described in [40]. Briefly, the coverslip was placed on the stage of a Nikon Eclipse TE2000-5 inverted microscope (Nikon, Champigny-sur-Marne, France) and perfused with PSS medium. A 60 X Nikon Plan Apo oil immersion objective was used for epifluorescence measurement. Cell preparation was excited every two seconds at two excitations wavelengths (340 and 380 nm) for 50 ms by a 75 W xenon lamp coupled to a monochromator (Cairn Optoscan, UK). A photomultiplier tube was used to detect the fluorescence emission at  $510\pm 20$  nm. The analogic signal that it generated was converted to digital signal by a Digidata 1322 A converter (Axon Instruments, Molecular Devices, Sunnyvale, Etats-Unis) at a sampling frequency of 2 kHz and analysed using Clampex 9.2 (Axon Instrument). Background fluorescence was determined at 340 and 380 nm at the end of each experiment switching to an area of the coverslip free of cell. Data were analysed with Clampex 9.2 software (Axon Instruments).

*Determination of enzymatic activities.*

All assays were performed on cell lysates as described in [18]



### *Quantification of the phosphorylated form of p38MAPK.*

HepG2 cells were cultured as described herein. Before dexamethasone treatment, hepG2 cells were incubated during thirty minutes with the following inhibitors: p38MAPK inhibitor: SB202190 (10  $\mu$ M), PKC inhibitor: bisindolylmaleimide I (BIM, 3  $\mu$ M) or intracellular calcium chelator: BAPTA-AM (1  $\mu$ M). Cells were harvested and lysed in cell lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM NaF, 20 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% Triton X-100, 10% glycerol, 0.1% SDS, 0.5% sodium deoxycholate, 1mM PMSF and antiprotease cocktail, pH 7.4) during 30 minutes, vortexing at 10 minutes intervals. Cells lysates were centrifuged 10 minutes at 13 000 rpm at 4°C. Supernatant containing proteins was stored at -80°C until the assay. Phosphorylated-p38MAPK were assayed with the PhoshoDetect™ p38 MAP Kinase (pThr<sup>180</sup>/pThr<sup>182</sup>) ELISA kit (Calbiochem, Merck chemicals, Nottingham, UK) according to the manufacturer's instructions.

### *Statistical analysis.*

A non-parametric Mann-Whitney test was used to compare treated groups and controls. Differences were considered significant at  $p < 0.05$ .

Results are expressed as mean  $\pm$  sem.

## **5. ACKNOWLEDGMENTS.**

Valérie Desquret was supported by a grant from Angers Loire Metropole. Authors thank Céline Wetterward her help in enzymatic measurement.

## **6. REFERENCES.**

1. Scheller, K & Sekeris, CE (2003) The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation, *Exp Physiol* **88**, 129-140.
2. Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P & Evans RM (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade, *Cell* **83**, 835-839.

3. Liu C, Zhou J, Zhang LD, Wang YX, Kang ZM, Chen YZ & Jiang, CL (2007) Rapid inhibitory effect of corticosterone on histamine release from rat peritoneal mast cells, *Horm Metab Res* **39**, 273-277.
4. Park S, Taub M & Han H (2001) Regulation of phosphate uptake in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells by glucocorticoids: evidence for nongenomic as well as genomic mechanisms, *Endocrinology* **142**, 710-720.
5. Takahashi T, Kimoto T, Tanabe N, Hattori TA, Yasumatsu N & Kawato S (2002) Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons, *J Neurochem* **83**, 1441-1451.
6. Daufeldt S, Lanz R & Allera A (2003) Membrane-initiated steroid signaling (MISS): genomic steroid action starts at the plasma membrane, *J Steroid Biochem Mol Biol* **85**, 9-23.
7. Lackner C, Daufeldt S, Wildt L & Allera A (1998) Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles. III. Specificity and stereospecificity, *J Steroid Biochem Mol Biol* **64**, 69-82.
8. Grote H, Ioannou I, Voigt J and Sekeris CE (1993) Localization of the glucocorticoid receptor in rat liver cells: evidence for plasma membrane bound receptor, *Int J Biochem* **25**, 1593-1599.
9. Wright MC & Paine AJ (1995) Characteristics of a membrane-associated steroid binding site in rat liver, *J Recept Signal Transduct Res* **15**, 543-556.
10. Jain S, Li Y, Kumar A and Sehgal PB (2005) Transcriptional signaling from membrane raft-associated glucocorticoid receptor, *Biochem Biophys Res Commun* **336**, 3-8.
11. Powell CE, Watson CS & Gametchu B (1999) Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90, *Endocrine* **10**, 271-280.
12. Gametchu B, Chen F, Sackey F, Powell C & Watson CS (1999) Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models, *Steroids* **64**, 107-119.
13. French-Mullen JM (1995) Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C, *J Neurosci* **15**, 903-911.
14. Han JZ, Lin W, Lou SJ, Qiu J & Chen YZ (2002) A rapid, nongenomic action of glucocorticoids in rat B103 neuroblastoma cells, *Biochim Biophys Acta* **1591**, 21-27.

15. Iwasaki Y, Aoki Y, Katahira M, Oiso Y & Saito H (1997) Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein, *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 295-299.
16. Qiu J, Lou LG, Huang XY, Lou SJ, Pei G & Chen YZ (1998) Nongenomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of nicotine-induced calcium influx in PC12 cells: involvement of protein kinase C, *Endocrinology* **139**, 5103-5108.
17. Lou SJ & Chen YZ (1998) The rapid inhibitory effect of glucocorticoid on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> increment induced by high extracellular K<sup>+</sup> and its underlying mechanism in PC12 cells, *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 403-407.
18. Desquiret V, Gueguen N, Malthièry Y, Ritz P & Simard G (2008). Mitochondrial effects of dexamethasone imply both membrane and cytosolic-initiated pathways in HepG2 cells, *Int J Biochem Cell Biol, In Press*.
19. Han JZ, Lin W & Chen YZ (2005) Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids : involvement of protein kinase A, *Acta Pharmacol Sin.* **26**, 199-204.
20. Park S, Taub M & Han H (2001) Regulation of phosphate uptake in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells by glucocorticoids: evidence for nongenomic as well as genomic mechanisms, *Endocrinology* **142**, 710-720.
21. Qi AQ, Qiu J, Xiao L & Chen YZ (2005) Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells, *J Neurosci Res.* **80**, 510-517.
22. Wang Y, Wang JX, Huang HD, Wang HY, Zhao XN and Zhang ZX (1999) Effects of dexamethasone on intracellular Ca<sup>2+</sup> in its sensitive cells from neonatal mouse hippocampus and cultured cortical neurogliaocytes, *Zhongguo Yao Li Xue Bao* **20**, 179-184.
23. Qi AQ, Qiu, J, Xiao L & Chen YZ (2005) Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells, *J Neurosci Res* **80**, 510-517.
24. Michelangeli F, Ogunbayo OA & Wootton LL (2005) A plethora of interacting organellar Ca<sup>2+</sup> stores, *Curr Opin Cell Biol* **17**, 135-140.
25. Xu JW, Morita L & Murota S (2001) Role of SERCA2b in mobilization of nuclear Ca<sup>2+</sup> in HeLa cells, *J Med Dent Sci* **48**, 51-59.
26. Lanini L, Bachs O & Carafoli E (1992) The calcium pump of the liver nuclear membrane is identical to that of endoplasmic reticulum, *J Biol Chem* **267**, 11548-11552.
27. Missiaen L, Vanoevelen J, Parys JB, Raeymaekers L, De Smedt H, Callewaert G, Erneux C & Wuytack F (2002) Ca<sup>2+</sup> uptake and release properties of a thapsigargin-insensitive nonmitochondrial Ca<sup>2+</sup> store in A7r5 and 16HBE14o- cells, *J Biol Chem* **277**, 6898-6902.

28. Van Baelen K, Vanoevelen J, Callewaert G, Parys JB, De Smedt H, Raeymaekers L, Rizzuto R, Missiaen L & Wuytack F (2003) The contribution of the SPCA1 Ca<sup>2+</sup> pump to the Ca<sup>2+</sup> accumulation in the Golgi apparatus of HeLa cells assessed via RNA-mediated interference, *Biochem Biophys Res Commun* **306**, 430-436.
29. Parekh AB (2003) Mitochondrial regulation of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling: more than just simple Ca<sup>2+</sup> buffers. *News Physiol Sci* **18**, 252-256.
30. Pizzo P & Pozzan T (2007) Mitochondria-endoplasmic reticulum choreography: structure and signaling dynamics, *Trends Cell Biol* **17**, 511-517.
31. Robb-Gaspers LD, Burnett P, Rutter GA, Denton RM, Rizzuto R & Thomas AP (1998) Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses, *Embo J* **17**, 4987-5000.
32. Bowser DN, Petrou S, Panchal RG, Smart ML & Williams DA (2002) Release of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> via the permeability transition activates endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake, *Faseb J* **16**, 1105-1107.
33. Ichas F & Mazat JP (1998) From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state, *Biochim Biophys Acta* **1366**, 33-50.
34. Smaili SS, Hsu YT, Youle RJ & Russell JT (2000) Mitochondria in Ca<sup>2+</sup> signaling and apoptosis, *J Bioenerg Biomembr* **32**, 35-46.
35. Visch, H.J. et al. (2004) Inhibition of mitochondrial Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange restores agonist-induced ATP production and Ca<sup>2+</sup> handling in human complex I deficiency, *J Biol Chem* **279**, 40328-40336.
36. Wright DC, Geiger PC, Han DH, Jones TE & Holloszy JO (2007) Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation, *J Biol Chem* **282**, 18793-18799.
37. Szanda G, Koncz P, Rajki A & Spat A (2008) Participation of p38 MAPK and a novel-type protein kinase C in the control of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Cell Calcium* **43**, 250-259.
38. Wall JA, Wei J, Ly M, Belmont P, Martindale JJ, Tran D, Sun J, Chen WJ, Yu W, Oeller P, Briggs S, Gustafsson AB, Sayen MR, Gottlieb RA & Glembotski CC (2006) Alterations in oxidative phosphorylation complex proteins in the hearts of transgenic mice that overexpress the p38 MAP kinase activator, MAP kinase kinase 6, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H2462-2472.

39. Li X, Qiu J, Wang J, Zhong Y, Zhu J & Chen Y (2001) Corticosterone-induced rapid phosphorylation of p38 and JNK mitogen-activated protein kinases in PC12 cells, *FEBS Lett.* **492**, 210-214.
40. Roger S, Potier M, Vandier C, Le Guennec, JY & Besson P (2004) Description and role in proliferation of iberiotoxin-sensitive currents in different human mammary epithelial normal and cancerous cells, *Biochim Biophys Acta* **1667**, 190-199.

## 7. TABLES

**Table 1: Enzymatic activities of complexes I, II and III of the respiratory chain of control HepG2 cells treated with calcium chelator (BAPTA-AM) or p38MAPK inhibitor (SB202190).**

Cells were incubated during 30 minutes either in control medium or in medium supplemented with 1  $\mu$ M of BAPTA/AM or with 10  $\mu$ M of SB202190. Results are normalised by the activity of the citrate synthase and are expressed as percentage of control cells activities. n=4 in duplicate. \*: p<0.05 compared with control cells.

	<b>Control</b>	<b>Control + BAPTA</b>	<b>Control + SB202190</b>
<b>Complex I</b>	100.00 $\pm$ 2.99	131.90 $\pm$ 6.67 *	89.31 $\pm$ 11.99
<b>Complex II</b>	100.00 $\pm$ 14.78	79.95 $\pm$ 9.41	81.02 $\pm$ 15.84
<b>Complex III</b>	100.00 $\pm$ 19.65	133.82 $\pm$ 23.43	161.92 $\pm$ 42.77

**Table 2: Enzymatic activities of complexes I, II and III of the respiratory chain of HepG2 dexamethasone-treated cells.**

Complex activities were assayed on cell lysates after a frozen/thaw cycle and after six cycles of five seconds of sonication for complex I. Results presented on this table are normalised by the activity of the citrate synthase and are expressed as percentage of control + inhibitor cells activities. n=4 in duplicate. \*: p<0.05 compared with control cells, §: p<0.05 compared with dexamethasone treated cells.

	w/o inhibitor		+ BAPTA		+ SB202190	
	Control	Dexa	Control	Dexa	Control	dexa
<b>Complex I</b>	100.00 ± 2.99	49.78 ± 6.81 *	100.00 ± 5.05	109.45 ± 1 6.82 §	100.00 ± 13.43	129.60 ± 27.54 §
<b>Complex II</b>	100.00 ± 14.78	21.66 ± 4.46 *	100.00 ± 11.77	89.13 ± 6.43 §	100.00 ± 19.54	93.18 ± 21.44 §
<b>Complex III</b>	100.00 ± 19.65	211.52 ± 67.68 *	100.00 ± 17.50	67.98 ± 0.58 §	100.00 ± 26.41	128.61 ± 8.61 §

## 8. FIGURES LEGENDS.

**Figure 1: IP1 concentration measurement in HepG2 dexamethasone treated cells.** IP1 concentration in HepG2 cells treated with 500 nM of dexamethasone was determined by ELISA with IP1-ELISA kit Cisbio kit. Results are expressed in nmol of IP1/million of cells. Open bars represent control cells and black bars dexamethasone treated cells. \*:  $p < 0.05$  compared with control cells,  $n=8$  in duplicate.

**Figure 2: Intracellular calcium concentration of HepG2 cells.** Cells were loaded with 5  $\mu\text{M}$  of FURA-2/AM. Results are expressed as percentage of initial fluorescence of FURA-2/AM loaded cells in a physiological buffer (PSS). A: dexamethasone-treated cells, B: dexamethasone + 20  $\mu\text{M}$  GDP $\beta$ S, C: dexamethasone + 0.5  $\mu\text{M}$  of U73122, D: dexamethasone + 3  $\mu\text{M}$  of Bisindolylmaleimide.  $n=5$  independent experiments.

**Figure 3: Characterisation of intracellular calcium stores involvement in dexamethasone-induced intracellular calcium concentration increase.** Representative graph of intracellular calcium measurement in calcium-free media supplemented or not with thapsigargin. Results are expressed as percentage of the initial fluorescence ratio of FURA-2/AM loaded cells in a calcium-free physiological buffer (PSS 0 Ca). Cells were incubated in PSS 0 Ca + 500 nM of dexamethasone to study the calcium release of intracellular stores (black diamonds) or in PSS 0 Ca + 500 nM of dexamethasone + 1  $\mu\text{M}$  thapsigargin to determine the ER-independent calcium release (grey triangles). The ER-dependent calcium release (open circles) was obtained by mathematical subtracting of the ER-independent calcium increase from the total intracellular calcium increase.  $n=5$  independent experiments.

**Figure 4: Quantification of the phosphorylated form of p38MAPK.** HepG2 cells were first cultured during ten minutes with 10  $\mu\text{M}$  of SB202190 (p38MAPK inhibitor) or with 1  $\mu\text{M}$  of BAPTA-AM (calcium chelator after de-esterification) or with 3  $\mu\text{M}$  of Bisindolylmaleimide (PKC inhibitor). Phosphorylated form of p38MAPK was detected by ELISA test.  $n=8$  in



duplicate, \*:  $p < 0.05$  compared with control cells, §:  $p < 0.05$  compared with dexamethasone-treated cells.

9. FIGURES.

Figure 1

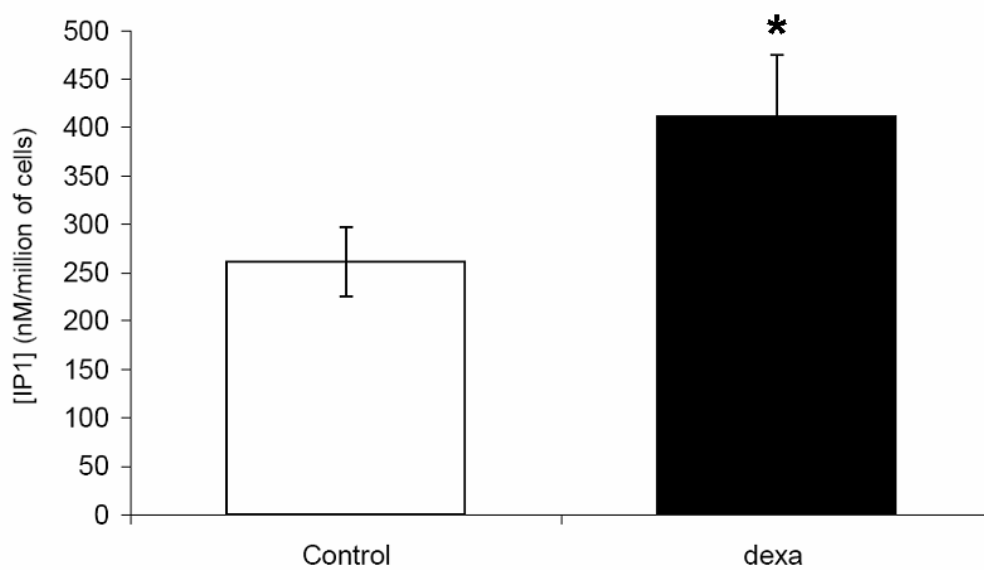


Figure 2

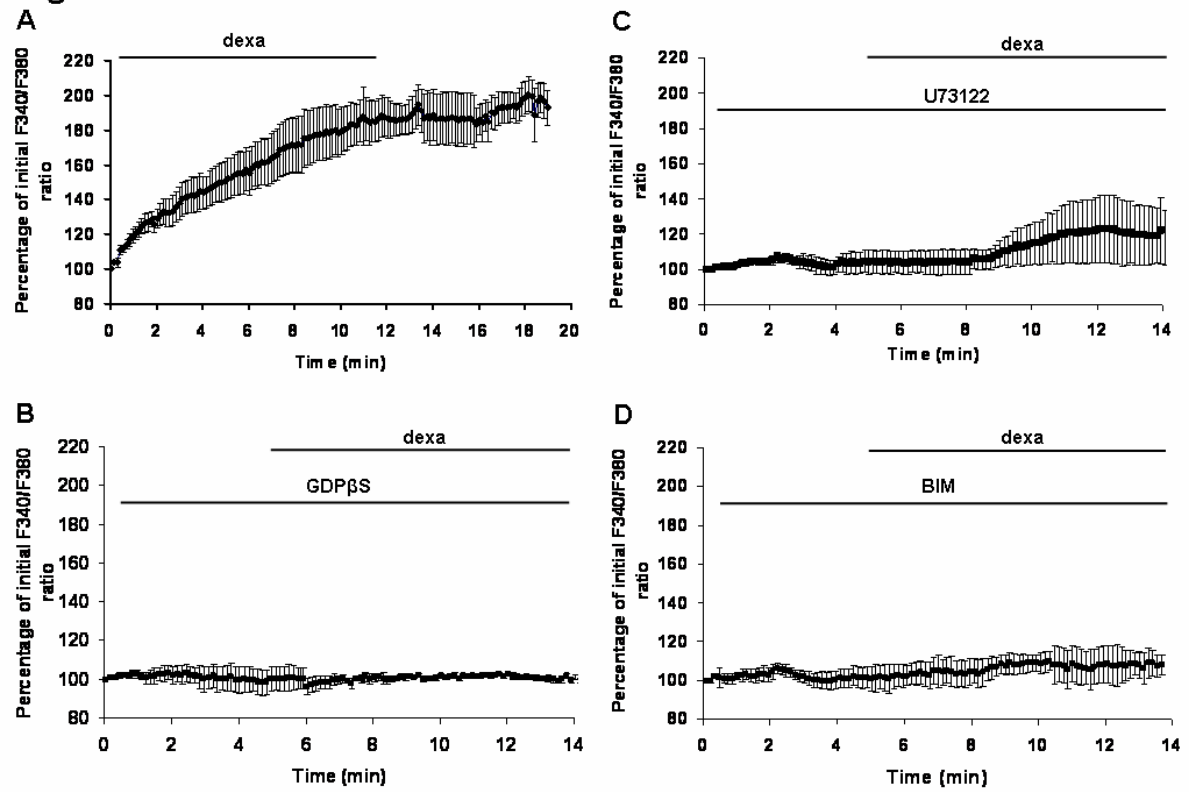


Figure 3

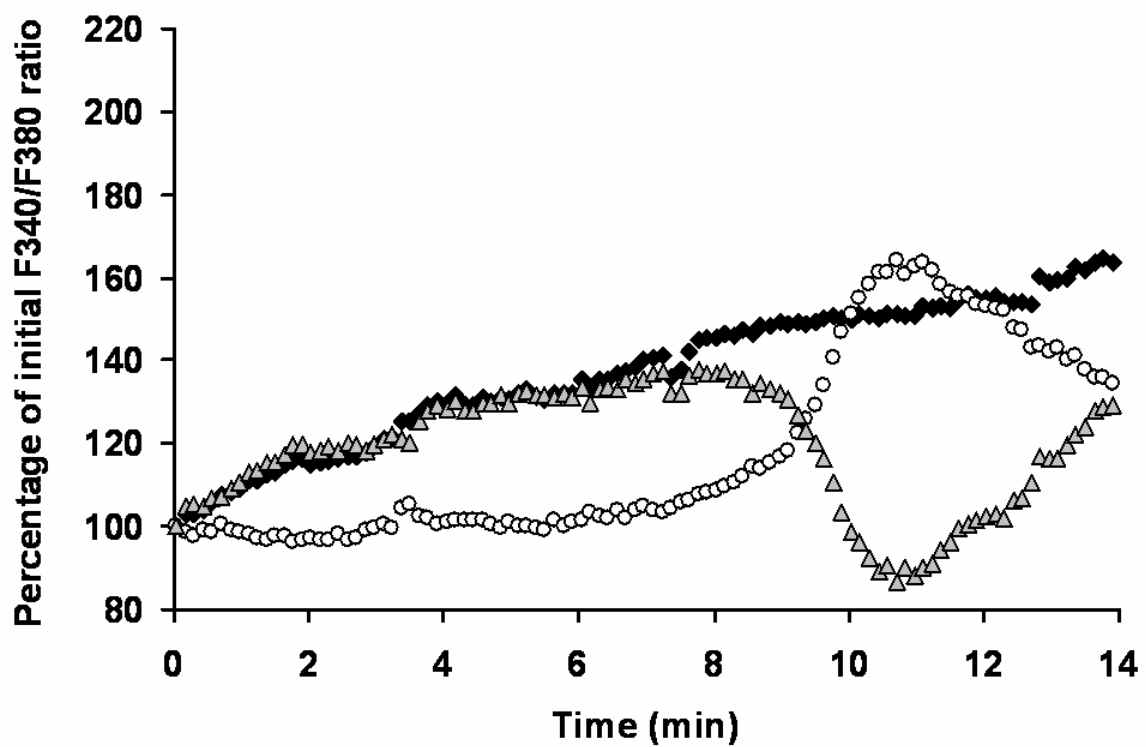
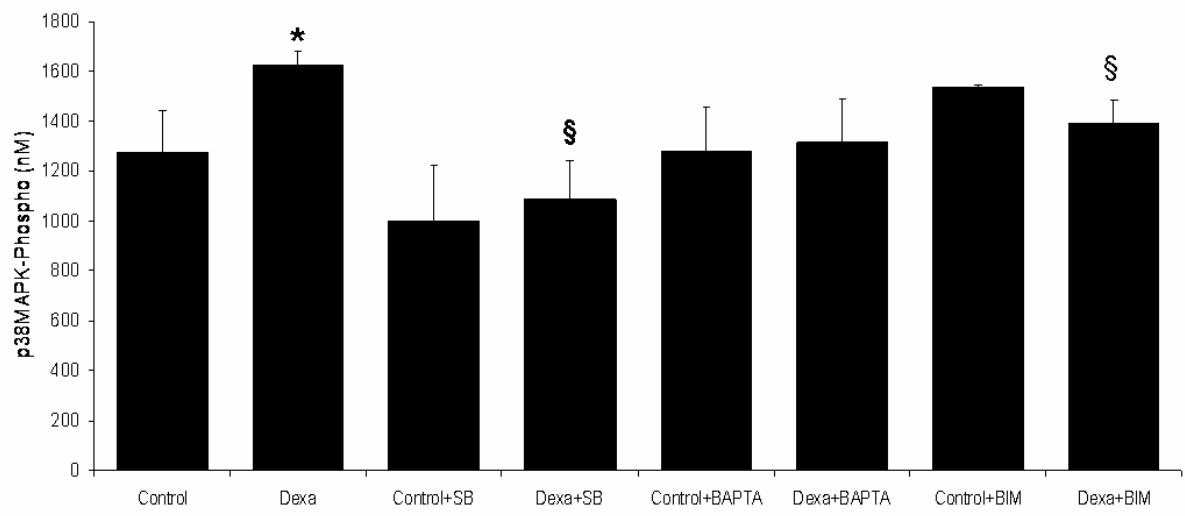


Figure 4



## **Résultats et discussion des articles n°2 et 3.**

Les résultats de l'article n°2 montrent que la mitochondrie est une des cibles des effets spécifiques du traitement par glucocorticoïdes. En effet, dans les cellules HepG2, ces hormones affectent le fonctionnement mitochondrial, non seulement par des effets génomiques, classiques, impliquant le récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes mais également par un mécanisme faisant intervenir un site de fixation membranaire aux glucocorticoïdes couplé aux protéines G. Ces effets des glucocorticoïdes sur la mitochondrie sont mis en place graduellement. Ainsi, après 10 minutes d'incubation, on observe une diminution de l'activité des complexes I et II et une augmentation de l'activité du complexe III par un mécanisme non transcriptionnel initié par la fixation de la dexaméthasone sur un « récepteur membranaire couplé aux protéines G » et impliquant les protéines p38MAPK et PKC. Après huit heures de traitement par dexaméthasone, viennent s'ajouter des effets transcriptionnels aboutissant à une stimulation de la capacité respiratoire mitochondriale ainsi qu'à une augmentation de l'activité du complexe IV. Enfin, la quantité de protéines COX IV et ANT est augmentée par un traitement à long terme par dexaméthasone. De plus, après huit heures de traitement par dexaméthasone, on observe une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative puisque, bien que la capacité respiratoire mitochondriale soit augmentée suite au traitement par glucocorticoïdes, la part de cette capacité utilisée pour synthétiser de l'ATP (RCRp) est diminuée de 40%.

La diminution d'efficacité de conversion énergétique mitochondriale suite au traitement par glucocorticoïdes a déjà été retrouvée dans plusieurs publications (Jani *et al.*, 1991, Kerppola, 1960, Kimberg *et al.*, 1968, Roussel *et al.*, 2003), mais, les mécanismes impliqués dans ce phénomène n'étaient pas clairement définis. Différentes études ont montré une augmentation de la fuite de protons induite par le traitement par dexaméthasone, expliquant en partie la diminution d'efficacité de la phosphorylation oxydative. Cependant, des travaux menés récemment dans notre équipe (Arvier *et al.*, 2007) ont permis de montrer, dans les mitochondries de foie de rat traité pendant 5 jours par dexaméthasone, que certes la dexaméthasone augmentait de manière significative la fuite de protons à l'état IV (consommation d'oxygène non couplée à la synthèse d'ATP) mais que lorsque les mitochondries étaient placées dans un état plus physiologique (entre l'état III, à concentration saturante en ADP et l'état IV), la synthèse d'ATP était augmentée sans diminution du rapport ATP/O.

Dans notre modèle de cellules HepG2 traitées par dexaméthasone, la part de la capacité respiratoire utilisée pour synthétiser de l'ATP (RCRp) est diminuée dans les cellules traitées

par dexaméthasone, laissant penser que l'efficacité de synthèse d'ATP est inférieure à celle des cellules contrôles. Cependant, ce rapport mathématique ( $RCR_p = [Routine-Oligo]/Découplée$ ) est calculé à partir de la différence entre la respiration de routine et celle insensible à l'oligomycine (état IV), ce qui donne une idée de la part de la respiration de routine utilisée pour synthétiser de l'ATP. Or, à l'état IV, la respiration mitochondriale est utilisée pour compenser la fuite de protons. Dans nos cellules traitées par dexaméthasone, cette fuite de protons étant augmentée, la respiration nécessaire au maintien du potentiel membranaire mitochondrial est donc plus importante. La respiration insensible à l'oligomycine augmente donc plus que la respiration de routine, d'où une diminution du paramètre (Routine-Oligomycine). De plus, la dexaméthasone entraîne une augmentation de la quantité de protéine COXIV, reliée à une augmentation de l'activité maximale du complexe IV ainsi qu'à une augmentation de la capacité de la chaîne respiratoire (respiration découplée). Cette augmentation de la respiration découplée dans les cellules traitées par dexaméthasone entraîne donc une diminution supplémentaire du  $RCR_p$  dans ces cellules. Nous pouvons donc penser que ce calcul mathématique majore la différence d'efficacité de phosphorylation oxydative entre les cellules contrôles et dexaméthasone puisque les trois paramètres qui le composent sont modifiés suite au traitement par dexaméthasone. De plus, les mesures de respiration sur cellules entières, même si elles sont un meilleur reflet des conditions physiologiques, ne nous permettent pas de contrôler finement la quantité de substrats et d'ADP fournis à la chaîne respiratoire et ne nous permettent donc pas une étude aussi précise de la relation entre respiration et synthèse d'ATP.

L'étude d'Arvier *et al.* sur mitochondries isolées de foie de rats traités par dexaméthasone et celle que nous avons menée sur cellules HepG2 traitées par ce même glucocorticoïde rapportent une augmentation de la quantité d'ANT suite au traitement par dexaméthasone. Ce transporteur situé dans la membrane interne mitochondriale, en permettant l'import de l'ADP cytosolique en échange d'ATP formé par l'ATP synthase, stimule donc la production d'ATP mitochondriale. La régulation de la transcription de ce gène par les glucocorticoïdes a été très peu étudiée. En revanche, il a été décrit une action activatrice de la triiodothyronine (T3) ainsi que des œstrogènes sur l'expression de différents isoformes de l'ANT (Dummler *et al.*, 1996, Luciakova *et al.*, 2000, Portman *et al.*, 2000). Il a été proposé qu'un élément de réponse à la T3 soit présent dans le promoteur du gène ANT2 mais la séquence de cet élément n'a jamais été clairement identifiée. D'autres auteurs postulent que les hormones thyroïdiennes influenceraient non pas la transcription mais la stabilité des ARNm de l'ANT (Portman *et al.*, 2000). De nombreuses analogies dans les voies de régulation peuvent être trouvées entre les

hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes. Nous pouvons donc raisonnablement penser qu'un mécanisme proche de celui observé avec la T3 puisse expliquer l'augmentation d'ANT dans notre modèle suite au traitement par dexaméthasone. Dans les cellules HepG2 traitées par glucocorticoïdes, nous retrouvons une augmentation de la quantité de protéines COXIV. Des variations d'activité ou de quantité de sous-unités du complexe IV suite au traitement par glucocorticoïdes ont été montrées dans plusieurs études (Djouadi *et al.*, 1994, Kimberg *et al.*, 1968, Rachamim *et al.*, 1995, Van Itallie, 1992, Weber *et al.*, 2002). Bien que certains résultats soient tissus-spécifiques, la majorité des publications montrent une augmentation de la transcription de certaines sous-unités du complexe IV. Nous avons montré dans l'article n°1, qu'un dysfonctionnement mitochondrial (DNP) induit, dans les cellules HepG2, une augmentation de la transcription du gène COXIV pour pallier ce déficit. Or, la dexaméthasone augmente la fuite de protons, nous émettons donc l'hypothèse que la transcription de COXIV est augmentée suite au traitement par dexaméthasone dans notre modèle afin de compenser le découplage mitochondrial. Une étude transcriptionnelle, par puce à ADN, des gènes différentiellement exprimés dans le foie de rat traité par dexaméthasone par rapport au foie de rat témoin a été réalisée par Matthieu Arvier (puce Mitoligo) afin de déterminer plus précisément les causes de ce gaspillage d'énergie induit au niveau de la mitochondrie par la dexaméthasone. Les résultats de ce travail de thèse sont en cours de publication.

Pour ce qui est de l'impact de la dexaméthasone sur les autres complexes de la chaîne respiratoire, très peu de données sont disponibles. Une étude rapporte que le traitement par methylprednisolone inhibe la respiration liée à l'oxydation du NAD dans les mitochondries de foie probablement en agissant sur le centre fer/soufre ou une protéine de liaison au coenzyme Q du complexe I (Martens *et al.*, 1991). Les auteurs montrent également une diminution de la respiration en succinate et relient cela à une inhibition du transport du succinate. Les effets d'inhibition de l'activité des complexes I et II que nous montrons suite au traitement par dexaméthasone dans les cellules HepG2 apparaissent à court terme et font intervenir un site de liaison membranaire aux glucocorticoïdes. De plus, l'activité que nous mesurons est une activité maximale et ne tient donc pas compte de la capacité de transport de la mitochondrie ni de la disponibilité en substrats dans ces cellules. Il apparaît donc peu probable qu'une diminution de la disponibilité en succinate puisse expliquer une telle diminution d'activité du complexe II dans notre modèle. Nous pensons plutôt que la dexaméthasone induit des modifications posttraductionnelles de certaines sous-unités des complexes telles que la phosphorylation de certains résidus. Cette hypothèse sera développée plus longuement dans la suite de la discussion. Une étude décrit également une stimulation de l'activité du complexe



III suite au traitement par dexaméthasone mais aucun mécanisme n'est proposé (Allan *et al.*, 1983).

Bien que de nombreuses publications aient décrit les effets des glucocorticoïdes sur la mitochondrie (Allan *et al.*, 1983, Kerppola, 1960, Kimberg *et al.*, 1968, Rachamim *et al.*, 1995), peu d'études se sont intéressées aux mécanismes permettant d'expliquer ces effets sur la mitochondrie. Buttgerit a rapporté que les effets inhibiteurs de la methylprednisolone sur la respiration des lymphocytes stimulés par la concavoline A sont dus à des effets non génomiques non spécifiques des glucocorticoïdes qui s'intercalent dans la membrane plasmique et modifient ainsi les propriétés physicochimiques de cette dernière et les activités des protéines associées à la membrane (Buttgerit, 2000). L'auteur émet l'hypothèse que les glucocorticoïdes inhibent de cette manière l'entrée de sodium et de calcium dans la cellule et s'enchâssent également dans la membrane interne mitochondriale entraînant une augmentation de la perméabilité membranaire aux protons. Cependant, ces effets non spécifiques des glucocorticoïdes se retrouvent à de fortes concentrations en hormone (à partir d'environ  $10^{-5}$  M de dexaméthasone), de tels mécanismes ne permettent donc pas d'expliquer les effets observés dans notre étude. De plus, les variations de respiration que nous retrouvons sont totalement inhibables par l'actinomycine D (donc transcriptionnelles) et ne font donc pas intervenir seulement des modifications de perméabilité membranaire.

Deux types d'effets des glucocorticoïdes sur la mitochondrie sont distinguables dans nos résultats : les effets à court terme non génomiques impliquant un site membranaire de fixation aux glucocorticoïdes (mGR) et les effets à long terme, transcriptionnels impliquant soit le mGR soit le récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes (cGR).

Les effets transcriptionnels à long terme impliquant le récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes sont les plus étudiés dans la littérature. En effet, classiquement, les glucocorticoïdes se fixent sur le cGR, induisent la dissociation des protéines chaperonnes et la dimérisation du complexe hormone/récepteur. Les complexes ainsi formés migrent alors dans le noyau où ils se fixent sur des éléments de réponses aux glucocorticoïdes (GRE) dans le promoteur des gènes cibles et activent ainsi leur transcription. Le complexe IV de la chaîne respiratoire semble une des cibles privilégiées pour les effets génomiques des glucocorticoïdes puisque des séquences GRE ont été identifiées à la fois sur des gènes nucléaires (COX Vb, (Scheller et Sekeris, 2003) et mitochondriaux (COX I et COX III, (Demonacos *et al.*, 1995) codant pour des sous-unités de ce complexe. Nous pouvons donc raisonnablement penser que dans notre modèle, l'augmentation de l'activité du complexe IV que nous retrouvons après huit heures de traitement par dexaméthasone s'explique par une

augmentation de la quantité de cette enzyme suite au traitement par glucocorticoïdes. De même, une séquence GRE a été identifiée récemment dans le promoteur du gène UCP3 dans le muscle squelettique (Amat *et al.*, 2007). Les auteurs montrent que le traitement par glucocorticoïdes stimule la transcription du gène UCP3 par un mécanisme impliquant à la fois la fixation du GR activé sur une séquence GRE présente dans le promoteur de ce gène et l'activation de la protéine histone acétylase p300.

Les effets non génomiques des glucocorticoïdes ont été définis par Lösel et Wehling comme « n'influençant pas initialement l'expression de gènes mais plutôt ayant des effets rapides comme l'activation de cascades de signalisation » (Losel et Wehling, 2003). En plus de cette rapidité de réponse, d'autres caractéristiques ont été établies pour définir les effets non génomiques : un profil pharmacologique différent puisque ces effets sont insensibles aux inhibiteurs de transcription et de traduction, une action sur les cellules non nucléées telles que les plaquettes, les érythrocytes et les spermatozoïdes et enfin la possibilité pour des stéroïdes couplés à la BSA (ne pouvant pas traverser la membrane plasmique) d'induire ces effets (Stellato, 2004). Les mécanismes d'action, même s'ils diffèrent selon le type cellulaire étudié et le stéroïde utilisé, sont souvent médiés par l'activation de seconds messagers, par des changements de flux ioniques ou l'activation de différentes protéines kinases. Certaines études rapportent la possibilité d'inhiber ces effets non génomiques par la mifépristone (RU486) montrant l'implication du récepteur intracellulaire (cGR) dans ces effets (Croxtall *et al.*, 2000, Hafezi-Moghadam *et al.*, 2002, Liu *et al.*, 2007, Lowenberg *et al.*, 2006, Solito *et al.*, 2003). Cependant, certains effets, insensibles à ce type d'inhibiteur, impliquent un autre type de récepteur, situé dans la membrane plasmique (mGR). La caractérisation et l'identification précise de ce récepteur sont encore très incomplètes. Néanmoins, quelques études avancent la possibilité d'un récepteur à sept domaines transmembranaires, couplé aux protéines G (French-Mullen, 1995, Lou et Chen, 1998, Orchinik *et al.*, 1992, Orchinik *et al.*, 1991). Dans l'article n°2 nous montrons qu'un tel récepteur est impliqué dans les effets à court terme des glucocorticoïdes sur la mitochondrie. Ainsi, les effets inhibiteurs de la dexaméthasone sur l'activité des complexes I et II sont inhibables par l'addition de GDPβS, un analogue non métabolisable du GDP. De plus, lorsque la forme phosphorylée (donc active) de la protéine p38MAPK est inhibée, on ne retrouve plus les effets mitochondriaux des glucocorticoïdes.

Dans l'article n°3, nous avons voulu déterminer de manière plus précise les éléments reliant l'activation d'un récepteur couplé aux protéines G par la dexaméthasone et les effets sur la chaîne respiratoire mitochondriale. Nous montrons que la fixation de la dexaméthasone sur le

récepteur membranaire entraîne l'activation d'une protéine Gq qui, en aval, conduit à une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium. Ce second messager est indispensable pour la survenue des effets sur la mitochondrie puisque si le calcium intracellulaire est chélaté par le BAPTA-AM, les effets inhibiteurs de la dexaméthasone sur l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire disparaissent. Dans l'article n°2, nous avons mis en évidence l'implication de p38MAPK dans la diminution d'activité des complexes I et II et l'augmentation de l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire. Le calcium et p38MAPK apparaissent donc comme des éléments clés dans la signalisation induite par les glucocorticoïdes. Dans ce troisième article, nous démontrons que ces deux éléments sont situés sur la même voie d'activation, la phosphorylation de p38MAPK étant abolie lorsque les cellules sont cultivées en présence de BAPTA. P38MAPK est donc située en aval de l'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium induite par la dexaméthasone. Des effets p38MAPK dépendants des glucocorticoïdes ont déjà été montrés par Qi et al (2005). Les auteurs démontrent que le traitement des cellules PC12 par cortisol ou cortisol-BSA induit l'activation et la translocation nucléaire des protéines p38MAPK et JNK. De même, Xia *et al.* ont démontré que le traitement à court terme par glucocorticoïdes induit une forte activation de la protéine p38MAPK, et ce par un mécanisme non inhibable par un antagoniste du cGR (Xia *et al.*, 2003).

Cette protéine kinase retient particulièrement notre attention puisqu'elle est au carrefour des voies non génomiques (activation rapide, modification d'activité de certaines protéines par phosphorylation) et des voies transcriptionnelles (p38MAPK peut être transloquée dans le noyau et modifier la transcription de certains gènes par phosphorylation de différents facteurs de transcription ou de résidus particuliers situés dans le promoteur des gènes cibles). Or, une liaison a pu être établie dans certains cas entre la fixation des glucocorticoïdes sur le mGR et les effets transcriptionnels de ces hormones, ce phénomène est abrégé en MISS (Membrane Initiated Steroid Signaling). La protéine p38MAPK, de par sa dualité d'effets (génomique et non génomique) apparaît comme un candidat intéressant pour participer à ce phénomène.

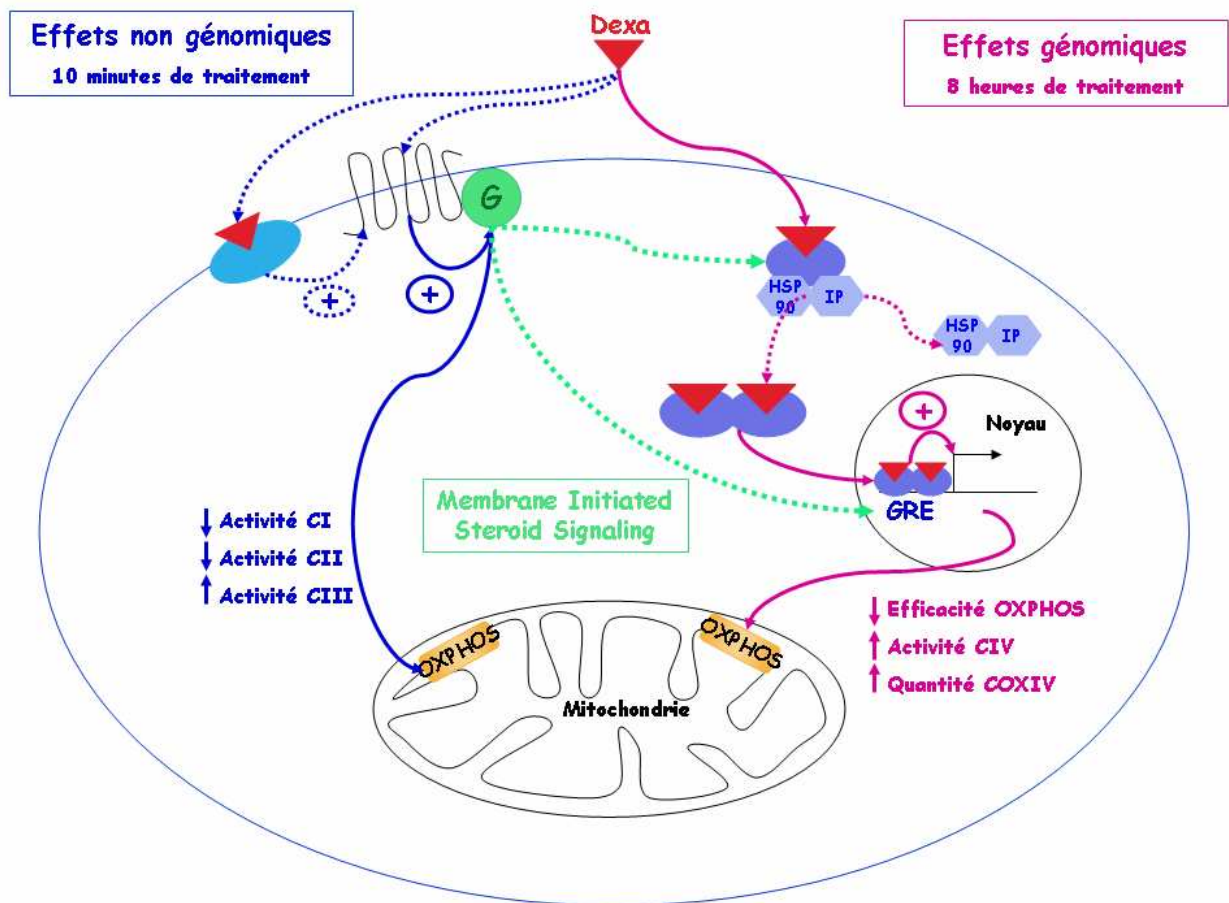
En effet, en plus de son implication dans les effets non génomiques des glucocorticoïdes (Xia *et al.*, 2003) p38MAPK est un régulateur important de plusieurs voies métaboliques au niveau du foie, notamment la lipogénèse (Xiong *et al.*, 2007) et la néoglucogénèse (Cao, W. *et al.*, 2005, Cao, W. H. *et al.*, 2007, Collins *et al.*, 2006). p38MAPK joue en effet un rôle activateur sur la néoglucogénèse hépatique par phosphorylation et activation du facteur CREB et du coactivateur PGC-1 $\alpha$ , deux éléments activateurs de la transcription des gènes néoglucogéniques phosphoénolpyruvate carboxykinase (PEPCK) et glucose-6-phosphatase

(G6Pase). Cette voie est une cible importante du traitement par glucocorticoïdes, on peut donc émettre l'hypothèse de l'implication de la protéine p38MAPK (et par là même du mGR) dans la stimulation de la néoglucogénèse hépatique par les glucocorticoïdes. p38MAPK peut également intervenir dans la régulation de l'activité même du récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes. En effet, deux sites de phosphorylation (sérine 211 et sérine 246, respectivement activateur et inhibiteur) ont été identifiés dans le promoteur du cGR (dans les lymphocytes et les cellules Hela) comme des cibles de phosphorylation par p38MAPK (Miller *et al.*, 2005, Szatmary *et al.*, 2004). Enfin, cette protéine joue un rôle dans le métabolisme oxydatif mitochondrial, puisque Szanda *et al.* ont montré récemment qu'elle participait, avec PKC (nouvelle isoforme) à l'inhibition du captage du calcium par la mitochondrie induit par l'angiotensine II (Szanda *et al.*, 2007). p38MAPK module également la composition de la chaîne respiratoire, dans le cœur, puisque la surexpression de la protéine MAP kinase kinase 6 induit une diminution de l'expression de sous-unités des quatre complexes de la chaîne respiratoire ainsi que de l'ATP synthase.

Aux vues de tous ces éléments, p38MAPK apparaît comme un élément crucial, à la fois dans la signalisation induite par les glucocorticoïdes et dans la régulation du métabolisme oxydatif mitochondrial. Il serait intéressant d'étudier la localisation subcellulaire des protéines p38MAPK suite au traitement par dexaméthasone afin de déterminer si les effets de cette kinase sur les complexes de la chaîne respiratoire peuvent être reliés à la localisation mitochondriale de cette dernière. De plus, les modifications post-transcriptionnelles (glutathiolation, myristoylation, phosphorylation...) des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale (surtout les complexes I et II) suite au traitement par glucocorticoïdes pourraient être étudiées dans les cellules HepG2, incubées ou non en présence de SB202190 (un inhibiteur de p38MAPK). Dans notre étude, nous n'avons pas mesuré la production d'EORs, or ce paramètre est un élément important de régulation de la fonction énergétique mitochondriale, et les variations d'activités des complexes I et III de la chaîne respiratoire suite au traitement par dexaméthasone sont susceptibles de modifier ce paramètre.

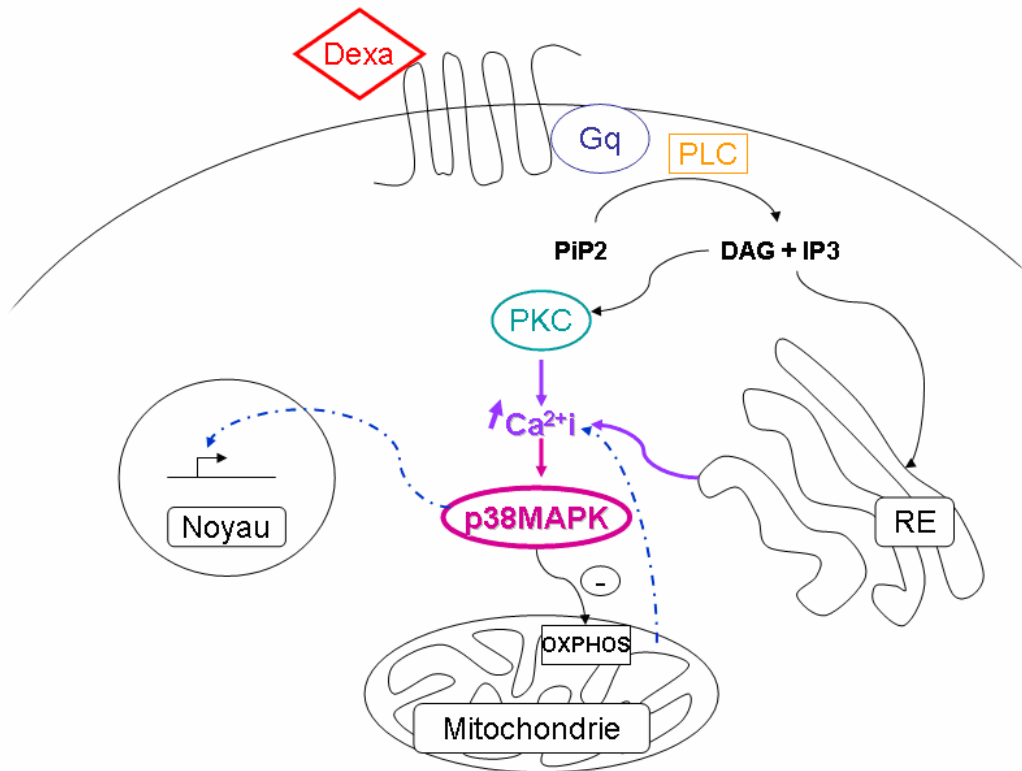
De plus, ces travaux ont été obtenus sur une lignée cellulaire ayant perdu certains caractères de différenciation hépatocytaire. Il serait donc intéressant d'étendre cette étude à des cellules plus proches des hépatocytes primaires. Pour cela, nous avons testé l'influence du traitement par glucocorticoïdes sur la lignée cellulaire HepaRG possédant des caractéristiques de différenciation proches des hépatocytes primaires. Les résultats (exposés dans la partie travail complémentaires) nous laissent penser que, dans ces cellules, le récepteur membranaire aux

glucocorticoïdes est absent ou non fonctionnel. Cependant, étant donné les conditions de culture particulières de ces cellules (en présence de fortes concentrations d'insuline et de glucocorticoïdes), on ne peut exclure une désensibilisation de ce récepteur membranaire aux glucocorticoïdes. Tout ceci nous amène à penser que cette lignée s'avérant très utile dans les études de toxicité hépatique des xénobiotiques notamment n'est peut-être la mieux adaptée pour notre modèle.



**Figure 28 : Schéma récapitulatif des éléments intracellulaires impliqués dans les effets de la dexaméthasone sur la mitochondrie dans les cellules HepG2 (article n°2).**

(Les flèches en traits pleins représentent les éléments que nous avons mesurés dans notre modèle ; celles en pointillés sont des éléments spéculatifs).



**Figure 29 : Schéma récapitulatif des voies de signalisation impliquées dans les effets à court terme de la dexaméthasone sur la mitochondrie dans les cellules HepG2 (article 3).**

(Les flèches en traits pleins représentent les éléments que nous avons mesurés dans notre modèle ; celles en pointillés sont des éléments spéculatifs).

## **Travail complémentaire**

***Caractérisation de la fonction oxydative mitochondriale des cellules HepaRG.***

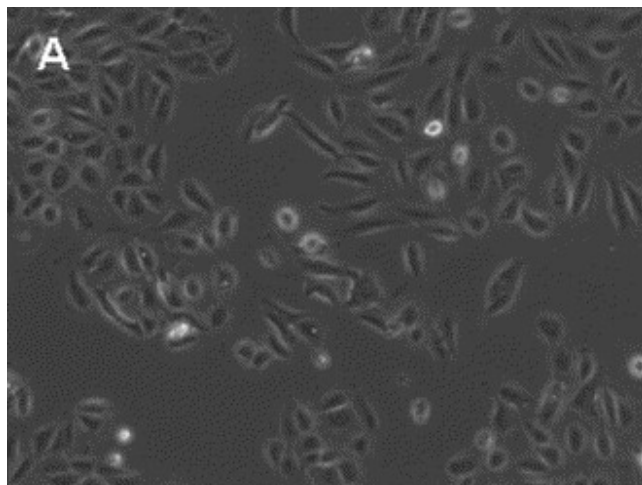
***Impact du traitement par glucocorticoïdes sur cette fonction.***

## **Introduction du travail complémentaire.**

Les expériences concernant les effets mitochondriaux du traitement par dexaméthasone que nous avons décrits dans les articles 2 et 3 ont été réalisées sur des cellules d'hépatoblastome humain en culture : la lignée HepG2. Ces cellules sont utilisées comme modèles expérimentaux dans de nombreuses études portant notamment sur le métabolisme cellulaire. Elles présentent en effet l'avantage d'avoir une bonne capacité proliférative et possèdent encore certaines enzymes de phase I et II du métabolisme des toxiques (UDP-glucuronyl transférase et glutathion-S-transférase par exemple, Doostdar *et al.*, 1988). Cependant, l'expression des principales enzymes de détoxification (notamment les cytochromes P450) est très faible dans cette lignée par rapport aux hépatocytes isolés et les isoformes exprimées s'apparentent à celles retrouvées dans les hépatocytes fœtaux (Wilkening *et al.*, 1997). De plus, les cellules HepG2 ont subi de nombreux réarrangements chromosomiques et présentent un caryotype aneuploïde avec un nombre de chromosomes variant de 48 à 54 par cellule. Afin de vérifier que les effets mitochondriaux que nous retrouvons suite au traitement par dexaméthasone sur les cellules HepG2 n'étaient pas dus à une faible capacité de détoxification de cette substance, nous avons voulu tester l'effet des glucocorticoïdes sur un modèle possédant des caractéristiques plus proche du foie « sain ». Notre première intention a été d'utiliser des hépatocytes isolés de rats ; cependant, ce modèle présentait le désavantage de n'avoir qu'une faible capacité proliférative (qui plus est limitée dans le temps : pas plus d'une semaine généralement) et de se différencier assez rapidement en culture. Nous avons donc choisi de réaliser nos expériences sur les cellules de la lignée HepaRG qui nous ont été fournies par Madame Guillouzo (INSERM U522 à Rennes). Ces cellules ont été isolées à partir d'un hépatocarcinome développé par une patiente souffrant d'une hépatite C. Lorsque ces cellules sontensemencées à une faible densité (2 millions par flask de 75 cm<sup>2</sup>) elles sont de forme allongée, très peu différenciées et prolifèrent très rapidement. Lorsqu'elles atteignent la confluence, deux types cellulaires se distinguent, des petites cellules granuleuses (ressemblant à des hépatocytes) et des cellules beaucoup plus grosses avec un cytoplasme clair. A ce stade, l'ajout de 2% de DMSO dans le milieu de culture induit la différenciation des structures « pseudohépatocytaires » en hépatocytes matures morphologiquement très proches des hépatocytes primaires. Des cellules apparentées à des canalicules biliaires se développent également sous l'influence du DMSO. Ces structures hépatocytaires sont bien différenciées et expriment différents marqueurs spécifiques du foie tels que l'aldolase B ou l'albumine. De plus, à ce stade de différenciation, la lignée HepaRG exprime les différents

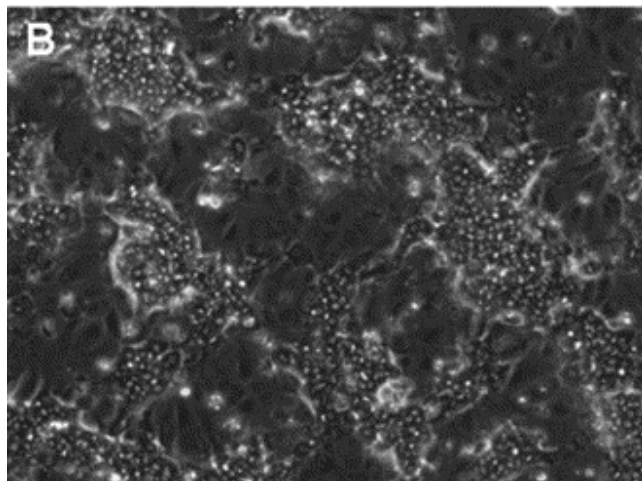


isoformes de cytochromes aux mêmes niveaux que les hépatocytes humains en culture primaire (Guillouzo A *et al.* 2007).



**Figure 30 : Morphologie des cellules HepaRG**

A. Cellules HepaRGensemencées à faible densité en phase de prolifération.



B. Cellules HepaRG différenciées cultivées pendant 15 jours en milieu sans DMSO puis 15 jours dans un milieu avec 2% de DMSO

*Tiré de Guillouzo A. et al., Chem Biol Interact. (2007)*

Aux vues de ces caractéristiques, les cellules HepaRG nous apparaissaient comme un bon compromis entre les cellules HepG2 et les hépatocytes en culture primaire. Nous avons donc testé l'impact du traitement par dexaméthasone sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale de ces cellules. Cependant, afin d'éviter une apoptose massive des cellules lors de l'ajout du DMSO, ces dernières sont cultivées en présence de 10  $\mu$ M d'hydrocortisone hemisuccinate et de 5  $\mu$ g/ml d'insuline. Afin de réaliser nos expériences, nous avons donc dû, dans un premier temps tester s'il était possible de sevrer la lignée en glucocorticoïdes et insuline pendant le temps de nos manipulations sans perdre le caractère différencié ni engendrer une augmentation de l'apoptose.

## **Résultats du travail complémentaire.**

*1°. Caractérisation fonctionnelle de la chaîne respiratoire des cellules HepaRG en présence ou en absence d'insuline et de glucocorticoïdes.*

Afin de tester l'impact du sevrage en insuline et glucocorticoïdes sur la différenciation, la survie et les caractéristiques fonctionnelles de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules HepaRG, nous avons cultivé les cellules HepaRG (passages 9 à 15 maximum) pendant deux semaines dans le milieu de prolifération puis pendant une semaine dans un milieu de différenciation contenant 2 % de DMSO avec insuline et glucocorticoïdes puis pendant 5 jours supplémentaires avec ou sans insuline et avec ou sans glucocorticoïdes. Quatre groupes ont été ainsi constitués :

- avec DMSO, avec glucocorticoïdes et avec insuline (+D+G+I) qui constitue notre condition contrôle
- avec DMSO, avec glucocorticoïdes et sans insuline (+D+G-I)
- avec DMSO, sans glucocorticoïdes et avec insuline (+D-G+I)
- avec DMSO, sans glucocorticoïdes et sans insuline (+D-G-I)

Nous avons fait des tests sur des cellules cultivées sans DMSO mais nous n'avons pas retenu cette condition expérimentale, les cellules perdant très vite leur morphologie différenciée et ayant une activité respiratoire mitochondriale très faible.

a. Quantification de l'aldolase B, un marqueur de différenciation hépatocytaire.

Les cellules HepG2 ont une faible expression de l'aldolase B, inférieure à celle des cellules HepaRG en phase proliférative. L'expression de ce marqueur augmente en fonction du stade de différenciation dans les cellules HepaRG. Le sevrage en glucocorticoïdes et insuline pendant 5 jours après une semaine de culture en milieu de prolifération ne semble pas affecter l'expression de l'aldolase B dans les cellules HepaRG (figure 31).

b. Mesure de la respiration mitochondriale des cellules HepaRG sevrées en glucocorticoïdes et insuline.

Les paramètres respiratoires des cellules HepaRG cultivées avec ou sans glucocorticoïdes et avec ou sans insuline sont identiques à l'exception des cellules cultivées avec glucocorticoïdes mais sans insuline qui présentent une respiration de routine et insensible à l'oligomycine significativement supérieure aux autres conditions expérimentales ( $p < 0.05$ , figure 32).

Nous concluons donc de cette étude sur les cellules HepaRG sevrées en insuline et glucocorticoïdes que le fait de cultiver les cellules HepaRG sans hormones pendant 5 jours à ce stade n'entraîne pas de dédifférenciation des cellules ni de modification des paramètres

respiratoires mitochondriaux de ces cellules. Pour la suite de nos études sur l'impact du traitement par dexaméthasone sur la chaîne respiratoire de ces cellules nous pourrions donc utiliser les cellules HepaRG différenciées sans glucocorticoïdes ni insuline comme contrôles.

2°. *Impact du traitement par dexaméthasone sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules HepaRG traitées par dexaméthasone.*

a. Mesure des paramètres respiratoires des cellules HepaRG traitées par dexaméthasone.

Le traitement par dexaméthasone pendant 8 heures des cellules HepaRG différenciées entraîne une augmentation de la respiration non phosphorylante (oligo) et découplée (FCCP) dès 50 nM de dexaméthasone. En revanche, la respiration de routine est stimulée dans les cellules traitées uniquement par 500 nM et 5 µM de dexaméthasone. La stimulation des paramètres respiratoires obtenue avec 5 µM de dexaméthasone n'est pas supérieure à celle obtenue en présence de 500 nM (figure 33).

b. Mesure de l'activité du complexe IV des cellules HepaRG traitées par dexaméthasone.

Dans les travaux menés sur les cellules HepG2, nous avons montré que la stimulation de la respiration maximale (respiration découplée obtenue en présence de FCCP) pouvait être reliée à une augmentation de l'activité du complexe IV dans ces cellules. Afin de voir si un tel mécanisme se retrouvait dans les cellules HepaRG, nous avons mesuré l'activité COX des cellules HepaRG différenciées traitées par 500 nM de dexaméthasone. Nous avons choisi cette dose car c'est la même que celle que nous avons utilisée sur les cellules HepG2 et cette dose est suffisante pour entraîner une stimulation de la chaîne respiratoire mitochondriale comparable à celles obtenues avec une dose plus forte (5µM). Lorsque l'on compare l'activité maximale de la COX entre les lignées HepG2 et HepaRG, on s'aperçoit que la capacité respiratoire des cellules HepaRG différenciées est nettement supérieure à celle des cellules HepG2 (multipliée par environ 3,5). Dans les deux lignées, le traitement pendant 8 heures par 500 nM de dexaméthasone entraîne une augmentation d'environ 90% de l'activité COX par rapport aux cellules contrôles de la même lignée (figure 35). Ces résultats permettent de mettre en évidence un mécanisme commun de stimulation de l'activité COX dans les deux lignées par le traitement par dexaméthasone, cependant, les cellules HepG2 et HepaRG ne possèdent pas le même métabolisme, les cellules HepaRG différenciées possédant une activité COX plus de trois fois supérieures aux cellules HepG2. Il est intéressant de noter que l'activité COX des cellules HepaRG non différenciées est identique à celle des cellules HepG2 (non montrée ici).

Comme c'était le cas dans les cellules HepG2, l'inhibition du récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes par la mifépristone empêche la stimulation de l'activité COX par la dexaméthasone. Il faut noter cependant que dans les cellules HepaRG, le traitement par mifépristone entraîne une forte mortalité cellulaire dans l'heure qui suit l'application de cette drogue. Afin de réduire cette mortalité, il nous a fallu diminuer la dose par rapport à celle utilisée sur les cellules HepG2 (2.5  $\mu$ M au lieu de 5  $\mu$ M). Dans ce cas, la viabilité cellulaire à 8 heures dépasse les 70% par rapport aux cellules contrôles et permet ainsi de faire les manipulations en présence de mifépristone.

c. Mesure du potentiel membranaire mitochondrial des cellules HepaRG.

Les résultats complémentaires de l'article 2 concernant les effets à 5 jours du traitement par dexaméthasone montrent que le potentiel de membrane à l'état IV (non phosphorylant) est diminué de 30 % dans les cellules traitées par dexaméthasone. Nous avons mesuré ce paramètre dans les cellules HepaRG contrôle (cultivées pendant 5 jours en milieu de différenciation sans insuline ni glucocorticoïdes) ainsi que dans celles ayant reçu 50 nM, 500 nM ou 5 $\mu$ M de dexaméthasone. Les résultats de cytométrie en flux (dont un exemple est présenté figure 33) ont mis en évidence deux populations dans ces cellules : une à forte intensité de fluorescence (population minoritaire représentant environ 20 % des cellules) et une à faible intensité de fluorescence (représentant 80 % des cellules). La mesure de fluorescence du DiOC<sub>6</sub> dans les cellules HepG2 mettait en évidence une seule population, homogène (figure 34), d'intensité de fluorescence similaire à la population la plus fluorescente retrouvée dans les cellules HepaRG. Ces deux populations n'ont donc pas permis une analyse plus précise de la variation du potentiel membranaire mitochondrial en fonction du traitement par dexaméthasone dans les cellules HepaRG.

## **Discussion des résultats complémentaires.**

Les cellules HepaRG ont été utilisées dans le but d'étudier les effets des glucocorticoïdes sur la fonction mitochondriale hépatique dans un modèle se rapprochant le plus possible du foie « sain ». Cependant, la culture de ces cellules nécessitant l'utilisation de fortes concentrations de glucocorticoïdes et d'insuline et leur fonction oxydative mitochondriale n'ayant jamais été étudiée, des études préliminaires ont été nécessaires.

La comparaison entre les cellules HepG2 et HepaRG a permis de montrer que ces dernières expriment de manière plus importante l'aldolase B, un marqueur de différenciation hépatocytaire et que cette expression n'est pas altérée par 5 jours de sevrage en glucocorticoïdes et insuline (figure 30). De plus, la capacité de la chaîne respiratoire mitochondriale (montrée par la respiration découplée) ainsi que l'activité maximale du complexe IV sont supérieures dans les cellules HepaRG (figures 33 et 35). En revanche, l'effet à court terme de diminution de l'activité du complexe II par dexaméthasone n'est pas retrouvé dans les cellules HepaRG (figure 36).

En ce qui concerne l'impact du traitement par glucocorticoïdes sur le métabolisme oxydatif mitochondrial, un effet stimulateur sur les paramètres respiratoires mitochondriaux est retrouvé. Cet effet est croissant entre 50 et 500 nM de dexaméthasone mais atteint un plateau après cette dose. De plus, les effets ayant été reliés, lors des travaux menés sur les cellules HepG2, à l'activation du récepteur classique, intracellulaire aux glucocorticoïdes ont également été mis en évidence dans la lignée HepaRG. Ainsi, le traitement pendant 8 heures par 500 nM de dexaméthasone induit une augmentation de la capacité maximale de la chaîne respiratoire mitochondriale et une stimulation de l'activité du complexe IV. Les mesures du potentiel membranaire mitochondrial sur ces cellules ont montré la présence de deux populations de cellules (ou deux populations de mitochondries au sein des mêmes cellules) d'intensité de fluorescence différentes. Ce phénomène a été retrouvé dans différentes études sur des mitochondries isolées de foie de rat (Lopez-Mediavilla *et al.*, 1995, Lopez-Mediavilla *et al.*, 1989, Lopez-Mediavilla *et al.*, 1992). La présence de mitochondries avec un potentiel membranaire différent a été reliée au stade de développement, le nombre de mitochondries à bas potentiel augmentant avec l'âge de l'animal (Lopez-Mediavilla *et al.*, 1989) ainsi que dans les hépatocytes mis en culture. De plus, la proportion de ces deux populations dépend également du statut énergétique des mitochondries. Ainsi, l'étude de Lopez Mediavilla en 1995 a montré que la dissipation du gradient mitochondrial, induite par l'ajout d'un agent découplant, affecte surtout la population mitochondriale à bas potentiel alors que l'inhibition de la synthèse d'ATP par l'oligomycine entraîne une augmentation de la fluorescence des

deux populations (Lopez-Mediavilla *et al.*, 1995). Les auteurs concluent donc de cette étude que la population avec un plus fort potentiel est formée par des formes mitochondriales immatures, les deux populations présentant différents types fonctionnels de mitochondries. Dans les cellules HepG2, les mitochondries sont toutes localisées dans la population à fort potentiel mitochondrial, ce qui confirme les résultats obtenus avec le Western blot anti-aldolase B selon lesquels ces cellules sont moins différenciées que les cellules HepaRG.

Nous pouvons émettre l'hypothèse que cette dédifférenciation des HepaRG, bien qu'elle ne fût pas visible avec le Western blot anti-aldolase B, soit due au sevrage en glucocorticoïdes et insuline pendant les cinq jours qui précèdent la mesure. En effet, ces hormones sont importantes lors du processus de différenciation des cellules HepaRG et peut-être qu'après cinq jours d'arrêt, les cellules commencent à se dédifférencier. Il aurait été intéressant de mesurer le potentiel sur des cellules HepaRG cultivées en milieu classique de différenciation afin de confirmer notre hypothèse. L'hétérogénéité des populations mitochondriales présentes dans les cellules HepaRG a également été retrouvée dans des essais de mesure de production de ROS par les cellules HepaRG en utilisant la sonde dihydroéthidium (données non présentées) montrant que ces deux populations de mitochondries semblent avoir un statut fonctionnel différent. Ces données montrent que les deux types cellulaires étudiés (HepG2 et HepaRG) présentent des réponses différentes suite au traitement par glucocorticoïdes. Ceci nous amène à nous demander pourquoi une telle différence ?

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer le fait que les effets imputés au récepteur membranaire aux glucocorticoïdes ne se retrouvent pas dans les cellules HepaRG :

- l'absence de ce type de récepteur sur ces cellules. Afin de vérifier cette hypothèse, il faudrait reproduire les expériences d'incubation de membranes isolées de cellules HepaRG avec la dexaméthasone fluorescéine (expériences décrites dans la partie « matériel et méthodes ») afin de vérifier que la dexaméthasone peut se fixer sur les membranes et que cette fixation peut être déplacée par la dexaméthasone-BSA par exemple.

- une « désensibilisation » aux glucocorticoïdes. Ces cellules étant cultivées en permanence avec une forte concentration d'hydrocortisone, nous pouvons émettre l'hypothèse que le site membranaire aux glucocorticoïdes est plus facilement saturable et que l'environnement riche en glucocorticoïdes induit une « résistance partielle aux glucocorticoïdes » dans cette lignée.

- des voies de signalisation en aval du récepteur membranaire différentes ou non fonctionnelles.

De par leur hétérogénéité de populations mitochondriales, les cellules HepaRG sont un modèle assez difficile à caractériser et à manipuler. Cependant, il reste intéressant car plus

proche des hépatocytes en culture et s'il s'avérait que ce modèle ne possédait réellement pas de récepteur membranaire aux glucocorticoïdes ou que ce récepteur, ou les voies en aval, étaient non fonctionnels, ces cellules représenteraient alors un modèle très intéressant afin de pouvoir discriminer entre les effets liés au récepteur membranaire et cytosolique et pourrait constituer un « contrôle » négatif pour l'étude des effets récepteur membranaire dépendants des glucocorticoïdes.

### **Légende des figures :**

Figure 31 : Les cellules HepaRG ont été cultivées pendant 15 jours dans un milieu de prolifération puis pendant une semaine dans le milieu de différenciation (milieu de prolifération contenant 5  $\mu$ M d'hydrocortisone plus 5 $\mu$ g/ml d'insuline) supplémenté avec 2% de DMSO. Au bout d'une semaine de différenciation, les cellules HepaRG ont été cultivées pendant 5 jours dans le milieu de différenciation (+D) avec ou sans glucocorticoïdes (+/- G) et avec ou sans insuline (+/- I). La condition « HepaRG Prolif » correspond à des cellules HepaRG cultivées pendant une semaine après repiquage dans le milieu de prolifération classique. Les cellules HepG2 ont été cultivées en milieu contrôle sans insuline ni glucocorticoïdes.

Figure 32 : Paramètres respiratoires des cellules HepaRG cultivées avec ou sans glucocorticoïdes et avec ou sans insuline. Les cellules HepaRG ont été cultivées pendant 15 jours dans le milieu de prolifération puis pendant une semaine dans le milieu de différenciation. Ensuite, les cellules ont été sevrées ou non en glucocorticoïdes et/ou insuline pendant 5 jours. Les cellules ont ensuite été trypsinées et leurs paramètres respiratoires ont été mesurés sur cellules entières par polarographie.

A. Respiration de routine (avec les substrats endogènes) des cellules HepaRG différenciées (+D) avec ou sans glucocorticoïdes (+/- G) et avec ou sans insuline (+/- I).

B. Respiration non couplée à la synthèse d'ATP mesurée en présence de 16  $\mu$ g/ml d'oligomycine dans les cellules HepaRG différenciées (+D) avec ou sans glucocorticoïdes (+/- G) et avec ou sans insuline (+/- I).

C. Respiration découplée (reflet de la capacité maximale de la chaîne respiratoire) obtenue par ajout d'un découplant (le FCCP) sur les cellules HepaRG différenciées (+D) avec ou sans glucocorticoïdes (+/- G) et avec ou sans insuline (+/- I).

Figure 33 : Paramètres respiratoires des cellules HepaRG cultivées avec ou sans dexaméthasone pendant 8 heures. Les cellules HepaRG ont été cultivées pendant 15 jours dans le milieu de prolifération puis pendant une semaine dans le milieu de différenciation. Ensuite, les cellules ont été cultivées pendant 8 heures en présence de différentes concentrations de dexaméthasone (de 50 nM à 5  $\mu$ M). Les cellules ont ensuite été trypsinées et leurs paramètres respiratoires ont été mesurés sur cellules entières par polarographie.

A. Respiration de routine (avec les substrats endogènes) des cellules HepaRG différenciées traitées pendant 8 heures par dexaméthasone.

B. Respiration non couplée à la synthèse d'ATP mesurée en présence de 16  $\mu$ g/ml d'oligomycine dans les cellules HepaRG différenciées traitées pendant 8 heures par dexaméthasone.

C. Respiration découplée (reflet de la capacité maximale de la chaîne respiratoire) obtenue par ajout d'un découplant (le FCCP) sur les cellules HepaRG différenciées traitées pendant 8 heures par dexaméthasone.

Figure 34 : Histogrammes de fluorescence de la sonde DiOC6(3) dans les cellules HepG2 (graphique A) et HepaRG différenciées (graphique B). Les cellules sont traitées par 500 nM de dexaméthasone pendant 8 heures puis elles sont incubées en présence de 20 nM du fluorochrome DiOC6(3) et 16 $\mu$ g/ml d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase pendant une demi-heure. La fluorescence du DiOC6(3), proportionnelle au potentiel membranaire mitochondrial, est ensuite lue par cytométrie en flux. Les cellules mortes sont exclues de l'étude par marquage à l'iodure de propidium.

Figure35 : Dosage de l'activité du complexe IV (cytochrome C oxydase) sur les cellules HepG2 et HepaRG traitées par 500 nM de dexaméthasone. Les résultats sont rapportés à l'activité de la citrate synthase (CS), un marqueur du volume mitochondrial dans les cellules.

Figure 36 : Dosage de l'activité du complexe II sur les cellules HepG2 et HepaRG traitées pendant dix minutes par 500 nM de dexaméthasone. Les résultats sont rapportés à l'activité de la citrate synthase (CS), un marqueur du volume mitochondrial dans les cellules.



*Figure 31.*

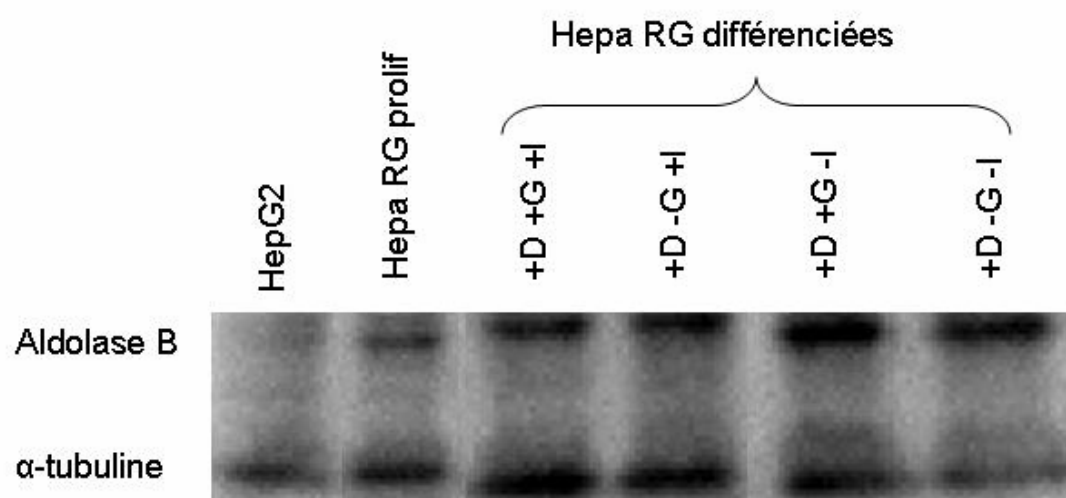
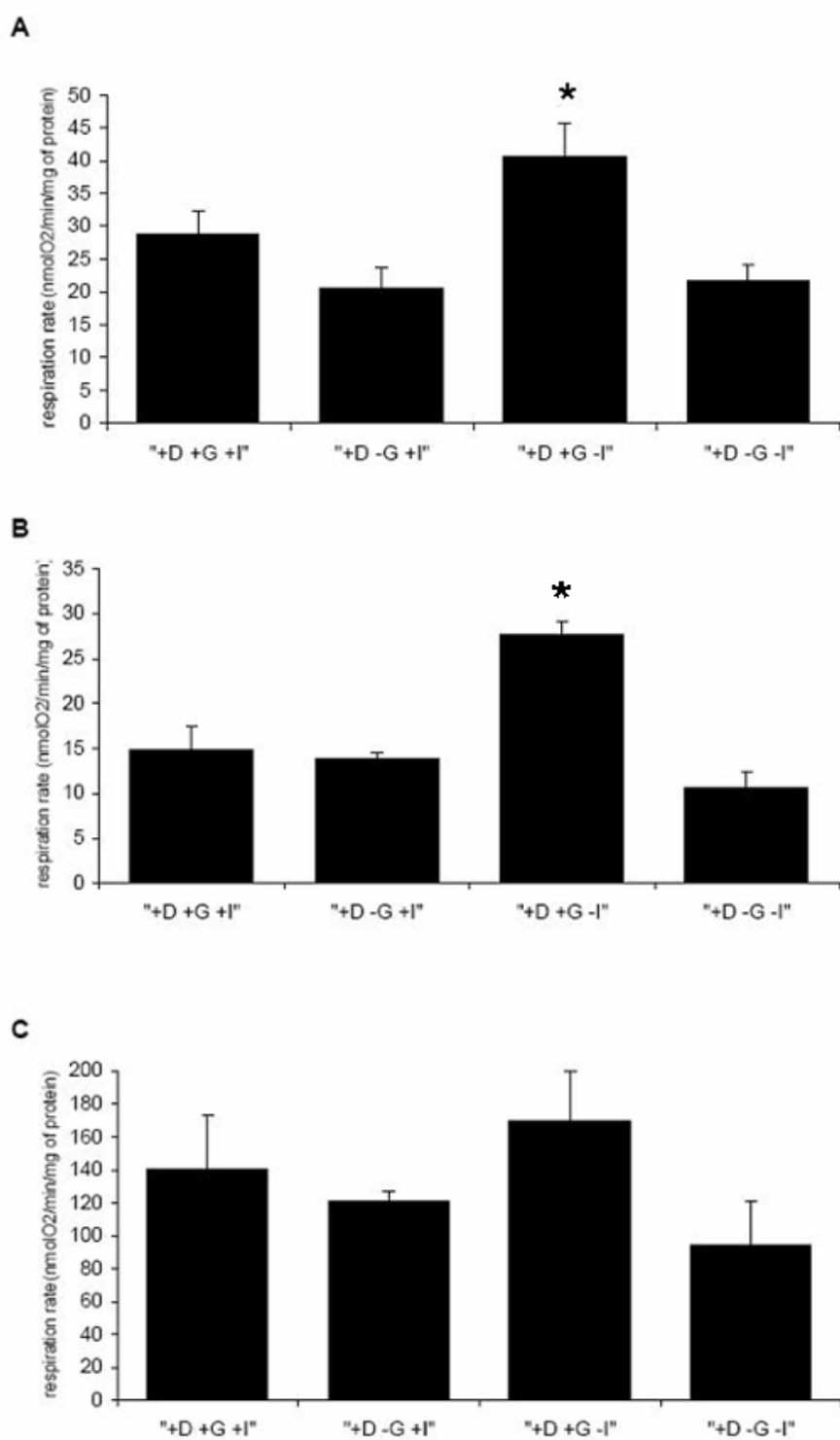
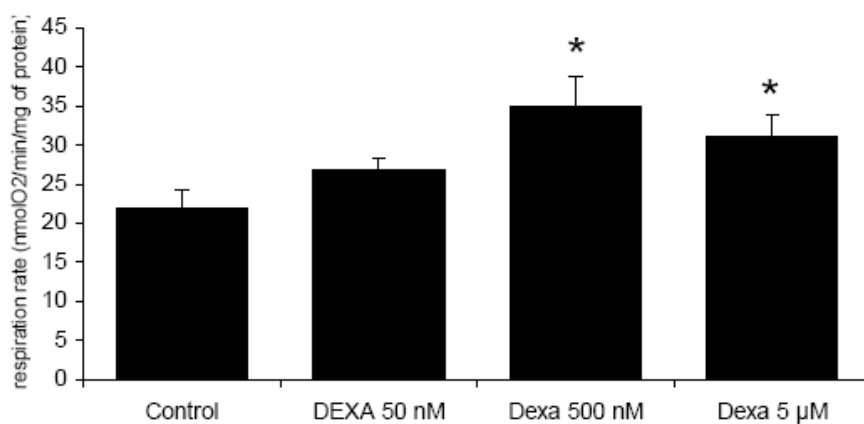


Figure 32.

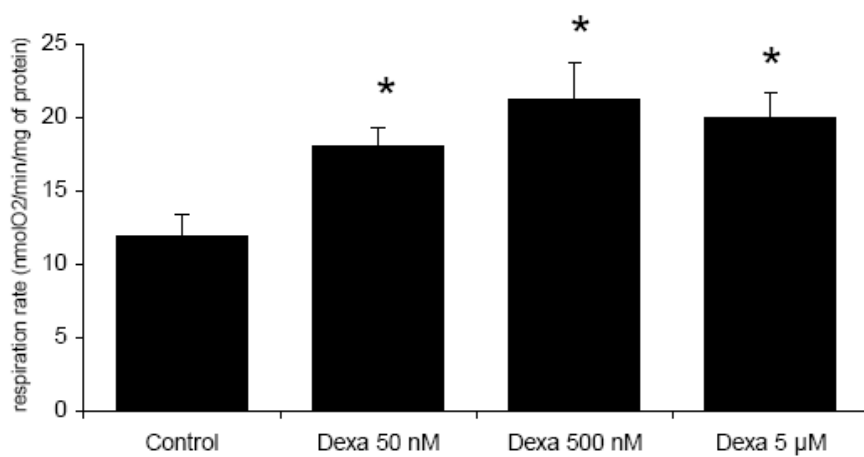


**Figure 33.**

**A**



**B**



**C**

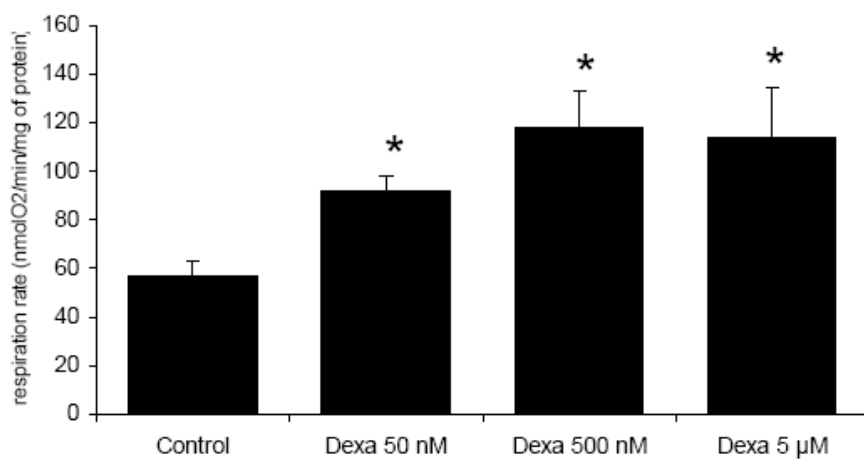
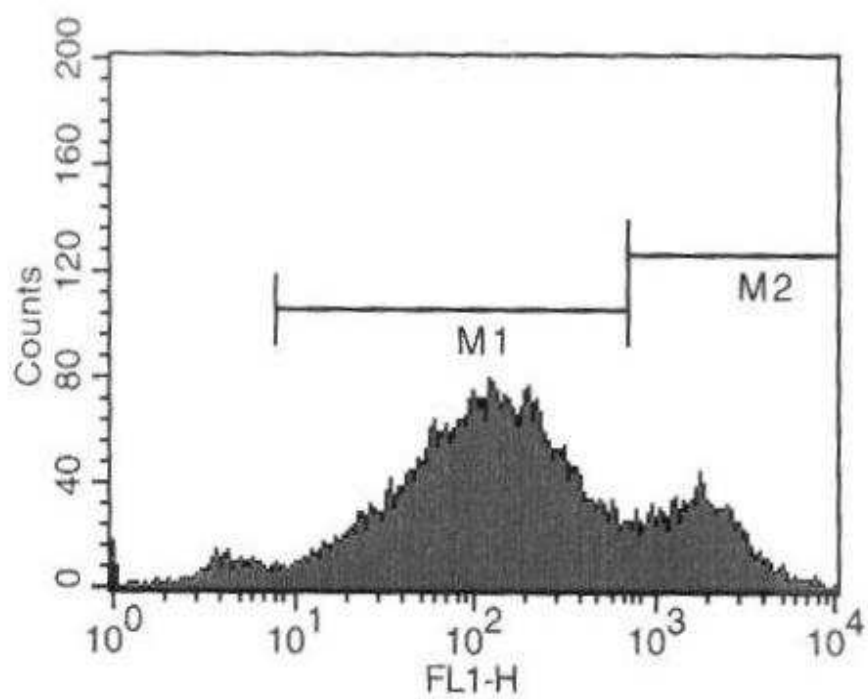
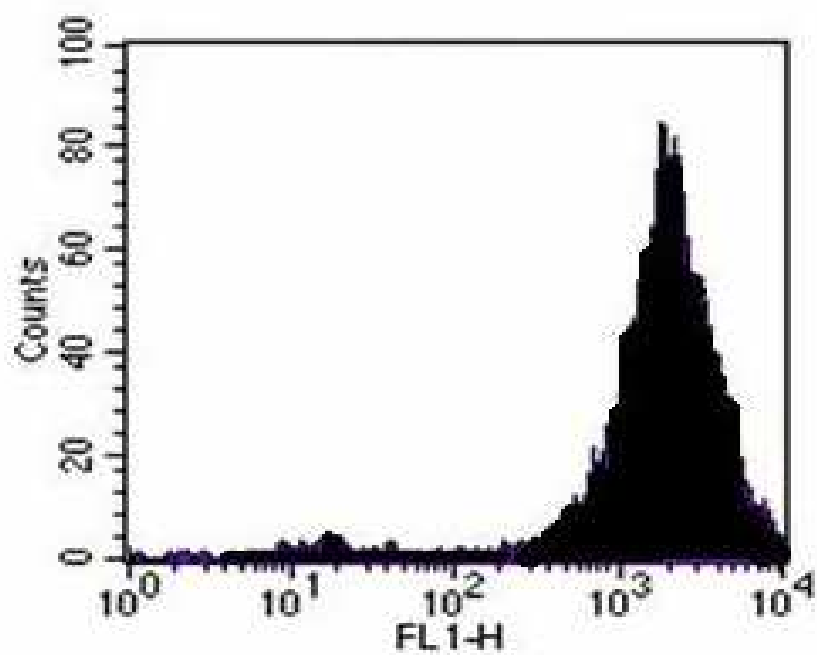
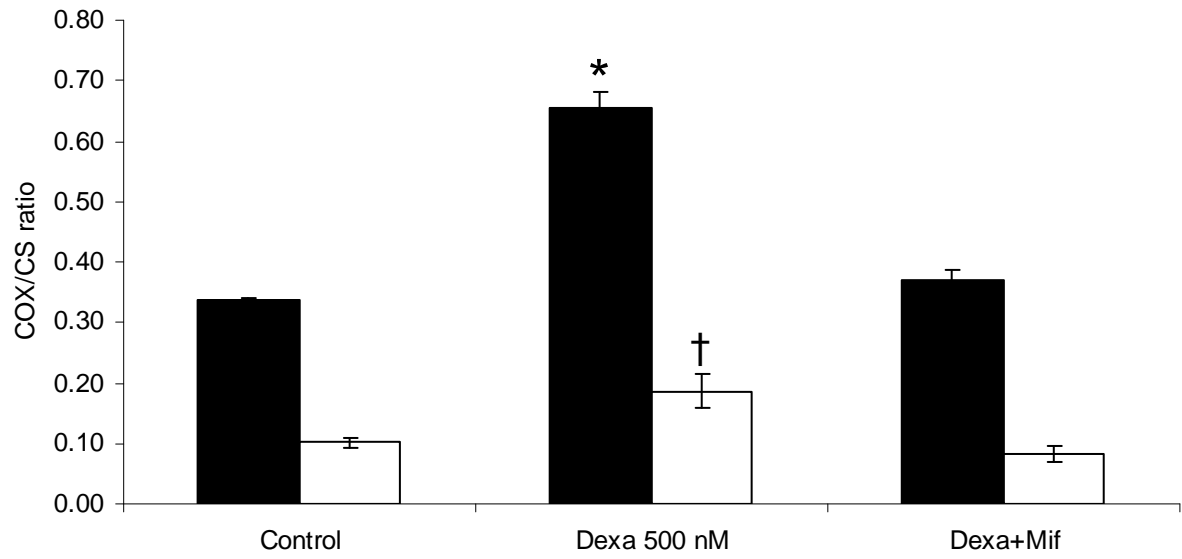


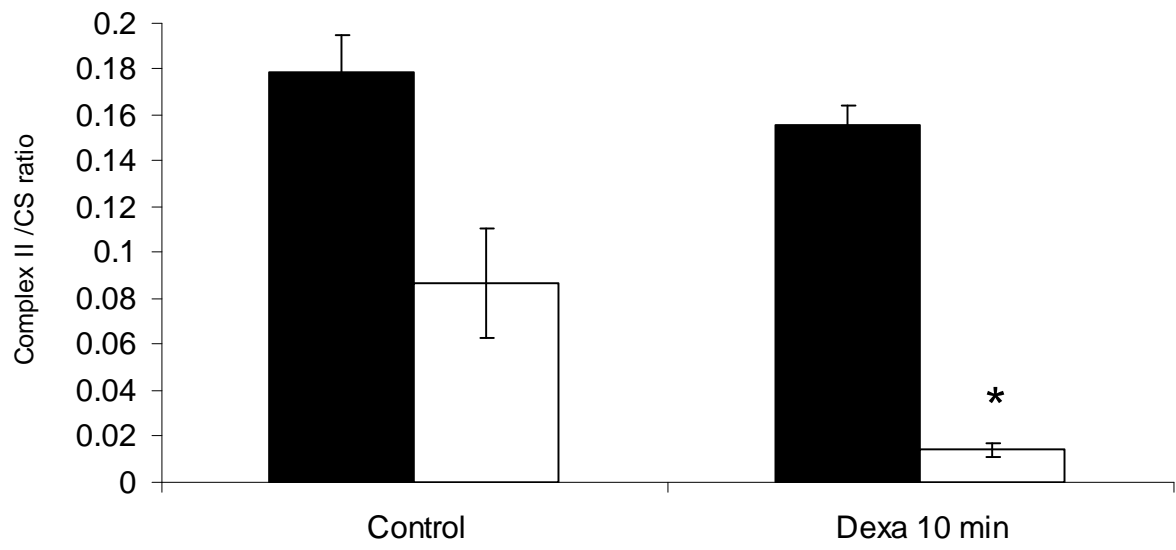
Figure 34.



**Figure 35.**



**Figure 36.**



# **CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES**

Notre projet consistait en l'étude du fonctionnement mitochondrial lors de situations de stress cellulaires touchant plus particulièrement les mitochondries tels que la dissipation du gradient de protons (découplage) ou le traitement par hormones glucocorticoïdes.

La première partie de ce travail nous a permis d'étudier l'impact d'un découplage mitochondrial modéré sur le métabolisme mitochondrial et la prolifération cellulaire dans deux lignées cellulaires présentant une orientation métabolique différente (plutôt oxydative ou plutôt glycolytique). Nos résultats montrent que contrairement à ce que l'on pouvait penser, lorsqu'un stress est appliqué au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale (découplage induit par le DNP), les cellules les plus glycolytiques (cellules 143B) ont une prolifération fortement ralentie et ce, malgré une stimulation de la glycolyse. Par contre, le découplage de cellules plus oxydatives (cellules HepG2) n'induit pas de diminution de la croissance cellulaire et conduit à des adaptations mitochondriales afin de faire face à cette diminution d'efficacité de la conversion énergétique. Dans ces cellules, le découplage entraîne une stimulation de la transcription de deux gènes nucléaires importants pour le métabolisme oxydatif mitochondrial (COXIV et ANT3).

La première interrogation soulevée par ces résultats est de savoir quels sont les éléments de signalisation intracellulaire impliqués dans la mise en place de ces adaptations mitochondriales au découplage dans les cellules HepG2 ?

Ces adaptations passent par l'activation d'un dialogue rétrograde de la mitochondrie vers le noyau conduisant notamment à la stimulation de la transcription de ces deux gènes nucléaires. Ce dialogue rétrograde, mis en place par suite d'un dysfonctionnement mitochondrial a été très étudié chez la levure (Jazwinski, 2000, Jazwinski, 2005, Liao et Butow, 1993, Liu *et al.*, 2001, Rothermel *et al.*, 1995, Sekito *et al.*, 2000). D'autres études ont montré son existence dans les cellules eucaryotes (Biswas *et al.*, 1999, Biswas *et al.*, 2005, Butow et Avadhani, 2004, Erol, 2005, Giannattasio *et al.*, 2005, Liu et Butow, 2006, Park *et al.*, 2006, Rohas *et al.*, 2007, Schieke et Finkel, 2006, Schroeder *et al.*, 2007) et différents éléments de cette cascade ont été identifiés.

Il serait intéressant d'étudier les variations d'expression et ou de quantité de ces différents facteurs suite à l'induction d'un découplage dans les cellules HepG2. L'augmentation de la concentration intracellulaire en calcium ayant été décrite comme un élément clé de cette cascade (Biswas *et al.*, 1999, Rohas *et al.*, 2007, Ryan et Hoogenraad, 2007), nous nous proposons de mesurer la concentration intracellulaire en calcium après différents temps de traitement par le DNP. De même, le facteur Sp1 a été identifié comme un régulateur important de la transcription de certains gènes OXPHOS (parmi lesquels COXIV, Carter et Avadhani,



1994) dont l'activité est régulée par phosphorylation par PKC ou p38MAPK (D'Addario *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006). L'inhibition ciblée de ces protéines kinases dans notre modèle ainsi que l'étude de l'état de phosphorylation du facteur Sp1 permettraient d'étudier leur implication dans le dialogue mis en place suite au découplage dans les cellules HepG2.

La seconde question est de comprendre pourquoi les cellules 143B, dont le métabolisme est le plus glycolytique et donc le moins dépendant de la fonction oxydative mitochondriale, ne parviennent pas à s'adapter au découplage ?

L'hypothèse d'un élément de signalisation manquant ou défaillant dans la cascade de signalisation précédemment citée est séduisante d'autant plus qu'il a été montré dans ces cellules des défauts d'homéostasie calcique (Szczepanowska *et al.*, 2004, von Kleist-Retzow *et al.*, 2007). Le relargage du calcium par la mitochondrie étant le point de départ de la mise en place de ce dialogue, il paraît intéressant de mesurer ce paramètre dans les cellules 143B soumises à un découplage mitochondrial. En outre, on peut penser que ces cellules utilisant de manière préférentielle la glycolyse ont une chaîne respiratoire mitochondriale moins fonctionnelle et un niveau d'utilisation du métabolisme oxydatif plus restreint. Elles présenteraient une capacité de réserve moins importante ne leur permettant pas de développer leur métabolisme oxydatif à la suite du stress mitochondrial, peut-être par un effet de seuil.

L'effet découplant du DNP présente des applications intéressantes notamment dans la détoxification des EORs et peut-être même le traitement de l'obésité. Le découplage permet en effet d'augmenter la respiration mitochondriale et la dépense énergétique corps entier. Le DNP a d'ailleurs déjà été utilisé dans cette application mais la fenêtre de concentration permettant d'obtenir les effets positifs sur la dépense énergétique sans induction de l'apoptose est très mince et son utilisation abusive a d'ailleurs causé plusieurs décès. Une meilleure compréhension des mécanismes soutenant les adaptations métaboliques mises en place dans les cellules lors d'un découplage modéré ainsi que l'identification des éléments-clés de ses voies pourraient peut-être permettre de mieux contrôler les effets toxiques du DNP, tout en gardant les effets sur le métabolisme énergétique. Ainsi, utilisé dans des conditions bien contrôlées, comme suggéré par Rohas *et al.* (2007), le DNP (ou d'autres découplants plus faibles, des dérivés d'hydroxytoluène, qui, utilisés à des doses minimales, ont une fenêtre d'action beaucoup plus large, Lou *et al.*, 2007) pourrait peut-être représenter une alternative thérapeutique intéressante dans le traitement de l'obésité.

La seconde partie de ce travail avait pour but d'étudier l'effet du traitement par les glucocorticoïdes sur la chaîne respiratoire et le métabolisme énergétique des cellules HepG2 ainsi que les voies de signalisation intracellulaires impliquées dans ces effets. Nos résultats

montrent que la mitochondrie est à la fois la cible d'effets rapides non génomiques et d'effets génomiques mis en place à plus long terme, ces deux types d'effets, spécifiques de la dexaméthasone, sont médiés par la fixation de cette hormone sur des récepteurs différents.

Le traitement à long terme des cellules HepG2 par dexaméthasone entraîne une stimulation de la respiration mitochondriale ainsi qu'une diminution de l'efficacité de synthèse d'ATP. Ces effets sont notamment reliés à une augmentation de l'activité et de la quantité du complexe IV de la chaîne respiratoire par un mécanisme transcriptionnel dépendant du récepteur « classique » intracellulaire aux glucocorticoïdes.

Pour autant, nous ne savons pas par quel mécanisme se produit le découplage dans ces cellules. On peut en effet exclure une action non spécifique des glucocorticoïdes (insertion dans la membrane mitochondriale par exemple) puisque lorsque la transcription est inhibée, on ne retrouve plus les variations de respiration mitochondriale. Le découplage est donc dépendant de l'activation d'une ou plusieurs protéines. Les principales protéines reconnues pour avoir un rôle découplant sont les UCP (Uncoupling Proteins) et l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator). Or, l'activité des protéines UCP dans le foie n'est pas clairement définie. Plusieurs études ont montré que l'ANT participe à l'augmentation de la fuite de protons (Brand *et al.*, 2005, Lombardi *et al.*, 2002, Shabalina *et al.*, 2006). Nos résultats après cinq jours de traitement par dexaméthasone montrent que la quantité de protéines ANT est augmentée dans les cellules HepG2. Cependant, aucune corrélation n'a été faite avec l'augmentation de la respiration que l'on retrouve également après cinq jours de dexaméthasone. Nous nous proposons d'effectuer des mesures de respiration cellulaire en réalisant une titration au carboxyatractylate, un inhibiteur de l'ANT, pour déterminer si cette protéine participe à l'augmentation de la fuite de protons que nous retrouvons dans ce modèle. Quant aux effets non génomiques précoces, nous montrons qu'après 10 minutes de traitement par dexaméthasone, les cellules HepG2 présentent une diminution de l'activité des complexes I et II de la chaîne respiratoire ainsi qu'une augmentation de l'activité du complexe III. Ces effets, non transcriptionnels, sont induits par la fixation de la dexaméthasone sur un site de fixation situé sur la membrane plasmique des cellules. Cette fixation entraîne l'activation d'une protéine Gq induisant en aval, par la voie de la phospholipase C, une sortie de calcium des stocks intracellulaires PKC-dépendante. Cette augmentation de la concentration intracellulaire en calcium est nécessaire pour les effets mitochondriaux de la dexaméthasone et ce, en activant la protéine kinase p38MAPK (cf figure 28). L'inhibition de l'activation de cette protéine entraîne une levée totale des effets de la dexaméthasone sur les complexes de la chaîne respiratoire.

Ces complexes peuvent subir des modifications post-traductionnelles rapides. En effet, deux sous-unités du complexe I peuvent être phosphorylées *in vitro* (Chen, R. *et al.*, 2004) ce qui peut modifier l'assemblage et l'activité de ce complexe (Yadava *et al.*, 2007). De plus, la possibilité de glutathiolation des complexes I et II de la chaîne respiratoire a été mise en évidence (Chen, C. L. *et al.*, 2007, Chen, Y. R. *et al.*, 2007). Il serait intéressant d'évaluer ces modifications post traductionnelles dans notre modèle après ajout de dexaméthasone et de l'inhibiteur de p38MAPK.

La dexaméthasone induit donc dans les cellules HepG2, via le récepteur membranaire aux glucocorticoïdes, des effets non génomiques conduisant à une inhibition de la chaîne respiratoire mitochondriale. Or, ces effets rapides ne sont pas retrouvés dans les cellules HepaRG qui présentent, lorsqu'elles sont différenciées, un métabolisme beaucoup plus oxydatif que les cellules HepG2 (et proche des hépatocytes isolés). On peut donc se demander, si les cellules tumorales peuvent tirer partie de ce dysfonctionnement mitochondrial induit par la dexaméthasone pour leur prolifération. En effet, l'hypoxie ayant été corrélée positivement à l'agressivité tumorale (Boyle et Travers, 2006), l'inhibition du fonctionnement mitochondrial induit par l'activation du récepteur membranaire aux glucocorticoïdes pourrait être un des facteurs de stimulation du développement tumoral. Cette surreprésentation de la forme membranaire de récepteurs aux stéroïdes a d'ailleurs été mise en évidence dans d'autres types tumoraux tels que le cancer du sein ou de la prostate (Dressing et Thomas, 2007, Dambaki *et al.*, 2005) où elle est reliée à l'agressivité de ces tumeurs. Dans ce cas, la présence d'une forme membranaire de récepteur aux stéroïdes confère aux cellules cancéreuses qui l'expriment de manière importante un caractère plus invasif et plus agressif. Kampa et Castanas (2006) ont d'ailleurs proposé le ciblage de ces récepteurs membranaires aux stéroïdes comme agent majeur ou adjuvant chimiothérapeutique. Ils concluent que ce ciblage peut représenter une alternative thérapeutique intéressante pour la destruction spécifique des cellules cancéreuses. Les cellules immunitaires ne semblent pas obéir à cette règle puisque bien qu'une augmentation de la quantité de récepteurs membranaires aux glucocorticoïdes ait été retrouvée dans les cellules leucémiques ainsi que dans les cellules immunitaires de patients souffrant de pathologies auto-immunes (Gametchu et Watson, 2002, Tryc *et al.*, 2006 et Spies *et al.*, 2006), la présence de ce récepteur serait le marqueur d'une plus grande sensibilité cellulaire à l'apoptose. Dans ce cas, la présence d'un récepteur membranaire aux glucocorticoïdes représenterait plutôt un frein à la prolifération des cellules pathologiques plutôt qu'un avantage prolifératif pour les cellules concernées. Il semble donc que la signalisation en aval de ce récepteur ainsi que les protéines-clés qui composent ces

voies diffèrent selon les types cellulaires et que, selon la cascade de signalisation activée, les effets puissent être totalement opposés (effet anti- ou proapoptotique). La caractérisation précise des voies mises en jeu dans ces modèles pourrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes reliant prolifération tumorale, métabolisme cellulaire et récepteurs membranaires aux stéroïdes.

Les effets induits par le récepteur membranaire ne sont cependant pas totalement dissociables des effets dépendants du récepteur intracellulaire et cibler précisément le récepteur membranaire peut avoir des conséquences également sur les effets génomiques classiques de ces hormones. On peut se demander quelles interactions peuvent exister entre les voies d'action génomiques et non génomiques des glucocorticoïdes. En effet, autant les effets à court terme semblent avoir une action inhibitrice sur le fonctionnement mitochondrial autant les effets à long terme semblent entraîner une stimulation du métabolisme oxydatif par des mécanismes transcriptionnels (cf figure 29). La mise en place des effets à long terme constitue-t-elle une adaptation cellulaire pour pallier les déficits engendrés par les effets non génomiques ou ces deux voies sont-elles indépendantes, se mettant en place de manière graduelle ?

L'implication du récepteur cytosolique aux glucocorticoïdes dans les effets à long terme nous laisse penser que les mécanismes de dialogue rétrograde mitochondrie-noyau, évoqués précédemment pour expliquer les effets du DNP, n'interviennent pas dans ce modèle. Il s'agirait plutôt d'une mise en place coordonnée des deux voies d'action des glucocorticoïdes. La stimulation du métabolisme oxydatif à long terme permettrait finalement la production d'ATP nécessaire pour approvisionner notamment la néoglucogenèse, voie stimulée par les glucocorticoïdes et consommatrice d'ATP. Les éléments permettant de relier l'activité de ces deux récepteurs restent à étudier. Certains auteurs ont émis l'hypothèse d'un recrutement et d'une activation du récepteur cytosolique par le récepteur membranaire (Daufeldt et *al.*, 2003). Dans notre modèle, certains des effets à long terme de la dexaméthasone sont retrouvés avec un ligand ne passant pas la membrane plasmique (dexaméthasone-BSA) et que d'autres sont totalement inhibables par la mifépristone (inhibiteur spécifique du récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes), ce qui rend peu probable la mise en place d'une telle voie. On peut penser au contraire que l'activation du récepteur membranaire réprime les effets dépendants du récepteur cytosolique et que, c'est lorsque ces effets disparaissent que les effets à long terme se mettent en place. Deux études ont rapporté que le récepteur intracellulaire aux glucocorticoïdes pouvait être inhibé par une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Sheppard, 1994) ainsi que par une activation de la protéine p38MAPK (Wang *et*

*al.*, 2004). Ces deux messagers étant des éléments-clés des effets non génomiques des glucocorticoïdes, la possibilité d'une inhibition du GR intracellulaire par ces molécules puis une levée progressive de cette inhibition peut être envisagée. Il serait intéressant d'étudier les effets à long terme des glucocorticoïdes après inhibition de la protéine p38MAPK ou après chélation du calcium intracellulaire.

Ces travaux nous ont permis de montrer que l'induction d'un stress au niveau de la mitochondrie (découplage chimique par DNP ou hormonal par dexaméthasone) induit des adaptations du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale visant à stimuler sa capacité afin de pallier son manque d'efficacité (stimulation de l'activité du complexe IV, augmentation de la quantité de protéines COXIV et ANT). Cependant, si les conséquences sur la chaîne respiratoire sont à peu près identiques, les voies qui sont impliquées semblent totalement différentes. Lors d'un découplage par DNP, la mitochondrie paraît être un acteur des adaptations (par la mise en place d'une signalisation rétrograde). Par contre, le découplage induit par dexaméthasone semble plutôt être une conséquence des adaptations cellulaires visant à augmenter la production d'ATP qu'un phénomène à l'origine de ces adaptations.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## A

- Abramson, J., Svensson-Ek, M., Byrne, B. and Iwata, S. (2001). "Structure of cytochrome c oxidase: a comparison of the bacterial and mitochondrial enzymes". *Biochim Biophys Acta* 1544(1-2): 1-9
- Adams, P. L., Lightowlers, R. N. and Turnbull, D. M. (1997). "Molecular analysis of cytochrome c oxidase deficiency in Leigh's syndrome". *Ann Neurol* 41(2): 268-270
- Allary, J. and Annane, D. (2005). "Glucocorticoids and sepsis". *Minerva Anesthesiol* 71(12): 759-768
- Allan, E. H., Chisholm, A. B. and Titheradge, M. A. (1983). "The stimulation of hepatic oxidative phosphorylation following dexamethasone treatment of rats". *Biochim Biophys Acta* 725(1): 71-76
- Allera, A. and Wildt, L. (1992). "Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles--II. Comparative influx and efflux". *J Steroid Biochem Mol Biol* 42(7): 757-771
- Amat, R., Solanes, G., Giralt, M. and Villarroya, F. (2007). "SIRT1 is involved in glucocorticoid-mediated control of uncoupling protein-3 gene transcription". *J Biol Chem* 282(47): 34066-34076
- Amuthan, G., Biswas, G., Ananatheerthavarada, H. K., Vijayasarathy, C., Shephard, H. M. and Avadhani, N. G. (2002). "Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells". *Oncogene* 21(51): 7839-7849
- Argiles, J. M., Busquets, S., Alvarez, B. and Lopez-Soriano, F. J. (1999). "Mechanism for the increased skeletal muscle protein degradation in the obese Zucker rat". *J Nutr Biochem* 10(4): 244-248
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. and Schagger, H. (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits". *Embo J* 17(24): 7170-7178
- Arnould, T., Vankoningsloo, S., Renard, P., Houbion, A., Ninane, N., Demazy, C., Remacle, J. and Raes, M. (2002). "CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation". *Embo J* 21(1-2): 53-63
- Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S. and Ricquier, D. (2000). "Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production". *Nat Genet* 26(4): 435-439

- Arvier, M., Lagoutte, L., Johnson, G., Dumas, J. F., Sion, B., Grizard, G., Malthiery, Y., Simard, G. and Ritz, P. (2007). "Adenine nucleotide translocator promotes oxidative phosphorylation and mild uncoupling in mitochondria after dexamethasone treatment". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293(5):E1320-4.
- Au, H. C., Seo, B. B., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T. and Scheffler, I. E. (1999). "The NDUFA1 gene product (MWFE protein) is essential for activity of complex I in mammalian mitochondria". *Proc Natl Acad Sci USA* 96(8): 4354-4359
- Auclair, D., Garrel, D. R., Chaouki Zerouala, A. and Ferland, L. H. (1997). "Activation of the ubiquitin pathway in rat skeletal muscle by catabolic doses of glucocorticoids". *Am J Physiol* 272(3 Pt 1): C1007-1016

## **B**

- Babcock, G. T. and Wikstrom, M. (1992). "Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration". *Nature* 356(6367): 301-309
- Baeuerle, P. A. and Henkel, T. (1994). "Function and activation of NF-kappa B in the immune system". *Annu Rev Immunol* 12: 141-179
- Balaban, R. S., Nemoto, S. and Finkel, T. (2005). "Mitochondria, oxidants, and aging". *Cell* 120(4): 483-495
- Bannister, A. J. and Kouzarides, T. (1996). "The CBP co-activator is a histone acetyltransferase". *Nature* 384(6610): 641-643
- Barnes, P. J. (1998). "Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms". *Clin Sci (Lond)* 94(6): 557-572
- Basso, E., Fante, L., Fowlkes, J., Petronilli, V., Forte, M. A. and Bernardi, P. (2005). "Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D". *J Biol Chem* 280(19): 18558-18561
- Bastl, C. P., Schulman, G. and Cragoe, E. J., Jr. (1992). "Glucocorticoids inhibit colonic aldosterone-induced conductive Na<sup>+</sup> absorption in adrenalectomized rat". *Am J Physiol* 263(3 Pt 2): F443-452
- Basu, A., Lenka, N., Mullick, J. and Avadhani, N. G. (1997). "Regulation of murine cytochrome oxidase Vb gene expression in different tissues and during myogenesis. Role of a YY-1 factor-binding negative enhancer". *J Biol Chem* 272(9): 5899-5908
- Baysal, B. E. (2006). "Role of mitochondrial mutations in cancer". *Endocr Pathol* 17(3): 203-212
- Behan, A., Doyle, S. and Farrell, M. (2005). "Adaptive responses to mitochondrial dysfunction in the rho degrees Namalwa cell". *Mitochondrion* 5(3): 173-193



- Bender, E. and Kadenbach, B. (2000). "The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation". *FEBS Lett* 466(1): 130-134
- Bernardi, P. (1999). "Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition". *Physiol Rev* 79(4): 1127-1155
- Bernardi, P., Scorrano, L., Colonna, R., Petronilli, V. and Di Lisa, F. (1999). "Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues". *Eur J Biochem* 264(3): 687-701
- Bianchi, C., Genova, M. L., Parenti Castelli, G. and Lenaz, G. (2004). "The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis". *J Biol Chem* 279(35): 36562-36569
- Biswas, G., Adebajo, O. A., Freedman, B. D., Anandatheerthavarada, H. K., Vijayasarathy, C., Zaidi, M., Kotlikoff, M. and Avadhani, N. G. (1999). "Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk". *Embo J* 18(3): 522-533
- Biswas, G., Guha, M. and Avadhani, N. G. (2005). "Mitochondria-to-nucleus stress signaling in mammalian cells: nature of nuclear gene targets, transcription regulation, and induced resistance to apoptosis". *Gene* 354 : 132-139
- Blanc, J., Alves-Guerra, M. C., Esposito, B., Rousset, S., Gourdy, P., Ricquier, D., Tedgui, A., Miroux, B. and Mallat, Z. (2003). "Protective role of uncoupling protein 2 in atherosclerosis". *Circulation* 107(3): 388-390
- Blum, A. and Maser, E. (2003). "Enzymology and molecular biology of glucocorticoid metabolism in humans". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 75: 173-216
- Bobyleva, V., Bellei, M., Paziienza, T. L. and Muscatello, U. (1997). "Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria". *Biochem Mol Biol Int* 41(3): 469-480
- Bodwell, J. E., Orti, E., Coull, J. M., Pappin, D. J., Smith, L. I. and Swift, F. (1991). "Identification of phosphorylated sites in the mouse glucocorticoid receptor". *J Biol Chem* 266(12): 7549-7555
- Boekema, E. J. and Braun, H. P. (2007). "Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system". *J Biol Chem* 282(1): 1-4
- Bollen, M., Keppens, S. and Stalmans, W. (1998). "Specific features of glycogen metabolism in the liver". *Biochem J* 336: 19-31

- Borisov, V. B. (2002). "Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies". *Mol Aspects Med* 23(5): 385-412
- Boss, O., Samec, S., Paoloni-Giacobino, A., Rossier, C., Dulloo, A., Seydoux, J., Muzzin, P. and Giacobino, J. P. (1997). "Uncoupling protein-3: a new member of the mitochondrial carrier family with tissue-specific expression". *FEBS Lett* 408(1): 39-42
- Bossenmaier, B., Mosthaf, L., Mischak, H., Ullrich, A. and Haring, H. U. (1997). "Protein kinase C isoforms beta 1 and beta 2 inhibit the tyrosine kinase activity of the insulin receptor". *Diabetologia* 40(7): 863-866
- Boumans, H., Grivell, L. A. and Berden, J. A. (1998). "The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit". *J Biol Chem* 273(9): 4872-4877
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Pequignot, E., Munnich, A. and Rotig, A. (1995). "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency". *Nat Genet* 11(2): 144-149
- Boyle, R. G. and Travers, S. (2006). "Hypoxia: targeting the tumour". *Anticancer Agents Med Chem* 6(4): 281-286
- Brand, M. D., Affourtit, C., Esteves, T. C., Green, K., Lambert, A. J., Miwa, S., Pakay, J. L. and Parker, N. (2004). "Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins". *Free Radic Biol Med* 37(6): 755-767
- Brand, M. D., Chien, L. F., Ainscow, E. K., Rolfe, D. F. and Porter, R. K. (1994). "The causes and functions of mitochondrial proton leak". *Biochim Biophys Acta* 1187(2): 132-139
- Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S. and Cornwall, E. J. (2005). "The basal proton conductance of mitochondria depends on adenine nucleotide translocase content". *Biochem J* 392(Pt 2): 353-362
- Brand, M. D., Steverding, D., Kadenbach, B., Stevenson, P. M. and Hafner, R. P. (1992). "The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones". *Eur J Biochem* 206(3): 775-781
- Brann, D. W., Hendry, L. B. and Mahesh, V. B. (1995). "Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones". *J Steroid Biochem Mol Biol* 52(2): 113-133
- Breckenridge, D. G., Stojanovic, M., Marcellus, R. C. and 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(7): 1115-1127

- Breslin, M. B. and Vedeckis, W. V. (1998). "The human glucocorticoid receptor promoter upstream sequences contain binding sites for the ubiquitous transcription factor, Yin Yang 1". *J Steroid Biochem Mol Biol* 67(5-6): 369-381
- Briere, J. J., Favier, J., El Ghouzzi, V., Djouadi, F., Benit, P., Gimenez, A. P. and Rustin, P. (2005). "Succinate dehydrogenase deficiency in human". *Cell Mol Life Sci* 62(19-20): 2317-2324
- Brillon, D. J., Zheng, B., Campbell, R. G. and Matthews, D. E. (1995). "Effect of cortisol on energy expenditure and amino acid metabolism in humans". *Am J Physiol* 268(3 Pt 1): E501-513
- Buckler, K. J. and Vaughan-Jones, R. D. (1998). "Effects of mitochondrial uncouplers on intracellular calcium, pH and membrane potential in rat carotid body type I cells". *J Physiol* 513: 819-833
- Butow, R. A. and Avadhani, N. G. (2004). "Mitochondrial signaling: the retrograde response". *Mol Cell* 14(1): 1-15
- Butterworth, J., Yates, C. M. and Reynolds, G. P. (1985). "Distribution of phosphate-activated glutaminase, succinic dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and gamma-glutamyl transpeptidase in post-mortem brain from Huntington's disease and agonal cases". *J Neurol Sci* 67(2): 161-171
- Buttgereit, F. (2000). "Mechanisms and clinical relevance of nongenomic glucocorticoid actions". *Z Rheumatol* 59 Suppl 2: 119-123
- Buttgereit, F., Grant, A., Muller, M. and Brand, M. D. (1994). "The effects of methylprednisolone on oxidative phosphorylation in Concanavalin-A-stimulated thymocytes. Top-down elasticity analysis and control analysis". *Eur J Biochem* 223(2): 513-519

## C

- Cao, W., Collins, Q. F., Becker, T. C., Robidoux, J., Lupo, E. G., Jr., Xiong, Y., Daniel, K. W., Floering, L. and Collins, S. (2005). "p38 Mitogen-activated protein kinase plays a stimulatory role in hepatic gluconeogenesis". *J Biol Chem* 280(52): 42731-42737
- Cao, W. H., Xiong, Y., Collins, Q. F. and Liu, H. Y. (2007). "p38 mitogen-activated protein kinase plays a critical role in the control of energy metabolism and development of cardiovascular diseases". *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 32(1): 1-14
- Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E., Villani, G. and Papa, S. (1991). "H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry of mitochondrial cytochrome complexes reconstituted in liposomes. Rate-

- dependent changes of the stoichiometry in the cytochrome c oxidase vesicles". *FEBS Lett* 288(1-2): 179-182
- Capitanio, N., Capitanio, G., Demarinis, D. A., De Nitto, E., Massari, S. and Papa, S. (1996). "Factors affecting the H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: influence of the rate of electron flow and transmembrane delta pH". *Biochemistry* 35(33): 10800-10806
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Shannon, R. J., Hirst, J. and Walker, J. E. (2006). "Bovine complex I is a complex of 45 different subunits". *J Biol Chem* 281(43): 32724-32727
- Carter, R. S. and Avadhani, N. G. (1994). "Cooperative binding of GA-binding protein transcription factors to duplicated transcription initiation region repeats of the cytochrome c oxidase subunit IV gene". *J Biol Chem* 269(6): 4381-4387
- Cassuto, H., Kochan, K., Chakravarty, K., Cohen, H., Blum, B., Olswang, Y., Hakimi, P., Xu, C., Massillon, D., Hanson, R. W. and Reshef, L. (2005). "Glucocorticoids regulate transcription of the gene for phosphoenolpyruvate carboxykinase in the liver via an extended glucocorticoid regulatory unit". *J Biol Chem* 280(40): 33873-33884
- Chen, C. L., Zhang, L., Yeh, A., Chen, C. A., Green-Church, K. B., Zweier, J. L. and Chen, Y. R. (2007). "Site-specific S-glutathiolation of mitochondrial NADH ubiquinone reductase". *Biochemistry* 46(19): 5754-5765
- Chen, F., Watson, C. S. and Gametchu, B. (1999). "Association of the glucocorticoid receptor alternatively-spliced transcript 1A with the presence of the high molecular weight membrane glucocorticoid receptor in mouse lymphoma cells". *J Cell Biochem* 74(3): 430-446
- Chen, R., Fearnley, I. M., Peak-Chew, S. Y. and Walker, J. E. (2004). "The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria". *J Biol Chem* 279(25): 26036-26045
- Chen, Y. R., Chen, C. L., Pfeiffer, D. R. and Zweier, J. L. (2007). "Mitochondrial complex II in the post-ischemic heart: oxidative injury and the role of protein S-glutathionylation". *J Biol Chem* 282(45): 32640-32654
- Chen, R., Fearnley, I. M., Peak-Chew, S. Y. and Walker, J. E. (2004). "The phosphorylation of subunits of complex I from bovine heart mitochondria". *J Biol Chem* 279(25): 26036-26045
- Chen, Y. Z. and Qiu, J. (2001). "Possible genomic consequence of nongenomic action of glucocorticoids in neural cells". *News Physiol Sci* 16 : 292-296

- Chiesi, M., Rogg, H., Eichenberger, K., Gazzotti, P. and Carafoli, E. (1987). "Stereospecific action of diltiazem on the mitochondrial Na-Ca exchange system and on sarcolemmal Ca-channels". *Biochem Pharmacol* 36(17): 2735-2740
- Chikanza, I. C. (2002). "Mechanisms of corticosteroid resistance in rheumatoid arthritis: a putative role for the corticosteroid receptor beta isoform". *Ann N Y Acad Sci* 966: 39-48
- Chung, A. B., Stepien, G., Haraguchi, Y., Li, K. and Wallace, D. C. (1992). "Transcriptional control of nuclear genes for the mitochondrial muscle ADP/ATP translocator and the ATP synthase beta subunit. Multiple factors interact with the OXBOX/REBOX promoter sequences". *J Biol Chem* 267(29): 21154-21161
- Cleeter, M. W., Cooper, J. M., Darley-USmar, V. M., Moncada, S. and Schapira, A. H. (1994). "Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases". *FEBS Lett* 345(1): 50-54
- Cobb, M. H., Xu, S., Cheng, M., Ebert, D., Robbins, D., Goldsmith, E. and Robinson, M. (1996). "Structural analysis of the MAP kinase ERK2 and studies of MAP kinase regulatory pathways". *Adv Pharmacol* 36: 49-65
- Cole, T. G., Wilcox, H. G. and Heimberg, M. (1982). "Effects of adrenalectomy and dexamethasone on hepatic lipid metabolism". *J Lipid Res* 23(1): 81-91
- Collins, Q. F., Xiong, Y., Lupo, E. G., Jr., Liu, H. Y. and Cao, W. (2006). "p38 Mitogen-activated protein kinase mediates free fatty acid-induced gluconeogenesis in hepatocytes". *J Biol Chem* 281(34): 24336-24344
- Crompton, M. (1999). "The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death". *Biochem J* 341 : 233-249
- Croxtall, J. D., Choudhury, Q. and Flower, R. J. (2000). "Glucocorticoids act within minutes to inhibit recruitment of signalling factors to activated EGF receptors through a receptor-dependent, transcription-independent mechanism". *Br J Pharmacol* 130(2): 289-298
- Cruciat, C. M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. and Stuart, R. A. (2000). "The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria". *J Biol Chem* 275(24): 18093-18098
- Csordas, G., Thomas, A. P. and Hajnoczky, G. (1999). "Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria". *Embo J* 18(1): 96-108

## D

- D'Addario, M., Arora, P. D. and McCulloch, C. A. (2006). "Role of p38 in stress activation of Sp1". *Gene* 379: 51-61

- Dahl, H. H., Hunt, S. M., Hutchison, W. M. and Brown, G. K. (1987). "The human pyruvate dehydrogenase complex. Isolation of cDNA clones for the E1 alpha subunit, sequence analysis, and characterization of the mRNA". *J Biol Chem* 262(15): 7398-7403
- Dambaki, C., Kogia, C., Kampa, M., Darivianaki, K., Nomikos, M., Anezinis, P., Theodoropoulos, P. A., Castanas, E. and Stathopoulos, E. N. (2005). "Membrane testosterone binding sites in prostate carcinoma as a potential new marker and therapeutic target: study in paraffin tissue sections". *BMC Cancer* 5:148
- Daufeldt, S., Lanz, R. and Allera, A. (2003). "Membrane-initiated steroid signaling (MISS): genomic steroid action starts at the plasma membrane". *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(1): 9-23
- De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S. and Joels, M. (1998). "Brain corticosteroid receptor balance in health and disease". *Endocr Rev* 19(3): 269-301
- de Lange, P., Koper, J. W., Brinkmann, A. O., de Jong, F. H. and Lamberts, S. W. (1999). "Natural variants of the beta isoform of the human glucocorticoid receptor do not alter sensitivity to glucocorticoids". *Mol Cell Endocrinol* 153(1-2): 163-168
- Dekker, L. V. and Parker, P. J. (1994). "Protein kinase C--a question of specificity". *Trends Biochem Sci* 19(2): 73-77
- Demonacos, C., Tsawdaroglou, N. C., Djordjevic-Markovic, R., Papalopoulou, M., Galanopoulos, V., Papadogeorgaki, S. and Sekeris, C. E. (1993). "Import of the glucocorticoid receptor into rat liver mitochondria in vivo and in vitro". *J Steroid Biochem Mol Biol* 46(3): 401-413
- Demonacos, C., Djordjevic-Markovic, R., Tsawdaroglou, N. and Sekeris, C. E. (1995). "The mitochondrion as a primary site of action of glucocorticoids: the interaction of the glucocorticoid receptor with mitochondrial DNA sequences showing partial similarity to the nuclear glucocorticoid responsive elements". *J Steroid Biochem Mol Biol* 55(1): 43-55
- Desbriere, R., Vuaroqueaux, V., Achard, V., Boullu-Ciocca, S., Labuhn, M., Dutour, A. and Grino, M. (2006). "11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 mRNA is increased in both visceral and subcutaneous adipose tissue of obese patients". *Obesity (Silver Spring)* 14(5): 794-798
- Devin, A. and Rigoulet, M. (2007). "Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells". *Am J Physiol Cell Physiol* 292(1): C52-58
- Dhalla, N. S. (1969). "Excitation-contraction coupling in heart. I. Comparison of calcium uptake by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria of the rat heart". *Arch Int Physiol Biochim* 77(5): 916-934

- Dilova, I., Chen, C. Y. and Powers, T. (2002). "Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*". *Curr Biol* 12(5): 389-395
- Dimroth, P., Kaim, G. and Matthey, U. (2000). "Crucial role of the membrane potential for ATP synthesis by F(1)F(o) ATP synthases". *J Exp Biol* 203 (Pt 1): 51-59
- Djouadi, F., Bastin, J., Gilbert, T., Rotig, A., Rustin, P. and Merlet-Benichou, C. (1994). "Mitochondrial biogenesis and development of respiratory chain enzymes in kidney cells: role of glucocorticoids". *Am J Physiol* 267(1 Pt 1): C245-254
- Dolinsky, V. W., Douglas, D. N., Lehner, R. and Vance, D. E. (2004). "Regulation of the enzymes of hepatic microsomal triacylglycerol lipolysis and re-esterification by the glucocorticoid dexamethasone". *Biochem J* 378(Pt 3): 967-974
- Doostdar, H., Duthie, S. J., Burke, M. D., Melvin, W. T. and Grant, M. H. (1988). "The influence of culture medium composition on drug metabolising enzyme activities of the human liver derived Hep G2 cell line". *FEBS Lett* 241(1-2): 15-18
- Dressing, G. E. and Thomas, P. (2007). "Identification of membrane progesterin receptors in human breast cancer cell lines and biopsies and their potential involvement in breast cancer". *Steroids* 72(2): 111-116
- Driggers, P. H. and Segars, J. H. (2002). "Estrogen action and cytoplasmic signaling pathways. Part II: the role of growth factors and phosphorylation in estrogen signaling". *Trends Endocrinol Metab* 13(10): 422-427
- Duborjal, H., Beugnot, R., De Camaret, B. M. and Issartel, J. P. (2002). "Large functional range of steady-state levels of nuclear and mitochondrial transcripts coding for the subunits of the human mitochondrial OXPHOS system". *Genome Res* 12(12): 1901-1909
- Duchen, M. R. (2000). "Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death". *J Physiol* 529: 57-68
- Dudkina, N. V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E. J. and Braun, H. P. (2005). "Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III". *Proc Natl Acad Sci USA* 102(9): 3225-3229
- Dumas, J. F., Simard, G., Roussel, D., Douay, O., Foussard, F., Malthiery, Y. and Ritz, P. (2003). "Mitochondrial energy metabolism in a model of undernutrition induced by dexamethasone". *Br J Nutr* 90(5): 969-977
- Dummler, K., Muller, S. and Seitz, H. J. (1996). "Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues". *Biochem J* 317: 913-918

## ***E***

- Echtay, K. S., Roussel, D., St-Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C. and Brand, M. D. (2002). "Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins". *Nature* 415(6867): 96-99
- Edery, P., Gerard, B., Chretien, D., Rotig, A., Cerrone, R., Rabier, D., Rambaud, C., Fabre, M., Saudubray, J. M., Munnich, A. and *et al.* (1994). "Liver cytochrome c oxidase deficiency in a case of neonatal-onset hepatic failure". *Eur J Pediatr* 153(3): 190-194
- Erol, A. (2005). "Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis". *Med Hypotheses* 65(3): 525-529
- Esteves, T. C. and Brand, M. D. (2005). "The reactions catalysed by the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3". *Biochim Biophys Acta* 1709(1): 35-44
- Evans, M. J. and Scarpulla, R. C. (1989). "Interaction of nuclear factors with multiple sites in the somatic cytochrome c promoter. Characterization of upstream NRF-1, ATF, and intron Sp1 recognition sequences". *J Biol Chem* 264(24): 14361-14368

## ***F***

- Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. (2000). "Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects". *Pharmacol Rev* 52(4): 513-556
- Ferguson-Miller, S. (1996). "Mammalian cytochrome c oxidase, a molecular monster subdued". *Science* 272(5265): 1125
- French-Mullen, J. M. (1995). "Cortisol inhibition of calcium currents in guinea pig hippocampal CA1 neurons via G-protein-coupled activation of protein kinase C". *J Neurosci* 15: 903-911
- Fleury, C., Neverova, M., Collins, S., Raimbault, S., Champigny, O., Levi-Meyrueis, C., Bouillaud, F., Seldin, M. F., Surwit, R. S., Ricquier, D. and Warden, C. H. (1997). "Uncoupling protein-2: a novel gene linked to obesity and hyperinsulinemia". *Nat Genet* 15(3): 269-272
- Freiman, R. N. and Tjian, R. (2003). "Regulating the regulators: lysine modifications make their mark". *Cell* 112(1): 11-17



## G

- Gametchu, B., Chen, F., Sackey, F., Powell, C. and Watson, C. S. (1999). "Plasma membrane-resident glucocorticoid receptors in rodent lymphoma and human leukemia models". *Steroids* 64(1-2): 107-119
- Gametchu, B. and Watson, C. S. (2002). "Correlation of membrane glucocorticoid receptor levels with glucocorticoid-induced apoptotic competence using mutant leukemic and lymphoma cells lines". *J Cell Biochem* 87(2): 133-146
- Gametchu, B., Watson, C. S. and Pasko, D. (1991). "Size and steroid-binding characterization of membrane-associated glucocorticoid receptor in S-49 lymphoma cells". *Steroids* 56(8): 402-410
- Ganote, C. E. and Armstrong, S. C. (2003). "Effects of CCCP-induced mitochondrial uncoupling and cyclosporin A on cell volume, cell injury and preconditioning protection of isolated rabbit cardiomyocytes". *J Mol Cell Cardiol* 35(7): 749-759
- Garesse, R. and Vallejo, C. G. (2001). "Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes". *Gene* 263(1-2): 1-16
- Garlid, K. D., Jaburek, M. and Jezek, P. (1998). "The mechanism of proton transport mediated by mitochondrial uncoupling proteins". *FEBS Lett* 438(1-2): 10-14
- Garside, H., Stevens, A., Farrow, S., Normand, C., Houle, B., Berry, A., Maschera, B. and Ray, D. (2004). "Glucocorticoid ligands specify different interactions with NF-kappaB by allosteric effects on the glucocorticoid receptor DNA binding domain". *J Biol Chem* 279(48): 50050-50059
- Giannattasio, S., Liu, Z., Thornton, J. and Butow, R. A. (2005). "Retrograde response to mitochondrial dysfunction is separable from TOR1/2 regulation of retrograde gene expression". *J Biol Chem* 280(52): 42528-42535
- Giannopoulos, G., Jackson, K. and Tulchinsky, D. (1983). "Specific glucocorticoid binding in human uterine tissues, placenta and fetal membranes". *J Steroid Biochem* 19(3): 1375-1378
- Giguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1986). "Functional domains of the human glucocorticoid receptor". *Cell* 46(5): 645-652
- Gilkerson, R. W., Selker, J. M. and Capaldi, R. A. (2003). "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation". *FEBS Lett* 546(2-3): 355-358
- Gimenez-Roqueplo, A. P., Favier, J., Rustin, P., Mourad, J. J., Plouin, P. F., Corvol, P., Rotig, A. and Jeunemaitre, X. (2001). "The R22X mutation of the SDHD gene in hereditary

- paranglioma abolishes the enzymatic activity of complex II in the mitochondrial respiratory chain and activates the hypoxia pathway". *Am J Hum Genet* 69(6): 1186-1197
- Giraud, M. F., Paumard, P., Soubannier, V., Vaillier, J., Arselin, G., Salin, B., Schaeffer, J., Brethes, D., di Rago, J. P. and Velours, J. (2002). "Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae?" *Biochim Biophys Acta* 1555(1-3): 174-180
- Goffart, S. and Wiesner, R. J. (2003). "Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis". *Exp Physiol* 88(1): 33-40
- Goleva, E., Li, L. B., Eves, P. T., Strand, M. J., Martin, R. J. and Leung, D. Y. (2006). "Increased glucocorticoid receptor beta alters steroid response in glucocorticoid-insensitive asthma". *Am J Respir Crit Care Med* 173(6): 607-616
- Grad, I. and Picard, D. (2007). "The glucocorticoid responses are shaped by molecular chaperones". *Mol Cell Endocrinol* 275(1-2): 2-12
- Gripon, P., Rumin, S., Urban, S., Le Seyec, J., Glaise, D., Cannie, I., Guyomard, C., Lucas, J., Trepo, C. and Guguen-Guillouzo, C. (2002). "Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus". *Proc Natl Acad Sci USA* 99(24): 15655-15660
- Grote, H., Ioannou, I., Voigt, J. and Sekeris, C. E. (1993). "Localization of the glucocorticoid receptor in rat liver cells: evidence for plasma membrane bound receptor". *Int J Biochem* 25(11): 1593-1599
- Gunter, T. E., Buntinas, L., Sparagna, G., Eliseev, R. and Gunter, K. (2000). "Mitochondrial calcium transport: mechanisms and functions". *Cell Calcium* 28(5-6): 285-296
- Gunter, T. E. and Pfeiffer, D. R. (1990). "Mechanisms by which mitochondria transport calcium". *Am J Physiol* 258(5 Pt 1): C755-786
- Guo, Z., Chen, Y. Z., Xu, R. B. and Fu, H. (1995). "Binding characteristics of glucocorticoid receptor in synaptic plasma membrane from rat brain". *Funct Neurol* 10(4-5): 183-194

## ***H***

- Hafezi-Moghadam, A., Simoncini, T., Yang, Z., Limbourg, F. P., Plumier, J. C., Rebsamen, M. C., Hsieh, C. M., Chui, D. S., Thomas, K. L., Prorock, A. J., Laubach, V. E., Moskowitz, M. A., French, B. A., Ley, K. and Liao, J. K. (2002). "Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase". *Nat Med* 8(5): 473-479
- Halestrap, A. P. (1989). "The regulation of the matrix volume of mammalian mitochondria in vivo and in vitro and its role in the control of mitochondrial metabolism". *Biochim Biophys Acta* 973(3): 355-382

- Han, J. Z., Lin, W., Lou, S. J., Qiu, J. and Chen, Y. Z. (2002). "A rapid, nongenomic action of glucocorticoids in rat B103 neuroblastoma cells". *Biochim Biophys Acta* 1591(1-3): 21-27
- Hansford, R. G. (1991). "Dehydrogenase activation by Ca<sup>2+</sup> in cells and tissues". *J Bioenerg Biomembr* 23(6): 823-854
- Han, J. Z., Lin, W. and Chen, Y. Z. (2005). "Inhibition of ATP-induced calcium influx in HT4 cells by glucocorticoids: involvement of protein kinase A". *Acta Pharmacol Sin* 26(2): 199-204
- Harper, M. E., Ballantyne, J. S., Leach, M. and Brand, M. D. (1993). "Effects of thyroid hormones on oxidative phosphorylation". *Biochem Soc Trans* 21: 785-792
- Harris, D. A. and Das, A. M. (1991). "Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart". *Biochem J* 280: 561-573
- Harvey, B. J., Alzamora, R., Healy, V., Renard, C. and Doolan, C. M. (2002). "Rapid responses to steroid hormones: from frog skin to human colon. A homage to Hans Ussing". *Biochim Biophys Acta* 1566(1-2): 116-128
- Hasselgren, P. O., Menconi, M. J., Fareed, M. U., Yang, H., Wei, W. and Evenson, A. (2005). "Novel aspects on the regulation of muscle wasting in sepsis". *Int J Biochem Cell Biol* 37(10): 2156-2168
- Hatakeyama, H., Inaba, S. and Miyamori, I. (2001). "11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human aortic smooth muscle cells". *Hypertens Res* 24(1): 33-37
- Hayat, L. H. and Crompton, M. (1985). "Ca<sup>2+</sup>-dependent inhibition by trifluoperazine of the Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> carrier in mitoplasts derived from heart mitochondria". *FEBS Lett* 182(2): 281-286
- Hazzalin, C. A. and Mahadevan, L. C. (2002). "MAPK-regulated transcription: a continuously variable gene switch?" *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(1): 30-40
- Heddi, A., Lestienne, P., Wallace, D. C. and Stepien, G. (1993). "Mitochondrial DNA expression in mitochondrial myopathies and coordinated expression of nuclear genes involved in ATP production". *J Biol Chem* 268(16): 12156-12163
- Hojlund, K., Wrzesinski, K., Larsen, P. M., Fey, S. J., Roepstorff, P., Handberg, A., Dela, F., Vinten, J., McCormack, J. G., Reynet, C. and Beck-Nielsen, H. (2003). "Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes". *J Biol Chem* 278(12): 10436-10442
- Hollenberg, S. M., Weinberger, C., Ong, E. S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., Thompson, E. B., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1985). "Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA". *Nature* 318(6047): 635-641

- Holt, I. J., Harding, A. E., Cooper, J. M., Schapira, A. H., Toscano, A., Clark, J. B. and Morgan-Hughes, J. A. (1989). "Mitochondrial myopathies: clinical and biochemical features of 30 patients with major deletions of muscle mitochondrial DNA". *Ann Neurol* 26(6): 699-708
- Hopper, R. K., Carroll, S., Aponte, A. M., Johnson, D. T., French, S., Shen, R. F., Witzmann, F. A., Harris, R. A. and Balaban, R. S. (2006). "Mitochondrial matrix phosphoproteome: effect of extra mitochondrial calcium". *Biochemistry* 45(8): 2524-2536
- Horbinski, C. and Chu, C. T. (2005). "Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death". *Free Radic Biol Med* 38(1): 2-11
- Howell, G. M., Po, C. and Lefebvre, Y. A. (1989). "Identification of dexamethasone-binding sites on male-rat liver plasma membranes by affinity labelling". *Biochem J* 260(2): 435-441
- Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T. and Michel, H. (2000). "Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome bc<sub>1</sub> complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment". *Structure* 8(6): 669-684
- Huttemann, M., Arnold, S., Lee, I., Muhlenbein, N., Linder, D., Lottspeich, F. and Kadenbach, B. (2000). "Turkey cytochrome c oxidase contains subunit VIa of the liver type associated with low efficiency of energy transduction". *Eur J Biochem* 267(7): 2098-2104

## **I**

- Ichas, F. and Mazat, J. P. (1998). "From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state". *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 33-50
- Ioannou, I. M., Tsawdaroglou, N. and Sekeris, C. E. (1988). "Presence of glucocorticoid responsive elements in the mitochondrial genome". *Anticancer Res* 8(6): 1405-1409
- Ismaili, N. and Garabedian, M. J. (2004). "Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation". *Ann N Y Acad Sci* 1024 : 86-101
- Isohashi, F. and Okamoto, K. (1993). "ATP-stimulated translocation promoter that enhances the nuclear binding of activated glucocorticoid receptor complex. Biochemical properties and its function (mini-review)". *Receptor* 3(2): 113-124
- Itoh, M., Adachi, M., Yasui, H., Takekawa, M., Tanaka, H. and Imai, K. (2002). "Nuclear export of glucocorticoid receptor is enhanced by c-Jun N-terminal kinase-mediated phosphorylation". *Mol Endocrinol* 16(10): 2382-2392
- Iwasaki, Y., Aoki, Y., Katahira, M., Oiso, Y. and Saito, H. (1997). "Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein". *Biochem Biophys Res Commun* 235(2): 295-299

## **J**

- Jaburek, M., Varecha, M., Gimeno, R. E., Dembski, M., Jezek, P., Zhang, M., Burn, P., Tartaglia, L. A. and Garlid, K. D. (1999). "Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3". *J Biol Chem* 274(37): 26003-26007
- Jakobs, S. (2006). "High resolution imaging of live mitochondria". *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 561-575
- Jani, M. S., Telang, S. D. and Katyare, S. S. (1991). "Effect of corticosterone treatment on energy metabolism in rat liver mitochondria". *J Steroid Biochem Mol Biol* 38(5): 587-591
- Jazwinski, S. M. (2000). "Metabolic mechanisms of yeast ageing". *Exp Gerontol* 35(6-7): 671-676
- Jazwinski, S. M. (2005). "The retrograde response links metabolism with stress responses, chromatin-dependent gene activation, and genome stability in yeast aging". *Gene* 354: 22-27
- Jezek, P. (1999). "Fatty acid interaction with mitochondrial uncoupling proteins". *J Bioenerg Biomembr* 31(5): 457-466
- Jezek, P. (2002). "Possible physiological roles of mitochondrial uncoupling proteins--UCPn". *Int J Biochem Cell Biol* 34(10): 1190-1206
- Jezek, P., Zackova, M., Ruzicka, M., Skobisova, E. and Jaburek, M. (2004). "Mitochondrial uncoupling proteins--facts and fantasies". *Physiol Res* 53 Suppl 1: S199-211
- Johnson-Cadwell, L. I., Jekabsons, M. B., Wang, A., Polster, B. M. and Nicholls, D. G. (2007). "'Mild Uncoupling' does not decrease mitochondrial superoxide levels in cultured cerebellar granule neurons but decreases spare respiratory capacity and increases toxicity to glutamate and oxidative stress". *J Neurochem* 101(6): 1619-1631
- Jones, C. G., Hothi, S. K. and Titheradge, M. A. (1993). "Effect of dexamethasone on gluconeogenesis, pyruvate kinase, pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase flux in isolated hepatocytes". *Biochem J* 289: 821-828
- Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A. and Rizzuto, R. (1999). "Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming". *Proc Natl Acad Sci USA* 96(24): 13807-13812
- Junge, W., Panke, O., Cherepanov, D. A., Gumbiowski, K., Muller, M. and Engelbrecht, S. (2001). "Inter-subunit rotation and elastic power transmission in F0F1-ATPase". *FEBS Lett* 504(3): 152-160

Jurkowitz, M. S., Altschuld, R. A., Brierley, G. P. and Cragoe, E. J., Jr. (1983). "Inhibition of Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> efflux from heart mitochondria by amiloride analogues". FEBS Lett 162(2): 262-265

## **K**

Kadenbach, B. (2003). "Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation". Biochim Biophys Acta 1604(2): 77-94

Kajita, K., Ishizuka, T., Miura, A., Kanoh, Y., Ishizawa, M., Kimura, M., Muto, N. and Yasuda, K. (2001). "Glucocorticoid-induced insulin resistance associates with activation of protein kinase C isoforms". Cell Signal 13(3): 169-175

Kamal, A. M., Flower, R. J. and Perretti, M. (2005). "An overview of the effects of annexin 1 on cells involved in the inflammatory process". Mem Inst Oswaldo Cruz 100 Suppl 1: 39-47

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1996). "A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors". Cell 85(3): 403-414

Kampa, M. and Castanas, E. (2006). "Membrane steroid receptor signaling in normal and neoplastic cells". Mol Cell Endocrinol 246(1-2): 76-82

Kellendonk, C., Eiden, S., Kretz, O., Schutz, G., Schmidt, I., Tronche, F. and Simon, E. (2002). "Inactivation of the GR in the nervous system affects energy accumulation". Endocrinology 143(6): 2333-2340

Kelly, D. P. and Scarpulla, R. C. (2004). "Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function". Genes Dev 18(4): 357-368

Kerppola, W. (1960). "Uncoupling of the oxidative phosphorylation with cortisone in liver mitochondria". Endocrinology 67 : 252-263

Kimberg, D. V., Loud, A. V. and Wiener, J. (1968). "Cortisone-induced alterations in mitochondrial function and structure". J Cell Biol 37(1): 63-79

King, M. P. and Attardi, G. (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation". Science 246(4929): 500-503

Koufali, M. M., Moutsatsou, P., Sekeris, C. E. and Breen, K. C. (2003). "The dynamic localization of the glucocorticoid receptor in rat C6 glioma cell mitochondria". Mol Cell Endocrinol 209(1-2): 51-60

Koukouritaki, S. B., Theodoropoulos, P. A., Margioris, A. N., Gravanis, A. and Stournaras, C. (1996). "Dexamethasone alters rapidly actin polymerization dynamics in human

- endometrial cells: evidence for nongenomic actions involving cAMP turnover". *J Cell Biochem* 62(2): 251-261
- Kroemer, G., Petit, P., Zamzami, N., Vayssiere, J. L. and Mignotte, B. (1995). "The biochemistry of programmed cell death". *Faseb J* 9(13): 1277-1287
- Krozowski, Z., Li, K. X., Koyama, K., Smith, R. E., Obeyesekere, V. R., Stein-Oakley, A., Sasano, H., Coulter, C., Cole, T. and Sheppard, K. E. (1999). "The type I and type II 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes". *J Steroid Biochem Mol Biol* 69(1-6): 391-401

## **L**

- Lackner, C., Daufeldt, S., Wildt, L. and Allera, A. (1998). "Glucocorticoid-recognizing and -effector sites in rat liver plasma membrane. Kinetics of corticosterone uptake by isolated membrane vesicles. III. Specificity and stereospecificity". *J Steroid Biochem Mol Biol* 64(1-2): 69-82
- Larochette, N., Decaudin, D., Jacotot, E., Brenner, C., Marzo, I., Susin, S. A., Zamzami, N., Xie, Z., Reed, J. and Kroemer, G. (1999). "Arsenite induces apoptosis via a direct effect on the mitochondrial permeability transition pore". *Exp Cell Res* 249(2): 413-421
- Le Drean, Y., Mincheneau, N., Le Goff, P. and Michel, D. (2002). "Potentiation of glucocorticoid receptor transcriptional activity by sumoylation". *Endocrinology* 143(9): 3482-3489
- Lee, I., Bender, E. and Kadenbach, B. (2002). "Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase". *Mol Cell Biochem* 234-235(1-2): 63-70
- Lee, I., Salomon, A. R., Ficarro, S., Mathes, I., Lottspeich, F., Grossman, L. I. and Huttemann, M. (2005). "cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity". *J Biol Chem* 280(7): 6094-6100
- Lee, I., Salomon, A. R., Yu, K., Doan, J. W., Grossman, L. I. and Huttemann, M. (2006). "New prospects for an old enzyme: mammalian cytochrome c is tyrosine-phosphorylated in vivo". *Biochemistry* 45(30): 9121-9128
- Lee, W. T., Wang, P. J., Young, C., Wang, T. R. and Shen, Y. Z. (1996). "Cytochrome c oxidase deficiency in fibroblasts of a patient with mitochondrial encephalomyopathy". *J Formos Med Assoc* 95(9): 709-711
- Lenka, N., Vijayasarathy, C., Mullick, J. and Avadhani, N. G. (1998). "Structural organization and transcription regulation of nuclear genes encoding the mammalian cytochrome c oxidase complex". *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 309-344

- Lerario, D. D., Ferreira, S. R., Miranda, W. L. and Chacra, A. R. (2001). "Influence of dexamethasone and weight loss on the regulation of serum leptin levels in obese individuals". *Braz J Med Biol Res* 34(4): 479-487
- Lescuyer, P., Martinez, P. and Lunardi, J. (2002). "YY1 and Sp1 activate transcription of the human NDUFS8 gene encoding the mitochondrial complex I TYKY subunit". *Biochim Biophys Acta* 1574(2): 164-174
- Leshinsky-Silver, E., Levine, A., Nissenkorn, A., Barash, V., Perach, M., Buzhaker, E., Shahmurov, M., Polak-Charcon, S., Lev, D. and Lerman-Sagie, T. (2003). "Neonatal liver failure and Leigh syndrome possibly due to CoQ-responsive OXPHOS deficiency". *Mol Genet Metab* 79(4): 288-293
- Li, B., Holloszy, J. O. and Semenkovich, C. F. (1999). "Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinate synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells". *J Biol Chem* 274(25): 17534-17540
- Li, K., Neuffer, P. D. and Williams, R. S. (1995). "Nuclear responses to depletion of mitochondrial DNA in human cells". *Am J Physiol* 269: C1265-1270
- Li, X. Y. (2001). "Rapid activation of p38 mitogen-activated protein kinase by corticosterone in PC12 cells". *Sheng Li Xue Bao* 53(6): 414-418
- Liao, X. and Butow, R. A. (1993). "RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus". *Cell* 72(1): 61-71
- Liao, X. S., Small, W. C., Srere, P. A. and Butow, R. A. (1991). "Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*". *Mol Cell Biol* 11(1): 38-46
- Lim, J. H., Lee, J. I., Suh, Y. H., Kim, W., Song, J. H. and Jung, M. H. (2006). "Mitochondrial dysfunction induces aberrant insulin signalling and glucose utilisation in murine C2C12 myotube cells". *Diabetologia* 49(8): 1924-1936
- Lin, C. S. and Klingenberg, M. (1980). "Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria". *FEBS Lett* 113(2): 299-303
- Litsky, M. L. and Pfeiffer, D. R. (1997). "Regulation of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter by external adenine nucleotides: the uniporter behaves like a gated channel which is regulated by nucleotides and divalent cations". *Biochemistry* 36(23): 7071-7080
- Liu, Z., Sekito, T., Epstein, C. B. and Butow, R. A. (2001). "RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p". *Embo J* 20(24): 7209-7219



- Liu, Z., Sekito, T., Spirek, M., Thornton, J. and Butow, R. A. (2003). "Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p". *Mol Cell* 12(2): 401-411
- Liu, Z. and Butow, R. A. (2006). "Mitochondrial retrograde signaling". *Annu Rev Genet* 40:159-185
- Liu, C., Zhou, J., Zhang, L. D., Wang, Y. X., Kang, Z. M., Chen, Y. Z. and Jiang, C. L. (2007). "Rapid inhibitory effect of corticosterone on histamine release from rat peritoneal mast cells". *Horm Metab Res* 39(4): 273-277
- Loechner, K. J., Knox, R. J., McLaughlin, J. T. and Dunlap, K. (1999). "Dexamethasone-mediated inhibition of calcium transients and ACTH release in a pituitary cell line (AtT-20)". *Steroids* 64(6): 404-412
- Lombardi, A., Silvestri, E., Moreno, M., De Lange, P., Farina, P., Goglia, F. and Lanni, A. (2002). "Skeletal muscle mitochondrial free-fatty-acid content and membrane potential sensitivity in different thyroid states: involvement of uncoupling protein-3 and adenine nucleotide translocase". *FEBS Lett* 532(1-2): 12-16
- Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., Garcia, M. V. and Medina, J. M. (1995). "Changes in adult rat liver mitochondrial populations at different energy states analyzed by flow cytometry". *Biochim Biophys Acta* 1232(1-2): 27-32
- Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., Gonzalez, M. and Medina, J. M. (1989). "Identification by flow cytometry of two distinct rhodamine-123-stained mitochondrial populations in rat liver". *FEBS Lett* 254(1-2): 115-120
- Lopez-Mediavilla, C., Orfao, A., San Miguel, J. and Medina, J. M. (1992). "Developmental changes in rat liver mitochondrial populations analyzed by flow cytometry". *Exp Cell Res* 203(1): 134-140
- Losel, R. and Wehling, M. (2003). "Nongenomic actions of steroid hormones". *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(1): 46-56
- Lou, P. H., Hansen, B. S., Olsen, P. H., Tullin, S., Murphy, M. P. and Brand, M. D. (2007). "Mitochondrial uncouplers with an extraordinary dynamic range". *Biochem J* 407(1): 129-140
- Lou, S. J. and Chen, Y. Z. (1998). "The rapid inhibitory effect of glucocorticoid on cytosolic free Ca<sup>2+</sup> increment induced by high extracellular K<sup>+</sup> and its underlying mechanism in PC12 cells". *Biochem Biophys Res Commun* 244(2): 403-407
- Lowenberg, M., Tuynman, J., Bilderbeek, J., Gaber, T., Buttgerit, F., van Deventer, S., Peppelenbosch, M. and Hommes, D. (2005). "Rapid immunosuppressive effects of glucocorticoids mediated through Lck and Fyn". *Blood* 106(5): 1703-1710

- Lowenberg, M., Tuynman, J., Scheffer, M., Verhaar, A., Vermeulen, L., van Deventer, S., Hommes, D. and Peppelenbosch, M. (2006). "Kinome analysis reveals nongenomic glucocorticoid receptor-dependent inhibition of insulin signaling". *Endocrinology* 147(7): 3555-3562
- Luciakova, K., Hodny, Z., Barath, P. and Nelson, B. D. (2000). "In vivo mapping of the human adenine nucleotide translocator-2 (ANT2) promoter provides support for regulation by a pair of proximal Sp1-activating sites and an upstream silencer element". *Biochem J* 352 Pt 2: 519-523
- Ludwig, B., Bender, E., Arnold, S., Huttemann, M., Lee, I. and Kadenbach, B. (2001). "Cytochrome C oxidase and the regulation of oxidative phosphorylation". *Chembiochem* 2(6): 392-403

## **M**

- Mahyar-Roemer, M., Katsen, A., Mestres, P. and Roemer, K. (2001). "Resveratrol induces colon tumor cell apoptosis independently of p53 and precede by epithelial differentiation, mitochondrial proliferation and membrane potential collapse". *Int J Cancer* 94(5): 615-622
- Malcher-Lopes, R., Di, S., Marcheselli, V. S., Weng, F. J., Stuart, C. T., Bazan, N. G. and Tasker, J. G. (2006). "Opposing crosstalk between leptin and glucocorticoids rapidly modulates synaptic excitation via endocannabinoid release". *J Neurosci* 26(24): 6643-6650
- Malyala, A., Kelly, M. J. and Ronnekleiv, O. K. (2005). "Estrogen modulation of hypothalamic neurons: activation of multiple signaling pathways and gene expression changes". *Steroids* 70(5-7): 397-406
- Mao, W., Yu, X. X., Zhong, A., Li, W., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H. and Pan, G. (1999). "UCP4, a novel brain-specific mitochondrial protein that reduces membrane potential in mammalian cells". *FEBS Lett* 443(3): 326-330
- Martens, M. E., Peterson, P. L. and Lee, C. P. (1991). "In vitro effects of glucocorticoid on mitochondrial energy metabolism". *Biochim Biophys Acta* 1058(2): 152-160
- Marusich, M. F., Robinson, B. H., Taanman, J. W., Kim, S. J., Schillace, R., Smith, J. L. and Capaldi, R. A. (1997). "Expression of mtDNA and nDNA encoded respiratory chain proteins in chemically and genetically-derived Rho0 human fibroblasts: a comparison of subunit proteins in normal fibroblasts treated with ethidium bromide and fibroblasts from a patient with mtDNA depletion syndrome". *Biochim Biophys Acta* 1362(2-3): 145-159
- Marver, D. (1984). "Assessment of mineralocorticoid activity in the rabbit colon". *Am J Physiol* 246(4 Pt 2): F437-446

- Mason, S. A. and Housley, P. R. (1993). "Site-directed mutagenesis of the phosphorylation sites in the mouse glucocorticoid receptor". *J Biol Chem* 268(29): 21501-21504
- McCormack, J. G. and Denton, R. M. (1980). "Role of calcium ions in the regulation of intramitochondrial metabolism. Properties of the Ca<sup>2+</sup>-sensitive dehydrogenases within intact uncoupled mitochondria from the white and brown adipose tissue of the rat". *Biochem J* 190(1): 95-105
- Meyer, T., Starr, D. B. and Carlstedt-Duke, J. (1997). "The rat glucocorticoid receptor mutant K461A differentiates between two different mechanisms of transrepression". *J Biol Chem* 272(34): 21090-21095
- Mignotte, B. and Vayssiere, J. L. (1998). "Mitochondria and apoptosis". *Eur J Biochem* 252(1): 1-15
- Miller, A. L., Webb, M. S., Copik, A. J., Wang, Y., Johnson, B. H., Kumar, R. and Thompson, E. B. (2005). "p38 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) is a key mediator in glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells: correlation between p38 MAPK activation and site-specific phosphorylation of the human glucocorticoid receptor at serine 211". *Mol Endocrinol* 19(6): 1569-1583
- Minet-Quinard, R., Moinard, C., Walrand, S., Villie, F., Normand, B., Vasson, M. P., Chopineau, J. and Cynober, L. (2000). "Induction of a catabolic state in rats by dexamethasone: dose or time dependency?" *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 24(1): 30-36
- Mitchell, P. (1975). "Protonmotive redox mechanism of the cytochrome b-c<sub>1</sub> complex in the respiratory chain: protonmotive ubiquinone cycle". *FEBS Lett* 56(1): 1-6
- Miyazaki, T., Neff, L., Tanaka, S., Horne, W. C. and Baron, R. (2003). "Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts". *J Cell Biol* 160(5): 709-718
- Morand, E. F. (2007). "Effects of glucocorticoids on inflammation and arthritis". *Curr Opin Rheumatol* 19(3): 302-307
- Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Cuellar, A. and Corona, N. (1995). "Modulation of 2-oxoglutarate dehydrogenase and oxidative phosphorylation by Ca<sup>2+</sup> in pancreas and adrenal cortex mitochondria". *Arch Biochem Biophys* 319(2): 432-444
- Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A. and Saavedra, E. (2007). "Energy metabolism in tumor cells". *Febs J* 274(6): 1393-1418
- Morley, J. E., Thomas, D. R. and Wilson, M. M. (2006). "Cachexia: pathophysiology and clinical relevance". *Am J Clin Nutr* 83(4): 735-743
- Moutsatsou, P., Kazazoglou, T., Fleischer-Lambropoulos, H., Psarra, A. M., Tsiapara, A., Sekeris, C. E., Stefanis, C. and Vernadakis, A. (2000). "Expression of the glucocorticoid

- receptor in early and late passage C-6 glioma cells and in normal astrocytes derived from aged mouse cerebral hemispheres". *Int J Dev Neurosci* 18(2-3): 329-335
- Muller, S., Hoegge, C., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2001). "SUMO, ubiquitin's mysterious cousin". *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 202-210
- Murphy, A. N., Kelleher, J. K. and Fiskum, G. (1990). "Submicromolar Ca<sup>2+</sup> regulates phosphorylating respiration by normal rat liver and AS-30D hepatoma mitochondria by different mechanisms". *J Biol Chem* 265(18): 10527-10534
- Murphy, M. P. and Brand, M. D. (1987). "Variable stoichiometry of proton pumping by the mitochondrial respiratory chain". *Nature* 329(6135): 170-172

## N

- Namba, C., Adachi, N., Liu, K., Yorozuya, T. and Arai, T. (2002). "Suppression of sodium pump activity and an increase in the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration by dexamethasone in acidotic mouse brain". *Brain Res* 957(2): 271-277
- Nicchitta, C. V. and Williamson, J. R. (1984). "Spermine. A regulator of mitochondrial calcium cycling". *J Biol Chem* 259(21): 12978-12983
- Nishikawa, T. and Araki, E. (2007). "Impact of mitochondrial ROS production in the pathogenesis of diabetes mellitus and its complications". *Antioxid Redox Signal* 9(3): 343-353
- Nisoli, E. and Carruba, M. O. (2006). "Nitric oxide and mitochondrial biogenesis". *J Cell Sci* 119: 2855-2862
- Nobukuni, Y., Smith, C. L., Hager, G. L. and Detera-Wadleigh, S. D. (1995). "Characterization of the human glucocorticoid receptor promoter". *Biochemistry* 34(25): 8207-8214
- Nyirenda, M. J., Dean, S., Lyons, V., Chapman, K. E. and Seckl, J. R. (2006). "Prenatal programming of hepatocyte nuclear factor 4alpha in the rat: A key mechanism in the 'foetal origins of hyperglycaemia'?" *Diabetologia* 49(6): 1412-1420

## O

- Ogbi, M. and Johnson, J. A. (2006). "Protein kinase Cepsilon interacts with cytochrome c oxidase subunit IV and enhances cytochrome c oxidase activity in neonatal cardiac myocyte preconditioning". *Biochem J* 393(Pt 1): 191-199
- Ogryzko, V. V., Schiltz, R. L., Russanova, V., Howard, B. H. and Nakatani, Y. (1996). "The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases". *Cell* 87(5): 953-959

- Ohno, M., Kobayashi, T., Tanaka, K., Goto, I. and Nonaka, I. (1990). "[Mitochondrial encephalomyopathy (focal cytochrome c oxidase deficiency) with transient episodes of muscle weakness and elevation of serum creatine kinase activity]". *Rinsho Shinkeigaku* 30(3): 317-319
- Ojuka, E. O., Jones, T. E., Han, D. H., Chen, M., Wamhoff, B. R., Sturek, M. and Holloszy, J. O. (2002). "Intermittent increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 283(5): E1040-1045
- Okuda, M., Li, K., Beard, M. R., Showalter, L. A., Scholle, F., Lemon, S. M. and Weinman, S. A. (2002). "Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein". *Gastroenterology* 122(2): 366-375
- Orchinik, M., Murray, T. F., Franklin, P. H. and Moore, F. L. (1992). "Guanyl nucleotides modulate binding to steroid receptors in neuronal membranes". *Proc Natl Acad Sci USA* 89(9): 3830-3834
- Orchinik, M., Murray, T. F. and Moore, F. L. (1991). "A corticosteroid receptor in neuronal membranes". *Science* 252(5014): 1848-1851

## *P*

- Paddenberg, R., Goldenberg, A., Faulhammer, P., Braun-Dullaeus, R. C. and Kummer, W. (2003). "Mitochondrial complex II is essential for hypoxia-induced ROS generation and vasoconstriction in the pulmonary vasculature". *Adv Exp Med Biol* 536: 163-169
- Pagliarini, D. J. and Dixon, J. E. (2006). "Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage?" *Trends Biochem Sci* 31(1): 26-34
- Palmeira, C. M., Moreno, A. J., Madeira, V. M. and Wallace, K. B. (1996). "Continuous monitoring of mitochondrial membrane potential in hepatocyte cell suspensions". *J Pharmacol Toxicol Methods* 35(1): 35-43
- Palmi, M., Youmbi, G. T., Fusi, F., Sgaragli, G. P., Dixon, H. B., Frosini, M. and Tipton, K. F. (1999). "Potentiation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> sequestration by taurine". *Biochem Pharmacol* 58(7): 1123-1131
- Papa, S. (2002). "The NDUF54 nuclear gene of complex I of mitochondria and the cAMP cascade". *Biochim Biophys Acta* 1555(1-3): 147-153
- Papa, S., Capitanio, N., Capitanio, G., De Nitto, E. and Minuto, M. (1991). "The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry". *FEBS Lett* 288(1-2): 183-186

- Papa, S., Lorusso, M. and Di Paola, M. (2006). "Cooperativity and flexibility of the protonmotive activity of mitochondrial respiratory chain". *Biochim Biophys Acta* 1757(5-6): 428-436
- Pardo, J., Perez-Galan, P., Gamen, S., Marzo, I., Monleon, I., Kaspar, A. A., Susin, S. A., Kroemer, G., Krensky, A. M., Naval, J. and Anel, A. (2001). "A role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in granulysin-induced apoptosis". *J Immunol* 167(3): 1222-1229
- Park, S., Taub, M. and Han, H. (2001). "Regulation of phosphate uptake in primary cultured rabbit renal proximal tubule cells by glucocorticoids: evidence for nongenomic as well as genomic mechanisms". *Endocrinology* 142(2): 710-720
- Park, S. Y., Lee, S., Park, K. S., Lee, H. K. and Lee, W. (2006). "Proteomic analysis of cellular change involved in mitochondria-to-nucleus communication in L6 GLUT4myc myocytes". *Proteomics* 6(4): 1210-1222
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. and Velours, J. (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology". *Embo J* 21(3): 221-230
- Pedersen, P. L. (2007). "Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen". *J Bioenerg Biomembr* 39(3): 211-222
- Pehowich, D. J. (1999). "Thyroid hormone status and membrane n-3 fatty acid content influence mitochondrial proton leak". *Biochim Biophys Acta* 1411(1): 192-200
- Pelletier, A., Joly, E., Prentki, M. and Coderre, L. (2005). "Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase and p38 mitogen-activated protein kinase participate in the stimulation of glucose uptake by dinitrophenol in adult cardiomyocytes". *Endocrinology* 146(5): 2285-2294
- Piechota, J., Szczesny, R., Wolanin, K., Chlebowski, A. and Bartnik, E. (2006). "Nuclear and mitochondrial genome responses in HeLa cells treated with inhibitors of mitochondrial DNA expression". *Acta Biochim Pol* 53(3): 485-495
- Pietrobon, D., Azzone, G. F. and Walz, D. (1981). "Effect of funiculosin and antimycin A on the redox-driven H<sup>+</sup>-pumps in mitochondria: on the nature of "leaks"". *Eur J Biochem* 117(2): 389-394
- Pinton, P., Leo, S., Wieckowski, M. R., Di Benedetto, G. and Rizzuto, R. (2004). "Long-term modulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signals by protein kinase C isozymes". *J Cell Biol* 165(2): 223-232

- Portman, M. A., Xiao, Y., Qian, K., Tucker, R. L., Parish, S. M. and Ning, X. H. (2000). "Thyroid hormone coordinates respiratory control maturation and adenine nucleotide translocator expression in heart in vivo". *Circulation* 102(11): 1323-1329
- Powell, C. E., Watson, C. S. and Gametchu, B. (1999). "Immunoaffinity isolation of native membrane glucocorticoid receptor from S-49++ lymphoma cells: biochemical characterization and interaction with Hsp 70 and Hsp 90". *Endocrine* 10(3): 271-280
- Poyton, R. O. and McEwen, J. E. (1996). "Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes". *Annu Rev Biochem* 65: 563-607
- Priceman, S. J., Kirzner, J. D., Nary, L. J., Morris, D., Shankar, D. B., Sakamoto, K. M. and Medh, R. D. (2006). "Calcium-dependent upregulation of E4BP4 expression correlates with glucocorticoid-evoked apoptosis of human leukemic CEM cells". *Biochem Biophys Res Commun* 344(2): 491-499
- Psarra, A. M., Solakidi, S., Trougakos, I. P., Margaritis, L. H., Spyrou, G. and Sekeris, C. E. (2005). "Glucocorticoid receptor isoforms in human hepatocarcinoma HepG2 and SaOS-2 osteosarcoma cells: presence of glucocorticoid receptor alpha in mitochondria and of glucocorticoid receptor beta in nucleoli". *Int J Biochem Cell Biol* 37(12): 2544-2558
- Psarra, G., Nassis, G. P. and Sidossis, L. S. (2006). "Short-term predictors of abdominal obesity in children". *Eur J Public Health* 16(5): 520-525

## Q

- Qi, A. Q., Qiu, J., Xiao, L. and Chen, Y. Z. (2005). "Rapid activation of JNK and p38 by glucocorticoids in primary cultured hippocampal cells". *J Neurosci Res* 80(4): 510-517
- Qi, D. and Rodrigues, B. (2007). "Glucocorticoids produce whole body insulin resistance with changes in cardiac metabolism". *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292(3): E654-667
- Qiu, J., Lou, L. G., Huang, X. Y., Lou, S. J., Pei, G. and Chen, Y. Z. (1998). "Nongenomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of nicotine-induced calcium influx in PC12 cells: involvement of protein kinase C". *Endocrinology* 139(12): 5103-5108
- Quelle, F. W., Smith, R. V., Hrycyna, C. A., Kaliban, T. D., Crooks, J. A. and O'Brien, J. M. (1988). "[3H]dexamethasone binding to plasma membrane-enriched fractions from liver of nonadrenalectomized rats". *Endocrinology* 123(3): 1642-1651

## R

- Rachamim, N., Latter, H., Malinin, N., Asher, C., Wald, H. and Garty, H. (1995). "Dexamethasone enhances expression of mitochondrial oxidative phosphorylation genes in rat distal colon". *Am J Physiol* 269(5 Pt 1): C1305-1310

- Rahman, S., Taanman, J. W., Cooper, J. M., Nelson, I., Hargreaves, I., Meunier, B., Hanna, M. G., Garcia, J. J., Capaldi, R. A., Lake, B. D., Leonard, J. V. and Schapira, A. H. (1999). "A missense mutation of cytochrome oxidase subunit II causes defective assembly and myopathy". *Am J Hum Genet* 65(4): 1030-1039
- Ramsey, J. J., Harper, M. E. and Weindruch, R. (2000). "Restriction of energy intake, energy expenditure, and aging". *Free Radic Biol Med* 29(10): 946-968
- Rapizzi, E., Pinton, P., Szabadkai, G., Wieckowski, M. R., Vandecasteele, G., Baird, G., Tuft, R. A., Fogarty, K. E. and Rizzuto, R. (2002). "Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca<sup>2+</sup> microdomains to mitochondria". *J Cell Biol* 159(4): 613-624
- Reed, K. C. and Bygrave, F. L. (1974). "The inhibition of mitochondrial calcium transport by lanthanides and ruthenium red". *Biochem J* 140(2): 143-155
- Rego, A. C. and Oliveira, C. R. (2003). "Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases". *Neurochem Res* 28(10): 1563-1574
- Reinders, J., Wagner, K., Zahedi, R. P., Stojanovski, D., Eyrich, B., van der Laan, M., Rehling, P., Sickmann, A., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2007). "Profiling phosphoproteins of yeast mitochondria reveals a role of phosphorylation in assembly of the ATP synthase". *Mol Cell Proteomics* 6(11): 1896-1906
- Reynolds, I. J. and Hastings, T. G. (1995). "Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation". *J Neurosci* 15(1): 3318-3327
- Reyns, G. E., Verhoelst, C. H., Kuhn, E. R., Darras, V. M. and Van der Geyten, S. (2005). "Regulation of thyroid hormone availability in liver and brain by glucocorticoids". *Gen Comp Endocrinol* 140(2): 101-108
- Rizzuto, R., Bernardi, P., Favaron, M. and Azzone, G. F. (1987). "Pathways for Ca<sup>2+</sup> efflux in heart and liver mitochondria". *Biochem J* 246(2): 271-277
- Rizzuto, R., Pinton, P., Brini, M., Chiesa, A., Filippin, L. and Pozzan, T. (1999). "Mitochondria as biosensors of calcium microdomains". *Cell Calcium* 26(5): 193-199
- Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F. S., Fogarty, K. E., Lifshitz, L. M., Tuft, R. A. and Pozzan, T. (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses". *Science* 280(5370): 1763-1766



- Robb-Gaspers, L. D., Burnett, P., Rutter, G. A., Denton, R. M., Rizzuto, R. and Thomas, A. P. (1998). "Integrating cytosolic calcium signals into mitochondrial metabolic responses". *Embo J* 17(17): 4987-5000
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis". *Science* 234(4774): 364-368
- Rohas, L. M., St-Pierre, J., Uldry, M., Jager, S., Handschin, C. and Spiegelman, B. M. (2007). "A fundamental system of cellular energy homeostasis regulated by PGC-1alpha". *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(19): 7933-7938
- Rolfe, D. F. and Brown, G. C. (1997). "Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals". *Physiol Rev* 77(3): 731-758
- Rossmesl, M., Barbatelli, G., Flachs, P., Brauner, P., Zingaretti, M. C., Marelli, M., Janovska, P., Horakova, M., Syrový, I., Cinti, S. and Kopecky, J. (2002). "Expression of the uncoupling protein 1 from the aP2 gene promoter stimulates mitochondrial biogenesis in unilocular adipocytes in vivo". *Eur J Biochem* 269(1): 19-28
- Rothermel, B. A., Shyjan, A. W., Etheredge, J. L. and Butow, R. A. (1995). "Transactivation by Rtg1p, a basic helix-loop-helix protein that functions in communication between mitochondria and the nucleus in yeast". *J Biol Chem* 270(49): 29476-29482
- Rotig, A., de Lonlay, P., Chretien, D., Foury, F., Koenig, M., Sidi, D., Munnich, A. and Rustin, P. (1997). "Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia". *Nat Genet* 17(2): 215-217
- Roussel, D., Dumas, J. F., Augeraud, A., Douay, O., Foussard, F., Malthiery, Y., Simard, G. and Ritz, P. (2003). "Dexamethasone treatment specifically increases the basal proton conductance of rat liver mitochondria". *FEBS Lett* 541(1-3): 75-79
- Ryan, M. T. and Hoogenraad, N. J. (2007). "Mitochondrial-nuclear communications". *Annu Rev Biochem* 76: 701-722

## S

- Salvi, M., Brunati, A. M. and Toninello, A. (2005). "Tyrosine phosphorylation in mitochondria: a new frontier in mitochondrial signaling". *Free Radic Biol Med* 38(10): 1267-1277
- Sanchez-Vega, B., Krett, N., Rosen, S. T. and Gandhi, V. (2006). "Glucocorticoid receptor transcriptional isoforms and resistance in multiple myeloma cells". *Mol Cancer Ther* 5(12): 3062-3070

- Santini, M. P., Talora, C., Seki, T., Bolgan, L. and Dotto, G. P. (2001). "Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21(WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation". *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(17): 9575-9580
- Satrustegui, J., Pardo, B. and Del Arco, A. (2007). "Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling". *Physiol Rev* 87(1): 29-67
- Savasta, S., Comi, G. P., Perini, M. P., Lupi, A., Strazzer, S., Rognoni, F. and Rossoni, R. (2001). "Leigh disease: clinical, neuroradiologic, and biochemical study of three new cases with cytochrome c oxidase deficiency". *J Child Neurol* 16(8): 608-613
- Sazanov, L. A. (2007). "Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain". *Biochemistry* 46(9): 2275-2288
- Scacco, S., Vergari, R., Scarpulla, R. C., Technikova-Dobrova, Z., Sardanelli, A., Lambo, R., Lorusso, V. and Papa, S. (2000). "cAMP-dependent phosphorylation of the nuclear encoded 18-kDa (IP) subunit of respiratory complex I and activation of the complex in serum-starved mouse fibroblast cultures". *J Biol Chem* 275(23): 17578-17582
- Scarpulla, R. C. (2002). "Nuclear activators and coactivators in mammalian mitochondrial biogenesis". *Biochim Biophys Acta* 1576(1-2): 1-14
- Scarpulla, R. C. (2006). "Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells". *J Cell Biochem* 97(4): 673-683
- Schafer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A. and Vonck, J. (2006). "Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes". *J Biol Chem* 281(22): 15370-15375
- Schagger, H. (2002). "Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria". *Biochim Biophys Acta* 1555(1-3): 154-159
- Schapira, A. H. (1998). "Mitochondrial dysfunction in neurodegenerative disorders". *Biochim Biophys Acta* 1366(1-2): 225-233
- Scheller, K. and Sekeris, C. E. (2003). "The effects of steroid hormones on the transcription of genes encoding enzymes of oxidative phosphorylation". *Exp Physiol* 88(1): 129-140
- Schieke, S. M. and Finkel, T. (2006). "Mitochondrial signaling, TOR, and life span". *Biol Chem* 387(10-11): 1357-1361
- Schon, E. A., Santra, S., Pallotti, F. and Girvin, M. E. (2001). "Pathogenesis of primary defects in mitochondrial ATP synthesis". *Semin Cell Dev Biol* 12(6): 441-448
- Schroeder, P., Pohl, C., Calles, C., Marks, C., Wild, S. and Krutmann, J. (2007). "Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling". *Free Radic Biol Med* 43(1): 128-135

- Seelan, R. S. and Grossman, L. I. (1997). "Structural organization and promoter analysis of the bovine cytochrome c oxidase subunit VIIc gene. A functional role for YY1". *J Biol Chem* 272(15): 10175-10181
- Segars, J. H. and Driggers, P. H. (2002). "Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes". *Trends Endocrinol Metab* 13(8): 349-354
- Sekito, T., Thornton, J. and Butow, R. A. (2000). "Mitochondria-to-nuclear signaling is regulated by the subcellular localization of the transcription factors Rtg1p and Rtg3p". *Mol Biol Cell* 11(6): 2103-2115
- Shabalina, I. G., Kramarova, T. V., Nedergaard, J. and Cannon, B. (2006). "Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively". *Biochem J* 399(3): 405-414
- Sheppard, K. E. (1994). "Calcium and protein kinase C regulation of the glucocorticoid receptor in mouse corticotrope tumor cells". *J Steroid Biochem Mol Biol* 48(4): 337-345
- Skulachev, V. P. (1996). "Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants". *Q Rev Biophys* 29(2): 169-202
- Solakidi, S. and Sekeris, C. E. (2003). "Oligonucleotide sequences similar to transcription factor consensi of nuclear genes are present in the human mitochondrial genome". *Anticancer Res* 23(2B): 1389-1393
- Solito, E., Mulla, A., Morris, J. F., Christian, H. C., Flower, R. J. and Buckingham, J. C. (2003). "Dexamethasone induces rapid serine-phosphorylation and membrane translocation of annexin 1 in a human folliculostellate cell line via a novel nongenomic mechanism involving the glucocorticoid receptor, protein kinase C, phosphatidylinositol 3-kinase, and mitogen-activated protein kinase". *Endocrinology* 144(4): 1164-1174
- Song, I. H. and Buttgeriet, F. (2006). "Non-genomic glucocorticoid effects to provide the basis for new drug developments". *Mol Cell Endocrinol* 246(1-2): 142-146
- Sparagna, G. C., Gunter, K. K., Sheu, S. S. and Gunter, T. E. (1995). "Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode". *J Biol Chem* 270(46): 27510-27515
- Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W. (1997). "Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase". *Nature* 389(6647): 194-198

- Spies, C. M., Schaumann, D. H., Berki, T., Mayer, K., Jakstadt, M., Huscher, D., Wunder, C., Burmester, G. R., Radbruch, A., Lauster, R., Scheffold, A. and Buttgerit, F. (2006). "Membrane glucocorticoid receptors are down regulated by glucocorticoids in patients with systemic lupus erythematosus and use a caveolin-1-independent expression pathway". *Ann Rheum Dis* 65(9): 1139-1146
- Starkov, A. A., Polster, B. M. and Fiskum, G. (2002). "Regulation of hydrogen peroxide production by brain mitochondria by calcium and Bax". *J Neurochem* 83(1): 220-228
- Stellato, C. (2004). "Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids". *Proc Am Thorac Soc* 1(3): 255-263
- Stockl, P., Zankl, C., Hutter, E., Unterluggauer, H., Laun, P., Heeren, G., Bogengruber, E., Herndler-Brandstetter, D., Breitenbach, M. and Jansen-Durr, P. (2007). "Partial uncoupling of oxidative phosphorylation induces premature senescence in human fibroblasts and yeast mother cells". *Free Radic Biol Med* 43(6): 947-958
- Sun, M., Ramirez, M., Challis, J. R. and Gibb, W. (1996). "Immunohistochemical localization of the glucocorticoid receptor in human fetal membranes and decidua at term and preterm delivery". *J Endocrinol* 149(2): 243-248
- Suzuki, H., Kumagai, T., Goto, A. and Sugiura, T. (1998). "Increase in intracellular hydrogen peroxide and upregulation of a nuclear respiratory gene evoked by impairment of mitochondrial electron transfer in human cells". *Biochem Biophys Res Commun* 249(2): 542-545
- Szabadkai, G., Bianchi, K., Varnai, P., De Stefani, D., Wieckowski, M. R., Cavagna, D., Nagy, A. I., Balla, T. and Rizzuto, R. (2006). "Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels". *J Cell Biol* 175(6): 901-911
- Szanda, G., Koncz, P., Rajki, A. and Spat, A. (2007). "Participation of p38 MAPK and a novel-type protein kinase C in the control of mitochondrial Ca(2+) uptake". *Cell Calcium*
- Szatmary, Z., Garabedian, M. J. and Vilcek, J. (2004). "Inhibition of glucocorticoid receptor-mediated transcriptional activation by p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase". *J Biol Chem* 279(42): 43708-43715
- Szczepanowska, J., Zablocki, K. and Duszynski, J. (2004). "Influence of a mitochondrial genetic defect on capacitative calcium entry and mitochondrial organization in the osteosarcoma cells". *FEBS Lett* 578(3): 316-322

## **T**

- Taanman, J. W. (1999). "The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication". *Biochim Biophys Acta* 1410(2): 103-123

- Taha, C., Tsakiridis, T., McCall, A. and Klip, A. (1997). "Glucose transporter expression in L6 muscle cells: regulation through insulin- and stress-activated pathways". *Am J Physiol* 273(1 Pt 1): E68-76
- Takahashi, T., Kimoto, T., Tanabe, N., Hattori, T. A., Yasumatsu, N. and Kawato, S. (2002). "Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> elevation in cultured rat hippocampal neurons". *J Neurochem* 83(6): 1441-1451
- Tasker, J. G., Di, S. and Malcher-Lopes, R. (2006). "Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors". *Endocrinology* 147(12): 5549-5556
- Ten Hove, W., Houben, L. A., Raaijmakers, J. A., Koenderman, L. and Bracke, M. (2006). "Rapid selective priming of FcαR on eosinophils by corticosteroids". *J Immunol* 177(9): 6108-6114
- Territo, P. R., Mootha, V. K., French, S. A. and Balaban, R. S. (2000). "Ca<sup>2+</sup> activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase". *Am J Physiol Cell Physiol* 278(2): C423-435
- Tian, S., Poukka, H., Palvimo, J. J. and Janne, O. A. (2002). "Small ubiquitin-related modifier-1 (SUMO-1) modification of the glucocorticoid receptor". *Biochem J* 367(Pt 3): 907-911
- Tiao, G., Fagan, J., Roegner, V., Lieberman, M., Wang, J. J., Fischer, J. E. and Hasselgren, P. O. (1996). "Energy-ubiquitin-dependent muscle proteolysis during sepsis in rats is regulated by glucocorticoids". *J Clin Invest* 97(2): 339-348
- Tomlinson, J. W. and Stewart, P. M. (2001). "Cortisol metabolism and the role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase". *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 15(1): 61-78
- Tong, D. C., Buck, S. M., Roberts, B. R., Klein, J. D. and Tumlin, J. A. (2004). "Calcineurin phosphatase activity: activation by glucocorticoids and role of intracellular calcium". *Transplantation* 77(2): 259-267
- Trenker, M., Malli, R., Fertschai, I., Levak-Frank, S. and Graier, W. F. (2007). "Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport". *Nat Cell Biol* 9(4): 445-452
- Tretter, L. and Adam-Vizi, V. (2007). "Uncoupling is without an effect on the production of reactive oxygen species by in situ synaptic mitochondria". *J Neurochem*
- Trueba, M., Ibarrola, I., Vallejo, A. I., Sancho, M. J., Marino, A. and Macarulla, J. M. (1989). "Characterization of specific binding sites for corticosterone in mouse liver plasma membrane". *Membr Biochem* 8(4): 229-239
- Tryc, A. B., Spies, C. M., Schneider, U., Kunkel, D., Berki, T., Sieper, J., Burmester, G. R., Radbruch, A., Scheffold, A. and Buttgereit, F. (2006). "Membrane glucocorticoid receptor

expression on peripheral blood mononuclear cells in patients with ankylosing spondylitis".  
J Rheumatol 33(11): 2249-2253

Tsao, C. Y., Mendell, J. R. and Bartholomew, D. (2001). "High mitochondrial DNA T8993G mutation (<90%) without typical features of Leigh's and NARP syndromes". J Child Neurol 16(7): 533-535

Turrens, J. F. (1997). "Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain". Biosci Rep 17(1): 3-8

## V

Vainio, H., Mela, L. and Chance, B. (1970). "Energy dependent bivalent cation translocation in rat liver mitochondria". Eur J Biochem 12(2): 387-391

Van Itallie, C. M. (1992). "Dexamethasone treatment increases mitochondrial RNA synthesis in a rat hepatoma cell line". Endocrinology 130(2): 567-576

Vander Kooi, B. T., Onuma, H., Oeser, J. K., Svitek, C. A., Allen, S. R., Vander Kooi, C. W., Chazin, W. J. and O'Brien, R. M. (2005). "The glucose-6-phosphatase catalytic subunit gene promoter contains both positive and negative glucocorticoid response elements". Mol Endocrinol 19(12): 3001-3022

Vayssiere, J. L., Petit, P. X., Risler, Y. and Mignotte, B. (1994). "Commitment to apoptosis is associated with changes in mitochondrial biogenesis and activity in cell lines conditionally immortalized with simian virus 40". Proc Natl Acad Sci U S A 91(24): 11752-11756

Vidal-Puig, A. J., Grujic, D., Zhang, C. Y., Hagen, T., Boss, O., Ido, Y., Szczepanik, A., Wade, J., Mootha, V., Cortright, R., Muoio, D. M. and Lowell, B. B. (2000). "Energy metabolism in uncoupling protein 3 gene knockout mice". J Biol Chem 275(21): 16258-16266

Von Kleist-Retzow, J. C., Hornig-Do, H. T., Schauen, M., Eckertz, S., Dinh, T. A., Stassen, F., Lottmann, N., Bust, M., Galunska, B., Wielckens, K., Hein, W., Beuth, J., Braun, J. M., Fischer, J. H., Ganitkevich, V. Y., Maniura-Weber, K. and Wiesner, R. J. (2007). "Impaired mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in respiratory chain-deficient cells but efficient compensation of energetic disadvantage by enhanced anaerobic glycolysis due to low ATP steady state levels". Exp Cell Res 313(14): 3076-3089

Votyakova, T. V. and Reynolds, I. J. (2001). "DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria". J Neurochem 79(2): 266-277

## W

- Wallace, A. D. and Cidlowski, J. A. (2001). "Proteasome-mediated glucocorticoid receptor degradation restricts transcriptional signaling by glucocorticoids". *J Biol Chem* 276(46): 42714-42721
- Wang, H. and Morais, R. (1997). "Up-regulation of nuclear genes in response to inhibition of mitochondrial DNA expression in chicken cells". *Biochim Biophys Acta* 1352(3): 325-334
- Wang, X., Wu, H. and Miller, A. H. (2004). "Interleukin 1alpha (IL-1alpha) induced activation of p38 mitogen-activated protein kinase inhibits glucocorticoid receptor function". *Mol Psychiatry* 9(1): 65-75
- Wang, Z., Frederick, J. and Garabedian, M. J. (2002). "Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo". *J Biol Chem* 277(29): 26573-26580
- Weber, K., Bruck, P., Mikes, Z., Kupper, J. H., Klingenspor, M. and Wiesner, R. J. (2002). "Glucocorticoid hormone stimulates mitochondrial biogenesis specifically in skeletal muscle". *Endocrinology* 143(1): 177-184
- Webster, J. C., Jewell, C. M., Bodwell, J. E., Munck, A., Sar, M. and Cidlowski, J. A. (1997). "Mouse glucocorticoid receptor phosphorylation status influences multiple functions of the receptor protein". *J Biol Chem* 272(14): 9287-9293
- Weinberger, C., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G. and Evans, R. M. (1985). "Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product". *Nature* 318(6047): 670-672
- Weitzel, J. M., Iwen, K. A. and Seitz, H. J. (2003). "Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone". *Exp Physiol* 88(1): 121-128
- Wikstrom, M. and Verkhovskiy, M. I. (2007). "Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases". *Biochim Biophys Acta* 1767(10): 1200-1214
- Wilson, V. G. and Rangasamy, D. (2001). "Intracellular targeting of proteins by sumoylation". *Exp Cell Res* 271(1): 57-65
- Wingrove, D. E. and Gunter, T. E. (1986). "Kinetics of mitochondrial calcium transport. I. Characteristics of the sodium-independent calcium efflux mechanism of liver mitochondria". *J Biol Chem* 261(32): 15159-15165
- Wingrove, D. E. and Gunter, T. E. (1986). "Kinetics of mitochondrial calcium transport. II. A kinetic description of the sodium-dependent calcium efflux mechanism of liver mitochondria and inhibition by ruthenium red and by tetraphenylphosphonium". *J Biol Chem* 261(32): 15166-15171

- Wojtczak, L. and Wieckowski, M. R. (1999). "The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane". *J Bioenerg Biomembr* 31(5): 447-455
- Wolkowicz, P. E., Michael, L. H., Lewis, R. M. and McMillin-Wood, J. (1983). "Sodium-calcium exchange in dog heart mitochondria: effects of ischemia and verapamil". *Am J Physiol* 244(5): H644-651
- Wright, D. C., Geiger, P. C., Han, D. H., Jones, T. E. and Holloszy, J. O. (2007). "Calcium induces increases in peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha and mitochondrial biogenesis by a pathway leading to p38 mitogen-activated protein kinase activation". *J Biol Chem* 282(26): 18793-18799
- Wright, M. C. and Paine, A. J. (1995). "Characteristics of a membrane-associated steroid binding site in rat liver". *J Recept Signal Transduct Res* 15(1-4): 543-556
- Wrutniak-Cabello, C., Casas, F. and Cabello, G. (2000). "The direct tri-iodothyronine mitochondrial pathway: science or mythology?" *Thyroid* 10(11): 965-969
- Wrutniak-Cabello, C., Casas, F. and Cabello, G. (2001). "Thyroid hormone action in mitochondria". *J Mol Endocrinol* 26(1): 67-77

## X

- Xia, B., Lu, J. and Wang, G. (2003). "Glucocorticoid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 and p38 in human ovarian cancer HO-8910 cells". *Chin Med J (Engl)* 116(5): 753-756
- Xiong, Y., Collins, Q. F., An, J., Lupo, E., Jr., Liu, H. Y., Liu, D., Robidoux, J., Liu, Z. and Cao, W. (2007). "p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis". *J Biol Chem* 282(7): 4975-4982

## Y

- Yadava, N., Potluri, P. and Scheffler, I. E. (2007). "Investigations of the potential effects of phosphorylation of the MWFE and ESSS subunits on complex I activity and assembly". *Int J Biochem Cell Biol*, *In Press*.
- Yagi, T. and Matsuno-Yagi, A. (2003). "The proton-translocating NADH-quinone oxidoreductase in the respiratory chain: the secret unlocked". *Biochemistry* 42(8): 2266-2274
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T. I., Jones, D. P. and Wang, X. (1997). "Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked". *Science* 275(5303): 1129-1132



- Yang, S. and Zhang, L. (2004). "Glucocorticoids and vascular reactivity". *Curr Vasc Pharmacol* 2(1): 1-12
- Yao, Y. Y., Liu, D. M., Xu, D. F. and Li, W. P. (2007). "Memory and learning impairment induced by dexamethasone in senescent but not young mice". *Eur J Pharmacol* 574(1): 20-28
- Yoshikawa, S. (2003). "A cytochrome c oxidase proton pumping mechanism that excludes the O<sub>2</sub> reduction site". *FEBS Lett* 555(1): 8-12
- Yu, X. X., Mao, W., Zhong, A., Schow, P., Brush, J., Sherwood, S. W., Adams, S. H. and Pan, G. (2000). "Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation". *Faseb J* 14(11): 1611-1618
- Yudt, M. R. and Cidlowski, J. A. (2001). "Molecular identification and characterization of a and b forms of the glucocorticoid receptor". *Mol Endocrinol* 15(7): 1093-1103

## Z

- Zaid, A., Li, R., Luciakova, K., Barath, P., Nery, S. and Nelson, B. D. (1999). "On the role of the general transcription factor Sp1 in the activation and repression of diverse mammalian oxidative phosphorylation genes". *J Bioenerg Biomembr* 31(2): 129-135
- Zeviani, M., Amati, P., Bresolin, N., Antozzi, C., Piccolo, G., Toscano, A. and DiDonato, S. (1991). "Rapid detection of the A---G(8344) mutation of mtDNA in Italian families with myoclonus epilepsy and ragged-red fibers (MERRF)". *Am J Hum Genet* 48(2): 203-211
- Zhang, D. and Trudeau, V. L. (2006). "Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling". *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 144(3): 306-315
- Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W. (2005). "Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria". *J Biol Chem* 280(33): 29403-29408
- Zhang, Y., Liao, M. and Dufau, M. L. (2006). "Phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase Czeta-induced phosphorylation of Sp1 and p107 repressor release have a critical role in histone deacetylase inhibitor-mediated derepression of transcription of the luteinizing hormone receptor gene". *Mol Cell Biol* 26(18): 6748-6761
- Zhou, J. and Cidlowski, J. A. (2005). "The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses". *Steroids* 70(5-7): 407-417
- Zong, J., Ashraf, J. and Thompson, E. B. (1990). "The promoter and first, untranslated exon of the human glucocorticoid receptor gene are GC rich but lack consensus glucocorticoid receptor element sites". *Mol Cell Biol* 10(10): 5580-5585

# **PUBLICATIONS**

## **Publications:**

***Dinitrophenol-induced mitochondrial uncoupling in vivo triggers respiratory adaptation in HepG2 cells.***

*Valérie Desquiret, Dominique Loiseau, Caroline Jacques, Olivier Douay, Yves Malthièry, Patrick Ritz et Damien Roussel.*

*Biochimica and Biophysica Acta-Bioenergetics, 2006 Jan, 1757(1) : 21-30.*

***Mitochondrial effects of dexamethasone imply both membrane and cytosolic-initiated pathways in HepG2 cells.***

*Valérie Desquiret, Naïg Gueguen, Yves Malthièry, Patrick Ritz et Gilles Simard.*

*International Journal of Biochemistry and Cell Biology. In Press.*

## **Communication orale:**

***Adaptations métaboliques induites par le découplage mitochondrial dans des modèles cellulaires humains.***

*Valérie Desquiret, Dominique Loiseau, Caroline Jacques, Olivier Douay, Yves Malthièry, Patrick Ritz et Damien Roussel*

*Congrès Groupe Français de Bioénergétique, septembre 2005.*

## **Résumé :**

La mitochondrie est un centre de régulation métabolique à la fois intégrateur de signaux (visant à ajuster son fonctionnement selon les besoins énergétiques cellulaires) et initiateur de voies rétrogrades (permettant une réponse cellulaire à des changements d'états fonctionnels de la mitochondrie). Ce travail s'intéresse plus particulièrement au métabolisme oxydatif mitochondrial et aux voies de signalisation activées, dans les cellules HepG2, lors de deux situations de stress énergétique : le découplage mitochondrial et le traitement par les hormones glucocorticoïdes. Le découplage mitochondrial constitue un signal conduisant les cellules à développer leur métabolisme oxydatif sans modifier la glycolyse (notamment par activation de la transcription de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales). La mitochondrie est également une des cibles du traitement par glucocorticoïdes, ces hormones induisant à la fois des effets à court terme et à long terme. Les effets rapides (modification de l'activité des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale) sont non génomiques et impliquent la fixation de la dexaméthasone sur un récepteur membranaire. Ces effets sont médiés par l'activation calcium-dépendante de la protéine p38MAPK. Les effets à long terme (augmentation de la capacité de la chaîne respiratoire) sont transcriptionnels et nécessitent le recrutement du récepteur intracellulaire classique aux glucocorticoïdes. Les modifications du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale par les glucocorticoïdes sont induites par le recrutement graduel de différents sites de liaison aux glucocorticoïdes (membranaire et intracellulaire).

**Mots clés :** *Mitochondrie, métabolisme énergétique, découplage, glucocorticoïdes, signalisation intracellulaire.*

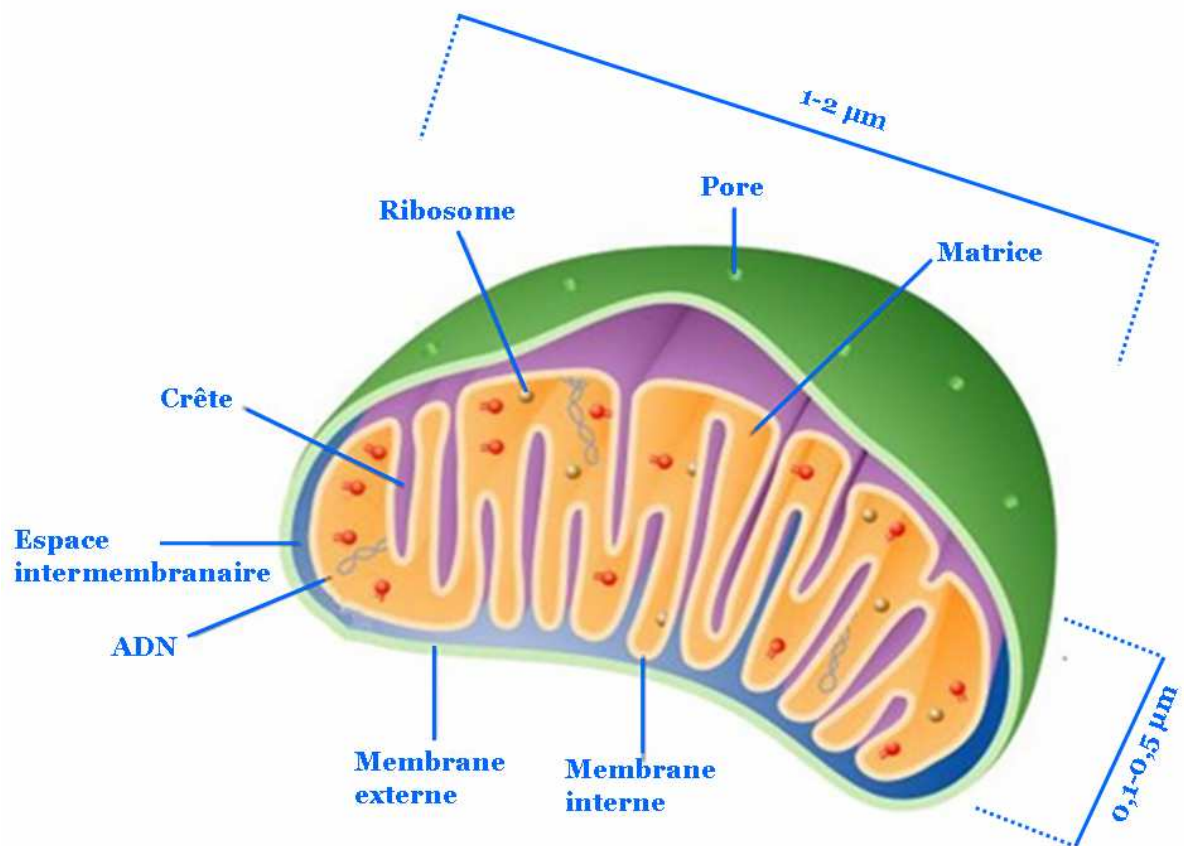
**English title :** MITOCHONDRIA AND ENERGETIC STRESS: SIGNALING PATHWAYS AND CELLULAR ADAPTATIONS.

## **Abstract :**

Mitochondria are integrators of intracellular signaling (adjusting its functioning to cellular energy demand) and initiators of retrograde pathways (triggering cellular response to variations of functional status of mitochondria). This work focus on oxidative mitochondrial metabolism and signaling pathways, in HepG2 cells, in response of two energetic stresses: mitochondrial uncoupling and glucocorticoids treatment. Mitochondrial uncoupling triggers an increase in oxidative metabolism without any change in glycolysis (notably by a stimulation of nuclear transcription of genes encoding mitochondrial proteins). Mitochondria are also one of targets of glucocorticoids, hormones that induce short term and long term effects. Rapid effects (modification of respiratory chain complexes I, II and III activities) involve dexamethasone binding on a membrane glucocorticoid receptor. These effects are mediated by calcium dependent activation of p38MAPK. Long term genomic effects (increase in respiratory chain capacity) implicate the classical intracellular glucocorticoid receptor. Modifications of the respiratory chain functioning induced by glucocorticoids involve the gradual recruitment of glucocorticoid binding sites (located in plasma membrane or in cytosol).

**Keywords :** *Mitochondria, energetic metabolism, uncoupling, glucocorticoids, intracellular signaling pathways.*

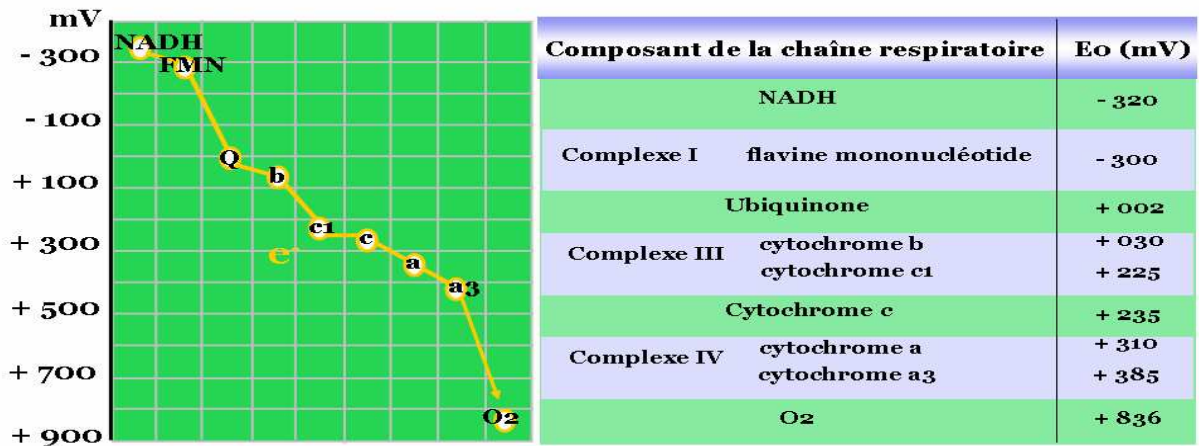
**Discipline :** Biologie cellulaire.



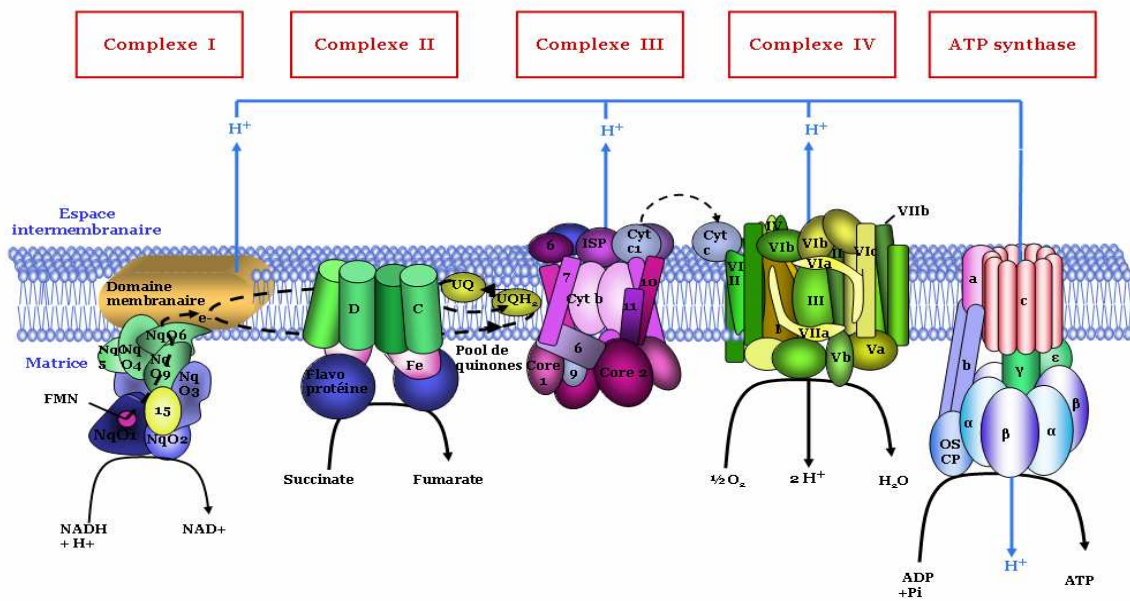
**Figure 1 : Structure de la mitochondrie**

La mitochondrie est composée de deux membranes aux propriétés physico-chimiques très différentes. Elles délimitent deux compartiments : l'espace intermembranaire et la matrice. La membrane interne forme des replis membranaires appelés crêtes mitochondriales.

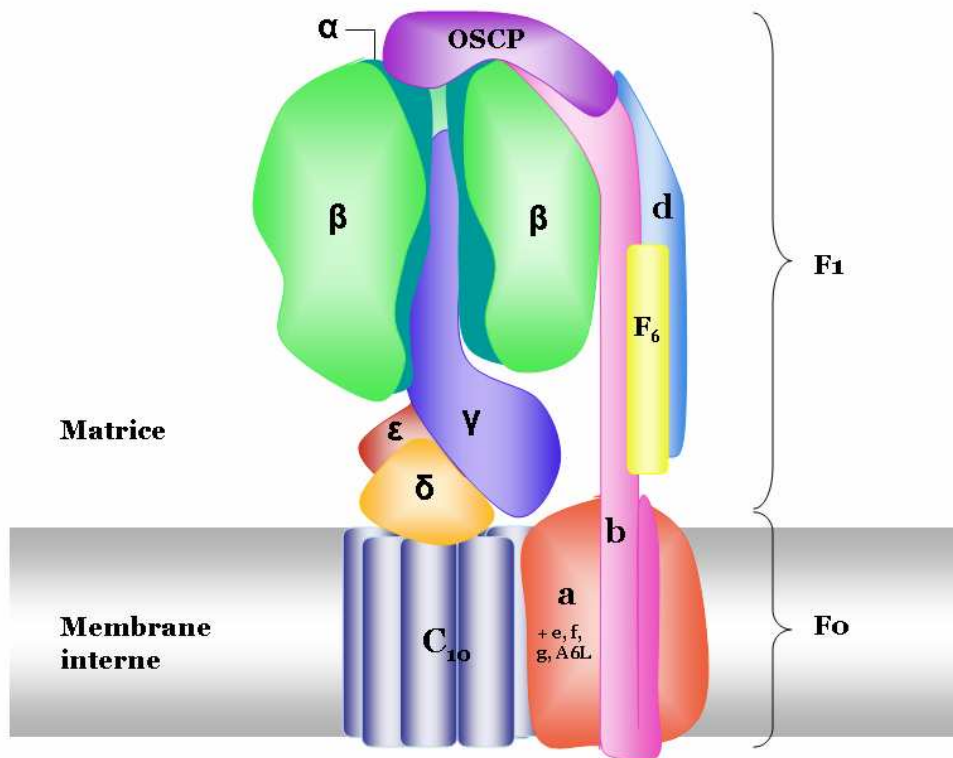
Schéma adapté à partir du site <http://www.vscht.cz>



**Figure 2 : Réactions d'oxydoréductions au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale**  
 La chaîne respiratoire transfère de manière progressive les électrons des coenzymes réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) vers le dioxygène via une succession de systèmes redox intervenant dans un ordre établi selon leur potentiel d'oxydoréduction allant du plus réducteur vers le plus oxydant.  
 Adapté du site [www.ulyse.u-bordeaux.fr](http://www.ulyse.u-bordeaux.fr).

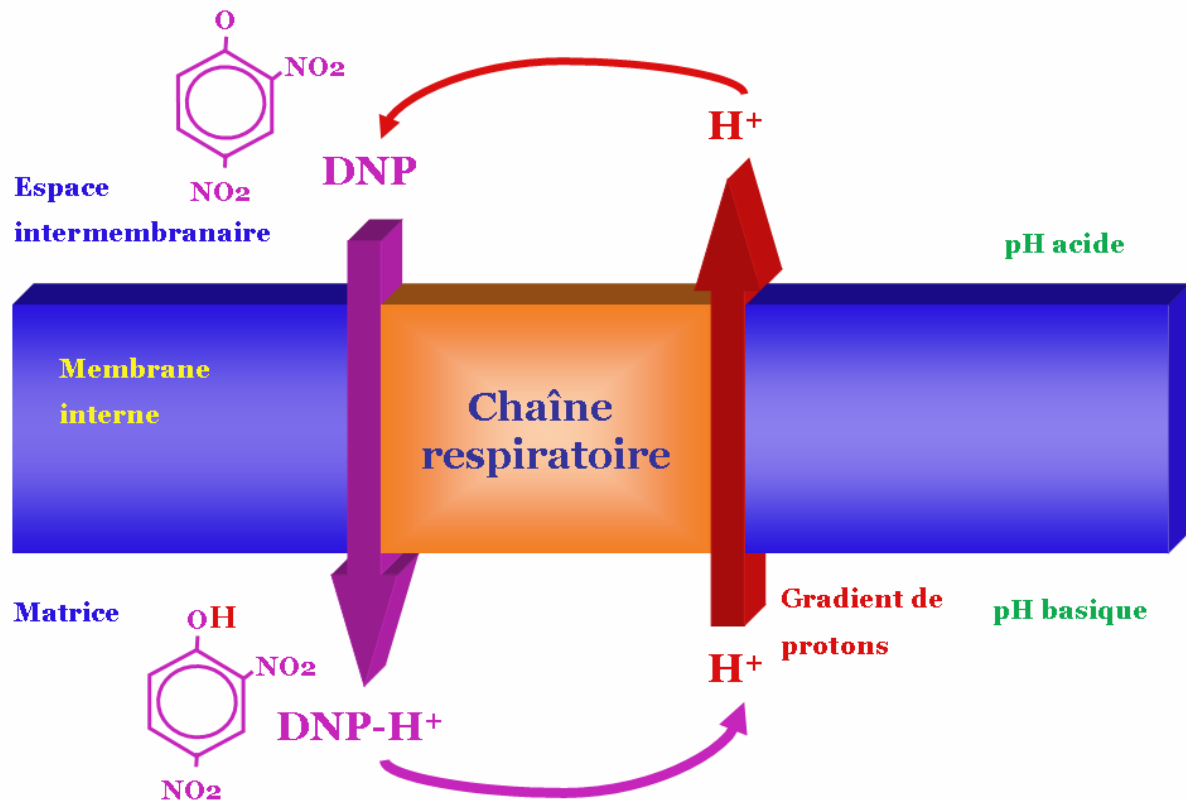


**Figure 3 : Structure schématique de la chaîne respiratoire mitochondriale.**  
 La chaîne respiratoire est située dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle est composée de quatre complexes protéiques : le complexe I (NADH ubiquinol réductase), le complexe II (succinate ubiquinone oxydoréductase), le complexe III (ubiquinone cytochrome c oxydoréductase) et le complexe IV (cytochrome c oxydase). Le transfert des électrons depuis les équivalents réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>) le long des complexes permet le pompage des protons par les complexes I, III et IV vers l'espace intermembranaire créant ainsi un gradient électrochimique. Le retour des protons dans la matrice par l'ATP synthase permet de coupler la respiration et la synthèse d'ATP. D'après le site [www.phys-mito.u-bordeaux2.fr](http://www.phys-mito.u-bordeaux2.fr).



**Figure 4 : Structure de l'ATP synthase de mammifère.**

L'ATP synthase est composée d'une partie mobile (rotor, F<sub>0</sub>) et d'une partie fixe (stator, F<sub>1</sub>). Le passage des protons entre le rotor (formé par l'ensemble des sous-unités c) et la sous-unité a du stator cause la rotation de la tige  $\gamma$  qui entraîne des changements de conformation des sous-unités  $\beta$  contenant les sites actifs de synthèse d'ATP. *D'après Walker et Dickson, Biochimica and Biophysica Acta, mai-juin 2006.*



**Figure 5 : Schéma représentant l'action découplante du 2,4 Dinitrophénol**

Le 2,4 Dinitrophénol est un acide faible lipophile qui, grâce au pH acide de l'espace intermembranaire peut capter un proton. Sous forme protonée, il traverse la membrane interne mitochondriale provoquant ainsi un retour des protons dans la matrice. Le pH matriciel, basique, permet le relargage du proton pris en charge par le DNP. Cet agent entraîne donc la dissipation du gradient de protons de protons généré par la chaîne respiratoire. Les protons ne peuvent plus être utilisés par l'ATP synthase, la respiration et la phosphorylation de l'ATP ne sont donc plus des réactions couplées, on parle alors de réaction de découplage entraînée par le DNP.



Groupe ou famille	Kinase ou phosphatase	Localisation	
<b>Protéines kinases</b> 	Src Lyn Fyn Csk Fgr Abl EGFR	EIM-MI EIM-MI EIM-MI EIM-MI EIM-MI ? M	
	.....		
	RAF1 RIP3	ME ?	
	MEK PAK5	ME ME	
	CKI	ME	
	GSK3β ERK CKII JNK SAPK	M ME, EIM M ou ? ME ME?	
	CDK11 PCTA	ME? ?	
	PKA	ME	
	Akt PKC DMPK	MI, M ME ou MI ?	
	PINK1	?	
	mTOR	ME	
	PDK	ME	
	BCKDK	M	
	<b>Protéines phosphatases</b> 	MKP-1 PTP1D PTPMT1	ME ME M
		SHP-2	MI ou EIM
.....			
.....			
.....			
TIM50		M	
PP1 PP2A		ME ME	
PP2Cγ? PDPs PCKDP		? M M	

EIM : espace intermembrnaire, M : matrice, ME : membrnae externe, MI : membrane interne.

**Figure 6 : Tableau des kinases et phosphatases présentes dans la mitochondrie.**

A ce jour, la majorité des familles de kinases et phosphatases ont été identifiées dans différents compartiments mitochondriaux montrant que la mitochondrie peut être une cible importante de phosphorylation par ces protéines. Cependant, leurs rôles dans la régulation du fonctionnement mitochondrial restent encore très peu connus. Adapté de *Pagliarini et al., TRENDS in Biological Sciences, Vol 10, janvier 2006.*

No.	Protein	Location	P site	Source	Function	Refs
1	PDC E1 $\alpha$	M	Ser	Various	Acetyl-CoA formation	[11]
2	PDC E1 $\beta$	M	Tyr	Human sperm	Acetyl-CoA formation	[8]
3	PDC E3	M	Tyr	Hamster sperm	Regulation of the PDC	[8]
4	PDK isoform 2 <sup>b</sup>	M	Ser/Thr	Rat	TCA	[27]
5	Aconitase	M	?	Bovine/potato	TCA	[22]
6	NAD-isocitrate dehydrogenase	M	?	Bovine/potato	TCA	[22]
7	NAD-malate dehydrogenase	M	?	Potato	TCA	[22]
8	NAD-malic enzyme	M	?	Potato	TCA	[22]
9	Succinyl-CoA-ligase $\alpha$ subunit	M	?	Rat/potato	TCA	[22,47]
10	Succinyl-CoA-ligase $\beta$ subunit	M	?	Rat/potato	TCA	[22,47]
11	Formate dehydrogenase	M	Ser/Thr	Potato	TCA	[22,23]
12	Aconitase	M	Tyr	Guinea pig synaptosomes	TCA	[8]
13	BCKAD	M	Ser	Various	AA metabolism	[31]
14	BCKAD kinase <sup>b</sup>	M	Ser	Rat	AA Metabolism	[54]
15	HSP22	M	Ser	Corn	Chaperone	[39]
16	HSP 90	M	?	Potato	Chaperone	[22]
17	Chaperonin 60	M	?	Potato	Chaperone	[22]
18	mthsp75	M	Tyr	Rat hepatoma cells	Chaperone	[29]
19	TRAP-1 <sup>c</sup>	M	Tyr	Human sperm	Chaperone	[8]
20	CYP2E1 <sup>c</sup>	M/IM?	Ser	COS	Detoxification	[43]
21	CYP2B1 <sup>c</sup>	M/IM?	Ser	COS	Detoxification	[18]
22	GSTA 4-4	M	Ser/Thr	COS	Detoxification	[44]
23	DBP	M	?	Yeast	mRNA turnover	[38]
24	MnSOD	M	?	Potato	Oxidative stress defense	[22]
25	EF-Tu	M	Thr?	Rabbit heart	Protein synthesis	[32]
26	Creatine kinase	M	?	Bovine	Synthesis of phosphocreatine	[45]
27	MTERF <sup>b</sup>	M	?	Rat	Transcription termination	[42]
28	Abf2p	M	Ser/Thr?	Yeast	mtDNA maintenance	[26]
29	MtTBP <sup>b</sup>	M	?	Yeast	mtDNA maintenance	[50]
30	NDK	M/IMS	Ser/His	Pisum sativum	Nucleoside triphosphate balance	[49]
31	StAR	IMS	Ser	COS-1	Steroid hormone synthesis	[19]
32	Axmito <sup>c</sup>	M?	Tyr	Rat	Regulation of PLAs?	[53]
33	SSAT <sup>b</sup>	M?	Ser?	Rat	Acetylation of spermidine	[21]
34	Sab	OM	Ser	Rat cardiac myocytes	SH3 domain-binding protein	[28]
35	CPT-I	OM	Ser	Rat	$\beta$ -OX	[35]
36	MtGAT <sup>c</sup>	OM	Ser/Thr?	Rat	Glycerolipid biosynthesis	[41]
37	BAD <sup>c</sup>	OM	Ser	FLS.12 cells	Apoptosis	[30]
38	BCL-2	OM	Ser	Jurkat	Apoptosis	[17,52]
39	Bcl-x <sub>L</sub>	OM	Thr	U-937 cells	Apoptosis	[36]
40	CREB	M/IM	Ser?	Rat	mtDNA transcription?	[24]
41	VDAC	OM	Tyr	Guinea pig synaptosomes	transport	[8,45]
42	CI: ESSS	IM	Ser	Bovine	OXPPOS	[25]
43	CI: 10 kDa	IM	Ser	Bovine	OXPPOS	[25]
44	CI 42 kDa (2 sites)	IM	Ser & Thr	Bovine	OXPPOS	[45,55]
45	CIII core I	IM	Tyr	Human sperm	OXPPOS	[8]
46	CIII core II	IM	?	Bovine	OXPPOS	[45]
47	CIV I	IM	Tyr	Bovine	OXPPOS	[37]
48	CIV II	IM	Tyr	Osteoclasts	OXPPOS	[40]
49	CIV III <sup>b</sup>	IM	Ser/Thr?	Bovine	OXPPOS	[34]
50	CIV IV	IM	?	Rat	OXPPOS	[46]
51	CIV Vb <sup>b</sup>	IM	Ser/Thr?	Bovine	OXPPOS	[34]
52	CV $\alpha$	IM	?	Bovine/potato	OXPPOS	[22]
53	CV $\beta$	IM	Thr	Human sk mus/bovine	OXPPOS	[33]
54	CV $\delta$	IM	?	Potato	OXPPOS	[48]
55	CV b	IM	?	Potato	OXPPOS	[48]
56	ScIRP	IM	?	Rat	OXPPOS	[20]
57	SDH-Fp	IM	?	Bovine/potato	OXPPOS	[22]
58	bc1 complex, $\beta$ -MPP subunit	IM	?	Potato	OXPPOS	[22]
59	CIII core I	IM	Tyr	Human sperm	OXPPOS	[8]
60	NAD(P) transhydrogenase	IM	?	Bovine	H <sup>+</sup> pump	[45]
61	ANT	IM	?	Bovine	Transport	[45]
62	Phosphate carrier protein	IM	?	Bovine	Transport	[45]
63	Aldose reductase <sup>c</sup>	?	S/T?	Various cell lines	Osmoregulation	[51]

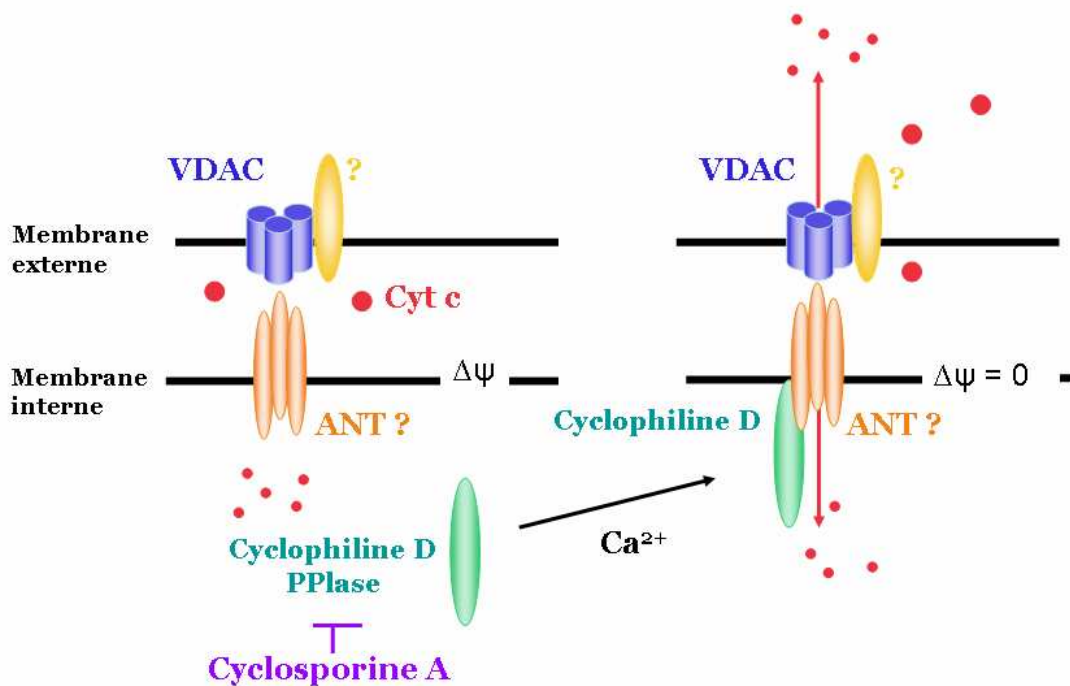
<sup>a</sup>Abbreviations: AA, amino acid (S, serine; T, threonine; Y, tyrosine); ANT, adenine nucleotide transporter; Axmito, mitochondrial annexin;  $\beta$ -OX,  $\beta$ -oxidation; BCKAD, branched chain ketoacid dehydrogenase; CI-CV, respiratory chain complexes 1-5; CPT, carnitine palmitoyltransferase; CREB, cAMP-responsive element (Cre)-binding protein; CYP, cytochrome P450; DBP, dodecamer-binding protein; EF, elongation factor; GST, glutathione S-transferase; HSP, heat shock protein; IM, inner membrane; IMS, intermembrane space; M, matrix; MnSOD, manganese super oxide dismutase; mTERF, mitochondrial transcription termination factor; mtGAT, mitochondrial glycerol-3-phosphatase acetyltransferase; mthsp, mitochondrial HSP; mtTBP, mitochondrial telomere-binding protein; NDK, nucleoside diphosphate kinase; OM, outer membrane; OXPPOS, oxidative phosphorylation; P site, site of phosphorylation; PDC E1/3, pyruvate dehydrogenase complex E1/3 subunit; PDK, pyruvate dehydrogenase kinase; PLA, phospholipase A; ScIRP, subunit c-immunoreactive peptide; SSAT, spermidine/spermine acetyltransferase; StAR, steroidogenic acute regulatory protein; TCA, tricarboxylic acid cycle; TRAP-1, tumor-necrosis factor type 1 receptor-associated protein; VDAC, voltage-dependent anion channel.

<sup>b</sup>Phosphorylation is observed only *in vitro* on recombinant protein.

<sup>c</sup>Protein translocates to mitochondria (i.e. protein is not a resident mitochondrial protein).

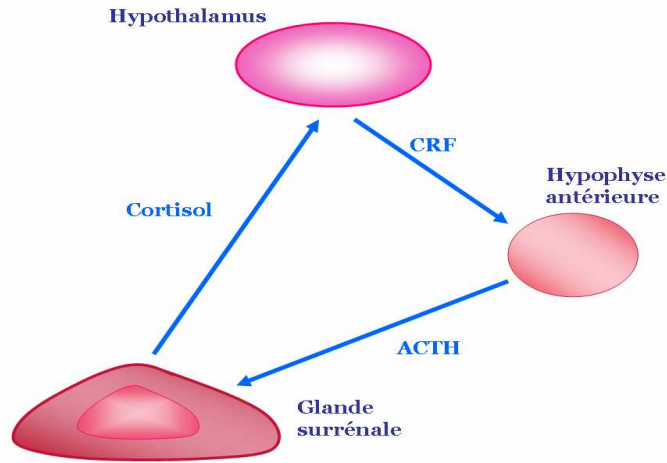
### Figure 7 : Liste des phosphoprotéines mitochondriales.

Plus de 60 protéines mitochondriales ont été identifiées comme des phosphoprotéines. Elles sont présentes dans tous les compartiments mitochondriaux et sont impliquées dans différentes fonctions mitochondriales. Cependant, la phosphorylation de ces protéines a souvent été démontrée *in vitro* et leur existence dans des conditions physiologiques ainsi que leur implication dans le fonctionnement mitochondrial reste à déterminer. Tableau issu de *Pagliarini et al., TRENDS in Biological Sciences, Vol 10, janvier 2006.*



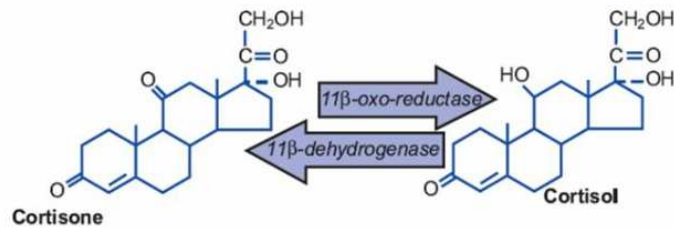
**Figure 8 : Représentation schématique du pore de transition de perméabilité mitochondrial.**

Le pore de transition de perméabilité mitochondrial (PTP) est un complexe multiprotéique situé aux points de contacts entre la membrane externe et la membrane interne de la mitochondrie. Il serait formé par les protéines suivantes : porine, ANT, cyclophiline D et d'autres composants encore non identifiés. En conditions physiologiques, son ouverture transitoire permet le passage de petites molécules de taille inférieure à 1500 Daltons. Cependant, le PTP occupe également une place centrale dans l'induction de la mort cellulaire. En effet, certains signaux proapoptotiques (dont une surcharge en calcium) convertissent cette association protéique en un pore non spécifique permettant la sortie de nombreuses protéines proapoptotiques parmi lesquelles le cytochrome c, élément important dans l'induction de l'apoptose. D'après *Tsujimoto et al., Biochimica and Biophysica Acta, 2006.*



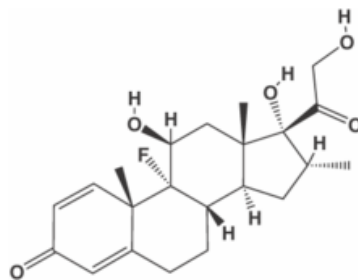
**Figure 9 : L'axe hypothalamo hypophysaire.**

La région hypothalamo-hypophysaire est un élément central du système endocrinien. Le Corticotrophin Releasing Factor (CRF) est sécrété par l'hypothalamus et atteint l'adénohypophyse où il entraîne la sécrétion d'ACTH par l'hypophyse antérieure. L'ACTH stimule ensuite la sécrétion de cortisol en favorisant la conversion du cholestérol et pregnénolone dans les glandes surrénales. Le cortisol alors exerce un rétrocontrôle négatif sur la sécrétion de CRF par l'hypothalamus. Schéma adapté de *David et al, Warde reports, Vol 15, 2004*.



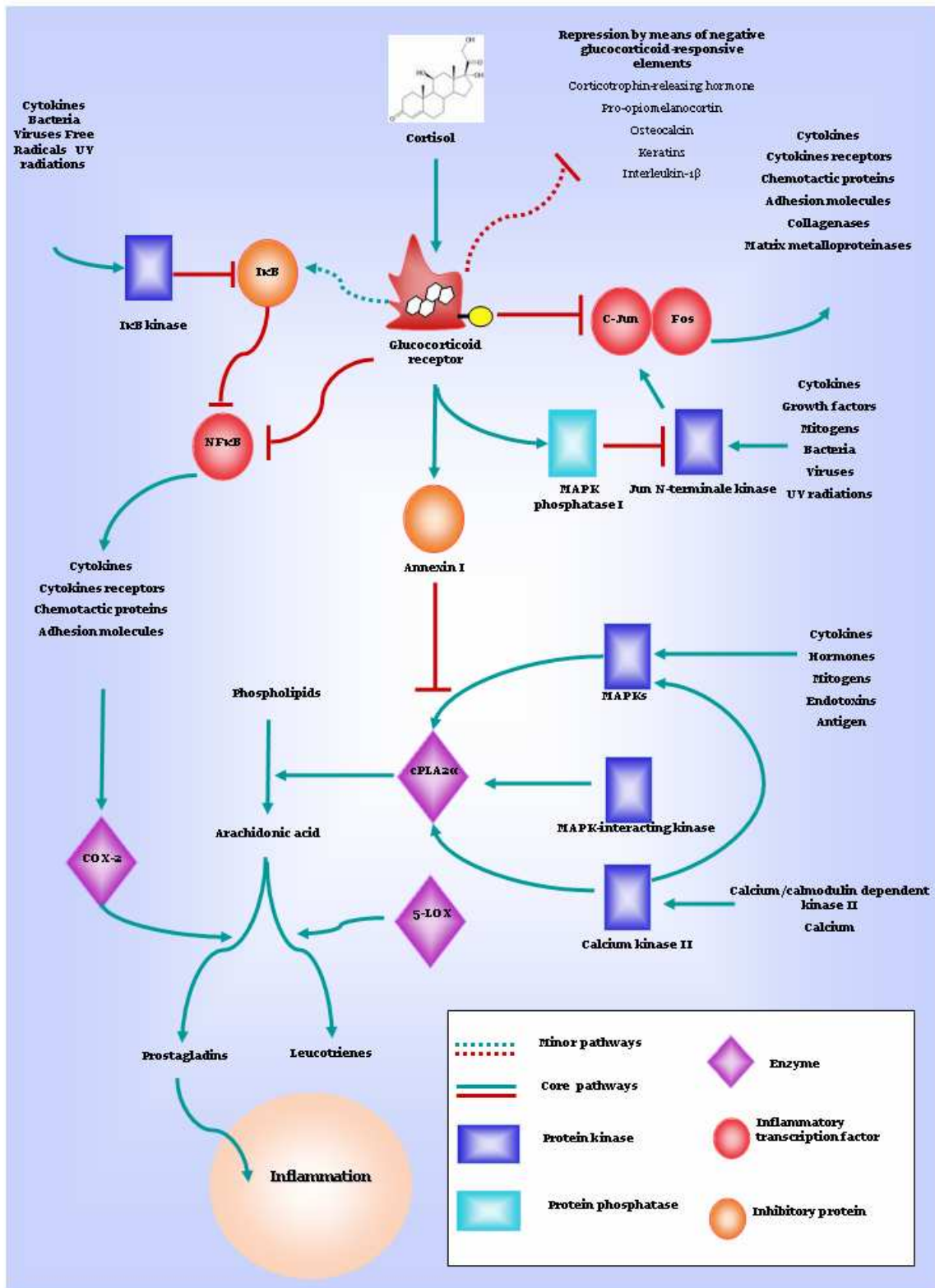
**Figure 10 : Interconversion du cortisol et de la cortisone par les enzymes 11βHSD.**

Il existe deux isoformes de 11βHSD qui interconvertissent le cortisol (actif) en cortisone (inactif). L'enzyme 11βHSD<sub>1</sub> agit surtout comme réductase à cofacteur NADP(H) pour former du cortisol. Elle est surtout exprimée dans le foie, le tissu adipeux, les gonades et les muscles. L'isoforme 11βHSD<sub>2</sub> a une action deshydrogénase NAD-dépendante et inactive le cortisol en cortisone. Elle est exprimée dans le rein, le colon, les glandes salivaires et le placenta. Issu de *Tomlinson et al. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. Mars 2001*.



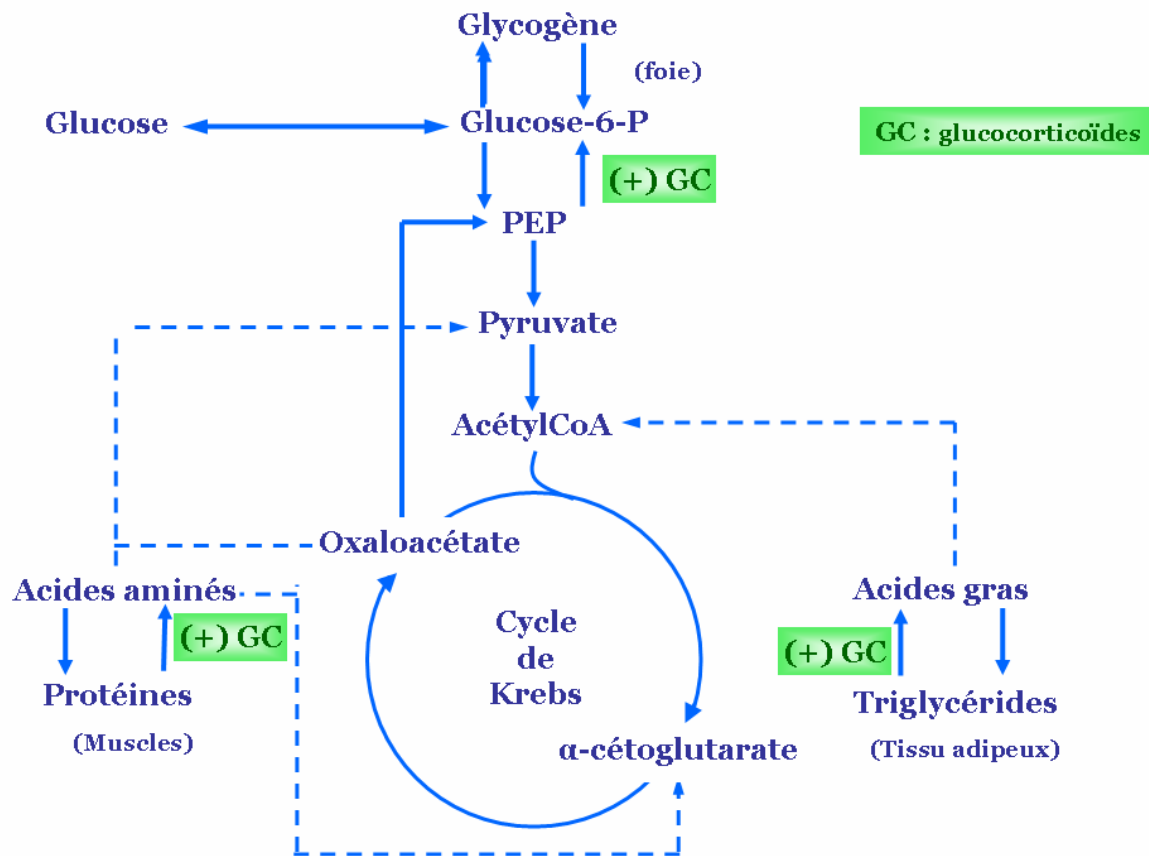
**Figure 11 : la molécule de dexaméthasone.**

Issu du site [www.emdbiosciences.com](http://www.emdbiosciences.com)



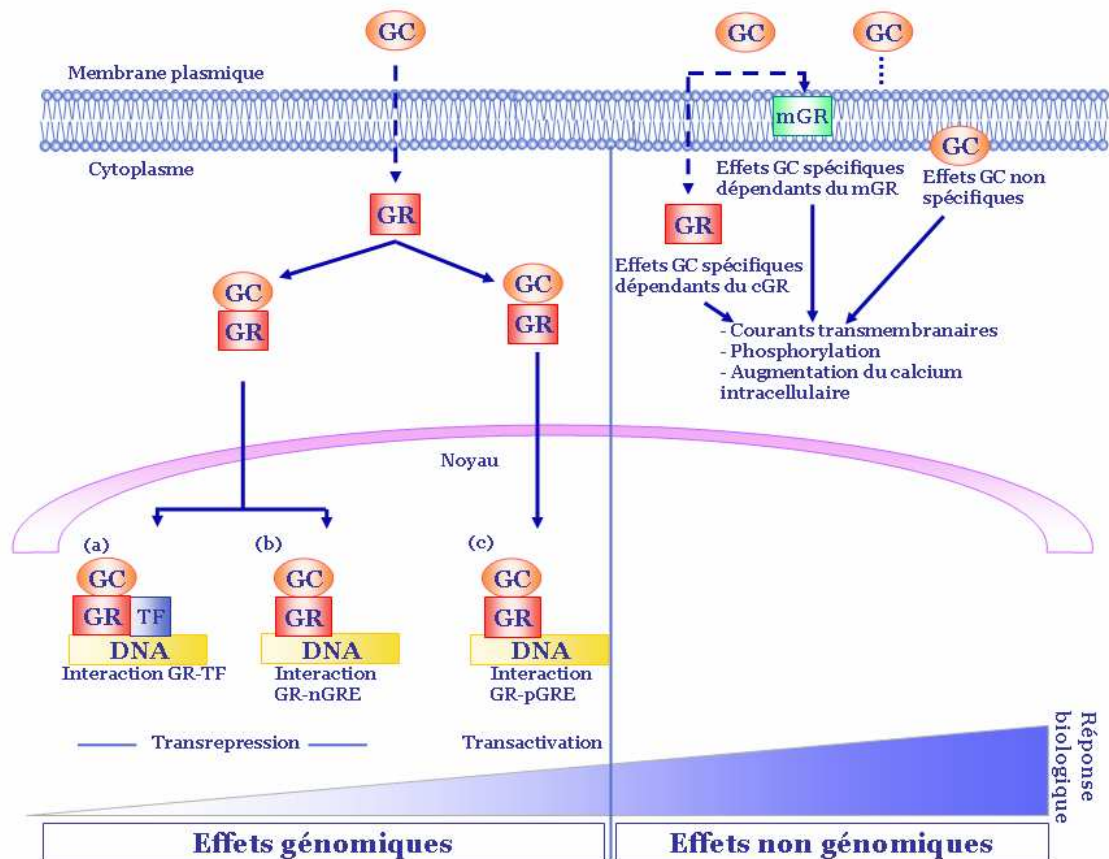
**Figure 12 : mécanismes de l'immunosuppression induite par les glucocorticoïdes.**

Les glucocorticoïdes sont les molécules les plus efficaces pour traiter les maladies inflammatoires chroniques telles que l'asthme. En effet, ces hormones sont au centre d'un réseau de régulation responsable de l'inhibition de la réponse inflammatoire. Ils sont à la fois responsable du blocage de la transcription de nombreuses molécules pro-inflammatoires (cytokines, chémokines ...) par l'intermédiaire des facteurs NFκB et AP1 et de l'activation de la transcription de molécules anti-inflammatoires (annexine 1, IL10, IκB...). D'après *Rhen et al, The New England Journal of Medicine, Octobre 2005.*



**Figure 13 : Réactions métaboliques régulées par les glucocorticoïdes.**

Les glucocorticoïdes sont des hormones cataboliques. Au niveau des muscles squelettiques, elles stimulent la dégradation des protéines et ralentissent leur synthèse. Dans le tissu adipeux, elles exercent un effet permissif sur la lipolyse. Les acides aminés issus de la dégradation protéique vont pouvoir être utilisés au niveau hépatique où ils vont servir de base à la néoglucogenèse, voie dont l'expression des enzymes clés (phosphoenolpyruvate carboxykinase et glucose 6 phosphatase notamment) est également stimulée par les glucocorticoïdes. D'après le site [coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch9s2b.htm](http://coproweb.free.fr/pagphy/physioan/ch9s2b.htm)



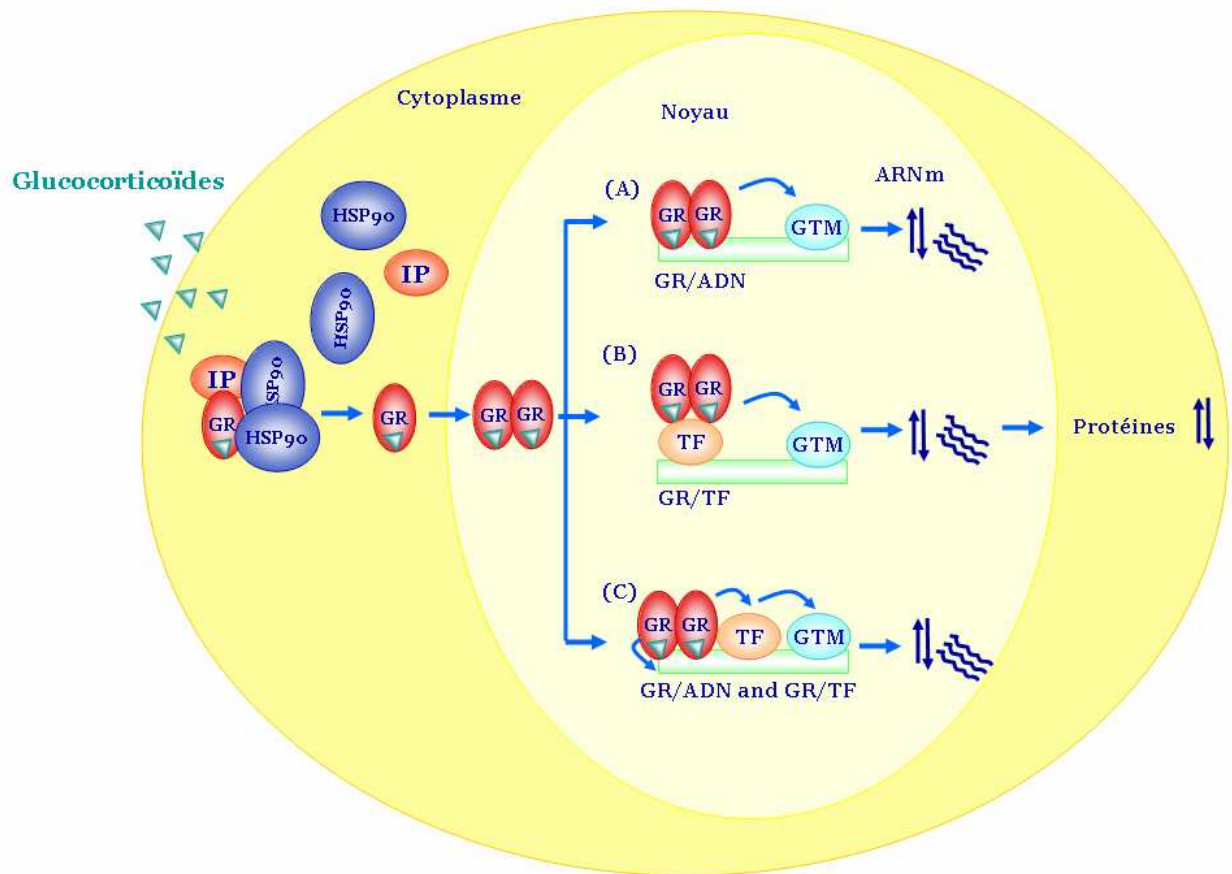
**Figure 14 : Classification des effets des glucocorticoïdes.**

Cette classification des effets génomiques et non génomiques des hormones stéroïdes a été établie lors du « First International Meeting on Rapid Response to Steroid Hormones » qui a eu lieu à Mannheim en 1998. Selon cette classification, les modes d'action des glucocorticoïdes et autres stéroïdes peut être divisés en deux (ici sont illustrées les voies d'action des glucocorticoïdes en particulier) :

- des actions génomiques impliquant la fixation de l'hormone sur son récepteur cytosolique, la translocation du complexe GR (Glucocorticoid Receptor)/ligand dans le noyau, sa fixation sur les régions GRE (Glucocorticoid Response Element) des gènes cibles induisant l'activation ou la répression de l'expression de ces derniers. Ces effets génomiques se manifestent plusieurs heures après l'ajout de l'hormone.

- des actions non génomiques mises en place quelques minutes voire quelques secondes après l'administration de l'hormone. Ces effets rapides peuvent eux-mêmes être divisés en deux classes : - les effets non spécifiques dus aux propriétés physico-chimiques des glucocorticoïdes et notamment à leur liposolubilité (modification de la conformation de certaines protéines membranaires parmi lesquelles certains canaux ioniques).

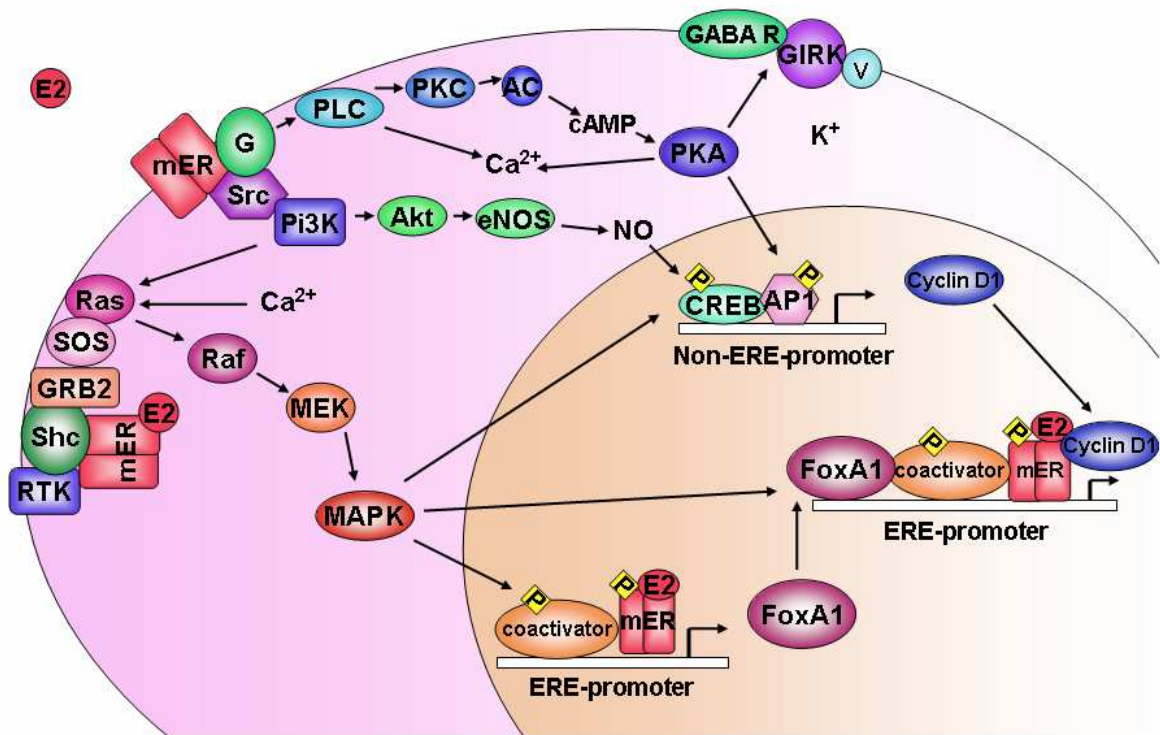
- les effets spécifiques nécessitant l'interaction entre l'hormone et un récepteur pouvant être le récepteur intracellulaire « classique » ou un récepteur membranaire apparenté ou non au GR cytosolique. D'après *Lowenberg et al., Trends in Molecular Medicine, Avril 2007.*



**Figure 15 : Actions génomiques des glucocorticoïdes.**

Les glucocorticoïdes diffusent librement à travers la membrane plasmique pour se lier de façon réversible à leur récepteur intracellulaire (GR). Cette fixation entraîne un changement de conformation permettant la libération des protéines chaperonnes (HSP 90 et immunophiline). Le complexe hormone/récepteur migre ensuite sous forme de dimère dans le noyau et par sa fixation sur une séquence GRE située dans le promoteur des gènes cibles (situation A) ou son interaction avec d'autres facteurs de transcription (situation B) régule l'expression de gènes cibles. Il existe des situations où le complexe hormone/ récepteur se fixe à la fois sur une séquence GRE et agit également par l'intermédiaire de facteurs de transcription fixés eux-aussi dans la région promotrice des gènes cibles (situation C). D'après *Zhou et Cidlowski, Steroids, Mai 2005*.





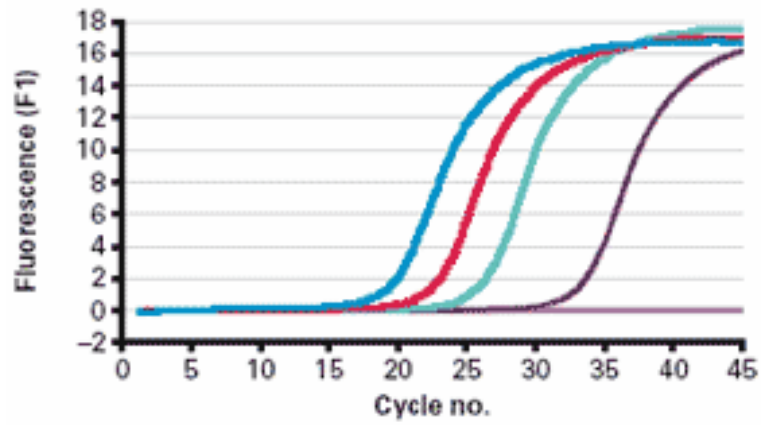
**Figure 16: Membrane Initiated Steroid Signaling.**

La liaison de l'hormone stéroïde sur son récepteur membranaire entraîne l'activation de différentes voies de signalisation intracellulaires aboutissant à l'activation de protéines kinases telles que les MAPK ou la protéine PKA, des protéines pouvant moduler, par phosphorylation, l'activité de certains facteurs de transcription. Par l'activation successive de protéines kinases, la fixation de l'hormone sur un site membranaire, impliqué surtout dans les effets rapides de ces hormones, peut également moduler, à plus long terme la transcription non seulement des gènes cibles de ces hormones mais également d'autres gènes ne contenant d'élément de réponse aux stéroïdes. D'après *Zhang et Trudeau, Comparative Biochemistry and Physiology, Juillet 2006.*

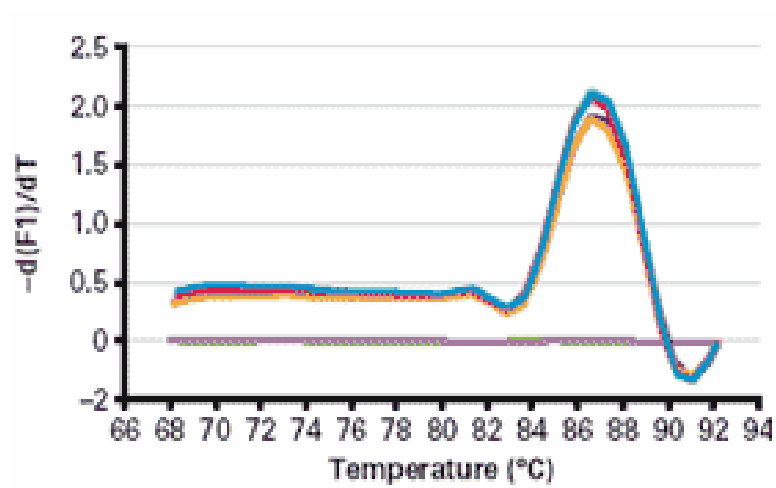
*Abréviations : G, G protein; PLC, phospholipase C; AC, adenylyl cyclase; GABA R, GABA receptor;  $\mu$ ,  $\mu$ -Opioid receptor; GRB2, growth factor receptor-bound protein 2; Ras, related RAS viral (r-ras) oncogene homolog; SOS, son of sevenless; Raf, v-raf-1 murine leukemia viral oncogene; MEK, mitogen/extracellular signal protein kinase.*



**Figure 17 : Extraction des ARN totaux à partir de cellules.**  
(D'après *RNeasy Mini Handbook*, Qiagen, Courtaboeuf, France)

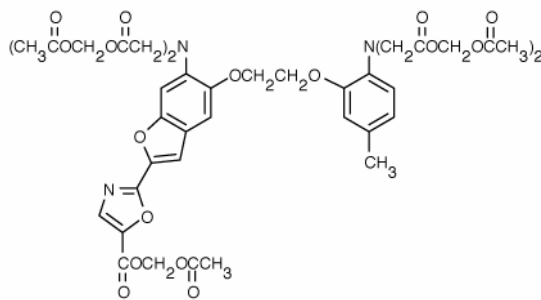


1. Courbe de quantification de la fluorescence du SYBR Green I

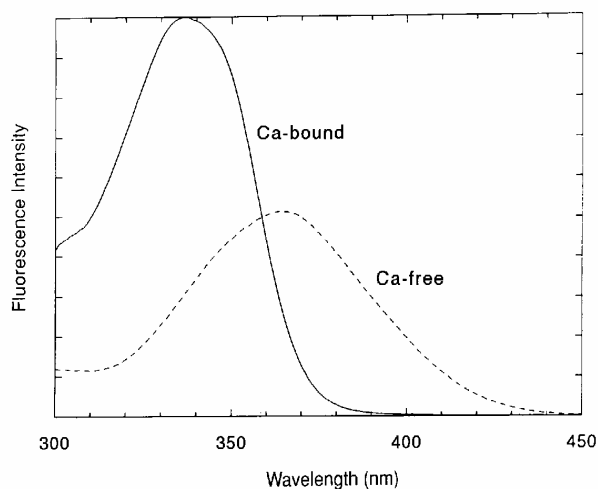


2. Courbe de fusion

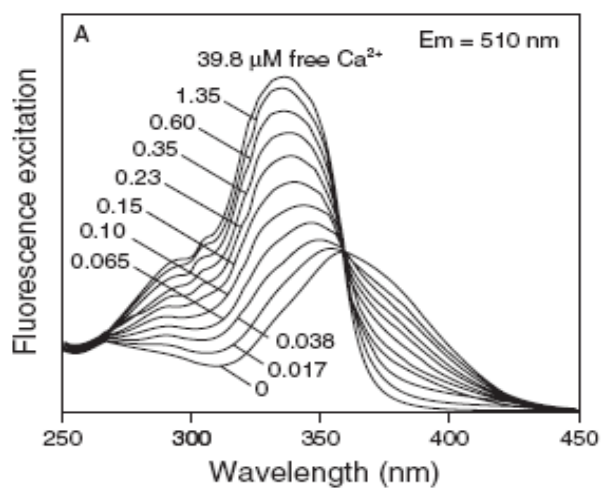
**Figure 18 : Courbes obtenues par microspectrofluorimétrie (technologie LightCycler®)**  
 (Données du site internet de Clontech, Takara bio Europe, Saint-Germain-en-Laye, France)



### 1. La molécule de FURA-2/AM

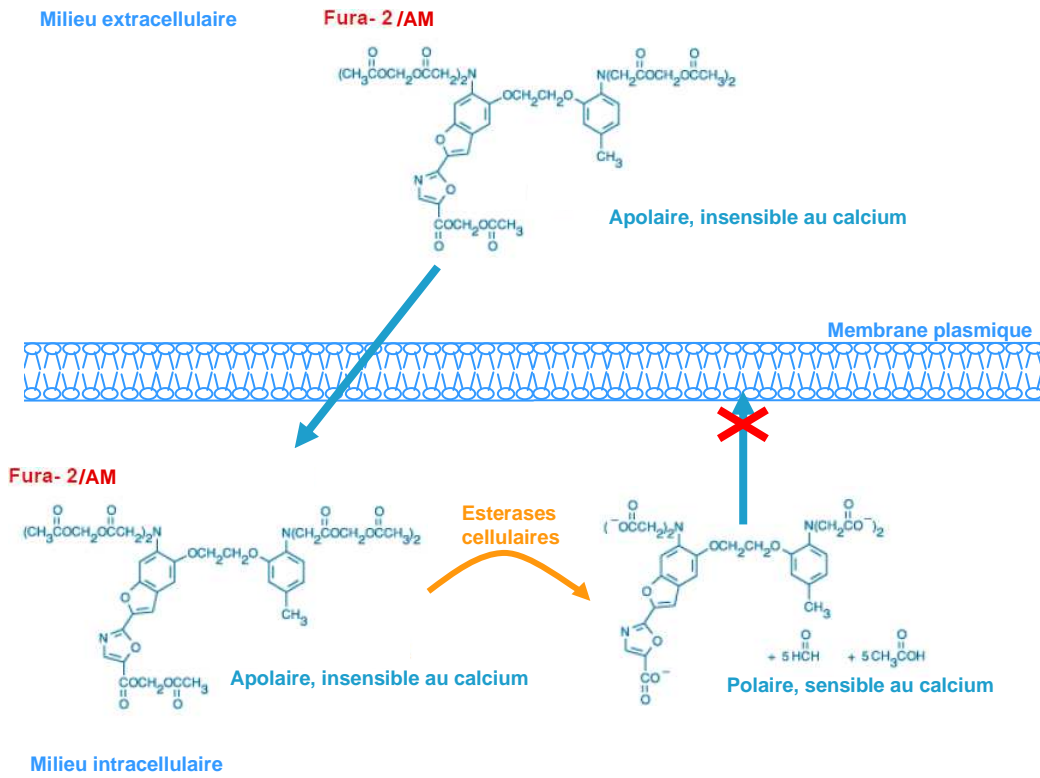


### 2. Fluorescence de la sonde FURA-2/AM en fonction de la longueur d'onde d'excitation

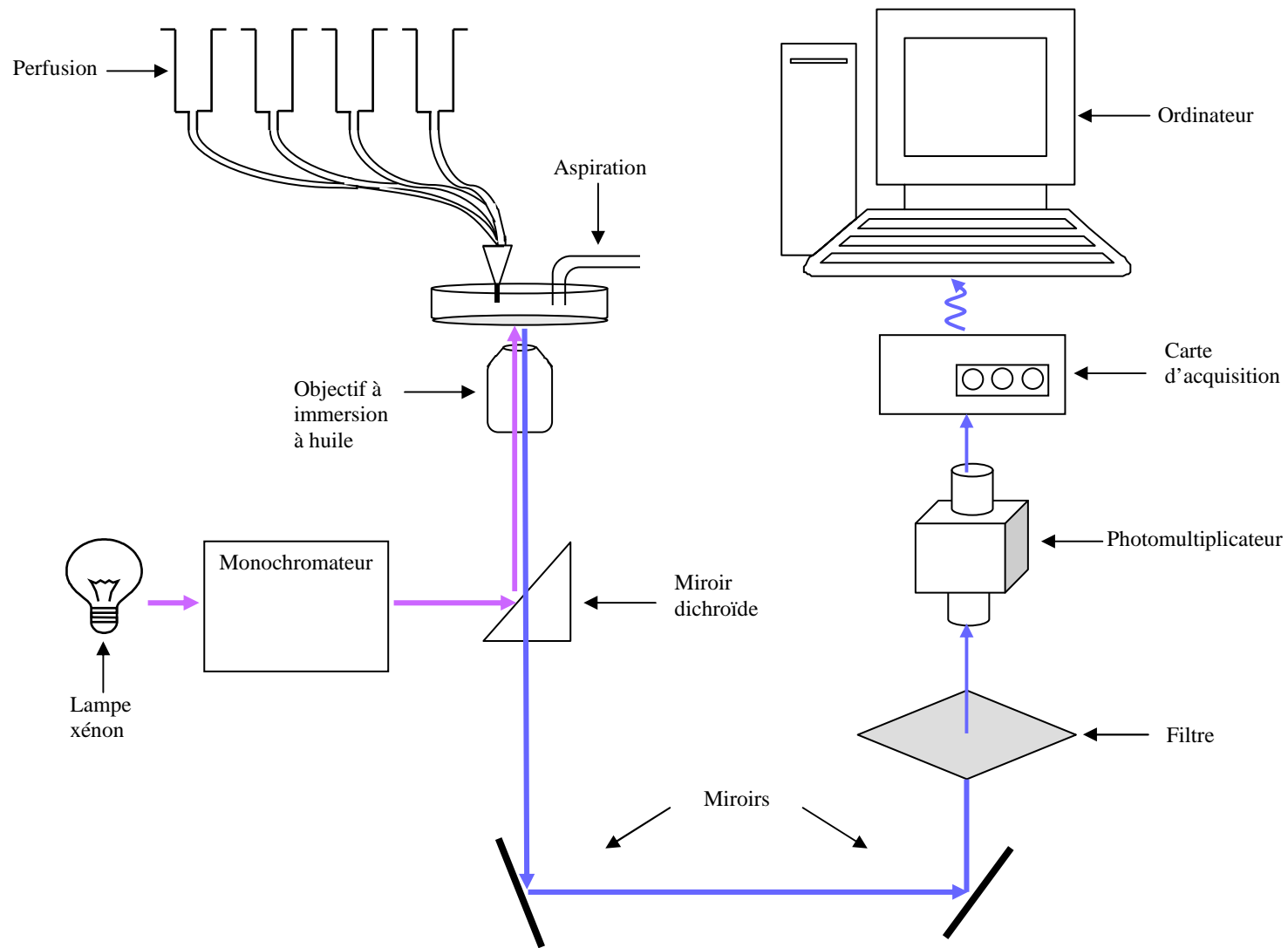


### 3. Fluorescence de la sonde FURA-2/AM en fonction de la concentration en calcium

**Figure 19 : Description des propriétés de la sonde FURA-2/AM**



**Figure 20 : Principe d'utilisation de la sonde FURA-2/AM**  
*(Adapté du site [www.biotek.com](http://www.biotek.com))*



**Figure 21 : Schéma du système de mesure utilisé pour la détection de la fluorescence de la sonde FURA-2/AM.**