



HAL
open science

Voies de régulation de la fonction mitochondriale dans les modèles de tumeurs thyroïdiennes

S. Le Pennec

► **To cite this version:**

S. Le Pennec. Voies de régulation de la fonction mitochondriale dans les modèles de tumeurs thyroïdiennes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université d'Angers, 2010. Français. NNT: . tel-00541313

HAL Id: tel-00541313

<https://theses.hal.science/tel-00541313>

Submitted on 30 Nov 2010

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.

**VOIES DE REGULATION DE LA FONCTION
MITOCHONDRIALE DANS LES MODELES DE TUMEURS
THYROÏDIENNES**

THESE DE DOCTORAT

Spécialité : Biologie Cellulaire

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

Présentée et soutenue publiquement

le : 15 juin 2010

à : Angers

par : Soazig LE PENNEC

Devant le jury ci-dessous :

M. Jacques E. DUMONT (Rapporteur), Professeur, Université Libre de Bruxelles

Mme Anne LOMBES (Rapporteur), Directrice de Recherche, Université Paris VI

M. Claude FOREST (Examineur), Directeur de Recherche, Université Paris Descartes

M. Bernard ROUSSET (Examineur), Professeur, Université Lyon 1

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

Co-directrice de thèse : Mme Frédérique SAVAGNER, Maître de Conférences,
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 tiens à exprimer tout d'abord mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Merci à Monsieur Jacques E. Dumont et Madame Anne Lombes d'avoir accepté d'être rapporteurs et de donner de leur temps pour juger ce travail.

Merci également à Messieurs Claude Forest et Bernard Rousset pour leur contribution à ce jury de thèse.

Je remercie Monsieur Yves Malthièry de m'avoir accueillie dans l'unité Inserm U694, de m'avoir donné les moyens de réaliser cette thèse et d'avoir examiné mon manuscrit.

Merci à Frédérique Savagner d'avoir encadré mon travail de thèse et de m'avoir fait profiter de son expérience. Je te remercie pour les conseils que tu as su m'apporter au cours de ma thèse et de la rédaction de ce mémoire qui ont permis d'orienter et de mener à bien ce travail.

Je remercie la région Pays de la Loire pour m'avoir financée pendant ces trois années de thèse, dans le cadre du projet CIMATH.

Merci Jocelyne pour tes qualités humaines et ton don unique pour raconter les histoires et écouter avec gentillesse celles que l'on te raconte dans l'ambiance calfeutrée de notre pièce de culture cellulaire (où j'ai passé tant d'heures en ta compagnie!).

Je remercie mes colocataires de bureau pour leurs conseils et leur bonne humeur tout au long de ces années de thèse.

Delphine, j'emmène avec moi les petits amis nés de tes travaux manuels : Madame chance et son ami ainsi que Monsieur Calcium et Madame NO. J'attends toujours de te faire découvrir la raclette aux légumes...

Nathalie, merci pour les bons moments passés à tes côtés, aussi bien dans la proximité des 30 cm qui séparent nos deux chaises de bureau qu'en dehors du labo, et...vivent les mises au point de PCR quantitatives et le chocolat!

Valérie, merci pour tes conseils « calciques et respiratoires » et ta présence aux heures où le laboratoire était vidé de la plupart de ses habitants.

Merci Dominique pour ta bonne humeur et ton esprit d'entraide. Travailler avec toi est un réel plaisir.

Je remercie Céline et Naïg pour leur aide au cours des journées de dosage de complexes. Même si vous n'aimez pas les RO82 W-1, cela mérite bien quelques petits Kinder...

Merci Virginie pour les discussions et les soirées sympathiques passées en ta compagnie.

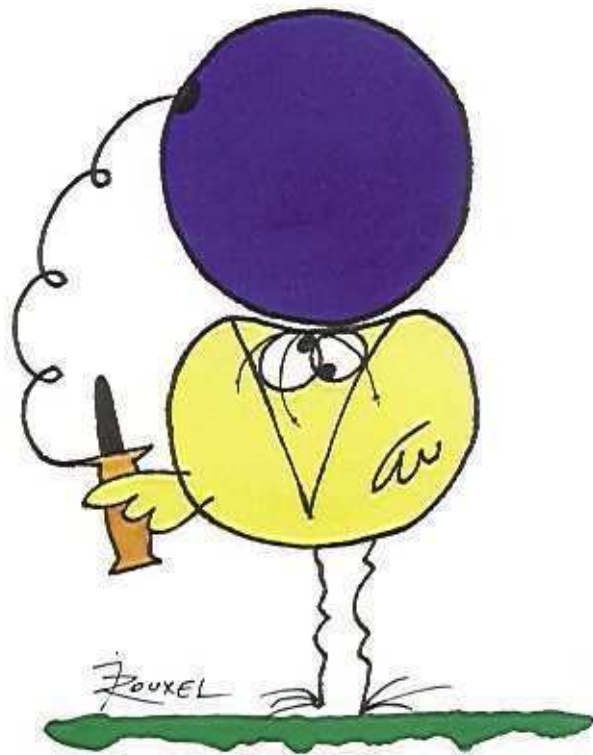
Un petit clin d'œil aux techniciennes d'UF3 pour tout ce que j'ai pu apprendre sur la maternité (avant même d'avoir des enfants!) grâce à leurs multiples anecdotes racontées en salle de repos pendant le déjeuner.

Je remercie tous les autres membres du laboratoire de Biochimie et Biologie Moléculaire pour leur aide et leur soutien.

Je tiens également à remercier les membres de l'UMR CNRS 6061 de Rennes (Yannick-Arlot Bonnemains, Jean-Guy Delcros, Xavier Le Goff, les M&M's...) qui ont participé dès mon stage de licence, par leur rigueur scientifique et leur bonne humeur, à confirmer mon envie de participer au monde de la recherche.

Enfin, je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien en dehors du labo. Merci pour tous les bons moments passés ensemble qui aident à supporter les difficultés rencontrées au cours de la thèse.

Les devises Shadok



EN ESSAYANT CONTINUUELLEMENT
ON FINIT PAR RÉUSSIR. DONC:
PLUS ÇA RATE, PLUS ON A
DE CHANCES QUE ÇA MARCHE.

Abréviations

AC : Adénylate Cyclase
acétyl coA : acétyl coenzyme A
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt : Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial
ADP : Adénosine DiPhosphate
ALA synthase : AminoLevulinic Acid synthase
AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique
AMPK : Adénosine MonoPhosphate-activated protein Kinase
ANT : Adénine Nucléotide Translocase
ARN : Acide RiboNucléique
ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1
ATF : Activating Transcription Factor
ATP : Adénosine TriPhosphate
BAX : Bcl-2-Associated X protein
Bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2
Bcl-XL : B-cell lymphoma-extra large
Bid : BH3-interacting domain death agonist
BN-PAGE : Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
CACT : Carnitine-AcylCarnitine Translocase
CaMK : Ca⁺⁺/CalModulin-dependent protein Kinase
CCCP : Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazone
cdk1 : cyclin-dependent kinase 1
ChIP-chip : Chromatin ImmunoPrecipitation on chip
CO₂ : dioxyde de carbone
COX : Cytochrome *c* OXYdase
CREB : cAMP Response Element Binding
CREM : cAMP Response Element Modulator
CRM1 : Chromosome Region Maintenance-1
DAG : Di-Acyl Glycérol
DCFDA : DiChlorodihydroFluorescein DiAcetate
DETA-NO : 2,2'-(hydroxynitrosohydrazino) *bis*-ethanamine
DHE : DiHydroEthidium
DO : Densité Optique
Duox : Dual oxidase
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase ou NOS3
Epac : Exchange protein activated by cAMP
ERAs : Espèces Réactives de l'Azote
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène
ERR : Estrogen-Related Receptor
ERRE : ERR Response Element
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée
FGF : Fibroblast Growth Factor
FH : Fumarate Hydratase
FSH : Follicle Stimulating Hormone
GABP : GA-Binding Protein
GDP : Guanosine DiPhosphate
GLUT-1 : GLUcose Transporter 1
GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique
GNAS : Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating
GPx : Glutathion Peroxydase
GSH/GSSG : Glutathion réduit/oxydé
GTP : Guanosine TriPhosphate
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HCF-1 : Host Cell Factor-1
hCG : human Chorionic Gonadotrophin
HEX : Haematopoietically EXpressed homeobox
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor-1 α
HT : Hormones Thyroïdiennes
IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1
IL1 : InterLeukine 1
iNOS : inducible Nitric Oxide Synthase ou NOS2
IP3 : Inositol tri-Phosphate
KO : Knock Out
LDH : Lactate DésHydrogénase
LH : Luteinizing Hormone
L-NAME : N^G-Nitro-L-Arginine-Méthyl Ester
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2
MKK 3/6 : Mitogen-activated protein Kinase Kinase 3/6
mTERF : mitochondrial transcription TERmination Factor
mtNOS : mitochondrial Nitric Oxide Synthase
mtTFB : mitochondrial Transcription Factor B
N₂O₃ : trioxyde de diazote
NAD : Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné
NADPH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné
NcoR : Nuclear receptor coRepressor
NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
NF κ B : Nuclear Factor-kappa B
NIS : Na⁺/I symporter
nNOS : neuronal Nitric Oxide Synthase ou NOS1
NO : monoxyde d'azote
NO₂ : nitrite

NOS : Nitric Oxide Synthase
NOX : NADPH OXidase
NPV : Noyau ParaVentriculaire
NRF : Nuclear Respiratory Factor
NTRK1 : Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor 1
O₂ : dioxygène
O₂⁻ : ion superoxyde
·OH : radical hydroxyle
ONOO⁻ : peroxydinitrite
OxPhos : Oxidative Phosphorylation
PAX8 : PAired boX protein 8
PDE : PhosphoDiEstérase
PDH : Pyruvate DésHydrogénase
PDK-1 : Phosphoinositide Dependent Kinase 1
PDK1 : Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1
PGC-1 : Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1
PhDs : Prolylhydroxylases
P_i : Phosphate inorganique
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PKA : Protéine Kinase A
PKB : Protéine Kinase B ou AKT
PKC : Protéine Kinase C
PLC : PhosphoLipase C
POLRMT : POLymerase (RNA) MiTochondrial
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor
PPFP : PAX8/PPAR γ
PRC : PGC-1-Related Coactivator
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
pVHL : protéine Von Hippel-Lindau
Q : ubiquinone
QH₂ : ubiquinol
RIP140 : Receptor-Interacting Protein 140
RXR : Retinoid X Receptor
SDH : Succinate DésHydrogénase
SDHAF2 : Succinate DeHydrogenase complex Assembly Factor 2
SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
shRNA : short hairpin RNA
siRNA : small interfering RNA
SMRT : Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptor
SNAP : (\pm)-S-Nitroso-N-AcetylPenicillamine
SOD : SuperOxyde Dismutase
Sp1 : Specificity protein 1
SRC-1 : Steroid Receptor Coactivator 1
T2 : 3,5-di-iodo-L-thyronine

T3 : 3,5,3' tri-iodo-thyronine
T4 : 3,5,3',5' tétra-iodo-thyronine ou thyroxine
TFAM : Transcription Factor A, Mitochondrial
TFB1M/TFB2M : Transcription Factor B1/2, Mitochondrial
TG : ThyroGlobuline
TGF : Transforming Growth Factor
ThOX : Thyroid OXidase
TIM : Translocase of the Inner Membrane
TNF : Tumor Necrosis Factor
TOM : Translocase of the Outer Membrane
TPO : ThyroPerOxydase
TR : Thyroid Receptor
TRE : Thyroid hormone Response Element
TRH : Thyrotropin-Releasing Hormone
TRX : ThioRedoXine
TSA : Thiol-Specific Antioxidant
TSH : Thyroid Stimulating Hormone ou thyrotropine
TSHR : Thyroid Stimulating Hormone Receptor
TTF : Thyroid Transcriptional Factor
UCP : UnCoupling Protein
VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel
Wnt : Wingless-type
YY1 : Yin Yang 1
 $\Delta\psi_m$: potentiel de membrane mitochondrial

Sommaire

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	1
I. La thyroïde.	2
A. Description.	2
B. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.	3
B.1. Structure des hormones thyroïdiennes.	3
B.2. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.	3
B.2.1. Captage de l'iodure.	4
B.2.2. Transport transmembranaire de l'iodure au pôle apical.	4
B.2.3. Organification de l'iodure et synthèse hormonale.	4
B.2.4. Sécrétion des hormones thyroïdiennes.	6
C. Action des hormones thyroïdiennes.	6
C.1. Effets des hormones thyroïdiennes.	6
C.1.1. Rôle dans le développement embryonnaire et foetal.	6
C.1.2. Effets métaboliques des hormones thyroïdiennes.	7
C.2. Modes d'actions des hormones thyroïdiennes.	7
C.2.1. Actions génomiques des hormones thyroïdiennes.	7
C.2.2. Actions non génomiques des hormones thyroïdiennes.	8
D. Contrôle de la fonction thyroïdienne.	9
D.1. La TSH.	9
D.2. Le récepteur à la TSH : TSHR.	9
D.3. Prolifération des thyrocytes : voies de signalisation impliquées dans l'action de la TSH. ...	10
D.3.1. Interaction du TSHR avec les protéines G.	10
o Protéines G α	11
o Protéines G $\beta\gamma$	11
D.3.2. Voies de signalisation activées par l'AMPc.	11
o Voie AMPc/PKA/CREB.	11
o Autre voie activée par l'AMPc.	12
E. Tumeurs thyroïdiennes.	13
E.1. Classification histologique des tumeurs différenciées.	14
E.1.1. Adénomes thyroïdiens.	14
E.1.2. Carcinomes thyroïdiens.	15
o Carcinomes papillaires.	15
o Carcinomes folliculaires.	15
o Carcinomes oncocytaires thyroïdiens.	15
E.2. Tumorigenèse thyroïdienne différenciée.	15
E.2.1 Oncogènes impliqués dans la tumorigenèse thyroïdienne.	16
o RAS.	16
o Réarrangements RET/PTC.	16
o Mutations de BRAF.	17
o Protéine de fusion PFPF.	18
E.2.2. Implication de la voie PI3K/AKT dans la tumorigenèse et la progression tumorale thyroïdiennes.	18
E.2.3. Autres Facteurs impliqués dans la tumorigenèse thyroïdienne.	19
o Facteurs de différenciation.	19
o TSHR et GNAS.	19
II. La mitochondrie.	20

A. Structure	20
B. La chaîne respiratoire mitochondriale	21
B.1. Fonctionnement de la phosphorylation oxydative	21
B.2. Composition du système de phosphorylation oxydative	22
B.2.1. Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase	22
B.2.2. Complexe II : succinate ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase	23
B.2.3. Complexe III : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase ou complexe cytochrome bc ₁	23
B.2.4. Complexe IV : cytochrome c oxydase (COX)	24
B.2.5. ATP synthase	24
B.2.6. Organisation en supercomplexes	25
B.3. Production d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie et systèmes de détoxification	25
C. Régulation de la phosphorylation oxydative	27
C.1. Contrôle respiratoire	27
C.2. Expression d'isoformes	27
C.3. Contrôle allostérique	27
C.4. Régulation par phosphorylation réversible	28
C.4.1. Phosphorylation du complexe I	28
C.4.2. Phosphorylation du complexe IV	28
C.5. Inhibition de la chaîne respiratoire par le monoxyde d'azote (NO)	29
C.5.1. Les NO synthases	29
C.5.2. Actions du NO sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire	30
C.6. Contrôle du rendement de la phosphorylation oxydative	31
C.6.1. Découplage extrinsèque : fuite de protons	32
o Fuite basale	32
o Fuite inductible	33
C.6.2. Découplage intrinsèque : patinage des pompes à protons	34
C.7. Régulation de la phosphorylation oxydative par le calcium	35
C.7.1. Modulation de l'apport de substrats et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire	35
C.7.2. Modulation de l'homéostasie des EROs	36
D. Biogenèse mitochondriale	37
D.1. Facteurs de transcription gouvernant les interactions noyau-mitochondrie	37
D.1.1. NRFs (Nuclear Respiratory Factors)	38
D.1.2. ERRs (Estrogen-Related Receptors)	39
D.1.3. PPARs	41
D.1.4. CREB	41
D.1.5. Sp1 (Specificity protein 1)	41
D.1.6. YY1 (Yin Yang 1)	41
D.1.7. c-MYC	42
D.2. Coactivateurs nucléaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale	42
D.2.1. PGC-1 α	42
o Implications de PGC-1 α dans le fonctionnement mitochondrial	43
o Voies de signalisation régulant l'expression de PGC-1 α	44
D.2.2. PGC-1 β	46
D.2.3. PRC	47
D.3. Calcium et biogenèse mitochondriale	49
E. Voie de signalisation rétrograde mitochondriale	50

E.1. Médiateurs clefs du dialogue rétrograde : calcium et EROs.....	51
E.2. Dialogue rétrograde et cancer.	52
F. Métabolisme énergétique et cancer.	54
F.1. HIF-1 α et régulation enzymatique du métabolisme énergétique.....	54
F.2. Gènes suppresseurs de tumeurs, oncogènes et régulation du métabolisme énergétique.	55
F.3. Métabolisme énergétique des oncocytomes thyroïdiens.	56
III. Problématique du travail de thèse.....	59
MATERIELS ET METHODES.....	62
I. Lignées cellulaires et réactifs.	63
A. Cellules.	63
B. Réactifs utilisés pour le traitement des cellules.	64
II. Inhibition de l'expression de PRC par siRNA.....	65
III. Extraction des ARNs totaux à partir de cellules.....	66
IV. Extraction d'ADN.	67
V. Transcription inverse (RT).....	67
VI. RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) quantitative.....	68
A. Principe de la technique.....	68
B. Protocole.....	68
VII. Dosage de l'activité de la NADH ubiquinone réductase (complexe I) sur cellules.	70
A. Principe de la technique.....	70
B. Réactifs.	70
C. Protocole.....	72
VIII. Dosage de l'activité de la succinate ubiquinone réductase (complexe II) sur cellules.	73
A. Principe de la technique.....	73
B. Réactifs.	74
C. Protocole.....	76
IX. Dosage de l'activité de l'ubiquinol cytochrome <i>c</i> reductase (complexe III) sur cellules.	77
A. Principe de la technique.....	77
B. Réactifs.	78
C. Protocole.....	80
X. Dosage de l'activité de la cytochrome <i>c</i> oxydase (complexe IV) sur cellules.....	81
A. Principe de la technique.....	81
B. Réactifs.	82
C. Protocole.....	83
XI. Dosage de l'activité de la citrate synthase sur cellules.....	84
A. Principe de la technique.....	84
B. Réactifs.	84

C. Protocole.....	85
XII. Dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) sur cellules.	86
A. Principe de la technique.....	86
B. Réactifs.....	87
C. Protocole.....	87
XIII. Mesure de la concentration intracellulaire en calcium.....	88
A. Principe de la technique.....	88
B. Réactifs.....	89
C. Protocole.....	90
XIV. Détection de protéines par la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). 92	92
A. Principe de la technique.....	92
B. Protocole.....	92
XV. Détection de protéines par Western-Blot.....	94
A. Principe de la technique.....	94
B. Réactifs.....	94
C. Protocole.....	96
XVI. Dosage du monoxyde d'azote.....	99
A. Principe de la technique.....	99
B. Protocole.....	99
XVII. Dosage du potentiel de membrane mitochondrial.....	99
A. Principe de la technique.....	99
B. Protocole.....	100
XVIII. Statistiques.....	100
RESULTATS ET DISCUSSION	101
Article n°1	102
Article n°2	124
Article n°3	140
Travail complémentaire.....	170
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	172
BIBLIOGRAPHIE	182
PUBLICATIONS.....	205

Données bibliographiques

I. La thyroïde.

A. Description.

- **Anatomie** : la glande thyroïde est un corps impair et médian appliqué sur la partie antérieure de l'axe laryngotrachéal. Elle présente une partie moyenne, mince et étroite, appelée isthme, et deux parties latérales volumineuses, les lobes droit et gauche. Du bord supérieur de l'isthme part un prolongement supérieur de hauteur variable : le lobe pyramidal (figure I1). Les dimensions de cette glande sont d'environ 5 cm de large (à la partie moyenne des deux lobes), 5 cm de haut (pour chaque lobe) et 1,5 cm d'épaisseur. Ces dimensions sont plus importantes chez la femme que chez l'homme. Le volume (10 à 28 ml) et le poids de la glande thyroïde (15 à 30 g) subissent des variations notables en fonction des saisons et surtout chez la femme en fonction des différentes étapes de l'activité génitale. Située au tiers inférieur du cou, elle est maintenue par sa capsule fibreuse et surtout par des adhérences à la trachée et à la gaine carotidienne. Elle a une très riche vascularisation sanguine.

- **Histologie** : l'unité fonctionnelle de la thyroïde est le follicule thyroïdien, sphère de 200 à 300 μm de diamètre constituée d'une paroi épithéliale et d'un contenu amorphe, pâteux et jaunâtre : la colloïde (figure I2). L'épithélium est unistratifié et contient des cellules folliculaires, majoritaires, et des cellules plus claires, dites parafolliculaires. Les cellules folliculaires sont encore appelées cellules vésiculaires ou thyrocytes. Le pôle basal des cellules folliculaires repose sur la lame basale du follicule, en contact avec les capillaires, alors que leur pôle apical, recouvert de microvillosités, se projette dans la colloïde. Le noyau est central et d'autant plus basal que la cellule est active. Les organites présents dans le thyrocyte sont d'autant plus développés et la colloïde réduite que la glande est hyperactive. Les cellules parafolliculaires (ou cellules C) représentent moins de 1 % du parenchyme thyroïdien. Elles sont plaquées contre la lame basale qui limite le follicule thyroïdien, et n'entrent jamais en contact avec la colloïde. Elles sont caractérisées par la présence de grains de sécrétion contenant de la calcitonine.

- **Contrôle moléculaire de l'ontogenèse thyroïdienne** : l'organogenèse et l'histogenèse thyroïdiennes sont sous la dépendance de mécanismes moléculaires complexes impliquant les facteurs de transcription spécifiques de la thyroïde. Initialement identifiés par leur capacité à lier les séquences régulatrices de gènes codant des protéines spécifiques des cellules folliculaires de la thyroïde, les TTFs (Thyroid Transcriptional Factors) se sont

révélés, dans des modèles murins d'inactivation génique, des acteurs essentiels de la migration et du développement de l'ébauche thyroïdienne. Ils sont au moins au nombre de quatre et incluent les facteurs TTF1, le premier exprimé lors de l'ébauche thyroïdienne, TTF2, facteur pouvant être spécifiquement impliqué dans la migration thyroïdienne, PAX8 (PAired boX protein 8), indispensable à la différenciation des cellules endodermiques en cellules folliculaires et HEX (Haematopoietically EXpressed homeobox), facteur impliqué plus généralement dans l'organogenèse de tous les dérivés de l'intestin pharyngien. Aucun de ces facteurs n'est totalement spécifique du tissu thyroïdien. En effet, TTF1 et HEX sont présents conjointement dans le poumon, PAX8 est aussi exprimé au niveau du rein. Cependant, la thyroïde est le seul tissu où ils sont tous conjointement exprimés. Chez les souris dépourvues de l'un ou l'autre de ces facteurs, la thyroïde est absente ou fortement hypoplasique.

B. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

B.1. Structure des hormones thyroïdiennes.

Les hormones produites par la glande thyroïde sont dérivées de la thyroglobuline (TG), protéine riche en acides aminés tyrosines. Elles contiennent des groupements acide (COOH) et amine primaire (NH₂) ainsi que deux noyaux phénols, appelés anneaux interne et externe (figure I3). Sur les anneaux sont branchés trois ou quatre atomes d'iode pour former la thyroxine (ou T4 ou 3,5,3',5' tétra-iodo-thyronine) et la 3,5,3' tri-iodo-thyronine (ou T3). La T3 n'est produite par la thyroïde qu'en quantité réduite (20 %). Elle provient essentiellement de la désiodation de l'anneau externe de la T4 par les tissus cibles périphériques (foie, rein, muscle, cerveau) ; cette production périphérique s'adapte aux conditions physiologiques puisque seule la T3 est l'hormone ayant une activité nucléaire au niveau périphérique.

B.2. Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

La biosynthèse des hormones thyroïdiennes (figure I4) comprend les étapes permettant la mise à disposition de l'iode pour son incorporation dans les précurseurs des hormones thyroïdiennes, les étapes permettant son incorporation dans la thyroglobuline (phase d'organification de l'iodure) et les étapes de libération des hormones thyroïdiennes dans le sang.

B.2.1. Captage de l'iode.

L'organisme puise l'iode dont il a besoin dans les aliments issus de la mer et le sel de table supplémenté. Il existe également une production d'iode endogène liée à la désiodation périphérique et intrathyroïdienne des hormones thyroïdiennes et de leurs catabolites. L'ion iodure est activement capté au pôle basolatéral des cellules folliculaires par le symporteur du sodium et de l'iode (NIS) (Dai *et al.*, 1996 ; Smanik *et al.*, 1996). Le gradient de Na^+ est assuré par une ATPase dépendante du Na^+ et du K^+ (Bizhanova et Kopp, 2009). Dans la thyroïde, NIS est exprimé spécifiquement à la membrane basolatérale des cellules folliculaires. La TSH (Thyroid Stimulating Hormone ou thyrotropine), par l'intermédiaire de son récepteur lui aussi situé au niveau basolatéral, augmente à la fois l'expression et l'activité du NIS (Bizhanova et Kopp, 2009). De plus, l'expression du NIS est sous la dépendance des facteurs TTF1, TTF2 et PAX8. Le NIS est également exprimé dans d'autres tissus tels que les glandes salivaires ou, au cours de l'allaitement, dans les glandes mammaires où il permet un transport actif de l'iode.

B.2.2. Transport transmembranaire de l'iode au pôle apical.

Le transport transmembranaire de l'iode au pôle apical nécessite un transporteur protéique actif : la pendrine. Dans la thyroïde, elle est spécifiquement exprimée au pôle apical des thyrocytes, avec une intensité variable d'un thyrocyte à l'autre et d'un follicule à l'autre (Royaux *et al.*, 2000). La pendrine se comporte comme un transporteur d'iode et de chlorure (Bizhanova et Kopp, 2009). Son expression à la membrane apicale augmente rapidement après traitement de cellules thyroïdiennes de rat PCCL3 avec de la TSH (Kopp *et al.*, 2008). L'expression de ce transporteur ne se limite pas au tissu thyroïdien. La pendrine est notamment exprimée en quantité importante au niveau du rein et de l'oreille interne. Une mutation du gène codant pour cette protéine est responsable du syndrome de Pendred caractérisé par une surdité et une hypothyroïdie (Kopp, 1999). Par ailleurs, d'autres canaux ou transporteurs pourraient être également impliqués dans la régulation de l'efflux apical de l'iode dans les thyrocytes, mais leur identité n'est pas déterminée au niveau moléculaire actuellement (Kopp *et al.*, 2008).

B.2.3. Organification de l'iode et synthèse hormonale.

L'iode capté par la cellule folliculaire et excrété dans la colloïde est incorporé à la thyroglobuline, support essentiel de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Cette incorporation est appelée organification de l'iode : celui-ci est dit alors iode organique. La

thyroglobuline est synthétisée dans la cellule folliculaire et excrétée dans la colloïde. Sous l'action de la thyroperoxydase (TPO), l'iode est couplé à certains résidus transformés de tyrosine présents dans la thyroglobuline. Dans cette réaction, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 est un élément limitant et sa mise à disposition dépend du système générateur d' H_2O_2 . La thyroglobuline iodée s'accumule dans la colloïde, assurant ainsi un stockage des hormones thyroïdiennes sous la forme de pro-hormones inactives dans un espace clos isolé des influences métaboliques non spécifiques. Sous la stimulation de facteurs spécifiques, la thyroglobuline est réabsorbée par la cellule folliculaire et clivée dans des vésicules lysosomiales de façon à libérer les hormones thyroïdiennes (figure I4).

Thyroglobuline : la thyroglobuline est une protéine spécifiquement produite par la glande thyroïde (Damante *et al.*, 2001). Cette particularité est d'ailleurs utilisée en pratique clinique dans la surveillance des cancers thyroïdiens différenciés après exérèse chirurgicale. L'iodation de certains résidus tyrosines de la thyroglobuline aboutit à la formation d'iodotyrosines et le couplage de deux iodotyrosines permet la formation d'iodothyronines T3 ou T4 (figure I3). Le gène de la thyroglobuline est un gène très long dont l'expression transcriptionnelle est stimulée par TTF1, PAX8, et indirectement par la TSH et l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor 1) et inhibée par TTF2 et HEX (Vlaeminck-Guillem, 2003).

Thyroperoxydase : elle est responsable de l'oxydation de l'iodure, de son incorporation ultérieure dans la thyroglobuline et du couplage des iodotyrosines en iodothyronines. Elle est située au pôle apical de la cellule folliculaire. L'expression du gène codant pour la TPO est strictement limitée à la cellule folliculaire thyroïdienne et est stimulée par la TSH (Vlaeminck-Guillem, 2003).

Système générateur d' H_2O_2 : l'activité catalytique de la TPO dépend strictement de l'oxydation de son hème par une molécule de peroxyde d'hydrogène. Elle utilise de plus une molécule d' H_2O_2 à chaque fois qu'elle incorpore un atome d'iode sur une tyrosine ou qu'elle réalise un couplage d'iodotyrosines en iodothyronines. L'enzyme responsable de la génération d' H_2O_2 est une NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogéné) OXYdase (NOX) spécifique de la thyroïde : la thyroïde oxydase ThOX/Duox (Thyroid OXidase/Dual oxidase) (De Deken *et al.*, 2000 et 2002). Présente à la membrane apicale de la cellule folliculaire, elle produit l' H_2O_2 à partir du NADPH, de l'oxygène et d'un ion hydrogène. Deux isoformes, Duox1 et Duox2, existent. Leur fonctionnement est activé par l'augmentation de la concentration en calcium intracellulaire dépendante de la TSH et par des

phosphorylations médiées par la protéine kinase A (PKA) pour Duox1 et par la protéine kinase C (PKC) pour Duox2 (Rigutto *et al.*, 2009). Les interactions entre la TPO et l' H_2O_2 aboutissent à la formation de radicaux libres qui participent aux modifications protéiques de la TG aboutissant à la synthèse des hormones thyroïdiennes. L'excès de radicaux libres, ou stress oxydatif, entraîne des effets délétères sur la structure et la fonction des protéines et des acides aminés. La thyroïde présente certaines caractéristiques constituant des parades aux effets du stress oxydatif : les réactions chimiques de synthèse des hormones thyroïdiennes ont lieu dans la colloïde ce qui préserve les cellules épithéliales, la thyroïde présente un potentiel antioxydant très élevé mais un très faible potentiel de multiplication. Cependant, l'efficacité de ces parades peut se révéler insuffisante et conduire à différentes pathologies de la glande thyroïde comme les cancers.

B.2.4. Sécrétion des hormones thyroïdiennes.

La première phase de sécrétion des hormones thyroïdiennes est la recapture de la TG stockée dans la colloïde par la cellule folliculaire (Hatipoglu et Schneider, 1999). Cette étape utilise un procédé d'endocytose qui est stimulé par la TSH. La thyroglobuline iodée internalisée est ensuite transférée vers un lysosome où elle va être digérée ce qui va générer les hormones T3 et T4 qui sont ensuite sécrétées dans la circulation sanguine au niveau de la membrane basolatérale.

C. Action des hormones thyroïdiennes.

Le maintien de la sécrétion thyroïdienne au cours de l'évolution suggère un rôle fondamental des hormones thyroïdiennes. Les déficits ou excès en hormones thyroïdiennes perturbent le fonctionnement de multiples organes et tissus, tels que le tissu osseux, le muscle, le système nerveux central et l'intestin.

C.1. Effets des hormones thyroïdiennes.

C.1.1. Rôle dans le développement embryonnaire et fœtal.

Chez l'homme, les conséquences d'un déficit embryonnaire ou fœtal en hormones thyroïdiennes se remarquent essentiellement au niveau du squelette et du système nerveux. Dans l'os, elles apparaissent plus nécessaires à l'ossification qu'à la croissance (Bassett *et al.*, 2007). Dans le système nerveux, les hormones thyroïdiennes jouent un rôle fondamental dans

la différenciation et la migration neuronales, la différenciation gliale et la synaptogenèse (Leonard, 2008).

C.1.2. Effets métaboliques des hormones thyroïdiennes.

L'action générale des hormones thyroïdiennes est de stimuler les métabolismes. Elles augmentent en effet la consommation d'oxygène dans tous les tissus et la production de chaleur par l'organisme en favorisant la thermogenèse inhérente aux réactions métaboliques (Silva, 1995). Elles sont hyperglycémiantes en accélérant notamment l'absorption intestinale de glucose et en accroissant la glycogénolyse. Elles stimulent également l'utilisation cellulaire du glucose. Dans le métabolisme protidique, les hormones thyroïdiennes stimulent à la fois la synthèse protidique et, de manière prédominante, le catabolisme protidique. L'action de ces hormones sur le métabolisme lipidique est également complexe avec une action stimulatrice de la synthèse du cholestérol aux concentrations physiologiques mais inhibitrice à des concentrations supérieures.

C.2. Modes d'actions des hormones thyroïdiennes.

C.2.1. Actions génomiques des hormones thyroïdiennes.

Au niveau du noyau, les hormones thyroïdiennes exercent leur activité de contrôle de l'expression des gènes par l'intermédiaire des récepteurs nucléaires thyroïdiens. Les récepteurs thyroïdiens (TRs) sont codés par deux gènes, *TR α* et *TR β* , codant pour plusieurs isoformes : TR α 1, TR α 2, TR β 1 et TR β 2 (Yen, 2001). La nature de la réponse transcriptionnelle est déterminée par le type cellulaire, l'environnement du promoteur et le statut hormonal (Aranda et Pascual, 2001). Dans la plupart des cas, les TRs sont des répresseurs transcriptionnels en absence de la T3 ou de la T4 et deviennent des activateurs après liaison de leur ligand. L'affinité de la T4 pour les TRs est beaucoup plus faible que celle de la T3, ce qui fait de la T3 le ligand naturel des TRs (Yen *et al.*, 2006). L'activité de régulation de l'expression de gènes par les TRs est exercée par la liaison de ces récepteurs à des séquences spécifiques de l'ADN, les TREs (Thyroid hormone Response Elements) au niveau des promoteurs des gènes cibles des hormones thyroïdiennes (figure I5). Les TRs peuvent lier l'ADN sous forme de monomère, d'homodimère ou d'hétérodimère avec le récepteur de l'acide rétinoïque RXR (Diallo *et al.*, 2007). La présence de corépresseurs ou de coactivateurs au niveau des TREs présents dans le promoteur ainsi que des modifications post-transcriptionnelles des TRs, telles que les phosphorylations, régulent leur activité transcriptionnelle (Yen, 2001). En absence de la T3, l'activité transcriptionnelle intrinsèque

des TRs est inhibée, en raison de la liaison à des corépresseurs comme NcoR (Nuclear receptor coRepressor) ou SMRT (Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid hormone receptor) qui empêchent la fixation de la machinerie transcriptionnelle sur le promoteur du gène cible. La liaison de la T3 sur le TR permet le relargage des corépresseurs et la fixation d'un nouveau complexe protéique, constitué de coactivateurs tels que SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator 1). La fixation de la machinerie transcriptionnelle permet alors l'expression du gène cible. Certains gènes cibles, tels que des gènes codant les sous-unités de la TSH, sont régulés négativement : leur expression est stimulée en absence de la T3 et la présence de l'hormone la réduit. Des anomalies du gène *TRβ* sont retrouvées dans les syndromes familiaux de résistance aux hormones thyroïdiennes (Yen, 2001). Ces anomalies sont majoritairement transmises sur un mode autosomique dominant. Elles affectent souvent le domaine de liaison à la T3 et s'accompagnent d'une diminution de l'affinité pour l'hormone. Le domaine de liaison à l'ADN est conservé, permettant au TRβ muté de lier l'ADN et d'entrer en compétition avec les isoformes fonctionnelles (effet dominant négatif).

C.2.2. Actions non génomiques des hormones thyroïdiennes.

Les actions des hormones thyroïdiennes n'impliquent pas forcément les TRs nucléaires et sont dans ce cas non génomiques. Les mécanismes de ces actions non génomiques dépendent de systèmes cellulaires de transduction du signal et de la présence de nouveaux récepteurs thyroïdiens à la surface des cellules, de TRβ extranucléaires ou de dérivés de TRα (Davis *et al.*, 2008). Cependant, les actions des hormones thyroïdiennes qui débutent de manière non génomique par l'intermédiaire d'un récepteur à la surface de la cellule peuvent aboutir à des évènements complexes nucléaires et cellulaires. L'action des hormones thyroïdiennes peut s'exercer sur la mitochondrie en induisant l'expression de protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire ou le génome mitochondrial, impliquées dans les réactions enzymatiques énergétiques de la mitochondrie (Psarra et Sekeris, 2009). Alors que les effets stimulateurs de la T3 sur le métabolisme mitochondrial nécessitent la transcription de gènes (inhibition de ces effets par l'ajout d'actinomycine D), les effets stimulateurs de la 3,5-di-iodo-L-thyronine (T2), plus rapides que ce qui est observé avec la T3, sont médiés par une interaction directe avec la mitochondrie (Goglia, 2005).

D. Contrôle de la fonction thyroïdienne.

L'axe hypothalamo-hypophysaire est contrôlé à de multiples niveaux (figure I6). La TRH (Thyrotropin-Releasing Hormone) produite au niveau de l'hypothalamus induit la synthèse de la TSH au niveau de l'hypophyse. La sécrétion des hormones thyroïdiennes par la glande thyroïde est principalement sous le contrôle de la TSH. Cette hormone stimule spécifiquement la prolifération des cellules folliculaires, l'expression de plusieurs des acteurs de la biosynthèse hormonale et la libération des hormones thyroïdiennes dans le sang. En retour, les hormones thyroïdiennes inhibent la synthèse de la TRH et de la TSH, principaux acteurs de la régulation de la fonction thyroïdienne (Chiamolera et Wondisford, 2009). Les actions de la TSH sur les cellules thyroïdiennes passent par sa fixation à un récepteur membranaire spécifique, le TSHR (TSH Receptor). La fixation de la TSH à son récepteur permet la transduction du signal d'activation de la TSH grâce à un relais avec des effecteurs enzymatiques qui produisent les seconds messagers intracellulaires comme l'AMPc (Adénosine MonoPhosphate cyclique) ou le phosphatidylinositol. D'autres signaux extracellulaires modulent également la fonction thyroïdienne : des neurotransmetteurs tels que les prostaglandines, la noradrénaline ou l'acétylcholine, des facteurs de croissance tels que le FGF (Fibroblast Growth Factor), l'insuline et l'IGF-1 qui stimulent globalement la fonction thyroïdienne et le TGF (Transforming Growth Factor) qui l'inhibe, ainsi que des cytokines comme le TNF α (Tumor Necrosis Factor α), le TNF β , l'interféron et l'interleukine 1 qui sont plutôt des inhibiteurs.

D.1. La TSH.

Comme la FSH (Follicle Stimulating Hormone), la LH (Luteinizing Hormone) et l'hCG (human Chorionic Gonadotrophin), la TSH correspond à l'assemblage non covalent de deux sous-unités, α et β , dont la première est commune à toutes ces hormones glycoprotéiques. Les gènes codant pour les sous-unités α et β sont localisés respectivement sur les bras courts des chromosomes 6 et 1. Les séquences régulatrices de ces deux gènes possèdent des TREs qui expliquent l'effet répresseur des hormones thyroïdiennes sur leur expression (Vlaeminck-Guillem, 2003).

D.2. Le récepteur à la TSH : TSHR.

Le récepteur à la TSH appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G et contient sept domaines transmembranaires ancrés dans la membrane basolatérale des

thyrocytes et de nombreuses autres cellules (figure I7). La protéine TSHR est codée par un seul gène et contient deux sous-unités : un grand ectodomaine, la sous-unité A ou α , qui lie l'ATP (Adénosine TriPhosphate) et un court domaine transmembranaire et intracellulaire, la sous-unité B ou β , qui interagit avec les protéines G (García-Jiménez et Santisteban, 2007). Un clivage intramoléculaire post-traductionnel d'une chaîne de cinquante acides aminés dans l'ectodomaine près de la membrane et la réduction de ponts disulfures permettent d'obtenir une conformation ouverte du récepteur (figure I8) sur lequel peut se fixer la TSH ce qui entraîne l'activation du récepteur (Davies *et al.*, 2002). Le TSHR est sous forme oligomérique dans la membrane jusqu'à ce que la fixation de la TSH entraîne la dissociation des récepteurs oligomériques en des monomères de TSHR activés qui sont par la suite recrutés au niveau des radeaux lipidiques (raft) où ils vont interagir avec les protéines G (Davies *et al.*, 2002). Après désensibilisation, le TSHR est rapidement internalisé puis la majorité des récepteurs endocytosés est recyclée à la membrane afin de maintenir le TSHR fonctionnel (Singh *et al.*, 2004).

D.3. Prolifération des thyrocytes : voies de signalisation impliquées dans l'action de la TSH.

La fixation de la TSH à son récepteur active de nombreuses voies de signalisation pour réguler la différenciation (expression de TG, TPO et NIS), la prolifération (en association avec notamment l'IGF-1 ou l'insuline) et la fonction thyroïdiennes. La prolifération des cellules thyroïdiennes est en grande partie due à une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc suite à l'activation du TSHR par la TSH. Cependant, dans la thyroïde, l'AMPc induit des effets mitogéniques différents selon les espèces : les cellules thyroïdiennes de porc et de bœuf, par exemple, ne prolifèrent pas en réponse à la TSH ou à l'AMPc (Dremier *et al.*, 2002). De plus, l'AMPc inhibe la croissance de certaines lignées cellulaires thyroïdiennes tumorales (Ohta *et al.*, 1997 ; Rocha *et al.*, 2008).

D.3.1. Interaction du TSHR avec les protéines G.

La fixation de la TSH à son récepteur induit la dissociation des protéines G hétérotrimériques et conduit à l'activation de G_α et $G_{\beta\gamma}$. Il existe de nombreux sous-types de sous-unités α et $\beta\gamma$ et leur combinaison active différentes voies de signalisation menant à la prolifération des thyrocytes chez l'homme (figure I9).

○ **Protéines G_{α} .**

La signalisation du TSHR dans le thyrocyte est principalement induite par G_{α_s} et G_{α_q} . La stimulation de G_{α_s} active l'adénylate cyclase (AC) ce qui entraîne l'augmentation de la production d'AMPc puis l'activation de la PKA ; le couplage de $G_{\alpha_q/11}$ au TSHR stimule la phospholipase C (PLC) (Allgeier *et al.*, 1994). Celle-ci catalyse l'hydrolyse des phosphatidylinositols en seconds messagers di-acyl glycérol (DAG) et inositol tri-phosphate (IP3). Le DAG stimule directement la PKC alors que l'IP3 augmente la concentration cytoplasmique de calcium ce qui entraîne notamment l'activation de la PKC (García-Jiménez et Santisteban, 2007). Cependant, bien que l'activation du TSHR augmente clairement les concentrations de calcium dans certaines conditions, l'activation de la PKC induite par le TSHR de manière dépendante du calcium reste un sujet de controverses, car celle-ci nécessite de fortes concentrations de TSH dans des cultures primaires de thyrocytes humains et des cellules thyroïdiennes de rat FRTL-5 (García-Jiménez et Santisteban, 2007). Par ailleurs, le TSHR peut se coupler à $G_{\alpha_{i1-3}}$ ce qui inhibe l'AC et diminue les niveaux d'AMPc permettant la désensibilisation du récepteur. Les niveaux d'AMPc sont également contrôlés par la dégradation de l'AMPc par les phosphodiesterases (PDEs) telles que PDE4 (Oki *et al.*, 2000).

○ **Protéines $G_{\beta\gamma}$.**

Dans les thyrocytes, $G_{\beta\gamma}$ active directement la PLC β et la PKC, ce qui stimule la voie de la protéine kinase B (PKB) encore appelée AKT (Rivas et Santisteban, 2003). De plus, l'activation de $G_{\beta\gamma}$ par le TSHR stimule la PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase) dans les thyrocytes de rat entraînant une diminution de l'expression du NIS (Zaballos *et al.*, 2008).

D.3.2. Voies de signalisation activées par l'AMPc.

○ **Voie AMPc/PKA/CREB.**

Dans les thyrocytes de rat, de chien et d'homme, l'activité de la PKA est nécessaire à la stimulation mitogénique par la TSH (Kimura *et al.*, 2001). La PKA est composée de deux sous-unités catalytiques et deux sous-unités régulatrices qui lient l'AMPc. Il existe plusieurs sous-unités catalytiques et régulatrices et, selon les combinaisons, les molécules de PKA ciblent les substrats cytosoliques (PKA I) ou ancrés à la membrane de certains organites (PKA II). Dans les cellules thyroïdiennes FRTL-5, la stimulation de la PKA I augmente la consommation d'iode sans affecter la transcription génique alors que l'activation de la PKA II induit la transcription et la prolifération ; l'inhibition de la sous-unité régulatrice RII β de la PKA II affecte les effets nucléaires de la TSH (Calebiro *et al.*, 2006). De plus, la PKA activée

par la TSH ou l'AMPc phosphoryle une sérine de la PI3K ce qui entraîne la liaison de la PI3K phosphorylée à la sous-unité RII β de la PKA II et le ciblage de la PKA II à la membrane dans les cellules FRTL-5 (De Gregorio *et al.*, 2007). L'activation de la PI3K par cette voie semble importante pour la transmission des signaux de croissance induits par l'AMPc.

Le facteur de transcription CREB (cAMP Response Element Binding) peut être activé, entre autres, par la PKA (Rosenberg *et al.*, 2002). Ce facteur de transcription ubiquitaire se lie aux éléments de réponse à l'AMPc situés dans les promoteurs de certains gènes et son activation par phosphorylation au niveau de la sérine 133 stimule la transcription de ces gènes. Les facteurs de transcription de la famille CREB/CREM (cAMP Response Element Modulator) sont nécessaires pour la prolifération dépendante de l'AMPc dans des cultures primaires de thyrocytes de chien et sont régulés par la TSH (Uyttersprot *et al.*, 1999). L'activité de CREB est importante pour la prolifération des thyrocytes induite par la TSH mais n'est pas suffisante pour mimer la synthèse d'ADN dépendante de la TSH. La transfection stable d'une version dominante négative de CREB dans les cellules FRTL-5 réduit de 40 % la croissance des thyrocytes induite par la TSH (Woloshin *et al.*, 1992). De plus, des souris transgéniques avec une expression ciblée d'une version dominante négative de CREB dans la thyroïde montrent un sévère retard de croissance et un hypothyroïdisme primaire. L'expression des gènes *pax8*, *tcf1* et *tcf2*, requis pour l'expression de *tshr*, *tg* et *tpo*, est inhibée chez ces souris (Nguyen *et al.*, 2000).

○ ***Autre voie activée par l'AMPc.***

Bien que l'activation de la PKA soit nécessaire aux effets mitogéniques de l'AMPc dans les cellules thyroïdiennes, elle n'est pas suffisante (Dremier *et al.*, 2002). Les protéines Epacs (Exchange protein activated by cAMP) sont d'autres effecteurs de l'AMPc. Ces facteurs d'échanges activent les petites GTPases, enzymes détruisant le GTP (Guanosine TriPhosphate), telles que Rap1 et Rap2. L'expression des Epacs est augmentée dans les thyrocytes (Richards, 2001) mais leur rôle reste mal caractérisé. En effet, Dremier et ses collaborateurs ont montré que, bien que l'Epac1 présente une expression et une sensibilité à la TSH élevées dans des thyrocytes canins, aucun des effets de la TSH médiés par l'AMPc (tels que la sécrétion des hormones thyroïdiennes, la génération d'H₂O₂, la réorganisation du cytosquelette ou la mitogenèse) ne nécessite l'activation d'Epac1 (Dremier *et al.*, 2007). Il a par ailleurs été montré que l'Epac1 et la PKA agissent en synergie pour induire la mitogenèse dépendante de la TSH dans des cellules thyroïdiennes de rat (Hochbaum *et al.*, 2008).

Une coopération avec d'autres voies de signalisation initiées par l'insuline, l'IGF-1, l'EGF (Epidermal Growth Factor) ou l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), par exemple, est requise pour que la TSH induise une activité mitogénique complète dans les thyrocytes (Kimura *et al.*, 2001 ; Dremier *et al.*, 2002). Cependant, les effets de la TSH et des autres facteurs sur la prolifération cellulaire des thyrocytes diffèrent selon le modèle biologique étudié. La TSH et l'IGF-1, par exemple, n'agissent pas de la même façon dans des cellules de rat que dans des cultures primaires de thyrocytes canins ou humains (Kimura *et al.*, 2001). Dans les lignées cellulaires thyroïdiennes de rat FRTL-5 et PCCL3, la TSH, par l'intermédiaire de l'AMPc, augmente la synthèse d'ADN induite par l'IGF-1 ou l'insuline mais l'AMPc n'est pas nécessaire pour la progression de la phase G1 du cycle cellulaire induite par l'IGF-1 et des niveaux élevés d'AMPc inhibent même la synthèse d'ADN. En revanche, dans les thyrocytes primaires canins ou humains, la TSH induit, par l'intermédiaire de l'AMPc, la synthèse d'ADN et l'IGF-1 (ou l'insuline) agit en synergie avec la TSH pour exercer une activité mitogénique complète.

De multiples voies de signalisation sont donc impliquées dans la prolifération des cellules thyroïdiennes et l'altération de ces voies entraîne l'apparition de pathologies telles que les cancers thyroïdiens.

E. Tumeurs thyroïdiennes.

En France, le cancer de la thyroïde représente environ 1 % de l'ensemble des nouveaux cas de cancers et la plus grande partie des cancers endocriniens. La dernière classification des tumeurs thyroïdiennes a été revue en 2004 par l'Organisation Mondiale de la Santé dans le cadre de la classification des tumeurs endocrines (Kleihues et Sobin, 2004).

Les tumeurs thyroïdiennes les plus fréquentes sont dérivées de la cellule folliculaire. Dans la majorité des cas (environ 95 %) ces tumeurs sont bénignes (kystes ou adénomes folliculaires). Parmi les tumeurs malignes, 80 % sont des cancers différenciés, ayant conservés certaines propriétés des cellules folliculaires normales telles que la production de la thyroglobuline et la fixation de l'iode radioactif. Les deux principaux types de cancers différenciés sont les cancers papillaires et les cancers folliculaires. Les cancers papillaires sont de loin les plus fréquents et exercent leur pouvoir métastatique par la voie lymphatique alors que les cancers folliculaires donnent des métastases uniquement par la voie hématogène. Les cancers peu

différenciés (environ 2 % des cas) et indifférenciés ou anaplasiques (4 à 5 % des cas) sont plus rares. Il existe par ailleurs (7 % des cas) des cancers dérivés de la cellule parafolliculaire ou cancers médullaires dont un quart est héréditaire.

Les éléments de pronostic reposent sur le type histologique, l'âge au diagnostic (plus ou moins de 45 ans), la taille de la tumeur (plus ou moins de 3 cm), le statut locorégional (confiné ou non à la glande), la présence ou non de métastases ganglionnaires, et l'existence ou non de métastases à distance. La survie à cinq ans des formes différenciées est excellente, proche de l'espérance de vie normale pour les cancers folliculaires et de 80 % pour les cancers papillaires. Le risque majeur est celui des métastases et le degré de différenciation des métastases peut être différent de celui des tumeurs primitives. Le pronostic est nettement plus réservé pour les cancers peu différenciés (survie d'environ 50 % à 5 ans) et désastreux pour les cancers anaplasiques (espérance de vie chiffrée en mois).

E.1. Classification histologique des tumeurs différenciées.

E.1.1. Adénomes thyroïdiens.

Les adénomes thyroïdiens sont des tumeurs épithéliales bénignes de la glande thyroïde. Il s'agit de nodules uniques, bien délimités par une capsule fine. Ces tumeurs apparaissent principalement chez des adultes âgés de 20 à 50 ans, avec une prédominance chez les femmes. En fonction de l'architecture du tissu thyroïdien et de la taille des cellules, différentes formes sont décrites :

- l'adénome normofolliculaire,
- l'adénome macrofolliculaire (ou colloïde), caractérisé par des follicules grands et riches en colloïde,
- l'adénome microfolliculaire (ou fœtal), caractérisé par des follicules petits et pauvres en colloïde,
- l'adénome trabéculaire (ou solide/embryonnaire), caractérisé par des follicules très petits, voire inexistant, présentant une architecture en travées,
- l'adénome oncocytaire, présentant plus de 75 % de cellules oxyphiles, grandes cellules avec de petits noyaux irréguliers et des granules acidophiles denses dus à la présence abondante de mitochondries.

E.1.2. Carcinomes thyroïdiens.

La principale caractéristique permettant de distinguer un adénome d'un carcinome est la présence d'invasion vasculaire ou capsulaire dans les carcinomes thyroïdiens.

○ *Carcinomes papillaires.*

Leur diagnostic histologique repose sur des altérations nucléaires caractéristiques avec un aspect en « verre dépoli ». Dans certains cas, il existe des formations papillaires bordées par une monocouche de cellules malignes s'adossant à un axe fibreux et vasculaire. Les cellules présentent un grand volume par rapport aux cellules normales, un contour irrégulier et des invaginations cytoplasmiques. De nombreuses variantes architecturales et cytologiques existent, la plus fréquente étant le variant folliculaire du cancer papillaire dont le diagnostic différentiel avec le cancer folliculaire est parfois difficile.

○ *Carcinomes folliculaires.*

Les cancers folliculaires (ou vésiculaires) bien différenciés présentent de véritables structures folliculaires isolées les unes des autres. Cette forme encapsulée, présente souvent une grande difficulté diagnostique en ce qui concerne l'affirmation de la malignité basée sur l'effraction capsulaire et l'invasion vasculaire. Ceci est particulièrement vrai pour les carcinomes folliculaires avec invasion minime dont le diagnostic différentiel avec les adénomes folliculaires est délicat.

○ *Carcinomes oncocytaires thyroïdiens.*

Ces tumeurs correspondent à une variante des carcinomes papillaires ou folliculaires présentant plus de 75 % de cellules oxyphiles. Le caractère malin des variants oncocytaires des tumeurs folliculaires est particulièrement difficile à déterminer, compte tenu de la forte vascularisation de ces tumeurs en relation avec leur richesse en mitochondries fonctionnelles.

Plusieurs nodules, pouvant appartenir à des classes différentes, peuvent coexister dans une même thyroïde sous la forme de goitre multi-nodulaire. Ces nodules peuvent être fonctionnels (nodule bénin le plus souvent), hypofonctionnels (nodule malin le plus souvent) mais aussi hyperfonctionnels ou toxiques.

E.2. Tumorigenèse thyroïdienne différenciée.

D'un point de vue moléculaire, les cellules cancéreuses sont le résultat d'une accumulation séquentielle d'altérations de gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération, de la

différenciation et de la mort cellulaire. Les mutations de proto-oncogènes ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs sont souvent à l'origine de la tumorigenèse. Les altérations moléculaires trouvées dans les carcinomes papillaires impliquent principalement des oncogènes codant pour les récepteurs à activité tyrosine kinase RET et NTRK1 (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor 1), et la protéine BRAF, appartenant à la voie des MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases), qui possède une activité sérine-thréonine kinase. Les carcinomes folliculaires sont caractérisés par des mutations dans les gènes *RAS* et *PTEN* (Phosphatase and TENsin homolog) ainsi que par la présence de la protéine de fusion PFP (PAX8/PPAR γ). De par le caractère peu prolifératif des cellules folliculaires normales, les signaux de différenciation thyroïdienne (TSH essentiellement) peuvent aussi être associés à la tumorigenèse du tissu thyroïdien. Il est à noter que les mutations sont exclusives les unes des autres.

E.2.1 Oncogènes impliqués dans la tumorigenèse thyroïdienne.

○ ***RAS.***

Les protéines de la famille RAS sont des petites protéines G qui transmettent des signaux provenant des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase aux MAPKs (figure I10). Elles sont codées par trois gènes différents, *H-RAS*, *K-RAS* et *N-RAS*. Quand les gènes *RAS* sont mutés, ils produisent des protéines qui sont constitutivement actives (liées au GTP), transmettant des signaux prolifératifs incontrôlés. Dans la thyroïde, les mutations des gènes *RAS* sont trouvées avec une prévalence élevée dans les adénomes et carcinomes folliculaires et plus rarement dans les carcinomes papillaires (Couto *et al.*, 2009). De plus, les mutations de *H-*, *K-* et *N-RAS* sont associées à une dédifférenciation des tumeurs et constituent un marqueur d'agressivité des tumeurs et un facteur de mauvais pronostic (García-Rostán *et al.*, 2003).

○ ***Réarrangements RET/PTC.***

Le proto-oncogène *RET* est situé sur le chromosome 10q11.2. La liaison de facteurs de croissance à ce récepteur membranaire possédant une activité tyrosine kinase entraîne la dimérisation du récepteur, l'autophosphorylation de résidus tyrosines dans le domaine intracellulaire et l'activation de la cascade de signalisation. Dans la thyroïde, *RET* est exprimé à un niveau élevé dans les cellules parafolliculaires mais pas dans les cellules folliculaires dans lesquelles son expression peut être activée par un réarrangement chromosomique entraînant la fusion de la partie 3' du gène *RET* à la partie 5' de différents gènes exprimés

dans les cellules folliculaires thyroïdiennes : les réarrangements *RET/PTC* (Fusco et Santoro, 2007). La grande majorité des réarrangements trouvés dans les carcinomes papillaires est de types *RET/PTC1* et *RET/PTC3*. Des souris transgéniques avec une expression ciblée de *RET/PTC1* ou *RET/PTC3* dans la thyroïde développent un cancer thyroïdien de type papillaire (Jhiang *et al.*, 1998 ; Powell *et al.*, 1998). Les effets de l'activation de *RET/PTC* semblent passer par l'induction de la voie des MAPKs (figure I10) : *RET/PTC* induit l'activation de *BRAF* de manière dépendante de *RAS* et l'activation de *ERK* (Extracellular signal-Regulated Kinase) de manière dépendante de *RAS* et *BRAF* (Melillo *et al.*, 2005). La voie *PI3K/AKT* est également activée par cette protéine chimérique dans les cellules *FRTL-5* (Miyagi *et al.*, 2004). Les réarrangements *RET/PTC* sont présents dans 20 à 40 % des cancers papillaires sporadiques de l'adulte et dans 40 à 70 % des cancers papillaires sporadiques de l'enfant et du jeune adulte (Ciampi et Nikiforov, 2007). La prévalence des réarrangements *RET/PTC* est supérieure dans les carcinomes papillaires de patients ayant été exposés à des radiations accidentelles ou thérapeutiques.

○ ***Mutations de BRAF.***

Après activation par l'intermédiaire de *RAS*, les sérine-thréonine kinases de la famille *RAF* phosphorylent et activent *MEK* ce qui induit l'activation de *ERK* et des effecteurs de la voie des MAPKs (figure I10). Parmi les trois protéines *RAF* fonctionnelles, *BRAF* possède la plus forte activité kinase et est le plus puissant activateur de *MEK* (Peyssonnaud et Eychène, 2001). Comme les réarrangements *RET/PTC*, la mutation de *BRAF* (entraînant le plus souvent la substitution d'une valine avec un acide glutamique en position 600 de la protéine : V600E) est associée aux carcinomes papillaires thyroïdiens et est présente dans environ 45 % des cas, avec une prévalence beaucoup plus élevée dans les cancers papillaires de l'adulte (Xing, 2007). Les mutations de *BRAF* sont également trouvées dans les carcinomes anaplasiques ou peu différenciés. La présence de ces mutations est corrélée avec un âge élevé des patients, des extensions extrathyroïdales plus fréquentes, un stade avancé de la tumeur et une récurrence de la tumeur (Ciampi et Nikiforov, 2007). Elle est aussi associée à une diminution de la capacité à fixer l'iode radioactif. L'implication de la mutation de *BRAF* dans l'initiation, la dédifférenciation et l'agressivité des carcinomes papillaires a également été suggérée par l'étude de souris transgéniques avec une expression spécifique de V600E *BRAF* au niveau de la thyroïde (Knauf *et al.*, 2005).

○ ***Protéine de fusion PFPF.***

Cette protéine est le résultat d'un réarrangement chromosomique créant un transcrite de fusion dans lequel la région 5' du gène *PAX8* est fusionnée avec l'exon 1 du gène *PPAR γ* (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ), un membre de la famille des récepteurs nucléaires aux hormones impliqué notamment dans la différenciation des adipocytes, le métabolisme des lipides et du glucose ainsi que la prolifération (Reddi *et al.*, 2007). PFPF est trouvée dans environ 50 % des carcinomes folliculaires thyroïdiens et, en plus faible proportion, dans les adénomes folliculaires, suggérant que PFPF pourrait être impliquée de manière précoce dans le développement néoplasique. Le mécanisme d'action de PFPF n'est pas bien caractérisé mais l'analyse du profil d'expression génique des carcinomes folliculaires thyroïdiens exprimant PFPF a montré que ces cancers présentent une signature transcriptionnelle (Lui *et al.*, 2005 ; Giordano *et al.*, 2006) : l'expression de gènes associés à la transduction du signal, la croissance cellulaire et le contrôle traductionnel est augmentée.

En plus des facteurs précédemment détaillés, la surexpression et l'activation d'autres récepteurs à activité tyrosine kinase, les mutations du gène *p53*, l'activation de la voie Wnt (Wingless-type), ainsi que la surexpression de facteurs angiogéniques sont fréquentes dans les carcinomes thyroïdiens en cours de dédifférenciation. La voie de signalisation PI3K/AKT joue également un rôle important dans la formation et la progression tumorales thyroïdiennes.

E.2.2. Implication de la voie PI3K/AKT dans la tumorigenèse et la progression tumorale thyroïdiennes.

Le facteur AKT est une molécule centrale dans la voie de signalisation de la PI3K (figure I11). Une augmentation de l'activité de la PI3K ou une diminution de celle de PTEN augmentent l'activation d'AKT. Une fois activée, la protéine AKT phosphoryle de nombreuses cibles, dans le cytoplasme ou le noyau, qui régulent l'apoptose, la prolifération, la progression du cycle cellulaire, la stabilité et la motilité du cytosquelette ainsi que le métabolisme énergétique. Le rôle d'AKT dans la tumorigenèse thyroïdienne a été mis en évidence chez des patients atteints du syndrome de Cowden dont la cause génétique est la perte d'expression de PTEN (Liaw *et al.*, 1997). Environ 50 % de ces malades développent des adénomes thyroïdiens ou des carcinomes folliculaires thyroïdiens associés à une augmentation de l'activité d'AKT. Un accroissement de l'activité de cette kinase a également été constaté dans des carcinomes folliculaires thyroïdiens sporadiques (Ringel *et al.*, 2001). Le gène *PIK3CA* code pour la sous-unité catalytique p110 α de la PI3K. Des mutations et des

amplifications de ce gène ont été observées dans les cancers thyroïdiens (Wu *et al.*, 2005 ; García-Rostán *et al.*, 2005). Dans les carcinomes papillaires thyroïdiens, la voie PI3K/AKT semble plutôt impliquée dans la progression tumorale. La taille et l'invasion de la tumeur ont été associées à l'activité d'AKT dans les cancers thyroïdiens folliculaires et papillaires, exception faite des tumeurs présentant une mutation de BRAF (Shinohara *et al.*, 2007).

E.2.3. Autres facteurs impliqués dans la tumorigenèse thyroïdienne.

○ ***Facteurs de différenciation.***

Les facteurs TTF1, TTF2, PAX8 et HEX jouent un rôle important dans la différenciation et l'organogenèse thyroïdiennes. Ces facteurs sont impliqués dans la tumorigenèse thyroïdienne (Zhang *et al.*, 2006 ; Lacroix *et al.*, 2006). Une diminution de l'expression des ARNm de ces facteurs est observée dans les carcinomes thyroïdiens, en association avec une baisse de l'expression des transcrits du NIS, de la TG ou de la TPO, impliqués dans le métabolisme de l'iode.

○ ***TSHR et GNAS.***

L'activation inappropriée de la voie du TSHR est très rarement accompagnée d'une transformation maligne. Des mutations du TSHR peuvent conduire à un changement de localisation et de renouvellement du récepteur ou encore à des activations ou des inactivations constitutives du récepteur. Des mutations somatiques activatrices du TSHR entraînent des nodules autonomes (bénins et hyperfonctionnels) alors que des mutations germinales sont associées à un hyperthyroïdisme congénital et à une hyperplasie thyroïdienne toxique non auto-immune héréditaire (García-Jiménez et Santisteban, 2007). Une diminution significative de l'expression du TSHR a été corrélée au développement de tumeurs oncocytaires (adénomes et carcinomes) (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2004). Ceci pourrait expliquer le manque d'efficacité du traitement à l'iode radioactif de ces tumeurs ainsi que leur pronostic controversé. La protéine G_{as} est codée par le gène *GNAS* (Guanine Nucleotide binding protein, Alpha Stimulating). Des mutations de ce gène ont été associées à des adénomes thyroïdiens toxiques, des goitres multi-nodulaires toxiques et des adénomes macrofolliculaires (Palos-Paz *et al.*, 2008 ; Liu *et al.*, 2010 ; Fontaine *et al.*, 2009).

II. La mitochondrie.

A. Structure.

Le nom de mitochondrie vient du grec *mitos* (fil) et de *chondros* (grain). Les mitochondries sont des organites dont la taille varie de 1 à 10 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large. Elles sont composées de deux compartiments séparés par deux membranes (interne et externe) : la matrice et l'espace intermembranaire (figure I12).

- **La membrane externe** : cette membrane entourant la mitochondrie a une composition en protéines (environ 60 %) et en lipides (environ 40 %) proche de celle des membranes plasmiques eucaryotes. Elle est perméable, et ceci grâce à la présence d'une protéine transmembranaire VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Celle-ci forme un canal qui laisse passer les molécules de petite taille (inférieures à 10 kDa) telles que des anions, des cations, différents métabolites (acides gras, pyruvate...) et des nucléotides. C'est donc un canal non spécifique. Par ailleurs, les translocases (TOM : Translocase of the Outer Membrane) contenues dans cette membrane permettent le transport des grosses protéines.

- **La membrane interne** : elle est beaucoup moins perméable que la membrane externe. Elle est composée de 75 % de protéines et de 25 % de lipides. Elle contient en quantité importante un phospholipide, la cardiolipine, qui renferme 4 acides gras rendant cette membrane imperméable à toutes les molécules polaires (ATP, Adénosine DiPhosphate : ADP, Phosphate inorganique : P_i), aux anions (pyruvate) et aux cations (Ca^{++} , H^+ , K^+). Des transporteurs sont donc nécessaires pour assurer le passage des molécules à travers la membrane interne. Parmi eux, la translocase H^+ /pyruvate (permet de transporter le pyruvate à l'intérieur de la mitochondrie), l'ANT (Adénine Nucléotide Translocase : échange un ATP mitochondrial contre un ADP cytosolique), le transporteur $\text{H}^+/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ (permet d'apporter le phosphate inorganique nécessaire à la phosphorylation de l'ADP) et la translocase carnitine-acylcarnitine (CACT : transporte les acides gras). Les protéines sont importées par les translocases TIM (Translocase of the Inner Membrane). La membrane interne forme des invaginations qui apparaissent sous forme de crêtes ou replis au microscope électronique. Les enzymes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase sont situées au niveau de ces crêtes. Celles-ci augmentent la surface de la membrane et leur nombre varie selon l'activité mitochondriale (respiration cellulaire, oxydation des acides gras...).

- **La matrice** : délimitée par la membrane interne, elle contient de nombreuses enzymes impliquées notamment dans le cycle de Krebs et la beta oxydation des acides gras, des mitoribosomes, des ARNs de transfert ainsi que l'ADN mitochondrial (ADNmt).

- **L'espace intermembranaire** : situé entre les deux membranes, sa composition est proche de celle du cytosol. Il contient de nombreuses protéines dont le cytochrome *c*, participant au fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale.

B. La chaîne respiratoire mitochondriale.

Le métabolisme oxydatif dans la mitochondrie est principalement tributaire des acides gras et du pyruvate produit par la glycolyse dans le cytosol. Ces composés sont sélectivement transportés du cytosol vers la matrice mitochondriale où ils sont clivés ce qui libère l'acétyl coenzyme A (figure I13). Cet acétyl coA est ensuite métabolisé par le cycle de Krebs qui produit des équivalents réduits sous forme de NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné) et FADH₂ (Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée).

B.1. Fonctionnement de la phosphorylation oxydative.

Dans le processus de phosphorylation oxydative, des électrons à haute énergie provenant du NADH et FADH₂ sont transmis à l'oxygène, accepteur final, par la chaîne respiratoire située dans la membrane interne de la mitochondrie. Chaque complexe dans la chaîne a une plus grande affinité pour les électrons que son prédécesseur, et les électrons passent d'un complexe à l'autre jusqu'à être finalement transférés à l'oxygène, qui a l'affinité la plus grande pour les électrons (figure I14). L'énergie ainsi libérée par le passage des électrons d'un transporteur au suivant est utilisée pour pomper des protons (H⁺) par l'intermédiaire des complexes I, III et IV, depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (figure I15). Ce mouvement de protons crée un gradient de pH de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale : le pH devient plus acide dans l'espace intermembranaire que dans la matrice. De plus, il engendre un potentiel de membrane ($\Delta\psi_m$) à travers la membrane interne de la mitochondrie : l'intérieur devient négatif et l'extérieur positif. La résultante de ces deux forces constitue un gradient électrochimique de protons qui va être employé pour activer l'ATP synthase qui catalyse la conversion d'ADP + P_i en ATP. Ce mécanisme de couplage de l'oxydation des substrats à la synthèse d'ATP par la force protomotrice a été proposé pour la première fois par Mitchell en 1961.

B.2. Composition du système de phosphorylation oxydative.

Cinq enzymes enchâssées dans la membrane interne mitochondriale constituent le système de phosphorylation oxydative (OxPhos) : les complexes I à IV qui composent la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Le système OxPhos génère la majorité de l'ATP cellulaire au cours du métabolisme oxydatif et est composé de plus de quatre-vingts protéines différentes, treize d'entre elles étant codées par l'ADN mitochondrial et les autres par le génome nucléaire.

B.2.1. Complexe I : NADH ubiquinone oxydoréductase.

Ce complexe est le principal point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Il catalyse le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone, ceci étant couplé à la translocation de quatre protons à travers la membrane interne mitochondriale (figure I15). Le complexe I est aussi un site majeur de production de superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) en raison de la réaction directe entre les électrons qui s'échappent de ce site et le dioxygène. Le complexe I est le plus gros des complexes enzymatiques respiratoires (environ 1 MDa). Il est constitué de quarante-six sous-unités dont sept sont codées par l'ADNmt (gènes *ND1-ND6* et *ND4L*) et les trente-neuf autres sont codées par des gènes nucléaires et importées dans la mitochondrie après leur synthèse dans le cytosol. Chez les mammifères, le complexe I a une forme de « L », composé de deux bras perpendiculaires : un bras hydrophobe enchâssé dans la membrane interne mitochondriale contenant les sous-unités codées par l'ADNmt, qui constituent le site catalytique de l'enzyme, et un bras périphérique hydrophile dépassant dans la matrice. Cette structure engendre trois modules fonctionnels : le module déshydrogénase responsable de l'oxydation du NADH en NAD^+ , le module hydrogénase, responsable du transfert d'électrons à l'ubiquinone et le module de translocation des protons constituant la majeure partie du bras membranaire (Fernandez-Vizarra *et al.*, 2009). Un déficit d'activité du complexe I est la cause la plus fréquente de maladie mitochondriale. Par ailleurs, le complexe I étant une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène (EROs), des mutations touchant ce complexe peuvent entraîner une augmentation de la production d'EROs et ainsi participer au développement de diverses maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer (Block, 2008) ou bien contribuer à la progression tumorale en augmentant le potentiel métastatique des cellules tumorales (Ishikawa *et al.*, 2008).

B.2.2. Complexe II : succinate ubiquinone oxydoréductase ou succinate déshydrogénase.

Il constitue un point d'entrée alternatif des électrons dans la chaîne respiratoire. Il transfère des électrons du succinate à l'ubiquinone connectant ainsi directement le cycle de Krebs à la chaîne respiratoire. Ce transfert d'électrons n'est pas couplé à la translocation de protons. Le complexe II est constitué de quatre sous-unités (A à D) codées par le génome nucléaire. Il est constitué d'un domaine hydrophobe (sous-unités C et D) enchâssé dans la membrane interne mitochondriale et d'un domaine hydrophile (sous-unités A et B) dépassant dans la matrice. Des défauts de la fonction succinate déshydrogénase (SDH) sont relativement rares chez l'homme. Cependant, comme c'est le cas pour des mutations touchant certaines sous-unités des trois autres complexes de la chaîne respiratoire, des mutations dans la sous-unité flavoprotéine, SDHA, entraînent un défaut de la chaîne respiratoire résultant notamment en une encéphalopathie mitochondriale. Par ailleurs, des mutations dans les sous-unités B, C et D sont responsables du développement des paragangliomes, tumeurs de la tête et du cou, ainsi que des phéochromocytomes (Rustin *et al.*, 2002). De plus, des paragangliomes familiaux ont été associés à des mutations du gène *hSDH5*, encore appelé *SDHAF2* (Succinate DeHydrogenase complex Assembly Factor 2) codant pour une protéine mitochondriale requise pour la flavination de la sous-unité SDHA, processus qui semble indispensable à la formation et à la fonction du complexe II (Hao *et al.*, 2009).

B.2.3. Complexe III : ubiquinol cytochrome c oxydoréductase ou complexe cytochrome bc₁.

Il transfère les électrons de l'ubiquinone réduite (ou ubiquinol) au cytochrome *c*, transporteur d'électrons mobile associé à la face externe de la membrane interne mitochondriale. Ce transfert est couplé à la translocation de quatre protons vers l'espace intermembranaire. Ce complexe est également un site de production de l'ion superoxyde (et d'EROs). Le complexe III est présent sous forme de dimère dans la membrane interne mitochondriale. Chez les mammifères, chaque monomère est composé de onze sous-unités structurales différentes. Trois sous-unités contiennent les centres métalliques responsables du transfert d'électrons : le cytochrome *b*, le cytochrome *c1* et la protéine Rieske Fe-S. La fonction des autres sous-unités reste à élucider. Les maladies liées à une déficience du complexe III sont cliniquement hétérogènes et relativement rares. La plupart des cas est liée à des mutations dans la seule sous-unité du complexe III codée par l'ADNmt, le cytochrome *b*.

B.2.4. Complexe IV : cytochrome c oxydase (COX).

Ce complexe terminal de la chaîne respiratoire catalyse le transfert d'électrons du cytochrome *c* à l'oxygène moléculaire, celui-ci étant par la suite réduit en eau. Il contribue également au gradient de protons en transloquant deux protons à travers la membrane interne mitochondriale. Chez les mammifères, le complexe IV est composé de treize sous-unités différentes. Les trois sous-unités les plus grosses sont codées par l'ADNmt : deux de ces sous-unités (COX I et COX II), contenant les hèmes a et a₃ et les centres cuivres Cu_A et Cu_B, constituent le centre catalytique de l'enzyme impliqué dans le transfert d'électrons et la troisième sous-unité jouerait un rôle dans le pompage des protons. Les dix sous-unités restantes (COX IV à VIII) sont codées par l'ADN nucléaire : la fonction de ces sous-unités est actuellement mal connue mais elles pourraient avoir un rôle dans la régulation de l'activité catalytique ainsi que dans l'assemblage et la stabilisation du complexe (Stiburek *et al.*, 2006 ; Fernandez-Vizarra *et al.*, 2009). Des déficits de la COX représentent une part importante des pathologies dues à un défaut de la chaîne respiratoire et sont associés à différents phénotypes cliniques.

B.2.5. ATP synthase.

L'ATP synthase est une enzyme fonctionnellement réversible : elle peut synthétiser de l'ATP en utilisant la force protomotrice à travers la membrane interne de la mitochondrie mais peut aussi hydrolyser l'ATP et pomper les protons hors de la matrice quand aucun gradient transmembranaire de protons n'est généré par la chaîne respiratoire. Chez les mammifères, l'ATP synthase est un complexe composé de multiples sous-unités (dont deux codées par l'ADNmt : ATP6/8) qui constituent deux domaines fonctionnels : un domaine hydrophobe membranaire F₀ constitué par les sous-unités ab₂c₁₂ jouant le rôle de canal à protons, connecté par deux tiges à un domaine catalytique hydrophile F₁ composé des sous-unités α₃β₃γδε dépassant dans la matrice (figure I16). L'ATP synthase est composée d'une partie mobile (rotor : sous-unités γεc₁₂) et d'une partie fixe (stator : sous-unités α₃β₃δ du segment F₁ et ab₂ de F₀) (Grover *et al.*, 2008). Le passage des protons à l'interface entre rotor et stator dans le domaine membranaire F₀ cause la rotation de la tige (γ) qui déforme les sous-unités α et β du domaine extra-membranaire F₁ et fournit à celles-ci l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP.

B.2.6. Organisation en supercomplexes.

On a longtemps pensé que les complexes de la chaîne respiratoire diffusaient librement dans la membrane interne mitochondriale et que le transfert d'électrons se faisait sur la base de collisions au hasard. Depuis dix ans pourtant, de nombreuses preuves mettent à mal ce modèle d'état fluide des composants de la chaîne respiratoire. Il a été montré en effet que les complexes I, III et IV s'assemblent pour former différents types de supercomplexes (Cruciat *et al.*, 2000 ; Schägger et Pfeiffer, 2000 ; Dudkina *et al.*, 2008 ; Vonck et Schäfer, 2009). En revanche, à ce jour, le complexe II n'a jamais été trouvé en association avec un autre complexe de la chaîne respiratoire, ceci étant en accord avec les indications cinétiques de son indépendance observées par analyse du contrôle du flux de la chaîne respiratoire (Bianchi *et al.*, 2004). L'existence de supercomplexes a été mise en évidence en partie par les expériences d'électrophorèses en « blue native ». Différents supercomplexes ont ainsi été décrits selon les espèces. Chez la levure *S. cerevisiae*, qui ne possède pas de complexe I, deux supercomplexes ont été trouvés : un complexe III dimérique associé à une ou deux copies du complexe IV (III_2IV_1 et III_2IV_2). Les complexes I_1III_2 (un complexe I et deux complexes III) et $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_1$ (un complexe I, deux complexes III et un complexe IV) ont été mis en évidence chez le bovin, le supercomplexe $\text{I}_1\text{III}_2\text{IV}_1$ ayant une activité et une stabilité supérieures au supercomplexe I_1III_2 . L'ATP synthase F_1F_0 est présente sous forme de dimères capables de s'associer pour former des oligomères. Cette organisation des complexes d'ATP synthases jouerait un rôle important dans la mise en place de la courbure serrée de la membrane interne mitochondriale aboutissant à la formation des crêtes. L'ATP synthase forme également un supercomplexe avec l'ANT et le transporteur de phosphate (Papa *et al.*, 2006). Des supercomplexes et des complexes OxPhos co-existent en fait dans la membrane interne mitochondriale et les associations de complexes en supercomplexes ou les dissociations de supercomplexes en complexes sont considérées comme un procédé dynamique dépendant de l'état physiologique de la cellule. D'un point de vue fonctionnel, la formation de supercomplexes semble être impliquée dans l'efficacité du transfert d'électrons et être une étape essentielle dans l'assemblage de la chaîne respiratoire.

B.3. Production d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie et systèmes de détoxification.

Les EROs sont des composés, contenant un ou plusieurs atomes d'oxygène, qui sont capables de réagir avec des composés réduits. Parmi eux, l'ion superoxyde O_2^- produit au cours du

fonctionnement de la chaîne respiratoire, le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et le radical hydroxyle $\cdot OH$ très réactif. Le complexe I relargue le superoxyde qu'il produit dans la matrice alors que le complexe III le relargue à la fois dans la matrice et dans l'espace intermembranaire (Camello-Almaraz *et al.*, 2006). Le complexe III forme l' $O_2^{\cdot -}$ au cours du cycle de l'ubiquinone qui peut fournir des électrons à l'oxygène moléculaire à la fois à la face interne et à la face externe de la membrane mitochondriale interne. L'importance relative des complexes I et III dans la production mitochondriale de superoxyde dépend du tissu et du statut respiratoire de la mitochondrie. En effet, quand le fonctionnement de la chaîne respiratoire est important (flux d'électrons élevé, synthèse d'ATP rapide, dépolarisation partielle de la membrane interne et diminution du ratio $NADH/NAD^+$), le complexe III semble être dominant et la production d' $O_2^{\cdot -}$ est proportionnelle au flux d'électrons. A l'inverse, quand le flux d'électrons et la synthèse d'ATP sont faibles et que les substrats sont fortement réduits, le complexe I est la principale source de superoxyde (Camello-Almaraz *et al.*, 2006).

L'anion $O_2^{\cdot -}$ produit en conséquence du fonctionnement de la chaîne respiratoire est rapidement transformé en H_2O_2 par les enzymes superoxyde dismutases SOD (figure I17). Les ions superoxydes sont dismutés par la SOD contenant du manganèse (Mn-SOD) dans la matrice alors que ceux présents dans l'espace intermembranaire sont convertis en H_2O_2 par les SOD contenant du zinc ou du cuivre (Zn-SOD et Cu-SOD). L' H_2O_2 peut ensuite, en présence de métaux de transition réduits tels que le fer Fe^{2+} ou le cuivre Cu^{2+} , être converti en $\cdot OH$ qui réagit avec la plupart des biomolécules (Ježek et Hlavatá, 2005). L' H_2O_2 peut également être réduit en eau par la catalase ou la glutathion peroxydase (GPx). De plus, les systèmes de tampon redox cellulaires et mitochondriaux, tels que le glutathion (couple GSH réduit/GSSG oxydé) et la thioredoxine (TRX) peuvent participer à la détoxification de l' H_2O_2 – le glutathion étant majeur dans la cellule et représentant un bon indicateur de l'environnement redox de celle-ci. En plus de leur implication dans la régulation du statut redox de la cellule, ces protéines à groupements thiols sont impliquées dans des processus de signalisation cellulaire redox comme la voie des MAPKs (Valko *et al.*, 2007 ; Matsuzawa et Ichijo, 2008).

C. Régulation de la phosphorylation oxydative.

La demande en énergie cellulaire dépend de la fonction et de l'activité de la cellule. Cet ajustement de la production d'énergie en fonction des besoins physiologiques est essentiel pour tous les organismes supérieurs et est soumis à de nombreuses régulations.

C.1. Contrôle respiratoire.

Le premier mécanisme identifié par lequel la phosphorylation oxydative est contrôlée est appelé « contrôle respiratoire » et consiste en la régulation de l'activité OxPhos par la disponibilité des substrats pour la synthèse d'ATP : l'ADP et le phosphate. En effet, l'activité OxPhos augmente quand l'utilisation de l'ATP génère de l'ADP et du phosphate. Cependant, de nombreux autres niveaux de contrôle existent, seuls ou en combinaison.

C.2. Expression d'isoformes.

L'expression d'isoformes de certaines protéines permet un mécanisme d'adaptation au niveau tissulaire. Des isoformes sont connues pour le cytochrome *c* et la COX (Hüttemann *et al.*, 2007 ; Hüttemann *et al.*, 2008). Il existe trois paires d'isoformes des sous-unités VIa, VIIa et VIII de la COX au niveau du foie et du cœur, une isoforme de la sous-unité IV spécifique du poumon, une isoforme de la sous-unité VIb spécifique des testicules et une troisième isoforme de la sous-unité VIII. En général, la COX de type hépatique, qui est exprimée dans des tissus avec une faible densité mitochondriale, tels que le cerveau, présente une activité plus forte que l'isoenzyme de type cardiaque qui est trouvée dans le cœur et le muscle squelettique présentant une forte capacité mitochondriale.

C.3. Contrôle allostérique.

L'ATP peut se lier au cytochrome *c* ce qui affecte la liaison de ce transporteur d'électrons à la COX entraînant ainsi l'inhibition de la réaction entre le cytochrome *c* et la COX. L'ATP peut également se lier au côté matriciel de la plus grande sous-unité de la COX codée par le génome nucléaire, la COX IV. Ceci entraîne une inhibition allostérique de l'activité de l'enzyme pour des ratios intramitochondriaux ATP/ADP élevés (condition où les cellules ne requièrent pas d'augmentation de l'activité OxPhos), ajustant la production d'énergie à la demande physiologique (Kadenbach, 2003 ; Hüttemann, 2007). Il a été montré, par ailleurs, que l'hormone thyroïdienne T2 peut se lier à la sous-unité matricielle de la COX, COX Va.

Cette interaction abolit alors l'inhibition allostérique de la COX par l'ATP ce qui permet une augmentation du taux métabolique basal même à des ratios ATP/ADP importants.

C.4. Régulation par phosphorylation réversible.

L'apport en équivalents réduits vers la chaîne respiratoire (le ratio NADH/NAD⁺) est en partie régulé par la phosphorylation réversible du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH), situé dans la membrane interne mitochondriale, qui catalyse la transformation du pyruvate en acétyl coA. La phosphorylation inactive cette enzyme alors que la déphosphorylation, par une phosphatase dépendante du calcium, active ce complexe.

Dans la mitochondrie, tous les composants de la chaîne respiratoire sont la cible de phosphorylations mais les voies de signalisation ainsi que les kinases et les phosphatases impliquées dans ces phosphorylations réversibles ne sont connues que pour quelques sites, principalement dans les complexes I et IV.

C.4.1. Phosphorylation du complexe I.

Une phosphorylation du complexe I dépendante de l'AMPc a été constatée pour la première fois par le groupe de Papa (Papa *et al.*, 1996). Ces travaux suggéraient que la PKA phosphorylait directement le complexe I, dans le cœur, entraînant l'activation du complexe. Dans les cellules de gliome C6 en prolifération, l'activité du complexe I diminue à mesure que la densité cellulaire augmente. Dans ces cellules, l'ajustement de la phosphorylation oxydative à la demande d'énergie est principalement dû à la régulation du taux de phosphorylation d'une sous-unité du complexe I (Devin et Rigoulet, 2007). Le niveau de phosphorylation de cette sous-unité de 18 kDa, diminue pendant la croissance des cellules, cette phosphorylation étant en partie contrôlée par l'AMPc et la déphosphorylation étant effectuée par une phosphatase inhibée par le calcium (Kadenbach, 2003).

C.4.2. Phosphorylation du complexe IV.

Bender et Kadenbach (2000) ont montré que la sous-unité I de la COX, dans le cœur de bœuf, peut être phosphorylée de manière dépendante de l'AMPc. Cette phosphorylation est impliquée dans l'inhibition allostérique de la COX. En revanche, cette inhibition allostérique peut être levée par la déphosphorylation de la COX activée par le calcium. Dans les ostéoclastes, la tyrosine kinase c-Src phosphoryle la sous-unité II du complexe IV, ce qui active cette enzyme. Ce mécanisme semble important pour l'activité de résorption de l'os et pourrait être altéré dans l'arthrite rhumatoïde (Miyazaki *et al.*, 2003). La COX peut également

être phosphorylée par la PKC ϵ et l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) mais l'identification des sites précis de phosphorylation reste à déterminer.

C.5. Inhibition de la chaîne respiratoire par le monoxyde d'azote (NO).

C.5.1. Les NO synthases.

Le NO est synthétisé à partir de la L-arginine et du dioxygène par les NO synthases (NOS) dans la plupart des cellules de mammifères. Cette famille d'enzymes comprend les isoformes nNOS (neuronal NOS ou NOS1), iNOS (inducible NOS ou NOS2) et eNOS (endothelial NOS ou NOS3). La protéine nNOS est exprimée de façon constitutive, principalement au niveau des neurones, du muscle squelettique, du pancréas et des reins. Le calcium, la calmoduline et des modifications post-traductionnelles régulent son activité (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998). La protéine eNOS est exprimée de façon constitutive dans les cellules endothéliales, les plaquettes, les cellules du muscle lisse, les myocytes cardiaques et les neurones. Cette NOS peut être activée de manière dépendante ou non du calcium. Dans le premier cas, l'augmentation du calcium intracellulaire favorise la liaison du complexe Ca⁺⁺-calmoduline à la protéine eNOS, ce qui entraîne la dissociation du complexe eNOS-cavéoline-1 et induit l'activation de la eNOS (Fleming et Busse, 1999). La phosphorylation de la eNOS au niveau de son résidu sérine en position 1179 par AKT sous l'influence de l'insuline ou du 17 β -œstradiol stimule également l'activité de la eNOS, de manière indépendante du calcium. L'enzyme iNOS n'est pas exprimée de façon constitutive mais son expression peut être induite par certaines cytokines et endotoxines bactériennes. Son activation ne nécessite pas la présence de concentrations élevées en calcium puisque la iNOS est fortement couplée à la calmoduline (Sennequier et Vadon-Le Goff, 1998). Dans des conditions normales, la iNOS n'est généralement présente qu'en faible quantité dans la cellule et est majoritairement exprimée dans les macrophages. Les quantités de NO produites par la iNOS sont associées à des effets bactéricides et cytotoxiques contre les microorganismes ou les cellules tumorales (Walford et Loscalzo, 2003). En plus de ces trois isoformes cytoplasmiques, les cellules de mammifères expriment une isoforme mtNOS (mitochondrial NOS) au niveau de la mitochondrie. En accord avec le modèle d'organisation de la chaîne respiratoire mitochondriale en supercomplexes, la mtNOS est liée aux complexes respiratoires I et IV (Navarro et Boveris, 2008). La proximité de la mtNOS et de la COX renforce la notion d'un rôle régulateur physiologique du NO dans la respiration cellulaire.

C.5.2. Actions du NO sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Le monoxyde d'azote interagit avec la chaîne respiratoire de différentes manières. Le NO entraîne une inhibition rapide, sélective, forte mais réversible de la COX alors que les espèces réactives de l'azote (ERAs : le peroxyde d'azote ONOO⁻, l'ion nitrite NO₂⁻, le trioxyde de diazote N₂O₃ et les S-nitrosothiols) induisent une inhibition lente, non sélective, faible mais irréversible de nombreux composants de la mitochondrie (figure I18).

L'inhibition de l'activité de la COX par le NO a été montrée dans des mitochondries de cœur et de cerveau (Moncada et Bolaños, 2006). Le NO entraîne une inhibition rapide et réversible de la COX à des concentrations physiologiques de NO (de l'ordre du nanomolaire) (Cleeter *et al.*, 1994). Le NO se fixe à deux composants (le fer de l'hème a₃ et le cuivre du centre Cu_B) du site de liaison à l'oxygène, empêchant ainsi la liaison de l'oxygène à la COX. Le NO peut soit réduire l'hème a₃ pour donner a₃²⁺-NO soit réduire le Cu_B²⁺ pour donner Cu_B⁺-NO⁺ ; le NO⁺ peut alors rapidement être transformé en nitrite NO₂⁻. Ces deux formes d'inhibition sont rapides et réversibles en raison de la perte de liaison du NO ou du nitrite avec l'hème ou le cuivre (Mason *et al.*, 2006). La première forme d'inhibition est en compétition avec l'oxygène et réversible par la lumière alors que la seconde forme d'inhibition ne présente pas ces caractéristiques. Dans certaines cellules, telles que les cellules cardiaques ou gliales, le NO produit de manière endogène par les NO synthases peut fortement inhiber la respiration au niveau de la COX. Cette inhibition étant généralement en compétition avec l'oxygène, le NO augmente alors de manière importante l'affinité apparente de la respiration pour l'oxygène. L'inhibition de la COX par le NO semble être impliquée dans la signalisation cellulaire physiologique (Moncada et Bolaños, 2006). En effet, cette inhibition a pour conséquence la redistribution du dioxygène hors de la mitochondrie vers des cibles « non respiratoires » dépendantes de l'oxygène, entraînant par exemple la déstabilisation continue de HIF-1α (Hypoxia-Inducible Factor-1α) dans les cellules endothéliales vasculaires (Quintero *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'inhibition de la COX par le NO jouerait un rôle dans la modulation de la signalisation calcique dans le cerveau, de l'activation de la glycolyse dans certaines cellules telles que les astrocytes ou encore du potentiel de membrane Δψ_m (Moncada et Bolaños, 2006).

En plus de cette inhibition directe de la COX par le NO, le NO et surtout les ERAs peuvent entraîner une inhibition persistante de la chaîne respiratoire. Le peroxyde d'azote et des concentrations élevées de NO (supérieures à 1 μM) peuvent induire une augmentation

irréversible de l'affinité apparente pour l'oxygène dans la COX (isolée ou dans des cellules) (Sharpe et Cooper, 1998 ; Cooper et Davies, 2000). De plus, une exposition prolongée de cellules endothéliales d'artère pulmonaire de porc à un donneur de NO, le DETA-NO (2,2'-(hydroxynitrosohydrazino) bis-ethanamine) entraîne une inhibition graduelle et persistante du complexe IV, en association avec une réduction des ratios mitochondriaux de glutathion réduit GSH et oxydé GSSG. Cette inhibition de l'enzyme est due à une S-nitrosylation (addition d'un groupement NO^+ à un résidu thiol) de résidus cystéines de la sous-unité II de la COX (Zhang *et al.*, 2005). Par ailleurs, le peroxy-nitrite peut entraîner la peroxydation des lipides, tels que les cardiolipines, et entraîner une perte de la fonctionnalité de ceux-ci. Or, l'activité du complexe IV est directement corrélée à la quantité de cardiolipines dans la membrane interne (Stewart et Heales, 2003). Les autres complexes de la chaîne respiratoire peuvent également être inhibés par le NO et les ERAs (Brown et Borutaite, 2007). Des S-nitrosylations ou des nitrations (ajout d'un groupement NO_2^+ , principalement sur des résidus tyrosines) inactivent le complexe I. La sensibilité du complexe I au peroxy-nitrite et aux autres dérivés de l'azote semble dépendante du taux intracellulaire de glutathion réduit GSH. Ceci pourrait expliquer les disparités de régulation du complexe I observées dans des types cellulaires différents (tels que les cellules neuronales et gliales) soumis à un stress nitrosant (Stewart et Heales, 2003). Le NO et le peroxy-nitrite semblent également inhiber les complexes II et III mais ces données sont soumises à controverses (Cassina et Radi, 1996 ; Poderoso *et al.*, 1996). Le NO et les espèces réactives de l'azote peuvent aussi stimuler la production d'EROs et d'ERAs par la mitochondrie (Brown et Borutaite, 2007). A des niveaux élevés, le NO peut réagir directement avec l'oxygène dans la mitochondrie pour donner du NO_2 et du N_2O_3 . A des niveaux modérés, le NO peut augmenter la production de superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ (particulièrement au niveau des complexes I et III) et de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 en inhibant la respiration mitochondriale, alors qu'à des niveaux plus élevés le NO inhibe la production d' H_2O_2 en capturant l' $\text{O}_2^{\cdot-}$, ce qui résulte en la production de peroxy-nitrite ONOO^- . Cette formation locale de peroxy-nitrite entraîne une inhibition irréversible de la respiration et la production supplémentaire d'oxydants, cercle vicieux qui peut entraîner la mort cellulaire.

C.6. Contrôle du rendement de la phosphorylation oxydative.

L'efficacité stœchiométrique de la phosphorylation est définie par le ratio P/O, c'est à dire la quantité de phosphate inorganique P_i incorporé dans l'ATP par quantité d'oxygène consommé. Le rendement maximal de production d'ATP provenant de l'oxydation complète du palmitate est de 96,5 molécules d'ATP par palmitate, avec un ratio P/O maximal global de

2,1 (Brand, 2005). Le rendement maximal de production d'ATP provenant de l'oxydation complète du glucose dans une cellule utilisant la navette malate-aspartate pour le transfert des équivalents réduits dans la matrice mitochondriale est de 28,9 molécules d'ATP par glucose (27,5 si la navette glycérol phosphate est utilisée), avec un ratio P/O maximal de 2,41 (2,29 si la navette glycérol phosphate est utilisée). Le découplage de l'OxPhos désigne tout processus qui diminue le ratio P/O, principalement basé sur une diminution du gradient de protons, entraînant une perte de l'énergie redox et une augmentation de la thermogénèse. Ce ratio P/O peut en fait être défini par plusieurs points :

- Le nombre de protons envoyés vers l'espace intermembranaire pour chaque atome d'oxygène consommé (ratio H^+/O) et pour chaque paire d'électrons transférée d'un donneur d'électrons à un accepteur d'électrons (ratio $H^+/2e^-$).
- Le nombre de protons qui retournent vers la matrice mitochondriale pour chaque molécule d'ADP phosphorylée en ATP (ratio H^+/ATP).

De nombreux paramètres peuvent dégrader le gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne et diminuer le ratio P/O.

C.6.1. Découplage extrinsèque : fuite de protons.

Un moyen de diminuer le ratio P/O est la fuite de protons à travers la membrane mitochondriale interne : les protons pompés par les complexes de la chaîne respiratoire reviennent dans la matrice sans passer par l'ATP synthase et donc sans entraîner la synthèse d'ATP. Cette fuite de protons est une des voies majeures altérant profondément la bioénergétique de la mitochondrie. Chez le rat, la somme des fuites de protons des différents organes a été estimée à environ 25 % du taux métabolique basal (Rolfe et Brown, 1997). La fuite de protons est importante en conditions non phosphorylantes alors que, lorsque l'ADP et le phosphate inorganique sont présents, l'ATP synthase est la voie favorisée pour le retour des protons dans la matrice (Brookes, 2005). La fuite de protons est donc faible quand la demande en énergie est forte. Cette fuite de protons peut être divisée en plusieurs catégories : la fuite basale et la fuite inductible par de nombreuses conditions physiologiques et pathologiques (médiée en partie par les protéines découplantes).

○ *Fuite basale.*

La fuite basale n'est pas une simple fuite de protons à travers la double couche phospholipidique car dans des liposomes réalisés à partir de phospholipides mitochondriaux la fuite de protons est environ 20 % plus faible que dans les membranes mitochondriales

(Brookes *et al.*, 1997). La mitochondrie contient donc « quelque chose », conférant à sa membrane interne une perméabilité aux protons, qui est perdue quand les liposomes sont fabriqués. Différentes pistes ont été évoquées pour expliquer cette fuite basale de protons : notamment la présence de certaines protéines dans la membrane interne ou la capacité de certaines molécules (acides gras libres, superoxyde) à porter des H⁺ et à les faire traverser la membrane (Brookes, 2005) mais le mécanisme de fuite basale de protons reste peu clair.

○ ***Fuite inductible.***

Tous les tissus sont susceptibles de moduler la disponibilité en ATP selon les besoins énergétiques grâce à la régulation du couplage entre la respiration cellulaire et la synthèse d'ATP. La première protéine découplante, ou UCP, a été identifiée dans les mitochondries du tissu adipeux brun (Lin et Klingenberg, 1980). La thermogénine, ou UCP1, est responsable de la production de chaleur dans cet organe. En réponse au froid, la PKA est activée ce qui entraîne une surexpression de l'UCP1 et les stocks de triacylglycérol sont hydrolysés pour libérer des acides gras. Les acides gras agissent simultanément comme substrats du transport des électrons et activateurs de la conductance aux protons de l'UCP1, ce qui résulte en un découplage entre le transport des électrons et la synthèse d'ATP. La respiration découplée permet l'oxydation rapide des acides gras et produit de la chaleur qui sera distribuée dans le reste du corps par la circulation (Brand, 2005). Des protéines homologues à l'UCP1 – l'UCP2 et l'UCP3 – ont été identifiées dans d'autres tissus tels que le poumon, la rate, le cerveau, le muscle squelettique et la thyroïde. La protéine UCP2 est ubiquitaire. Un modèle a été proposé pour expliquer l'activation de ces UCPs (Brand, 2005). Dans ce modèle (figure I19), l'activation de l'UCP2 et l'UCP3, et peut-être de l'UCP1, par les EROs semble être essentielle pour permettre la conductance des protons. Les UCPs seraient inactives ou faiblement actives en absence d'espèces réactives de l'oxygène. A des concentrations physiologiques d'ATP, les UCPs découpleraient uniquement en présence d'EROs et d'acides gras. Une des fonctions de ce découplage régulé par les UCPs pourrait être d'atténuer les dommages causés par la production d'EROs au niveau de la chaîne de transport des électrons (Arsenijevic *et al.*, 2000 ; Criscuolo *et al.*, 2005 ; Brand et Esteves, 2005). Quand la force protomotrice est importante, le potentiel de membrane est élevé et entraîne une production importante d'EROs au sein de la chaîne respiratoire. Le découplage modéré induit par l'activation des UCPs par les EROs limiterait la force protomotrice et atténuerait la production d'EROs. Il semble donc qu'une boucle de rétrocontrôle existe entre les EROs et la

fuite de protons : la fuite de protons diminuant la production d'EROs et les EROs générés par la mitochondrie augmentant la fuite de protons (Brookes, 2005).

L'ANT, une des protéines les plus abondantes dans la membrane mitochondriale interne, semble également impliquée dans la fuite inductible de protons. Il a été montré que l'AMP peut agir de manière allostérique sur l'ANT pour induire une fuite de protons (Cadenas *et al.*, 2000). De plus, dans les mitochondries de la graisse brune, il existe une fuite basale de protons assez élevée, indépendante de l'UCP1, et cette fuite basale est sensible à un inhibiteur de l'ANT (Shabalina *et al.*, 2006). L'isoforme ANT2 serait impliquée dans le découplage induit par les acides gras alors que l'ANT1 serait responsable d'une part importante de la fuite basale de protons élevée dans les mitochondries du tissu adipeux brun.

En plus de ces différents mécanismes qui dégradent le gradient de protons, une diminution de l'efficacité des pompes à protons (diminution de la stoechiométrie H^+/e^- ou H^+/ATP) peut entraîner une diminution du ratio P/O. Ce phénomène correspond au découplage intrinsèque.

C.6.2. Découplage intrinsèque : patinage des pompes à protons.

Si les pompes à protons ne sont pas parfaitement couplées, elles peuvent patiner, particulièrement quand la force protomotrice est importante, ce qui a pour conséquence la baisse de la quantité de protons pompés par les complexes de la chaîne respiratoire pour chaque paire d'électrons transférée ou la diminution de la quantité d'ATP fabriquée par l'ATP synthase pour chaque proton qui la traverse. Le patinage de la conversion d'énergie est en théorie possible pour toutes les pompes à protons. Cependant, une signification physiologique de cette régulation par patinage (ou slipping) *in vivo* n'a été montrée que pour le complexe IV et l'ATP synthase.

L'ATP synthase consiste en deux moteurs rotatifs qui, en fonction de la demande en ATP ou de la force protomotrice, peuvent fonctionner dans les deux sens. Le patinage ne se produit pas au niveau de la conversion entre énergie chimique et énergie mécanique dans le domaine F_1 mais est possible au niveau de la conversion entre énergie mécanique et énergie électrochimique dans le domaine F_0 (Junge *et al.*, 2001). Par ailleurs, la stoechiométrie H^+/ATP de l'ATP synthase est variable en fonction du nombre de sous-unités c dans l'anneau rotatif, ce nombre différant selon les espèces (Kadenbach, 2003).

De nombreux auteurs ont décrit une diminution de la stoechiométrie H^+/e^- au niveau du complexe IV quand la force protomotrice est élevée (Azzone *et al.*, 1985 ; Babcock et

Wikström, 1992 ; Capitanio *et al.*, 1996). Le patinage de la COX permettrait de prévenir la production d'EROs quand le potentiel de membrane est élevé (Papa *et al.*, 1997). Par ailleurs, chez les mammifères, il existe plusieurs isoformes de la cytochrome *c* oxydase, différant principalement au niveau des sous-unités VIa, VIIa et VIII (Kadenbach, 2003). Concernant l'isoenzyme de type cardiaque, la diminution de la stœchiométrie H^+/e^- est due à un échange entre l'ADP lié et l'ATP au niveau du domaine matriciel de la sous-unité VIaH. Cette diminution de stœchiométrie H^+/e^- dans l'enzyme du cœur et du muscle squelettique pour des ratios ATP/ADP élevés permettrait de stimuler la thermogenèse au repos.

C.7. Régulation de la phosphorylation oxydative par le calcium.

C.7.1. Modulation de l'apport de substrats et de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire.

Une augmentation du taux de calcium intra-mitochondrial augmente l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire. En effet, la phosphorylation du complexe I entraîne l'activation de celui-ci alors que la déphosphorylation du complexe IV entraîne son activation ; or les déphosphorylations du complexe I et du complexe IV de la chaîne respiratoire sont respectivement inactivée ou activée par le calcium. Par ailleurs, l'ATP synthase et l'ANT sont activées par le calcium (Moreno-Sánchez, 1985 ; Harris et Das, 1991). En plus de cette stimulation directe de la phosphorylation oxydative par le calcium, des déshydrogénases impliquées dans le cycle de Krebs (pyruvate, isocitrate et 2-oxoglutarate déshydrogénases) sont sensibles au calcium. L'activation de ces enzymes par le calcium entraîne une stimulation du système d'oxydation des substrats (McCormack et Denton, 1990) et donc par la suite une augmentation de la phosphorylation oxydative.

De manière opposée, l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire obtenue par ajout de l'ionophore de calcium A23187 dans des myotubes en culture entraîne une diminution de l'activité de la COX (Freysenet *et al.*, 2004). De même, l'addition de calcium dans des mitochondries isolées de cerveau de rat entraîne une baisse de l'activité du complexe IV (Calderón-Cortés *et al.*, 2008). Dans ce cas, l'inhibition de la COX par le calcium est dépendante de la production de NO par la NO synthase mitochondriale, enzyme dont l'activité de synthèse du NO est contrôlée par le calcium. Dans des mitochondries de cerveau, la perte du cytochrome *c* causée par le calcium entraîne une inhibition de l'activité du complexe IV et une altération du potentiel de membrane (Buratta *et al.*, 2006).

Il a par ailleurs été montré que les protéines UCP2 et UCP3 sont impliquées dans la séquestration du calcium dans la matrice mitochondriale par l'uniport calcique mitochondrial (Trenker *et al.*, 2007). Dans la plupart des cellules, l'extrusion de quantités élevées de calcium mitochondrial est assurée par l'échangeur mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (figure I20). Le Na^+ est ensuite expulsé par un échangeur Na^+/H^+ non identifié, ce qui entraîne une acidification de la matrice et diminue le gradient de protons à travers la membrane mitochondriale interne (Graier *et al.*, 2007). Cette acidification de la matrice dépendante du calcium augmente l'activité de la chaîne respiratoire sans augmenter la formation d'ATP car la réduction du gradient de protons diminue l'activité de l'ATP synthase. La consommation de calcium par la mitochondrie, assurée par les protéines UCP2 et UCP3, pourrait donc entraîner un découplage mitochondrial sans conductance directe des protons par ces UCPs (Graier *et al.*, 2008). Un tel découplage médié par le calcium contrebalance l'effet stimulateur du calcium sur l'activité des déshydrogénases mitochondriales. Le résultat de cette régulation bidirectionnelle de la formation d'ATP par le calcium pourrait dépendre de la quantité de Ca^{++} séquestré dans la mitochondrie et être stimulateur à des concentrations calciques mitochondriales faibles et inhibiteur à des concentrations plus élevées pathologiques.

C.7.2. Modulation de l'homéostasie des EROs.

Le calcium intracellulaire module à la fois la production et la détoxification des EROs. Une conséquence du fonctionnement de la chaîne respiratoire est la production d'EROs par la mitochondrie. Le calcium peut augmenter le métabolisme et en conséquence augmenter la production d'EROs. Il existe en effet une corrélation entre la production mitochondriale d'EROs et le taux métabolique basal (Perez-Campo *et al.*, 1998). Le calcium peut également, de manière spécifique du tissu, augmenter la production d'EROs quand les complexes de la chaîne respiratoire sont inhibés. Des études *in vitro* ont montré que le calcium stimule la production d'EROs dans des mitochondries isolées de cœur en présence d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III, et dans des mitochondries de cerveau en présence de roténone, un inhibiteur du complexe I (Yan *et al.*, 2006). Cependant, les mécanismes de production mitochondriale d'EROs par le calcium restent mal compris. Le calcium peut, en revanche, directement stimuler les enzymes du système de défense antioxydante telles que les SODs. De plus, la calmoduline, protéine ubiquitaire liant le calcium, interagit avec les enzymes antioxydantes impliquées dans l'homéostasie des EROs (Yan *et al.*, 2006).

En plus de cette adaptation rapide de la fonction énergétique mitochondriale, les cellules peuvent faire varier leur production d'ATP par une adaptation à plus long terme impliquant une modification de la quantité d'enzymes du système OxPhos dans la cellule. Cette variation quantitative implique le mécanisme de biogenèse mitochondriale, sans modification d'activité de chacun des composants de ce système.

D. Biogenèse mitochondriale.

Le protéome mitochondrial comprend environ 1100 à 1500 protéines. La vaste majorité d'entre elles est codée par des gènes nucléaires alors que le génome mitochondrial code pour 13 sous-unités des enzymes de la phosphorylation oxydative. La biogenèse mitochondriale nécessite donc la coordination de la transcription d'un large nombre de gènes dans le noyau et des gènes essentiels dans la mitochondrie. La transcription de ces gènes localisés dans deux compartiments cellulaires distincts dépend de facteurs de transcription codés par le noyau. Certains de ces facteurs sont dirigés vers la mitochondrie où ils permettent la transcription bidirectionnelle de l'ADN mitochondrial. D'autres facteurs agissent au niveau de gènes nucléaires qui codent pour la majorité des sous-unités de la chaîne respiratoire et de nombreux autres gènes impliqués notamment dans l'assemblage et le fonctionnement de la chaîne respiratoire. La co-expression de ces facteurs est par ailleurs contrôlée directement ou indirectement par les coactivateurs transcriptionnels de la famille PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1) dont l'expression est dépendante de nombreux signaux environnementaux (figure I21).

D.1. Facteurs de transcription gouvernant les interactions noyau-mitochondrie.

Certains de ces facteurs participent à la transcription de l'ADNmt. La transcription de l'ADNmt par la polymérase mitochondriale POLRMT (POLYmerase (RNA) MiTOchondrial) est initiée de manière bidirectionnelle au niveau des bruns lourd et léger de l'ADNmt dans la région régulatrice « D-loop » à partir des promoteurs HSP et LSP. Elle nécessite l'assemblage de plusieurs facteurs transcriptionnels dont TFAM (Transcription Factor A, Mitochondrial) et les isoformes de mtTFB (mitochondrial Transcription Factor B) TFB1M et TFB2M. Le facteur de terminaison mTERF (mitochondrial transcription TERmination Factor) est impliqué dans la terminaison de la transcription de l'ADNmt. TFAM est essentiel pour l'activation de la transcription de l'ADNmt. TFB1M et TFB2M, en agissant comme des

facteurs de reconnaissance des promoteurs, sont nécessaires pour la transcription basale de l'ADNmt. Ils augmentent de manière importante la transcription de l'ADNmt en présence de TFAM et POLRMT (Gleyzer *et al.*, 2005).

D'autres facteurs gouvernent l'expression coordonnée de gènes impliqués dans la chaîne respiratoire. Parmi eux, les facteurs NRF-1, NRF-2, ERR α , PPARs, CREB, c-MYC, Sp1 et YY1.

D.1.1. NRFs (Nuclear Respiratory Factors).

L'analyse du promoteur du cytochrome *c* a mis en évidence un site palindromique de reconnaissance pour le facteur de transcription **NRF-1** (Evans et Scarpulla, 1989). Les sites de liaison à NRF-1 sont également présents dans les promoteurs de nombreux autres gènes impliqués dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Evans et Scarpulla, 1990). NRF-1 a un domaine unique de liaison à l'ADN, il lie son site de reconnaissance sous forme d'homodimère et fonctionne comme un régulateur positif de la transcription (Scarpulla, 2008b). Dans les cellules en prolifération, la protéine NRF-1 est phosphorylée sur une sérine située dans sa partie N-terminale ; cette phosphorylation est associée à une augmentation de ses activités de liaison à l'ADN et de trans-activation (Gugneja et Scarpulla, 1997 ; Herzig *et al.*, 2000). NRF-1 joue un rôle clef dans la régulation de l'expression de nombreux gènes nucléaires requis pour le fonctionnement de la respiration mitochondriale tels que les gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (Scarpulla, 2002). De plus, NRF-1 participe à la coordination de l'expression des sous-unités codées par les deux génomes en contrôlant l'expression de régulateurs majeurs de la transcription mitochondriale tels que les gènes *TFAM*, *TFB1M* et *TFB2M* (Gleyzer *et al.*, 2005). NRF-1 permet également l'expression de facteurs impliqués dans l'import de protéines et l'assemblage de sous-unités de la chaîne respiratoire (Scarpulla, 2008a). Par ailleurs, des souris *NRF-1*^{-/-} présentent une mortalité embryonnaire précoce accompagnée d'une sévère diminution de l'ADNmt (Huo et Scarpulla, 2001). NRF-1 est donc un facteur jouant un large rôle dans l'orchestration de la biogenèse mitochondriale (figure I22). En effet, une augmentation de l'expression de l'ARNm ou de l'activité de liaison à l'ADN de NRF-1 a été associée dans de nombreuses études à des effets généralisés sur la biogenèse mitochondriale. NRF-1 est surexprimé durant la réponse adaptative du muscle squelettique à l'exercice chez le rat (Murakami *et al.*, 1998) ou en réponse à une augmentation de calcium dans des myotubes en culture (Ojuka *et al.*, 2003), situations qui entraînent notamment une augmentation de

l'expression du cytochrome *c* ou de sous-unités de la COX. L'ARNm de NRF-1 est également surexprimé quand la biogenèse mitochondriale est induite par l'hormone thyroïdienne T3 (Weitzel *et al.*, 2003) ou par le 17 β -œstradiol et son récepteur (Chen *et al.*, 2009). Chez le rat, une augmentation de l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) suite à un traitement par un analogue de la créatine kinase induit une augmentation de l'activité de liaison à l'ADN de NRF-1, une augmentation de l'expression de l'ARNm de l'ALA synthase (AminoLevulinic Acid synthase), enzyme permettant la synthèse de l'hème, ainsi qu'une augmentation du contenu en cytochrome *c* et de la densité mitochondriale (Bergeron *et al.*, 2001). Il a été montré par ailleurs une augmentation de l'expression de l'ARNm et de l'activité de liaison à l'ADN de NRF-1 suite à un stress oxydant. Toutes ces données sont en accord avec un rôle général de NRF-1 dans les interactions noyau-mitochondrie. NRF-1 régule également de nombreux gènes avec des fonctions non mitochondriales et en particulier des gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et la prolifération. Ceci pourrait expliquer la létalité embryonnaire précoce des souris KO pour *NRF-1*.

L'équipe de Scarpulla (Virbasius *et al.*, 1993) a identifié **NRF-2** comme étant un activateur du promoteur de la sous-unité IV de la COX. La protéine NRF-2 est composée de 5 sous-unités (α , β_1 , β_2 , γ_1 , γ_2). La sous-unité α lie l'ADN alors que les autres s'associent à cette sous-unité α pour former des complexes hétérodimériques ou hétérotétramériques. NRF-2 est un homologue humain de GABP (GA-Binding Protein) murin composé de trois sous-unités (α , β_1 , β_2). Les sous-unités NRF-2 β humaines correspondant à GABP β_1 possèdent un domaine de dimérisation qui facilite la liaison des hétérotétramères à l'ADN (Scarpulla, 2008b). Des sites de liaison de NRF-2 fonctionnels ont été identifiés dans les promoteurs de nombreux gènes codant pour des composants de la chaîne respiratoire et des protéines impliquées dans l'import mitochondrial ainsi que dans les promoteurs de *TFAM*, *TFB1M* et *TFB2M* (Hock et Kralli, 2009). En accord avec un rôle de NRF-2 dans l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale, l'inactivation du gène *NRF-2* dans des cellules entraîne une réduction de l'expression des dix gènes *COX* codés par le noyau, de *TFAM*, *TFB1M* et *TFB2M* et d'un composant impliqué dans l'import mitochondrial *TOMM20*, ainsi qu'une réduction de 20 % de l'activité de la COX (Ongwijitwat *et al.*, 2006).

D.1.2. ERRs (*Estrogen-Related Receptors*).

Les ERRs appartiennent à la famille des récepteurs nucléaires et présentent des similarités de séquence avec les récepteurs aux œstrogènes, particulièrement au niveau des domaines de

liaison à l'ADN. Malgré ces similarités, les ERRs ne sont pas activés par les œstrogènes et leur activation transcriptionnelle se fait en absence de ligand (Kallen *et al.*, 2004). L'activité transcriptionnelle des ERRs est en fait régulée par des interactions physiques avec des corégulateurs (figure I23). Les ERRs, en formant un complexe avec RIP140 (Receptor-Interacting Protein 140), répriment l'expression de gènes alors que le plus caractérisé des ERRs, $ERR\alpha$, augmente l'expression de gènes quand il est associé aux coactivateurs de la famille PGC-1 (Villena et Kralli, 2008). Les ERRs sont aussi sujets à des régulations par phosphorylation et sumoylation (liaison covalente d'une ou plusieurs protéines SUMO) qui affectent la liaison à l'ADN, la dimérisation et l'interaction des coactivateurs (Giguère, 2008). Les ERRs se lient à l'ADN au niveau des ERREs (ERR Response Elements) sous forme de monomères, d'homodimères ou d'hétérodimères des différents ERRs. Ces ERREs sont présents dans les promoteurs de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans le système OxPhos et sont souvent trouvés en association avec les sites de reconnaissance pour les NRFs (Mootha *et al.*, 2004). Les ERRs régulent en fait l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans tous les aspects du fonctionnement de la mitochondrie (figure I24). Parmi les gènes cibles des ERRs, se trouvent des gènes codant pour des protéines impliquées dans l'oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative, la production et l'export d'ATP, la transcription et la traduction de l'ADNmt (Giguère, 2008). Par ailleurs, des expériences d'inhibition d' $ERR\alpha$ ont montré que la présence d' $ERR\alpha$ endogène est nécessaire à l'induction de la biogenèse et de la respiration mitochondriales par le coactivateur PGC-1 α (Schreiber *et al.*, 2004). L'étude de souris $ERR\alpha^{-/-}$ a permis de clarifier le rôle physiologique d' $ERR\alpha$ dans le fonctionnement mitochondrial. Le tissu adipeux brun de ces souris KO présente une diminution de 40 % du contenu mitochondrial et des capacités oxydatives par rapport à ce observé pour des souris sauvages. Ce déficit énergétique rend ces souris incapables de conserver leur température corporelle quand elles sont soumises à des températures moyennement froides (13°C), malgré une expression normale de la protéine UCP1 (Villena *et al.*, 2007). Une déficience énergétique, sans altération du contenu mitochondrial, a également été observée dans le cœur de ces souris lors d'une augmentation de la charge de travail (Huss *et al.*, 2007). Par ailleurs, les macrophages dont le gène $ERR\alpha$ est invalidé ont des capacités de lutte contre les pathogènes diminuées et les souris KO pour $ERR\alpha$ ont des taux de survie plus faible que les souris sauvages lors d'une infection par la *Listeria* (Sonoda *et al.*, 2007). Des changements d'expression de gènes mitochondriaux et de la capacité oxydative ont également été observés dans d'autres tissus mais ces souris sont pourtant viables et fertiles. Le phénotype modéré

observé dans ces souris peut être expliqué de deux manières non exclusives. D'une part, ERR α pourrait faire partie du mécanisme d'adaptation aux signaux spécifiques du tissu (dans son état physiologique) et ne pas être essentiel pour l'expression basale de gènes impliqués dans le fonctionnement de la mitochondrie. D'autre part, la perte d'ERR α pourrait être compensée par une augmentation de l'activité d'autres ERRs ou d'autres facteurs ayant des rôles similaires.

D.1.3. PPARs.

Les récepteurs nucléaires PPARs sont connus pour leurs effets sur le transport et le métabolisme des lipides. PPAR α et PPAR δ sont principalement des régulateurs de l'oxydation des lipides alors que PPAR γ est impliqué dans la synthèse et le stockage des lipides. Ces facteurs sont également impliqués dans la biogenèse mitochondriale de manière tissu-spécifique (Hock et Kralli, 2009). L'activation de PPAR γ et PPAR δ induit la biogenèse mitochondriale au niveau de la graisse blanche et du muscle squelettique respectivement. De plus, ces deux facteurs favorisent la biogenèse mitochondriale et le fonctionnement du métabolisme oxydatif au cours de l'activation alternative des macrophages.

D.1.4. CREB.

CREB est un facteur de transcription ubiquitaire impliqué dans la régulation de fonctions biologiques très variées. Le promoteur du cytochrome *c* contient des sites de reconnaissance pour les facteurs de transcription de la famille ATF (Activating Transcription Factor)/CREB (Evans et Scarpulla, 1989 ; Gopalakrishnan et Scarpulla, 1994). La phosphorylation de CREB et de NRF-1 est liée à l'induction de l'expression du cytochrome *c* par le sérum dans des fibroblastes quiescents (Herzig *et al.*, 2000 ; Vercauteren *et al.*, 2006).

D.1.5. Sp1 (Specificity protein 1).

Une activité maximale du promoteur du cytochrome *c* dépend également du facteur de transcription général Sp1 (Evans et Scarpulla, 1989). Plusieurs études ont montré que ce facteur est impliqué dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale (Freyssenet *et al.*, 2004 ; Krafts *et al.*, 2006).

D.1.6. YY1 (Yin Yang 1).

Le facteur d'initiation de la transcription YY1 a été impliqué à la fois dans la régulation positive et négative de gènes codant pour des sous-unités de la COX (Basu *et al.*, 1997 ; Seelan et Grossman, 1997). De plus, dans le muscle, YY1 en complexe avec PGC-1 α permet

l'augmentation de l'expression de gènes de la mitochondrie et de la respiration cellulaire (Cunningham *et al.*, 2007). Par ailleurs, tout comme les souris KO pour *NRF-1* ou *NRF-2α*, des souris KO pour *YY1* présentent une létalité embryonnaire précoce (Donohoe *et al.*, 1999).

D.1.7. c-MYC.

Le facteur c-MYC semble également jouer un rôle dans la biogenèse mitochondriale. Ce facteur peut induire l'expression du cytochrome *c* et d'autres gènes cibles de NRF-1 en se liant à des sites contenus dans le promoteur de *NRF-1* et sensibiliser les cellules à l'apoptose en dérégulant l'expression de gènes cibles de NRF-1 (Morrish *et al.*, 2003). De plus, des fibroblastes dont le gène *MYC* a été invalidé présentent une diminution de leur contenu mitochondrial. La ré-expression de c-MYC dans ces cellules permet de restaurer partiellement la masse mitochondriale (Li *et al.*, 2005).

D.2. Coactivateurs nucléaires impliqués dans la biogenèse mitochondriale.

Les coactivateurs de la famille PGC-1 jouent un rôle important dans le contrôle de la biogenèse et du fonctionnement de la mitochondrie en intégrant des signaux externes et internes et en augmentant de manière coordonnée l'activité de divers facteurs de transcription régulant l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le fonctionnement mitochondrial. PGC-1α a été identifié par l'équipe de Spiegelman (Puigserver *et al.*, 1998) comme une protéine interagissant avec PPARγ. PGC-1β et PRC (PGC-1-Related Coactivator) ont été identifiés sur la base de leur similarité avec PGC-1α. Ces trois coactivateurs partagent des caractéristiques moléculaires importantes pour la régulation des gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial.

D.2.1. PGC-1α.

PGC-1α possède différents domaines fonctionnels référencés par Scarpulla (2008a). Bien que n'ayant pas d'activité de modification des histones par lui-même, PGC-1α interagit par l'intermédiaire d'un puissant domaine d'activation transcriptionnel NH₂-terminal avec des cofacteurs possédant une activité intrinsèque de remodelage de la chromatine (figure I25). En plus de PPARγ, PGC-1α se lie à plusieurs récepteurs nucléaires aux hormones. Il active le promoteur d'*UCP-1* par l'intermédiaire de PPARγ et du récepteur thyroïdien β. Le motif LXXLL adjacent au domaine d'activation est essentiel pour la coactivation par l'intermédiaire de certains récepteurs nucléaires. La région COOH-terminale, qui comprend un domaine riche

en arginines et en sérines ainsi qu'un domaine de liaison à l'ARN, permettrait le couplage entre l'épissage de l'ARN pré-messager et la traduction.

○ ***Implications de PGC-1 α dans le fonctionnement mitochondrial.***

- *Rôles de PGC-1 α dans le fonctionnement de la machinerie oxydative mitochondriale.*

PGC-1 α est impliqué dans la régulation de la thermogenèse adaptative ; l'expression de l'ARNm de ce coactivateur est considérablement augmentée dans la graisse brune après exposition au froid (Puigserver *et al.*, 1998). La thermogenèse adaptative passe par une induction de la biogenèse mitochondriale et PGC-1 α est un puissant inducteur de ce procédé. La surexpression de PGC-1 α dans des myoblastes en culture ou dans d'autres cellules entraîne une augmentation de l'expression des transcrits de sous-unités de la chaîne respiratoire, des protéines COX IV et cytochrome *c* ainsi que de la quantité d'ADNmt (Wu *et al.*, 1999). NRF-1 est une cible importante pour l'induction de la biogenèse mitochondriale médiée par PGC-1 α (figure I26). Ce coactivateur peut induire l'expression de *TFAM*, *TFB1M* et *TFB2M* par l'intermédiaire de NRF-1 et NRF-2 ce qui entraîne une augmentation de la transcription de l'ADNmt (Gleyzer *et al.*, 2005). ERR α a également été associé à la biogenèse mitochondriale induite par PGC-1 α (Schreiber *et al.*, 2004). En plus de ses effets sur la chaîne respiratoire et la transcription de l'ADNmt, PGC-1 α participe au fonctionnement oxydatif mitochondrial en induisant l'expression de gènes impliqués dans les voies d'oxydation des acides gras et de synthèse de l'hème. PPAR α induit l'expression des ARNm des enzymes responsables de l'oxydation des acides gras ; son expression est enrichie dans la graisse brune et d'autres tissus présentant un fort métabolisme oxydatif comme le cœur, le rein et le muscle squelettique (Gulick *et al.*, 1994). La fixation de PPAR α sur le motif LXXLL de PGC-1 α est associée à l'activation des promoteurs dépendant de PPAR α (Vega *et al.*, 2000). PGC-1 α peut aussi utiliser NRF-1 pour induire la transcription de la δ -ALA synthase, enzyme limitante de la voie de synthèse de l'hème (Handschin *et al.*, 2005). Tel que le résume la figure I26, PGC-1 α a donc la capacité d'intégrer les activités de divers facteurs de transcription impliqués dans l'expression et le fonctionnement de la machinerie oxydative mitochondriale pour induire la biogenèse et la respiration mitochondriales.

- *Implication de PGC-1 α dans le système de défense des EROs.*

La chaîne de transport des électrons mitochondriale est la principale source de production des EROs dans la cellule. Dans des cellules, un stress oxydatif engendré par le peroxyde

d'hydrogène H₂O₂ induit non seulement l'expression de gènes codant pour des protéines du système de défense des EROs telles que les superoxydes dismutases SOD1 et SOD2, la catalase et la glutathion peroxydase mais aussi l'expression des ARNm de PGC-1 α , de l'UCP2, de l'UCP3 et de l'ANT1 (St-Pierre *et al.*, 2006). Un ARN interférent dirigé contre PGC-1 α abolit l'augmentation d'expression de ces gènes suite à un traitement par H₂O₂. De plus, des souris PGC-1 α ^{-/-} présentent un système de défense contre les EROs réduit (St-Pierre *et al.*, 2006). La liaison de la forme phosphorylée de CREB sur le promoteur de PGC-1 α augmente suite à un traitement par H₂O₂, ce qui suggère l'implication de CREB dans l'induction de l'expression des gènes du système de défense des EROs médiée par PGC-1 α . Par ailleurs, Rangwala et ses collaborateurs (2007) ont montré que l'induction, par PGC-1 α , de l'expression de gènes du système de défense des EROs, dont SOD2, nécessite la présence d'ERR α .

PGC-1 α est donc impliqué dans l'activation de nombreux mécanismes. L'expression transcriptionnelle de PGC-1 α peut être régulée physiologiquement par différentes voies de signalisation.

- *Voies de signalisation régulant l'expression de PGC-1 α .*

- *Induction de PGC-1 α et de la biogenèse mitochondriale par la voie de l'AMPc.*

Dans le tissu adipeux brun, suite à une exposition au froid, la production d'AMPc augmente, ce qui entraîne la phosphorylation de CREB par la PKA et, par conséquent, active CREB (figure I26). CREB peut alors induire des effets directs et indirects sur le programme de thermogénèse en induisant notamment l'expression de PGC-1 α et de l'UCP1 (Cao *et al.*, 2004). En réponse au jeûne, la voie AMPc/CREB peut également induire l'expression de PGC-1 α dans le foie où le coactivateur régule l'expression de gènes codant pour des enzymes de la gluconéogenèse (Yoon *et al.*, 2001).

- *Induction de PGC-1 α et de la biogenèse mitochondriale dans le muscle par l'exercice et la privation d'énergie.*

De nombreuses études ont montré que PGC-1 α est impliqué dans la biogenèse mitochondriale induite par l'exercice dans le muscle squelettique. Chez des rats, après exercice, l'expression de PGC-1 α , l'activité de liaison à l'ADN de NRF-1 et de NRF-2 ainsi que l'expression de plusieurs gènes cibles des NRFs sont augmentées (Baar *et al.*, 2002). Durant la contraction musculaire, la concentration calcique cytoplasmique augmente. Des

changements d'expression d'ARNm similaires à ceux obtenus après exercice chez le rat ont été observés dans des myotubes en culture en réponse à une élévation des taux de calcium (Ojuka *et al.*, 2003 ; Wright *et al.*, 2007), ce qui suggère un rôle de PGC-1 α dans la biogenèse mitochondriale adaptative des cellules musculaires squelettiques.

La privation en énergie, consécutive à l'exercice, augmente l'expression de PGC-1 α dans le muscle (figure I26). La consommation d'ATP durant l'exercice conduit à une élévation du ratio AMP/ATP, ce qui augmente l'activité de l'AMPK. Or, l'AMPK participe à la biogenèse mitochondriale induite par PGC-1 α . En effet, chez des souris sauvages, la déplétion des stocks de phosphocréatine du muscle par un analogue de la créatine kinase entraîne une activation de l'AMPK ce qui a pour conséquences une augmentation de l'expression de l'ARNm de PGC-1 α , de la protéine cytochrome *c* et de la densité mitochondriale (Zong *et al.*, 2002). En revanche, chez des souris transgéniques exprimant une forme mutante dominante-négative de l'AMPK dans le muscle squelettique, aucun de ces paramètres n'est augmenté suite au traitement par l'analogue de la créatine kinase. De plus, l'exercice modéré ou une stimulation électrique entraînent l'activation de l'AMPK et une augmentation de l'ARNm et de la protéine PGC-1 α (Terada *et al.*, 2002 ; Atherton *et al.*, 2005). Par ailleurs, l'augmentation du taux de calcium par la contraction musculaire active la CaMK (Ca⁺⁺/Calmodulin-dependent protein Kinase) qui entraîne l'activation de CREB et, associée à l'activation de l'AMPK, conduit à l'induction de l'expression de PGC-1 α et à l'activation des NRFs (Ojuka, 2004). Cependant, le rôle physiologique de la CaMK dans la régulation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle en réponse à l'exercice physique demeure source de controverses (Reznick et Shulman, 2006).

L'augmentation de la concentration en calcium induite par l'exercice entraîne également la transcription de PGC-1 α par l'intermédiaire de la calcineurine A et de MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2), facteur régulant l'expression de sous-unités de la COX spécifiques du muscle et dont l'expression est elle-même régulée par le coactivateur PGC-1 α (Handschin *et al.*, 2003). La contraction musculaire conduit aussi à l'activation de la voie des MAPKs, ce qui induit l'expression de PGC-1 α par l'intermédiaire d'ATF2 (Akimoto *et al.*, 2005).

- *Induction de PGC-1 α et de la biogenèse mitochondriale par le monoxyde d'azote.*

Le traitement de différents types de cellules (adipocytes primaires et 3T3, cellules monocytaires U937, cellules HeLa, myoblastes L6 et cellules de phéochromocytome PC12),

pendant plusieurs jours, par le SNAP ((±)-S-Nitroso-N-AcetylPenicillamine) ou le DETA-NO, des donneurs de NO, augmente le contenu en ADNmt ainsi que l'expression de la sous-unité COX IV et du cytochrome *c* ; ces effets sont abolis par l'oxyhémoglobine qui capture le NO (Nisoli *et al.*, 2003 ; Nisoli *et al.*, 2004). Cette augmentation de la biogenèse mitochondriale passe par une augmentation de l'expression des ARNm de PGC-1 α , NRF-1 et TFAM et dépend du second messager GMPc (Guanosine MonoPhosphate cyclique). Par ailleurs, le NO entraîne la biogenèse de mitochondries fonctionnellement actives capables de produire de l'ATP par la phosphorylation oxydative (Nisoli *et al.*, 2004). L'étude de souris *eNOS*^{-/-} a montré que la NOS endothéliale joue un rôle très important dans la biogenèse mitochondriale (Nisoli *et al.*, 2003). La graisse brune de ces souris est fonctionnellement inactive avec un défaut de la biogenèse mitochondriale et une diminution de la température corporelle lors de l'exposition au froid. La délétion de *eNOS* est suffisante pour réduire la masse mitochondriale même dans des tissus ayant une expression basale des autres formes de NOS, nNOS et iNOS, et est accompagnée d'une diminution de la consommation d'oxygène et du taux d'ATP comparativement à ce qui est observé chez les souris sauvages. L'induction de l'expression de la NOS endothéliale dans des cellules HeLa, n'exprimant pas cette protéine, entraîne en revanche les mêmes effets que ce qui est observé avec les donneurs de NO ; ces effets sont abolis par un inhibiteur de la eNOS, le L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginine-Méthyl Ester) (Nisoli *et al.*, 2003). Par ailleurs, le pré-conditionnement hypoxique induit une biogenèse mitochondriale subcorticale dans le cerveau de souris par un mécanisme nécessitant la régulation de PGC-1 α et de CREB par la nNOS (Gutsaeva *et al.*, 2008).

D.2.2. PGC-1 β .

PGC-1 β possède une séquence protéique plus grande que celle de PGC-1 α mais partage des similarités de séquences avec ce coactivateur sur toute sa longueur (Lin *et al.*, 2002). L'expression tissulaire de l'ARNm de PGC-1 β est parallèle à celle de PGC-1 α , avec les niveaux les plus élevés dans la graisse brune, le cœur et le muscle squelettique, tissus possédant un contenu mitochondrial et une production d'énergie par voie oxydative élevés. En revanche, PGC-1 β diffère de PGC-1 α dans la mesure où son expression n'est pas induite dans la graisse brune après une exposition au froid et qu'il est un faible inducteur de l'expression de gènes impliqués dans la gluconéogenèse dans le foie (Meirhaeghe *et al.*, 2003). PGC-1 β se lie à NRF-1 et entraîne une augmentation de la transcription des gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale (Lin *et al.*, 2002). La surexpression de PGC-1 β dans des cellules musculaires en culture induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale et de la

consommation d'oxygène (St-Pierre *et al.*, 2003). Chez des souris dans lesquelles PGC-1 β est surexprimé au niveau du muscle squelettique, ce coactivateur entraîne un accroissement massif du contenu mitochondrial (Arany *et al.*, 2007). Cette biogenèse mitochondriale induite par PGC-1 β est le résultat de l'activation de facteurs de transcription tels que MEF2, ERR α et PPAR α . Tout comme PGC-1 α , PGC-1 β semble impliqué dans la détoxification des EROs. Il stimule en effet l'expression de la SOD et de la glutathion peroxydase ainsi que celle des protéines UCP2 et UCP3.

D.2.3. PRC.

Le facteur PRC a été identifié par son homologie de séquence nucléotidique avec PGC-1 α . Il présente des similarités de séquence protéique avec PGC-1 α dans le domaine carboxy-terminal R/S et le motif de reconnaissance de l'ARN (Andersson et Scarpulla, 2001). Comme l'illustre la figure I27, ces deux coactivateurs partagent également un domaine d'activation amino-terminal, une région centrale riche en prolines, la signature LXXLL et le motif DHDY de liaison à HCF-1 (Host Cell Factor-1).

PRC ressemble à PGC-1 α et β par son interaction avec NRF-1 *in vitro* et *in vivo* et sa capacité à activer la transcription des gènes cibles de NRF-1 (Andersson et Scarpulla, 2001). L'activation transcriptionnelle dépendante de NRF-1 nécessite le domaine d'activation de PRC, ce qui suggère que ce domaine partage avec celui de PGC-1 α la fonction de recrutement de cofacteurs remodelant la chromatine permettant la transcription (Wallberg *et al.*, 2003). De plus, PRC ressemble à PGC-1 α car il peut activer, par l'intermédiaire de NRF-1 et de NRF-2, les promoteurs du cytochrome *c*, de la 5-ALA synthase, de *TFB1M* et de *TFB2M* (Gleyzer *et al.*, 2005). Malgré ces similarités, l'expression de l'ARNm de PRC n'est pas plus importante dans la graisse brune que dans la graisse blanche et est seulement très faiblement augmentée dans la graisse brune après une exposition au froid (Andersson et Scarpulla, 2001). PRC ne semble donc pas avoir un rôle majeur dans la thermogenèse adaptative, d'autant plus que son expression est ubiquitaire.

Cependant, contrairement à PGC-1 α , l'expression de PRC est rapidement induite lors du traitement de fibroblastes quiescents par du sérum et est plus importante dans des cellules en prolifération que dans des cellules quiescentes. L'induction de PRC par le sérum s'accompagne d'une augmentation de l'expression d'un ensemble de gènes de façon similaire à celle observée en réponse à PGC-1 α : *TFAM*, *TFB1M*, *TFB2M* et des gènes nucléaires et mitochondriaux codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire (Gleyzer *et al.*, 2005).

L'expression des transcrits de PRC et de PGC-1 α est rapidement induite dans le muscle squelettique en réponse à un exercice d'endurance (Russell *et al.*, 2005). L'expression de l'ARNm de PRC est augmentée immédiatement et jusqu'à quatre heures pour revenir à un niveau basal vingt-quatre heures après l'exercice. PRC pourrait donc être impliqué dans l'adaptation précoce de la cellule musculaire en réponse à l'exercice.

L'induction rapide de PRC par le sérum fait penser aux gènes précoces dont l'expression est induite par les facteurs de croissance du sérum en absence de synthèse *de novo*. Leur induction est un événement clef pour initier le programme génétique de croissance cellulaire. La possibilité que PRC puisse contribuer à intégrer le fonctionnement de divers facteurs de transcription durant la croissance cellulaire a été examinée par l'équipe de Scarpulla. Il a été montré dans un premier temps que l'expression du cytochrome *c* est induite par le sérum durant la transition entre les phases G₀ et G₁ du cycle cellulaire dans des fibroblastes murins quiescents ce qui entraîne une augmentation de la respiration mitochondriale (Herzig *et al.*, 2000). Cette étude a également mis en évidence que l'induction maximale de l'expression du cytochrome *c* nécessite la présence de sites de reconnaissance de CREB et de NRF-1 dans le promoteur du cytochrome *c* et que ces deux protéines sont phosphorylées dès l'entrée dans le cycle cellulaire. Une étude plus récente (Vercauteren *et al.*, 2006) a montré que NRF-1 et CREB se lient sur des sites proches dans les promoteurs et que l'interaction de ces facteurs avec PRC nécessite leur domaine de liaison à l'ADN. De plus, PRC, NRF-1 et CREB sont liés au promoteur du cytochrome *c in vivo* et la présence de PRC ainsi que la phosphorylation de CREB augmentent en réponse à la stimulation par le sérum. PRC pourrait donc cibler NRF-1 et CREB en réponse à des signaux mitogéniques (figure I28). Ceci est conforté par le fait que lorsque l'interaction entre PRC et CREB/NRF-1 est empêchée, la croissance est inhibée dans un milieu contenant du galactose comme source de carbone, condition où la respiration mitochondriale est requise pour la croissance (Vercauteren *et al.*, 2006).

PRC en complexe avec NRF-2 et HCF-1, composant majeur de la chromatine, induit l'expression de nombreux gènes impliqués dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire (Vercauteren *et al.*, 2008). De plus, l'inhibition de l'expression de PRC par shRNA (short hairpin RNA), en absence de PGC-1 α , entraîne une diminution de la croissance de cellules d'ostéosarcome U2OS en milieu contenant du galactose ainsi qu'une diminution de l'activité de la COX. Ceci est accompagné d'une diminution de l'expression des ARNm de plusieurs gènes nucléaires et mitochondriaux codant pour des composants de la chaîne respiratoire tels

que le cytochrome *c*, COX IV, ATP1, COX II et ND6 (Vercauteren *et al.*, 2009). Ce défaut global de l'expression des gènes codant pour des composants de la chaîne respiratoire peut être expliqué en partie par une diminution de l'expression des ARNm de TFAM, TFB1M et TFB2M.

Tous ces résultats sont en faveur d'un rôle de PRC dans l'intégration de voies régulant conjointement le fonctionnement de la respiration mitochondriale et la croissance cellulaire.

D.3. Calcium et biogenèse mitochondriale.

Un accroissement de la concentration cellulaire en calcium entraîne une augmentation de l'expression de certains marqueurs de la biogenèse mitochondriale dans des myotubes en culture. Les ionophores de calcium comme l'A23187 ou l'ionomycine permettent l'entrée du calcium à travers le sarcolème alors que la caféine ou le composé W7 induisent une augmentation de la concentration calcique cytoplasmique en relargant le calcium du reticulum sarcoplasmique. Plusieurs études ont montré que le traitement continu ou intermittent de myotubes en culture pendant plusieurs jours avec l'un de ces composés entraîne une augmentation de l'expression de protéines mitochondriales telles que l'ALA synthase, la COX I, le cytochrome *c* et la citrate synthase, enzyme matricielle impliquée dans le cycle de Krebs (Ojuka *et al.*, 2002 et 2003). Ces traitements augmentent également l'expression protéique de PGC-1 α et TFAM ainsi que l'activité de liaison à l'ADN de NRF-1 et de NRF-2 (Ojuka *et al.*, 2002 et 2003 ; Irrcher *et al.*, 2003). Ces résultats sont en accord avec les travaux de l'équipe de Hood qui ont montré qu'un traitement à long terme de myotubes par l'A23187 augmente l'expression des ARNm du cytochrome *c*, de la sous-unité β de la F₁ ATPase et de la malate déshydrogénase mitochondriale (Freysenet *et al.*, 2004). En revanche, ces auteurs ont montré que le traitement par l'A23187 n'entraîne pas de variation de l'expression des sous-unités IV, Vb et VIc de la COX codées par le génome nucléaire mais une diminution de 30 % et 70 % respectivement de l'expression des ARNm des sous-unités COX II et COX III codées par le génome mitochondrial et de TFAM ainsi qu'une diminution de l'activité de la COX de 20 %. La p38 MAPK et les CaMKs sont impliquées dans l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale induite par le calcium (Ojuka *et al.*, 2003 ; Wright *et al.*, 2007). Des souris transgéniques avec une forme constitutivement active de la CaMKIV au niveau du muscle présentent une augmentation de la biogenèse mitochondriale dans le muscle squelettique (Wu *et al.*, 2002). De plus, l'administration de caféine augmente la phosphorylation de la CaMKII et la biogenèse

mitochondriale dans des myotubes, en partie par l'intermédiaire des NOS (McConell *et al.*, 2010). Par ailleurs, Yoshioka et ses collaborateurs ont identifié une nouvelle isoforme du transcrit PGC-1 α enrichie dans le muscle, nommée PGC-1 α -b ; le traitement de myotubes en culture par l'A23187 régule positivement l'ARNm de PGC-1 α -b mais négativement le transcrit de PGC-1 α -a (Yoshioka *et al.*, 2009).

Le calcium peut également jouer un rôle dans la modulation de la biogenèse mitochondriale dans d'autres tissus. Il a été observé en effet, dans des cellules humaines de granulosa, une augmentation de l'expression des ARNm de COX I, ATPase 6, SDHA et TFAM ainsi qu'une augmentation des protéines COX I et NDUFA9, sous-unité du complexe I, suite à un traitement par l'A23187 (Yeh *et al.*, 2005 ; Au *et al.*, 2005). Une augmentation de la masse mitochondriale et du nombre de copies d'ADNmt a également été décrite dans des cellules T activées par de l'ionomycine (D'Souza *et al.*, 2007). Par ailleurs, dans des cellules tubulaires rénales de lapin, une élévation de la concentration cytoplasmique en calcium par le biais de la thapsigargine (qui entraîne le relargage du calcium contenu dans le réticulum endoplasmique) induit une dégradation de PGC-1 α dépendante de la calpaïne ; cette dégradation est également observée dans des lysats cellulaires incubés avec du calcium (Rasbach *et al.*, 2008).

La biogenèse mitochondriale est donc induite en réponse à de nombreux signaux environnementaux qui activent diverses voies de signalisation permettant ainsi l'activation de nombreux facteurs coordonnant l'expression de gènes codés par les génomes nucléaire et mitochondrial. Mais ce dialogue ainsi généré entre le noyau et la mitochondrie n'est pas à sens unique et, dans certaines conditions, un dialogue rétrograde peut être mis en place entre la mitochondrie et le noyau. Les événements ayant pour origine la mitochondrie qui contribuent à la régulation du fonctionnement cellulaire sont encore largement méconnus. Cependant, le NO, les modifications du potentiel membranaire mitochondrial, les EROs et l'ion calcium semblent impliqués dans ce dialogue rétrograde.

E. Voie de signalisation rétrograde mitochondriale.

Les mécanismes impliqués dans le dialogue rétrograde ont d'abord été étudiés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* où ce dialogue est utilisé comme un détecteur du dysfonctionnement mitochondrial qui initie des réajustements du métabolisme des glucides et

de l'azote. Les gènes *RTG1*, *RTG2* et *RTG3* sont responsables de cette régulation chez la levure. Les protéines Rtg1p et Rtg3p sont séquestrées dans le cytoplasme jusqu'à ce que la voie rétrograde soit activée ce qui entraîne une translocation de ces facteurs de transcription dans le noyau (Erol, 2005). Le facteur Rtg2p agit comme un détecteur du fonctionnement mitochondrial qui transmet les signaux mitochondriaux au complexe Rtg1p/Rtg3p et entraîne la localisation de ce complexe dans le noyau. La protéine humaine MYC présente une homologie avec Rtg3p de levure ; elle est impliquée dans la régulation de nombreuses fonctions cellulaires comme la progression du cycle cellulaire, la régulation de la glycolyse, la réponse au stress cellulaire et l'apoptose. Chez les mammifères (figure I29), une altération de l'expression de gènes nucléaires en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial a été suggérée par des études montrant une augmentation de l'expression des ARNm de gènes codant pour diverses protéines mitochondriales dans des cellules déplétées en ADNmt (Marusich *et al.*, 1997 ; Wang et Morais, 1997 ; Mercy *et al.*, 2005).

E.1. Médiateurs clefs du dialogue rétrograde : calcium et EROs.

Le dialogue rétrograde, aussi appelé stress mitochondrial, a été défini dans les cellules de myoblastes C2C12 puis dans des cellules de carcinome de poumon A549 par une altération du potentiel de membrane mitochondrial induite soit par une déplétion partielle ou totale de leur ADNmt par traitement avec du bromure d'ethidium soit par un ionophore spécifique de la mitochondrie, le CCCP (Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazone) (Butow et Avadhani, 2004). Ces traitements entraînent une perturbation du potentiel de membrane mitochondrial et une augmentation du taux de calcium cytoplasmique libre. Ceci entraîne notamment l'activation de la calcineurine par l'intermédiaire de la Ca^{++} /CaMK ce qui permet d'activer NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells) et NFκB (Nuclear Factor-kappa B). Les changements d'expression de gènes nucléaires, l'élévation du taux de calcium libre dans le cytoplasme ainsi que l'altération de la morphologie cellulaire associés à la déplétion en ADNmt sont perdus dans des cellules dont le contenu en ADNmt est augmenté suite à la croissance des cellules dans un milieu dépourvu de bromure d'ethidium, ce qui montre un lien direct entre le stress mitochondrial et l'altération de la physiologie cellulaire et l'expression de gènes nucléaires. Arnould et ses collaborateurs ont par ailleurs montré que dans des cellules déplétées en ADNmt, la déficience de la chaîne respiratoire et l'augmentation de calcium libre qui lui est associée induisent l'activation de la CaMKIV, qui à son tour active CREB (Arnould *et al.*, 2002). Les résultats obtenus par Mercy et ses collaborateurs vont dans le même sens et suggèrent que dans les cellules déplétées en ADNmt la biogenèse

mitochondriale est stimulée (reflétée par une augmentation du contenu en cytochrome *c* et de la masse mitochondriale) et implique une activation de CREB dépendante d'une augmentation en calcium cytoplasmique, ceci étant associé à une diminution de l'import mitochondrial des protéines matricielles (Mercy *et al.*, 2005). Dans toutes ces études, les différentes réponses observées suite au stress mitochondrial sont inhibées par la chélation du calcium, ce qui confirme le rôle du calcium dans le dialogue rétrograde.

Il a été montré par ailleurs que les cellules humaines répondent à un défaut de fonctionnement de la chaîne respiratoire en favorisant l'expression de gènes nucléaires et mitochondriaux par une voie dépendante du peroxyde d'hydrogène (Suzuki *et al.*, 1998). Dans des cellules déplétées en ADNmt, l'élévation de la quantité d'EROs intracellulaires est corrélée à une hausse de l'expression de NRF-1 et TFAM (Miranda *et al.*, 1999). De plus, l'inhibition du complexe I de la chaîne respiratoire par la roténone accroît le contenu en ADNmt dans les cellules HeLa. Après inhibition du complexe III par l'antimycine A dans les cellules de poumon MRC-5, l'élévation de la quantité d'EROs intracellulaires induit une augmentation de la masse mitochondriale (Lee et Wei, 2005). Un nombre élevé de copies d'ADNmt par cellule a été associé à un stress oxydant important dans les tissus vieillissants. Cet accroissement de la quantité d'ADNmt pourrait être le résultat d'un mécanisme de rétrocontrôle qui compenserait l'existence de mitochondries défectueuses présentant des détériorations de la chaîne respiratoire ou des mutations de l'ADNmt (Lee et Wei, 2005).

Les mutations de l'ADNmt et le dialogue rétrograde ont été associés à la progression tumorale.

E.2. Dialogue rétrograde et cancer.

L'ADNmt humain est plus sensible aux dommages oxydatifs et en conséquence acquiert des mutations à un taux plus élevé que l'ADN nucléaire en raison d'une exposition à des niveaux importants d'EROs produits au cours de la respiration, d'un manque d'histones protectrices et d'une capacité limitée à réparer les dommages causés à l'ADN (Lee et Wei, 2005 ; Reinecke *et al.*, 2009). Des mutations ou des délétions de l'ADNmt sont présentes dans de nombreuses tumeurs (Horton *et al.*, 1996 ; Polyak *et al.*, 1998 ; Yeh *et al.*, 2000). L'induction de la signalisation rétrograde, par déplétion de l'ADNmt ou par traitement avec un composé découplant, entraîne une augmentation du comportement invasif dans les cellules C2C12 non tumorales et dans les cellules de carcinome de poumon A549 (Butow et Avadhani, 2004). La signalisation rétrograde induit l'expression de gènes marqueurs spécifiques de tumeurs tels

que la cathepsine L, une protéase de la matrice extracellulaire, le TGF β (Transforming Growth Factor beta) ou l'épiréguine, un ligand de l'EGFR. Cette voie rétrograde entraîne également des changements dans la structure cellulaire et le développement de structures ressemblant à des pseudopodes souvent observées dans les cellules tumorales invasives. Cette augmentation du comportement invasif des cellules C2C12 dont l'ADNmt est déplété peut être inversée par la restauration du contenu en ADNmt. Par ailleurs, de nombreuses cellules tumorales présentent une élévation du potentiel de membrane mitochondrial (Don et Hogg., 2004). Le mécanisme par lequel les cellules transformées présentent un accroissement du $\Delta\psi_m$ est inconnu mais il a été montré qu'une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale interne entraîne une augmentation de la concentration calcique mitochondriale, une activation de NFAT et la prolifération des cellules immortalisées de lymphocytes T Jurkat et des cellules HT29 de carcinome de côlon humain (Valero *et al.*, 2008). A l'inverse, une faible dépolarisation mitochondriale est suffisante pour inhiber fortement la consommation de calcium par la mitochondrie ainsi que la prolifération de ces cellules. La résistance à l'apoptose est une caractéristique des cellules cancéreuses à un stade avancé de progression tumorale. La signalisation rétrograde mitochondriale entraîne l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma 2) et Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large) et diminue l'activation de la protéine pro-apoptotique Bid (BH3-interacting domain death agonist) dans des cellules cancéreuses partiellement ou totalement déplétées en ADNmt (Dey et Moraes, 2000 ; Amuthan *et al.*, 2002). La biogenèse mitochondriale et la maintenance de l'ADNmt semblent jouer un rôle important dans la détermination des voies de vie ou de mort de la cellule en réponse au stress. En plus de son rôle dans la biogenèse mitochondriale, le facteur c-MYC, lorsqu'il est transformé, favorise l'apoptose en amplifiant ou en transmettant les signaux provenant de récepteurs de mort ou des signaux de stress à la mitochondrie. Il a été montré que la protéine kinase activée par le stress, p38, est un médiateur essentiel de l'activation de la protéine pro-apoptotique BAX (Bcl-2-Associated X protein) induite par l'agent anti-cancéreux cisplatine (Desbiens *et al.*, 2003). Le cisplatine (ou d'autres agents endommageant l'ADN tel que l'étoposide) induit, par l'intermédiaire de c-MYC, l'activation de la kinase MKK 3/6 (Mitogen-activated protein Kinase Kinase 3/6) et d'ASK1 (Apoptosis Signal-regulating Kinase 1), ce qui permet la stimulation de la protéine p38. Un mécanisme possible de sensibilisation de l'activation d'ASK1 par la transformation de c-MYC implique la production d'EROs. La protéine ASK1 est fortement activée par le stress oxydant (Matsuzawa et Ichijo, 2008). Cette activation est médiée par l'oxydation de la thioredoxine, inhibiteur endogène d'ASK1 qui, à l'état oxydé, se dissocie d'ASK1. Selon la durée et

l'intensité du stress oxydant, ASK1 peut induire la survie, la différenciation ou la mort de la cellule.

De nombreuses études se sont intéressées au lien entre mitochondrie et cancer, en particulier entre métabolisme énergétique et cancer.

F. Métabolisme énergétique et cancer.

Les cellules cancéreuses présentent des différences génétiques, histologiques et biochimiques importantes par rapport aux cellules saines. L'altération du métabolisme énergétique la plus connue dans la cellule cancéreuse a été décrite pour la première fois par Otto Warburg au début du XX^{ème} siècle. Il a en effet constaté une augmentation des capacités glycolytiques des cellules cancéreuses à croissance rapide, même en présence d'oxygène, et a proposé que cette « glycolyse aérobie » était provoquée par une altération mitochondriale et était à l'origine de la transformation des cellules cancéreuses. Cependant, l'analyse du degré d'inhibition de la glycolyse par l'oxygène, phénomène appelé « Effet Pasteur », a montré que, tout comme dans les cellules normales, l'aérobiose réduit la glycolyse dans les cellules cancéreuses. Il est aujourd'hui établi que même si le métabolisme glycolytique est augmenté dans de nombreuses tumeurs, la majorité des cellules cancéreuses a la capacité de produire de l'énergie par le biais de la phosphorylation oxydative (Rossignol *et al.*, 2004 ; Fantin *et al.*, 2006). La cellule cancéreuse présentant les mêmes besoins vitaux que la cellule saine en prolifération, une augmentation de la glycolyse dans les cellules cancéreuses peut refléter un besoin de production rapide d'ATP et des précurseurs nécessaires à la synthèse des protéines et des lipides (Frezza et Gottlieb, 2009). Le fort degré de glycolyse est d'ailleurs généralement corrélé avec l'agressivité de la tumeur. Cette glycolyse élevée est assurée par diverses adaptations métaboliques, faisant intervenir notamment une augmentation de l'expression et de l'activité des enzymes de la glycolyse.

F.1. HIF-1 α et régulation enzymatique du métabolisme énergétique.

Les tumeurs solides à croissance rapide sont souvent en situation d'hypoxie, ce qui induit la stabilisation et l'activation de HIF-1 α (Brahimi-Horn *et al.*, 2007). Une conséquence de l'activation de HIF-1 α est l'élévation de la consommation et de la phosphorylation du glucose due à une augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT-1 (GLUCose Transporter 1) et de l'hexokinase phosphorylant le glucose ce qui conduit à l'accélération des

deux premières étapes du métabolisme du glucose (figure I30). Les voies de catabolisme du pyruvate produit par la glycolyse déterminent le métabolisme tumoral : le pyruvate peut être réduit dans le cytoplasme par la lactate déshydrogénase (LDH) pour donner du lactate ou être oxydé dans la mitochondrie par la pyruvate déshydrogénase pour donner de l'acétyl coA qui sera ensuite utilisé dans le cycle de Krebs (figure I30). Or, HIF-1 α contrôle la détermination entre ces deux voies de catabolisme en induisant l'activité de la LDH et en inhibant celle de la PDH par l'intermédiaire de la Pyruvate Déshydrogénase Kinase 1 (PDK1) (Papandreou *et al.*, 2006 ; Brahim-Horn *et al.*, 2007). Cependant, les tumeurs solides, comprenant les tumeurs endocrines telles que les tumeurs thyroïdiennes, sont généralement bien vascularisées et par conséquent ne se trouvent pas en condition d'hypoxie mais présentent une activité élevée de HIF-1 α en présence d'oxygène. De telles conditions de pseudo-hypoxie sont souvent associées à la perte de certains gènes codant pour des facteurs suppresseurs de tumeurs tels que la protéine Von Hippel-Lindau (pVHL), la SDH ou la Fumarate Hydratase (FH), enzymes du cycle de Krebs (Gottlieb et Tomlinson, 2005).

F.2. Gènes suppresseurs de tumeurs, oncogènes et régulation du métabolisme énergétique.

Des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités B, C et D de la SDH ont été trouvées dans des paragangliomes et des phaeochromocytomes héréditaires (Rustin *et al.*, 2002) alors que des mutations dans le gène codant pour la FH (ou fumarase) ont été associées à des léiomyomatoses et des cancers du rein héréditaires (Stewart *et al.*, 2008). Le succinate ou le fumarate qui s'accumulent dans la mitochondrie à cause de l'inactivation de la SDH ou de la FH s'échappent vers le cytoplasme et inhibent une famille de prolylhydroxylases (PhDs). Ceci entraîne soit une résistance à l'apoptose soit une activation, par le biais de HIF-1 α , de la réponse pseudo-hypoxique qui augmente la glycolyse (King *et al.*, 2006). D'autres altérations génétiques peuvent modifier le degré de glycolyse dans les cellules cancéreuses (figure I30). Une dérégulation de la voie PI3K/AKT ou un déséquilibre de l'activité des facteurs de transcription c-MYC et p53 induisent une augmentation du métabolisme du glucose et des acides aminés. AKT stimule l'expression de GLUT-1 ; c-MYC augmente l'expression de la LDH de type A (LDHA) et en synergie avec HIF-1 α induit l'expression de la PDK1 alors que p53 induit l'expression de protéines mitochondriales requises pour l'assemblage de la COX (Frezza et Gottlieb, 2009).

Toutes les tumeurs ne présentent pourtant pas un métabolisme glycolytique accru et certaines tumeurs dépendent autant, voir plus, de la phosphorylation oxydative que de la glycolyse pour leurs besoins énergétiques. Les oncocytomes thyroïdiens sont un exemple de tumeurs présentant un métabolisme oxydatif.

F.3. Métabolisme énergétique des oncocytomes thyroïdiens.

Les oncocytomes sont des tumeurs caractérisées par leur richesse en mitochondries. Elles se développent plus fréquemment dans le rein, les parathyroïdes et la thyroïde. Elles sont le plus souvent bénignes sauf dans le tissu thyroïdien où les carcinomes oncocytaires représentent un variant de cancer touchant les cellules folliculaires. La fréquence et le risque de développement malin dans ce tissu endocrine semble être liés à la vascularisation importante et à la richesse naturelle en mitochondries de ce tissu à l'état physiologique. Plusieurs événements initiateurs de cette prolifération mitochondriale ont été suspectés. Un mécanisme compensatoire d'un déficit fonctionnel de la chaîne respiratoire a été évoqué selon le modèle des pathologies mitochondriales ; certaines études ont fait état de la présence de la délétion commune de l'ADNmt, d'autres de mutations dans le gène *GRIM19* codant pour une sous-unité du complexe I de la chaîne respiratoire (Maximo *et al.*, 1998 ; Maximo *et al.*, 2005). A ce jour, la délétion commune est trouvée dans les tumeurs et leur tissu environnant pour des sujets âgés et est plus sûrement associée au vieillissement qu'au développement tumoral. L'anomalie mutationnelle de *GRIM19* est rare et ne peut être identifiée comme un mécanisme général du développement des tumeurs oncocytaires. La recherche de mutations dans ce gène pour les tumeurs dont nous disposons au laboratoire s'est toujours révélée négative. Un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire conduisant à une production élevée de radicaux libres a aussi été suspecté. L'exploration fonctionnelle de la chaîne respiratoire de nombreux tissus tumoraux n'a été réalisée que dans notre laboratoire. Dans les oncocytomes thyroïdiens, les complexes de la chaîne respiratoire sont fonctionnels mais un déficit de la production d'ATP est observé par comparaison avec des tissus sains (Savagner *et al.*, 2001b). Ce léger découplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP est associé à la surexpression de la protéine découplante UCP2 pouvant à la fois adapter la production d'ATP de ces tumeurs très riches en mitochondries à la demande énergétique réelle de la cellule mais aussi dissiper une production excessive de radicaux libres. L'étude des profils d'expression de trente-trois oncocytomes thyroïdiens par puce d'expression a confirmé la surexpression de gènes impliqués dans la fonction énergétique mais également dans le métabolisme matriciel de la mitochondrie (cycle de Krebs, métabolisme de l'hème et beta-oxydation) (Baris *et al.*,

2004). Par ailleurs, une sous-expression du gène codant pour la LDHA indique que les tumeurs oncocytaires thyroïdiennes produisent bien leur énergie par la voie oxydative. Enfin, les gènes codant pour les facteurs PRC, NRF-1, TFAM, ND5 et eNOS, impliqués dans la biogenèse mitochondriale, sont surexprimés dans ces oncocytopes, en association avec une augmentation de l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire (Savagner *et al.*, 2003 ; Baris *et al.*, 2004). La protéine eNOS est également surexprimée dans les oncocytopes thyroïdiens par rapport au tissu sain mais aussi par rapport à des carcinomes papillaires riches en mitochondries, en association avec une augmentation de l'expression de sous-unités des complexes III et IV de la chaîne respiratoire (Baris *et al.*, 2005). Le NO pouvant inhiber l'activité du complexe IV par compétition avec le dioxygène (Cleeter *et al.*, 1994), augmenter le flux d'électrons à travers les complexes III et IV pourrait favoriser la fixation du dioxygène et donc le métabolisme oxydatif, et limiter la possibilité de production de radicaux libres. Dans les tumeurs oncocytaires, les résultats des profils transcriptionnels sont ainsi homogènes et corrélés à la présence de mitochondries fonctionnelles assurant un métabolisme oxydatif au sein des tumeurs.

L'exploration de la fonction mitochondriale des modèles cellulaires de tumeurs riches en mitochondries est plus délicate. Un seul modèle cellulaire d'oncocytopes thyroïdiens est disponible actuellement. La lignée cellulaire XTC.UC1 a été établie à partir d'une métastase mammaire de carcinome folliculaire oncocytopes thyroïdiens (Zielke *et al.*, 1998). En accord avec ce qui est décrit dans les carcinomes oncocytopes thyroïdiens, les cellules XTC.UC1 possèdent un nombre élevé de mitochondries. Dans ces cellules, le contenu en ADNmt ainsi que l'expression des transcrits mitochondriaux de ND2 et de ND5 et du transcrit nucléaire de l'UCP2 sont plus élevés que dans la lignée cellulaire B-CPAP de carcinome papillaire (Savagner *et al.*, 2001a). Il a été montré dans cette étude que la quantité d'ATP cellulaire basale est plus élevée dans les cellules XTC.UC1 que dans les cellules B-CPAP et qu'elle est liée à la persistance d'un métabolisme oxydatif dans ces cellules. Malgré l'augmentation de l'expression de l'UCP2, le découplage entre la respiration et la synthèse d'ATP n'est pas significatif, ce qui est sûrement lié à une induction de la biogenèse mitochondriale plus faible dans ce modèle cellulaire que dans les tumeurs. Les données concernant l'activité des complexes de la chaîne respiratoire dans ces cellules sont controversées. Stankov et ses collaborateurs décrivent une diminution de l'activité du complexe III de la chaîne respiratoire associée à une augmentation de l'activité des complexes I et II dans les cellules XTC.UC1, comparé à la lignée B-CPAP (Stankov *et al.*, 2006). Dans cette étude, même si la production

d'ATP dans la lignée oncocyttaire dépend plus de la phosphorylation oxydative que de la glycolyse (production de lactate plus faible que dans les cellules B-CPAP), la production d'ATP est diminuée en comparaison de celle mesurée dans les cellules B-CPAP. Une autre étude réalisée par la même équipe (Bonora *et al.*, 2006) a montré que la diminution de la production d'ATP conduite par le complexe I dans les cellules XTC.UC1 est associée à une diminution de l'activité des complexes I et III de la chaîne respiratoire par rapport aux cellules TPC-1 de carcinome papillaire thyroïdien. Même si des mutations ont été trouvées au niveau de l'ADNmt dans certains échantillons de tumeurs thyroïdiennes oncocytaires, dans la majorité de ces tumeurs l'ADNmt est intact (Rogounovitch *et al.*, 2004). Dans l'étude menée par Bonora, des mutations ont été trouvées dans l'ADNmt codant pour des sous-unités des complexes I (ND1) et III (cytochrome *b*) dans les cellules XTC.UC1. Les résultats divergents obtenus au cours de ces trois études concernant l'activité des complexes de la chaîne respiratoire de la lignée oncocyttaire pourraient s'expliquer par l'emploi de techniques différentes pour évaluer le fonctionnement de la chaîne respiratoire ainsi que par la comparaison des résultats obtenus pour les cellules XTC.UC1 à des lignées « contrôle » différentes (B-CPAP et TPC-1). De manière opposée à ce qui a été décrit par les autres équipes dans les tumeurs oncocytaires et dans le modèle cellulaire oncocyttaire, Bonora et ses collaborateurs ont observé une incapacité des cellules XTC.UC1 à survivre en milieu contenant du galactose comme source de carbone, condition où la cellule dépend uniquement de la phosphorylation oxydative pour sa production d'énergie (Bonora *et al.*, 2006). Ces résultats contradictoires obtenus parfois au sein d'une même équipe montrent la difficulté de conserver cette lignée comme modèle reflétant ce qui est observé dans les tissus tumoraux.

Des constats différents existent également en ce qui concerne les taux d'EROs dans les cellules XTC.UC1. Ceci peut s'expliquer par la différence des sondes utilisées pour estimer cette quantité intracellulaire d'EROs. Les études de Stankov et Bonora décrivent une quantité d'EROs, mesurée par la sonde fluorescente DCFDA (DiChlorodihydroFluorescein DiAcetate), plus importante dans le modèle XTC.UC1 que dans les lignées « contrôle » de carcinomes papillaires. Or, cette sonde réagit avec l'H₂O₂ mais également avec le NO et d'autres EROs. Des expériences menées au laboratoire ont ainsi révélé que la quantité de NO est plus importante dans les cellules XTC.UC1 que dans la lignée B-CPAP ce qui peut fausser le dosage par le DCFDA. Ainsi, la fluorescence émise par la sonde DHE (DiHydroEthidium) qui reflète la production intracellulaire de superoxyde est plus faible dans la lignée

oncocytaire. Ces résultats sont à mettre en relation avec l'induction de l'expression de l'UCP2 mais aussi de la SOD2 dans la lignée cellulaire comme dans les tumeurs oncocytaires.

Certaines différences concernant le métabolisme énergétique de la lignée XTC.UC1 peuvent être dues à l'emploi de méthodes d'évaluation du fonctionnement de la chaîne respiratoire variables d'une étude à l'autre mais aussi à des évolutions différentes de la lignée cellulaire XTC.UC1 dans les différents laboratoires au cours du temps. Les lignées cellulaires cancéreuses peuvent ne reproduire, en effet, que partiellement le phénotype ou même le génotype de la tumeur *in vivo* pour laquelle elles sont utilisées comme modèle et posséder certaines caractéristiques différentes de celles qu'elles présentaient au moment de leur établissement (Schweppe *et al.*, 2008 ; van Staveren *et al.*, 2009). Les résultats exposés par Bonora et ses collaborateurs concernant le modèle cellulaire XTC.UC1 diffèrent en de nombreux points de ce qui a été observé dans les tissus oncocytaires thyroïdiens. Les mutations de l'ADNmt, et les défauts de la chaîne respiratoire associés, observés dans cette étude pourraient être la conséquence d'une pression de sélection due au stress oxydant dans ces cellules. Il est à noter également que, contrairement à ce qui est pratiqué au laboratoire, dans l'étude de Bonora et ses collaborateurs, les cellules XTC.UC1 sont cultivées en absence de TSH. Ceci pourrait participer à expliquer les différences fonctionnelles observées par ce groupe entre la lignée cellulaire XTC.UC1 et ce qui est décrit dans les oncocytomes thyroïdiens. Afin de limiter le risque d'induire de telles modifications dans nos études, nous avons veillé à utiliser ce modèle cellulaire dans les mêmes conditions de culture et de passage pour toutes les études d'inactivation de gènes et de transfection en relation avec les études de la fonction mitochondriale.

III. Problématique du travail de thèse.

La compréhension du métabolisme des tumeurs solides est un enjeu du ciblage thérapeutique. Plus particulièrement, les mécanismes d'adaptation du métabolisme cellulaire à l'environnement tumoral peuvent représenter des nœuds de régulation contrôlant une cascade d'évènements liés à la prolifération ou la différenciation cellulaire. Le modèle tumoral thyroïdien différencié présente l'intérêt d'un développement très lent pouvant représenter une suite d'états « stationnaires » dans l'évolution du processus d'adaptation du métabolisme de la cellule. La production énergétique dans la cellule est un événement extrêmement contrôlé car nécessitant la coordination de deux génomes. La biogenèse mitochondriale implique la

coordination de ces génomes conduisant à l'efficacité fonctionnelle des mitochondries. Les oncocytomes thyroïdiens représentent ainsi des tumeurs de prolifération lente pour lesquelles la biogenèse mitochondriale est exacerbée mais contrôlée puisque conduisant au maintien d'un métabolisme tumoral de type oxydatif. Ils sont aussi un modèle d'étude des voies de coordination des proliférations cellulaires et mitochondriales. Ces deux voies de prolifération sont rarement étudiées conjointement. Or, la disponibilité en énergie est indispensable au déroulement des différentes phases du cycle cellulaire.

Les travaux antérieurs du laboratoire sur ces tumeurs oncocytaires ont mis en évidence la surexpression préférentielle d'un coactivateur transcriptionnel comme pouvant être un des maillons assurant la coordination du contrôle entre proliférations cellulaires et mitochondriales. Les coactivateurs de la famille PGC-1 jouent un rôle très important dans la régulation de la biogenèse et de la fonction mitochondriale. De nombreuses études se sont intéressées à PGC-1 α , ce qui a permis de révéler différents signaux environnementaux contrôlant l'expression de ce coactivateur ainsi que certains partenaires protéiques et gènes cibles de celui-ci. En revanche, beaucoup moins d'informations sont disponibles pour le coactivateur PRC. Nous avons donc cherché à caractériser plus précisément le rôle de PRC dans le dialogue nucléo-mitochondrial.

Pour cela, nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires thyroïdiens humains. En effet, les lignées cellulaires de carcinomes thyroïdiens expriment faiblement PGC-1 α et chaque lignée présente une richesse en mitochondries, une orientation métabolique et un niveau de différenciation qui lui sont propres. C'est pourquoi, ces lignées constituent de bons modèles d'étude des mécanismes médiés par PRC impliqués dans la prolifération mitochondriale et le métabolisme énergétique en relation avec la prolifération cellulaire.

L'inhibition de PRC par siRNA a permis de mettre en évidence de nouveaux gènes cibles de PRC et les voies de signalisation cellulaire régulées par ce coactivateur. Il a été observé au laboratoire une forte corrélation du niveau d'expression de PRC et d'ERR α lors de l'induction par le sérum. C'est pourquoi, nous avons cherché à caractériser l'importance du complexe ERR α -PRC pour la biogenèse de mitochondries fonctionnelles. Nous avons par ailleurs étudié l'influence de signaux endogènes jouant un rôle important dans la physiologie thyroïdienne – la TSH, le calcium et le monoxyde d'azote – sur la biogenèse et le fonctionnement des mitochondries dans nos modèles. La caractérisation des mécanismes régulant la biogenèse et le fonctionnement des mitochondries dans les lignées de carcinomes

thyroïdiens présentant différentes orientations métaboliques pourrait en effet permettre d'envisager le ciblage thérapeutique du métabolisme dans les tumeurs thyroïdiennes mais également plus largement dans d'autres tumeurs solides.

Matériels et méthodes

I. Lignées cellulaires et réactifs.

A. Cellules.

Les lignées cellulaires FTC-133 et RO82 W-1 proviennent d'Interlab Cell Line Collection (National Institute for Cancer Research, Gênes, Italie).

➤ FTC-133 :

Les cellules FTC-133 ont été obtenues à partir d'une métastase de carcinome folliculaire thyroïdien humain. Elles sont cultivées en milieu DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F12 ; Institut de biotechnologie Jacques Boy, Reims, France) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (Institut de biotechnologie Jacques Boy, Reims, France), 1 % de L-glutamine (Dominique Dutscher, Brumath, France) et 1 % de pénicilline/streptomycine/antifongique (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

➤ RO82 W-1 :

La lignée RO82 W-1 a été établie à partir d'une métastase de carcinome folliculaire thyroïdien humain. Ces cellules sont cultivées dans 60 % de milieu DMEM-F12 et 30 % de milieu Endothel Basal Medium (Laboratoires PAA, Les Mureaux, France), supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (Institut de biotechnologie Jacques Boy, Reims, France), 1 % de L-glutamine (Dominique Dutscher, Brumath, France) et 1 % de pénicilline/streptomycine/antifongique (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

➤ XTC.UC1 :

La lignée XTC.UC1 a été fournie gracieusement au laboratoire par le professeur O. Clark (Département de chirurgie, Université de Californie, San Francisco, Etats-Unis). Ces cellules dérivent d'une métastase mammaire d'un variant oncocytaire de carcinome folliculaire thyroïdien humain. Elles sont cultivées dans le même milieu que celui utilisé pour les cellules FTC-133, additionné de 10 mU/ml de TSH (Sigma Aldrich, Lyon, France).

➤ B-CPAP :

Les cellules B-CPAP ont été fournies gracieusement par le docteur C. Paulin (Université de Lyon, France). Cette lignée a été établie à partir d'un carcinome papillaire thyroïdien humain. Ces cellules sont cultivées en milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute medium ; Laboratoires PAA, Les Mureaux, France) supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal

(Institut de biotechnologie Jacques Boy, Reims, France), 1 % de L-glutamine (Dominique Dutscher, Brumath, France) et 1 % de pénicilline/streptomycine/antifongique (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France).

B. Réactifs utilisés pour le traitement des cellules.

- SNAP ((±)-S-Nitroso-N-AcetylPenicillamine) (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France)

Le SNAP est un donneur de NO (figure M1). Vingt milligrammes de SNAP sont repris dans 908 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) (Sigma Aldrich, Lyon, France) afin d'obtenir une solution stock d'une concentration de 100 mM. La solution stock ainsi reconstituée est aliquotée et conservée à -20°C. Ce composé étant sensible à la lumière, il est protégé de la lumière lors des manipulations.

- Ionomycine (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France)

L'ionomycine est un ionophore produit par la bactérie *Streptomyces globatus* (figure M2). Elle est utilisée en recherche pour augmenter le niveau de calcium intracellulaire. Un milligramme d'ionomycine est repris par 1 ml de DMSO pour obtenir une concentration de 1,41 mM. Cette solution stock est aliquotée puis conservée à +4°C pendant un an. Ce composé étant sensible à la lumière, il est protégé de la lumière lors des manipulations.

- BAPTA/AM (1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid tetra (acetoxymethyl) ester) (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France)

Le BAPTA/AM (figure M3) est une forme de BAPTA qui peut traverser les membranes cellulaires. Une fois chargé dans les cellules, il est hydrolysé par les estérases cytoplasmiques et se trouve sous la forme active du chélateur de calcium BAPTA. Vingt-cinq milligrammes de BAPTA/AM sont repris par 2,5 ml de DMSO pour obtenir une solution stock à 13 mM aliquotée et conservée à -20°C pendant un mois. Ce composé étant sensible à la lumière, il est protégé de la lumière lors des manipulations.

- TSH (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Dix unités de TSH bovine lyophilisée sont solubilisées dans 10 ml d'eau stérile. Cette solution stock de TSH à 1 U/ml est aliquotée et stockée à -20°C.

- siRNA PRC/témoin et *Silencer*TM siRNA Transfection Kit II (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France)

Quarante nanomoles de siRNA (small interfering RNA) sont reprises dans 800 µl d'eau stérile pour obtenir une solution à 50 µM. Cette solution est aliquotée et stockée à -20°C. Pour transférer le siRNA dans les cellules, l'agent de transfection siPORT *NeoFX* du kit *Silencer*TM siRNA Transfection Kit II a été utilisé. Celui-ci est stocké à +4°C. Il est constitué de liposomes dans une proportion adaptée à un moindre stress de la cellule. Ces liposomes permettent une néofection, c'est-à-dire qu'il est possible de synchroniser le cycle cellulaire au moment de la transfection. Le siRNA témoin utilisé correspond à un « scramble » universel testé pour être inefficace quelque soit le gène cible invalidé.

II. Inhibition de l'expression de PRC par siRNA.

Afin d'inhiber l'expression de PRC dans les cellules XTC.UC1 selon le principe d'ARN interférence décrit dans la figure M4, trois siRNAs ont été testés en comparaison à un témoin négatif (scramble, N° 4635). Le siRNA PRC N° 121729 a été choisi car son introduction dans les cellules permet une inhibition d'au moins 70 % de l'expression de l'ARNm de PRC dans les cellules XTC.UC1 après 48 h.

Les cellules préalablement synchronisées par privation de sérum sont décollées par l'action de la trypsine puis resuspendues à une concentration de 1.10^5 cellules/ml dans du milieu de culture. En parallèle, les complexes ARN/agent de transfection sont préparés. L'agent de transfection siPORT *NeoFX* est dilué à raison de 5 µl de solution stock dans 100 µl de milieu OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium (Gibco, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) préalablement incubé pendant 10 minutes à température ambiante. Le siRNA PRC ou contrôle est dilué à une concentration finale de 30 nM dans 100 µl de milieu OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium. Puis l'agent de transfection dilué et l'ARN dilué sont mélangés et ce mélange est incubé à température ambiante pour permettre aux complexes de transfection de se former. Deux cent microlitres de ce mélange sont ensuite distribués dans chaque puits d'une plaque 6 puits (Falcon, Becton-Dickinson, le Pont de Claix, France) puis 2,3 ml de suspension de cellules (soit $2,3.10^5$ cellules) sont ajoutés dans le puits. La plaque est doucement agitée puis placée dans l'étuve à 37°C pendant 7 heures. Ce mélange de transfection est ensuite enlevé et les cellules sont incubées dans du milieu de culture contenant 20 % de sérum de veau foetal

dans l'étuve à 37°C pendant 24, 48 ou 72 h puis les cellules sont récupérées afin de réaliser une extraction d'ARN, d'ADN ou de protéines par la suite.

III. Extraction des ARNs totaux à partir de cellules.

Les ARNs totaux sont extraits à l'aide du kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France).

Un culot sec de cellules congelées est d'abord lysé et homogénéisé dans 600 µl de tampon RLT additionné de 10 µl d'une solution de 98 % de beta-mercaptoéthanol (Sigma Aldrich, Lyon, France). Ce tampon très dénaturant, fortement concentré en thiocyanate de guanidine, inactive les RNases, ce qui permet la purification d'ARNs intacts. Le lysat est transféré sur une colonne QIAshredder permettant l'élimination des agrégats et débris cellulaires (figure M5). Après une centrifugation de deux minutes à 10000 g, le lysat est récupéré dans le tube collecteur placé sous la colonne.

Au lysat, 600 µl d'éthanol à 70 % sont ajoutés et le tout est transféré sur une colonne de silice RNeasy placée sur un tube collecteur. Cette étape permet de retenir les ARNs sur la colonne et d'éluer les contaminants. Après 15 secondes de centrifugation à 10000 g, l'éluat est éliminé puis trois lavages avec centrifugation sont effectués : un lavage avec 700 µl de tampon RW1 (contenant une petite quantité de thiocyanate de guanidine) suivi de deux lavages avec 500 µl de tampon RPE. Une dernière centrifugation est effectuée sans tampon afin d'éliminer complètement l'excédent de tampon et d'alcool de la colonne.

Les ARNs totaux sont ensuite élués par ajout de 30 à 40 µl d'eau stérile (dépourvue de RNases) sur la colonne puis centrifugation pendant une minute à 10000 g.

La concentration des ARNs totaux obtenus est mesurée à l'aide du spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Nyxor Biotech, Labtech, Palaiseau, France). La densité optique (DO) des échantillons est lue à 260 nm (longueur d'onde d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines). La pureté des échantillons est évaluée par le rapport DO_{260}/DO_{280} : celui-ci doit être supérieur à 1,8. Les échantillons d'ARN en solution sont alors conservés à -80°C.

IV. Extraction d'ADN.

L'ADN est extrait à l'aide du BioRobot EZ1 et du kit EZ1 DNA tissue kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Le culot cellulaire est remis en suspension dans 190 µl de tampon G2 auxquels 10 µl de protéinase K sont ajoutés. Le mélange est incubé pendant 15 minutes à 56°C. Ce lysat est ensuite placé dans le robot qui va isoler l'ADN du lysat en une étape par liaison de l'ADN à des billes de silice magnétiques en présence d'un tampon chaotrope. Les billes sont séparées du lysat à l'aide d'un aimant. L'ADN est ensuite lavé puis élué dans 200 µl de tampon. Les échantillons d'ADN ainsi obtenus sont conservés à -20°C.

V. Transcription inverse (RT).

La transcription inverse permettant la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à partir d'une matrice ARNm grâce à une reverse transcriptase rétrovirale (MMLV : Moloney-Murine Leukemia Virus) est réalisée à l'aide du kit Advantage® RT-for-PCR kit (Clontech, Ozyme, Montigny Le Bretonneux, France).

Un volume correspondant à 2 µg d'ARN total est utilisé. De l'eau contenant du diethylpyrocarbonate (DEPC, permettant la dégradation des RNases) est ajoutée afin d'obtenir un volume de 12,5 µl. Des hexamères d'amorces (1 µl) sont ajoutés au mélange et le tout est chauffé à 72°C pendant 2 min puis la réaction est stoppée en plaçant les tubes dans la glace.

Les composés suivants sont ensuite ajoutés dans chaque tube :

- 4 µl de tampon de réaction 5X (250 mM Tris-HCl, pH 8,3, contenant 375 mM de KCl et 15 mM de MgCl₂)
- 1 µl de mélange de dNTPs (10 mM de chaque)
- 0,5 µl d'inhibiteur de RNases (RNasin)
- 1 µl de transcriptase inverse MMLV

La réaction de transcription inverse est alors réalisée en incubant les tubes à 42°C pendant une heure. Les tubes sont ensuite chauffés à 94°C pour stopper la réaction de synthèse des ADNc complémentaires et détruire toute activité DNase. Les échantillons d'ADNc sont ensuite dilués en ajoutant 130 µl d'eau DEPC puis congelés en aliquots à -20°C.

VI. RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) quantitative.

A. Principe de la technique.

La technologie de RT-PCR quantitative est basée sur la détection et la quantification d'une sonde fluorescente intégrée dans une structure double brin. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la phase où la réaction de PCR est d'ordre 0. Cette linéarité est appréciée par la définition du cycle seuil ou cycle Treshold (Ct) correspondant au début de cette phase. La sonde utilisée lors de ces expériences est le SYBR Green I dont l'émission fluorescente augmente lorsqu'il est lié à l'ADN double brin. Cette technique permet une détection assez sensible et rapide de la quantité d'ADN double brin synthétisé mais, le SYBR Green I se fixant 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 d'ADNc cible. Il convient donc de s'assurer de la spécificité des produits de PCR par la détermination d'une courbe de fusion des produits obtenus après amplification.

B. Protocole.

➤ Préparation des standards.

Afin d'analyser de manière quantitative l'amplification du gène d'intérêt, une gamme de nombres de copies connus d'amplicons du gène cible est réalisée. Dans ce but, une PCR classique est effectuée en mélangeant les éléments suivants : 2 µl d'ADNc (obtenus à partir d'ARNm extraits de tissu thyroïdien sain ou de lignées cellulaires thyroïdiennes), 2 µl d'amorce sens à 20 mM, 2 µl d'amorce anti-sens à 20 mM, 14 µl d'eau et 20 µl de HotGoldStar Mix (Eurogentec, Angers, France) contenant l'ADN polymérase Taq HotStar, les dNTPs (concentration finale à 200 µM), du MgCl₂ (concentration finale à 1,5 mM) et du tampon 2X. Les ADNc sont d'abord dénaturés à 94°C pendant 10 minutes puis 35 cycles d'amplification (composés d'une dénaturation à 95°C pendant 30 secondes, d'une hybridation au Ta (température d'annealing ; Ta = Tm (température de demi-dénaturation) – 5°C) du couple d'amorces pendant 30 secondes et d'une élongation à 72°C pendant 30 secondes) sont effectués et enfin la PCR se termine par une étape à 72°C pendant 3 minutes. L'amplification du produit de PCR d'intérêt est vérifiée par migration de 8 µl d'échantillon sur gel d'agarose à 2,5 %. Les ADNc amplifiés sont ensuite purifiés sur colonne à l'aide du kit High pure PCR

product purification (Roche, Meylan, France) puis quantifiés par mesure de la densité optique à 260 nm en utilisant le spectrophotomètre Nanodrop ND-1000. Le nombre de copies dans les échantillons est calculé grâce à la formule suivante :

Nombre de copies = DO (ng/ μ l) * 9,1. 10¹¹ / nombre de paires de bases du produit de PCR

Les échantillons sont dilués pour obtenir 10¹⁰ copies/ μ l. La gamme est ensuite réalisée par dilutions en cascade de cet échantillon à 10¹⁰ copies/ μ l dans de l'eau stérile.

➤ RT-PCR quantitative.

Les quantifications en temps réel d'ADN mitochondrial et d'ADN complémentaire sont réalisées en plaques 96 puits dans l'appareil Chromo4 (BioRad, Marnes La Coquette, France).

Pour la quantification de l'ADN mitochondrial, un mélange réactionnel est préparé pour l'ensemble des échantillons. Celui-ci comprend, pour chaque échantillon, 1 μ l d'amorce sens et 1 μ l d'amorce anti-sens à 10 mM chacune ainsi que 10 μ l de iQ SYBR Green Supermix 2X (BioRad, Marnes La Coquette, France) composé de 100 mM KCl, 40 mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,4 mM de chaque dNTP, 50 U/ml d'iTaq DNA polymérase, 6 mM MgCl₂, SYBR Green I, 20 nM de fluorescéine. Huit microlitres d'ADN sont ajoutés aux 12 μ l du mélange dans chaque puits. Les amorces utilisées (figure M6) sont localisées au niveau des gènes ND1 (amorce sens) et ARNt^{Leu} (amorce antisens).

Pour la quantification de l'ADNc, le même mélange réactionnel que pour la quantification de l'ADN mitochondrial est réalisé en y ajoutant 4 μ l d'eau pour chaque échantillon. Un volume de 4 μ l d'ADNc est ajouté aux 16 μ l du mélange dans chaque puits. Les différentes amorces utilisées sont listées dans le tableau M6. Pour chaque expérience, un témoin négatif (ne contenant pas d'ADN mais de l'eau) est effectué pour s'assurer de l'amplification spécifique du gène d'intérêt. La plaque est ensuite placée dans le Chromo4. Le programme consiste en une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 minutes puis 40 cycles d'amplification. La fluorescence est mesurée à la fin de chaque cycle d'amplification, ce qui permet d'établir une courbe de quantification représentant la fluorescence en fonction du nombre de cycles (figure M7A). Les valeurs de Ct obtenues pour les différents points de la gamme diluée en cascade permettent de tracer une droite standard. L'équation de cette droite permet de déterminer le niveau d'expression (exprimé en nombre de copies) du gène d'intérêt correspondant au Ct obtenu pour un échantillon donné. L'expression du gène d'intérêt est ensuite normalisée par

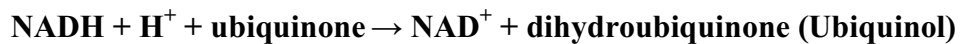
rapport à l'expression d'un gène de référence dont l'expression n'est pas influencée par les divers traitements testés.

Une courbe de fusion (figure M7B) est réalisée après la phase d'amplification afin de s'assurer de la spécificité des produits de PCR amplifiés. Cette courbe de fusion (en fonction de la température) permet de discriminer les dimères d'amorces et les produits de PCR spécifiques. Pour cela, une étape de dénaturation ponctuelle à 95°C est effectuée 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. Un pic unique pour l'échantillon inconnu, se superposant aux pics obtenus pour les dilutions de l'échantillon de référence signe la fiabilité des mesures de quantification.

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

A. Principe de la technique.

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



Au cours de cette réaction, le NADH, qui absorbe la lumière à 340 nm, est oxydé en NAD⁺, un composé qui n'absorbe pas la lumière à cette longueur d'onde. Lors de la mesure spectrophotométrique, la décroissance de l'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 KH₂PO₄ 100 mM, pH 7,4 (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Les 1,36 g de KH₂PO₄ sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH 5 N. Ce réactif, une fois aliquoté, se conserve à -20°C pendant un mois.

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

Les 10 mg d'ubiquinone-1 sont repris par 1 ml d'éthanol absolu pour obtenir une solution stock à 39,9 mM. Cette solution stock est stable pendant un mois à -20°C mais doit être

protégée de la lumière. Avant chaque expérience, 100 µl de cette solution sont ajoutés à 1,398 ml d'éthanol absolu pour obtenir une concentration à 2,5 mM qui est conservée à l'abri de la lumière dans la glace pendant l'expérience.

➤ NADH (Roche, Rosny-sous-bois, France)

Une solution à 15 mM de NADH est préparée extemporanément. Pour cela, 11,5 mg de NADH sont dissous dans 1 ml d'eau distillée. La solution est conservée dans la glace et protégée de la lumière pendant l'expérience.

➤ Azide de sodium (NaN₃) (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Ce composé inhibe spécifiquement le complexe IV de la chaîne respiratoire. Une solution à 1 M est préparée en dissolvant 65 mg d'azide de sodium dans 1 ml d'eau distillée. Cette solution, une fois aliquotée, se conserve pendant 6 mois à -20°C.

➤ Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Ce composé inhibe spécifiquement le complexe I de la chaîne respiratoire. Une solution de roténone à 0,5 mM est préparée en dissolvant 1,97 mg de roténone dans 10 ml d'un mélange 50 % éthanol/ 50 % DMSO. Une fois aliquotée, cette solution peut être conservée pendant un mois à -20°C.

➤ Cyanure de potassium (KCN) (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Ce composé inhibe spécifiquement le complexe IV de la chaîne respiratoire. Vingt-six milligrammes de cyanure de potassium sont dissous dans 800 µl d'eau distillée pour obtenir une solution à 0,5 M. Une fois aliquotée, cette solution peut être conservée pendant un mois à -20°C.

➤ 2,6 dichlorophenolindophenol (DCPIP) (Sigma Aldrich, Lyon, France)

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

➤ Tampon A

Ce tampon a pour composition : 250 mM de saccharose, 20 mM de Tris base, 2 mM d'acide éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) et 1 mg/ml d'albumine de sérum bovin (BSA). Pour cela, 8,56 g de saccharose (Eurobio, Les Ulis, France), 242,28 mg de Tris base (Eurobio, Les

Ulis, France), 58,45 mg d'EDTA (Sigma Aldrich, Lyon, France) et 100 mg de BSA (Sigma Aldrich, Lyon, France) sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,2 avec de l'HCl 5 N. Cette solution peut être conservée en aliquots pendant 6 mois à -20°C.

C. Protocole.

➤ 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 de tampon A par million de cellules et congelé 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 d'un sonicateur est introduite dans le tube jusqu'au centre du liquide en prenant garde de 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 sonication afin de rendre le complexe I de la chaîne respiratoire plus accessible.

➤ 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 ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,4	800 µl	80 mM
Ubiquinone-1 2,5 mM	40 µl	0,1 mM
Azide de sodium 1M	2 µl	2 mM
KCN 0,5 M	2 µl	1 mM
DCPIP	15 µl	0,075 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) y 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 cuves sont placées dans le spectrophotomètre (Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France) thermostaté à 37°C et la cinétique de décroissance de l'absorbance à 340 nm est suivie pendant 40 secondes. Sans stopper la lecture, 6 µl de roténone à 0,5 mM sont ajoutés dans chaque cuve et après homogénéisation avec le cône, l'absorbance est suivie à nouveau pendant 40 secondes. La lecture est ensuite arrêtée et les pentes de décroissance sont notées :

- la pente initiale avant l'ajout de roténone
- la pente après l'ajout de roténone.

➤ Calcul de l'activité du complexe I.

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

$$\text{Activité spécifique : AS (cell)} = \frac{\Delta\text{DO}(-\text{R}) - \Delta\text{DO}(+\text{R})}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times \text{Sn}_{\text{NADH}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta\text{DO}(-\text{R})$: delta DO par minute mesurée avant addition de roténone

$\Delta\text{DO}(+\text{R})$: delta DO par minute mesurée après addition de roténone

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

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

Sn_{NADH} : nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{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.

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

A. Principe de la technique.

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 qui absorbe la lumière à 600 nm. Ce dernier va être réduit par l'ubiquinol-2 formé lors de la réaction précédente. Le DCPIP va alors perdre sa couleur bleue et ne va plus absorber de lumière. La réaction permettant de doser l'activité du complexe II va donc consister à suivre la décroissance 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)

Les 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°C .

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

Dix milligrammes d'ubiquinone-1 sont repris par 1 ml d'éthanol absolu pour constituer une solution stock à 39,9 mM. Avant chaque expérience, 100 μl 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°C mais doit être protégée de la lumière.

- Acide succinique (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Une solution à 500 mM est préparée en dissolvant 29,5 mg d'acide succinique dans 1 ml d'eau distillée puis, après ajustement du pH à 7 avec du KOH 5N, de l'eau distillée est ajoutée à cette solution pour obtenir un volume de 2 ml. La solution ainsi obtenue se conserve en aliquots pendant 1 mois à -20°C .

- Acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Pour préparer la solution d'EDTA à 20 mM, 14,89 mg d'EDTA sont dissous dans 1 ml d'eau distillée puis le pH est ajusté à 7 avec du KOH 5N et de l'eau distillée est ajoutée à cette solution pour obtenir un volume final de 2 ml. La solution ainsi obtenue 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 de sérum bovin sans acides gras libres (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Deux cent cinquante milligrammes d'albumine de sérum bovin 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 de l'expérience, 5,80 mg de DCPIP sont repris par 4 ml d'eau distillée et cette solution à 5 mM est placée à 37°C jusqu'à utilisation.

- Triton X-100 (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Le triton X-100 est conservé à 4°C. La veille du dosage, il est placé à température ambiante. Puis, une solution à 10 % est préparée en diluant 1 ml de triton X-100 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 dilué dans 20 ml d'éthanol absolu pour obtenir une solution à 0,5 mg/ml qui est conservée pendant 1 mois à -20°C.

- Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Ce réactif est un inhibiteur du complexe I. Deux milligrammes de roténone sont repris par 2 ml d'un mélange volume à volume d'éthanol absolu et de 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.

➤ 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 de tampon A par million de cellules (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.

➤ 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 ₂ PO ₄ 100 mM pH 7,5	500 µl	50 mM
Eau distillée	160 µl	
EDTA	5 µl	0,1 mM
Albumine de sérum bovin	20 µl	1 mg/ml
Cyanure de potassium	200 µl	2 mM
Roténone	4 µl	0,01 mM
Antimycine A	4 µl	0,002 mM
Acide succinique	40 µl	20 mM
DCPIP	16 µl	0,08 mM
Triton X-100 10 %	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 million 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 microcuves à usage unique (CML, Nemours, France). Les cuves sont placées dans le spectrophotomètre (Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France) thermostaté à 37°C et la cinétique de décroissance de l'absorbance du DCPIP à 600 nm est suivie pendant 90 secondes. Sans stopper la lecture, 5 µl de thénoltrifluoroacétone à 40 mM sont ajoutés dans chaque cuve et après homogénéisation

avec le cône, l'absorbance est suivie à nouveau pendant 90 secondes. La lecture est ensuite arrêtée et les pentes de décroissance sont notées :

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

➤ Calcul de l'activité du complexe II.

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

$$\text{Activité spécifique : AS (cell)} = \frac{\Delta\text{DO}(-\text{T}) - \Delta\text{DO}(+\text{T})}{l \times \epsilon_{\text{DCPIP}} \times \text{Sn}_{\text{DCPIP}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta\text{DO}(-\text{T})$: delta DO par minute mesurée avant addition de thénoltrifluoroacétone

$\Delta\text{DO}(+\text{T})$: delta DO par minute mesurée après addition de thénoltrifluoroacétone

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

ϵ_{DCPIP} : coefficient d'extinction du DCPIP à 600 nm et pH 7,5, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 19,1

Sn_{DCPIP} : nombre stœchiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit 1

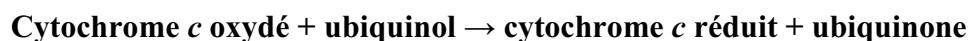
q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel, soit 0,5 million

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

IX. Dosage de l'activité de l'ubiquinol cytochrome *c* reductase (complexe III) sur cellules.

A. Principe de la technique.

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 KH₂PO₄ 20 mM, pH 7,8 (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Les 272,2 mg de KH₂PO₄ 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 5N et enfin de l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume final de 2 ml. Cette 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 de sérum bovin sans acides gras libres (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Deux cent cinquante milligrammes d'albumine de sérum bovin 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 dilué dans 10 ml d'éthanol absolu pour obtenir une solution à 1 mg/ml qui est conservée pendant 1 mois à -20°C.

- Roténone (Sigma Aldrich, Lyon, France)

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

- Cytochrome *c* oxydé (Acros Organics, Fisher Scientific, Illkirch, France)

Une solution à 1 mM 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 dans de la 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 13 mM. Le spectre de l'ubiquinone oxydée est réalisé en diluant 10 µl de décylubiquinone à 13 mM 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 g. Le surnageant est réparti dans deux tubes en verre et dans chacun des tubes sont ajoutés 2,5 ml de tampon KH_2PO_4 100 mM / sorbitol 250 mM pH 7,4 et 1,5 ml de cyclohexane. Les tubes sont bouchés avec un parafilm percé d'un trou et agités fortement. Les deux solutions sont regroupées dans un même tube et centrifugées pendant 10 minutes à 1000 g. 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 1,5 ml de cyclohexane et centrifugation à 1000 g 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 le mélange est aliquoté par fraction de 50 µl dans des tubes « microvials » (Agilent Technologies, Massy, France). Les tubes sont alors mis à évaporer sous azote puis bouchés rapidement et conservés à l'obscurité à -80°C. Le tube ayant contenu l'extrait sec est pesé à nouveau et son poids est retranché de 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, le contenu d'un « microvial » est repris par de l'éthanol absolu. Le volume d'éthanol nécessaire est calculé en fonction de la masse de décylubiquinol contenue dans le « microvial » de manière à obtenir une concentration de 25 mM.

C. Protocole.

➤ 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 de tampon A par million de cellules (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.

➤ 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 ₂ PO ₄ 20 mM pH 7,8	500 µl	10 mM
Eau distillée	307 µl	
EDTA	100 µl	2 mM
Albumine de sérum bovin	20 µl	1 mg/ml
Cyanure de potassium	24 µl	0,24 mM
Roténone	2 µl	0,005 mM
Cytochrome <i>c</i> oxydé	40 µl	0,04 mM

Pour chaque échantillon, deux séries de tubes sont préparées en duplicat. Une série est incubée telle quelle et dans l'autre, 4 µl d'antimycine A à 1 mg/ml (soit une concentration finale de 5 µg/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 (soit une concentration finale de 0,05 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 60 secondes. La lecture est ensuite arrêtée et les pentes sont notées :

- la pente obtenue pour les tubes sans antimycine A

- la pente obtenue pour les tubes avec antimycine A.

➤ Calcul de l'activité du complexe III.

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

$$\text{Activité spécifique : AS (cell)} = \frac{\Delta\text{DO}(-\text{A}) - \Delta\text{DO}(+\text{A})}{l \times \epsilon_{\text{cyt } c} \times \text{Sn}_{\text{cyt } c}} \times \frac{V_{\text{total}}}{q_{\text{cellules}}}$$

$\Delta\text{DO}(-\text{T})$: delta DO par minute mesurée dans les tubes sans antimycine A

$\Delta\text{DO}(+\text{T})$: delta DO par minute mesurée dans les tubes avec antimycine A

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

$\epsilon_{\text{cyt } c}$: 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

$\text{Sn}_{\text{cyt } c}$: nombre stœchiométrique du cytochrome c dans l'équation de la réaction, soit 1

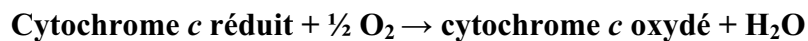
q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel, soit 0,1 million

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

X. 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. Le cytochrome c réduit absorbe la lumière à 550 nm ; la disparition de la forme réduite du cytochrome c entraînera donc une décroissance de l'absorbance à 550 nm, cette décroissance de l'absorbance étant proportionnelle à l'activité du complexe IV.

B. Réactifs.

- Tampon KH_2PO_4 100 mM, pH 6,5 (Sigma Aldrich, Lyon, France)

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

- Albumine de sérum bovin sans acides gras libres (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Aux 250 mg d'albumine bovine sont ajoutés 5 ml d'eau distillée. La solution à 50 mg/ml ainsi préparée est stable pendant 6 mois à -20°C .

- Laurylmaltoside (Fluka, Sigma Aldrich, Lyon, France)

Une solution à 125 mM est préparée en dissolvant 63,83 mg de laurylmaltoside dans 1 ml d'eau distillée. Cette solution est stable un mois à -20°C .

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

Pour préparer une solution à 1 mM, 3,72 mg de cytochrome *c* sont dissous dans 300 μl de tampon KH_2PO_4 100 mM pH 6,5. Cette solution est préparée le jour du dosage et conservée sur la glace.

- Cytochrome *c* réduit

Ce dernier est préparé à partir de la solution de cytochrome *c* oxydé décrite ci-dessus. Pour cela, 250 μl de cytochrome *c* oxydé à 1 mM sont dilués dans 4,75 ml de tampon KH_2PO_4 100 mM pH 6,5.

Deux microcuvettes (CML, Nemours, France) contenant 1 ml de cette solution sont préparées. Dans une des deux microcuvettes, 5 mg de cristaux de ferricyanure de potassium (Sigma Aldrich, Lyon, France) sont ajoutés pour obtenir une solution 100 % oxydée. Dans l'autre microcuvette, 5 mg de dithionite de sodium (Fluka, Sigma Aldrich, Lyon, France) sont ajoutés pour obtenir une solution de cytochrome *c* 100 % réduit.

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 100 % oxydée et compris entre 7,1 et 10 pour la solution 100 % réduite. Si tel est le cas, une fourchette de $\text{DO}_{550 \text{ nm}}$ est calculée selon les formules suivantes, pour obtenir 92 à 97 % de réduction :

92 % de réduction : $((DO_{550 \text{ nm réduit}} - DO_{550 \text{ nm oxydé}}) \times 0,92) + DO_{550 \text{ nm oxydé}}$

97 % de réduction : $((DO_{550 \text{ nm réduit}} - DO_{550 \text{ nm oxydé}}) \times 0,97) + DO_{550 \text{ nm oxydé}}$

Vingt microlitres de solution 100 % réduite sont alors ajoutés à la solution de cytochrome *c* oxydé diluée et la densité optique est lue à 550 nm. Cette opération est répétée jusqu'à l'obtention d'une DO comprise dans la fourchette calculée ci-dessus.

C. Protocole.

➤ 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 de tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I) par million de cellules.

➤ Mesure de l'activité du complexe IV par spectrophotométrie.

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en plastique :

Réactif	Volume	Concentration finale
Albumine de sérum bovin	20 µl	1 mg/ml
Eau distillée	455 µl	
Cytochrome <i>c</i> réduit	500 µl	0,015 mM

Pour chaque échantillon, les mesures sont effectuées en duplicat. Le mélange réactionnel est incubé pendant 3 minutes à 37°C. Cinq microlitres de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) y 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 ; les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre (Beckman U 640B, Beckman Coulter, Roissy CDG, France) thermostaté à 37°C et la cinétique de décroissance de l'absorbance du cytochrome *c* réduit est suivie à 550 nm pendant 90 secondes. A la fin de la lecture, la pente de la droite obtenue est notée.

➤ Calcul de l'activité du complexe IV.

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

$$\text{Activité spécifique : AS (cell)} = \frac{\Delta\text{DO}}{l \times \epsilon_{\text{cyt } c} \times \text{Sn}_{\text{cyt } c}} \times \frac{V_{\text{total}}}{q_{\text{cellules}}}$$

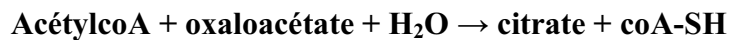
- ΔDO** : delta DO par minute mesurée sur la zone linéaire de la courbe de décroissance
- V_{total}** : volume total dans la cuve, en ml, soit 1
- l** : longueur de traversée du faisceau optique, en cm, soit 1
- $\epsilon_{\text{cyt } c}$** : coefficient d'extinction du cytochrome *c* à 550 nm et pH 7,8, en $\text{mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, soit 18,5
- $\text{Sn}_{\text{cyt } c}$** : nombre stœchiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit 1
- q_{cellules}** : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel, soit 0,1 million

Ce calcul fournit les résultats en nmol/min/million de cellules.

XI. Dosage de l'activité de la citrate synthase sur cellules.

A. Principe de la technique.

La citrate synthase est la première enzyme du cycle de Krebs. Elle catalyse la réaction suivante :



L'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) intervient dans le dosage. Celui-ci réagit avec les groupements thiols (SH) du coA-SH formé dans la réaction ci-dessus et forme du coA-TNB et du TNB. Le TNB 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 1 M pH 8,1 (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Les 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 5 N. Ce tampon, 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 1 M. Cette solution à 1 mM est alors utilisable pendant une demi-journée en la conservant à l'abri de la lumière.

- Acétyl coA (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Les 25 mg d'acétyl coA sont dissous dans 1,2 ml d'eau distillée afin d'obtenir une solution à 10 mM. Cette solution est stable pendant un mois à -20°C.

- Oxaloacétate (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Extemporément, 6,6 mg d'oxaloacétate sont dilués dans 5 ml d'eau distillée pour obtenir une solution à 10 mM.

- Triton X-100 10 % (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Après avoir dilué 1 ml de triton X-100 dans 9 ml d'eau distillée, cette solution de triton X-100 10 % se conserve en aliquots pendant 6 mois à -20°C.

C. Protocole.

- 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 de tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I) par million de cellules.

- 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	0,15 mM
Eau distillée	755 µl	
Acétyl coA	30 µl	0,3 mM
Oxaloacétate	50 µl	0,5 mM
Triton X-100 10 %	10 µl	0,1 %

Pour chaque échantillon, les mesures sont effectuées 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 ; les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre thermostaté à 37°C et la cinétique d'augmentation de l'absorbance du TNB à 412 nm est suivie pendant 60 secondes. La pente de la droite obtenue est notée en fin de lecture.

➤ Calcul de l'activité de la citrate synthase.

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

$$\text{Activité spécifique : AS (cell)} = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{DTNB}} \times S_{\text{DTNB}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{q_{\text{cellules}}}$$

ΔDO : delta DO par minute mesurée au niveau de la zone linéaire de la courbe

V_{total} : volume total dans la cuvette, en ml, soit 1

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

ε_{DTNB} : coefficient d'extinction du DTNB à 412 nm, en mM⁻¹.cm⁻¹, soit 13,6

S_{DTNB} : nombre stœchiométrique du DTNB dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel, soit 0,1 million

Ce calcul fournit les résultats en nmol/min/million de cellules.

XII. Dosage de l'activité de la lactate déshydrogénase (LDH) sur cellules.

A. Principe de la technique.

La lactate déshydrogénase catalyse la réaction suivante :



Au cours de cette réaction, le NADH, qui absorbe la lumière à 340 nm, est oxydé en NAD⁺, un composé qui n'absorbe pas la lumière à cette longueur d'onde. Lors de la mesure spectrophotométrique, la décroissance de l'absorbance du NADH à 340 nm est donc suivie et sera proportionnelle à l'activité de la LDH.

B. Réactifs.

- Tampon Tris-HCl 100 mM pH 7,1 (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Les 1,21 g de Tris sont dissous dans 100 ml d'eau distillée et le pH est ajusté à 7,1 avec de l'HCl 5 N. Ce tampon, une fois aliquoté, se conserve pendant 3 mois à -20°C.

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

Une solution à 15 mM de NADH est préparée extemporanément. Pour cela, 11,5 mg de NADH sont dissous dans 1 ml d'eau distillée. La solution est conservée dans la glace et protégée de la lumière pendant l'expérience.

- Pyruvate (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Extemporément, 110 mg de pyruvate sont dilués dans 1 ml d'eau distillée pour obtenir une solution à 1 M.

- Triton X-100 10 % (Sigma Aldrich, Lyon, France)

Après avoir dilué 1 ml de triton X-100 dans 9 ml d'eau distillée, cette solution de triton X-100 10 % se conserve en aliquots pendant 6 mois à -20°C.

C. Protocole.

- 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 de tampon A (composition : cf dosage de l'activité du complexe I) par million de cellules.

- Mesure de l'activité de la lactate déshydrogénase par spectrophotométrie.

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactif	Volume	Concentration finale
Tris-HCl pH 7,1	940 µl	95 mM
Pyruvate	10 µl	10 mM
Triton X-100 10 %	25 µl	0,25 %

Pour chaque échantillon, les mesures sont effectuées en duplicat. Ce mélange est incubé pendant 5 minutes à 37°C. Cinq microlitres de la suspension cellulaire (soit 0,1 million de cellules) sont ajoutés puis la réaction est déclenchée en ajoutant 20 µl de NADH à 15 mM. Le mélange est ensuite rapidement transvasé dans des microcuvettes ; les cuvettes sont placées dans le spectrophotomètre thermostaté à 37°C et la cinétique de diminution de l'absorbance du NADH à 340 nm est suivie pendant 100 secondes. La pente de la droite obtenue est notée en fin de lecture.

➤ Calcul de l'activité de la lactate déshydrogénase.

L'activité de la lactate déshydrogénase est calculée en utilisant la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique : AS (cell)} = \frac{\Delta DO}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times S_{\text{NADH}}} \times \frac{V_{\text{total}}}{q_{\text{cellules}}}$$

ΔDO : delta DO par minute mesurée au niveau de la zone linéaire de la courbe

V_{total} : volume total dans la cuvette, en ml, soit 1

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

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

S_{NADH} : nombre stœchiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit 1

q_{cellules} : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel, soit 0,1 million

Ce calcul fournit les résultats en nmol/min/million de cellules.

XIII. Mesure de la concentration intracellulaire en calcium.

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 (figure M8A), un dérivé du chélateur de calcium EGTA (acide éthylène glycol tétra-acétique). Cette forme acétoxyméthylester du FURA-2 peut traverser la membrane plasmique des cellules. Une fois cette sonde à l'intérieur de la cellule, le groupement acétoxyméthylester est clivé par les estérases cellulaires présentes dans le cytoplasme, ce qui libère le FURA-2. N'étant plus

lipophile, le FURA-2 ne peut plus traverser les membranes cellulaires et reste dans le cytosol où il peut se lier au calcium (figure M8B). Le FURA-2 est 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. Le FURA-2 émet en revanche à une seule longueur d'onde : 510 nm (figure M8C). Le calcul du ratio de la 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	8,18 g
KCl	4 mM	0,30 g
MgCl ₂	1 mM	0,2033 g
NaH ₂ PO ₄	0,33 mM	0,04 g
Hepes	10 mM	2,38 g
Glucose	11,1 mM	2 g
CaCl ₂	2 mM	0,294 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 1000 ml de tampon. Celui-ci est ajusté à pH 7,4 avec du NaOH 1N puis conservé en aliquots à -20°C.

➤ Tampon PSS 0 mM Ca⁺⁺

Ce tampon est préparé de façon identique au tampon PSS 2 mM Ca⁺⁺, mais sans incorporation de CaCl₂.

➤ Tampon PSS/BSA

Le jour du dosage de calcium, un aliquot de 45 ml de tampon PSS 2 mM Ca⁺⁺ est décongelé. Quarante-cinq milligrammes d'albumine de sérum bovin (Sigma Aldrich, Lyon, France) sont dissous dans le tampon afin d'obtenir une solution à 0,1 % de BSA. La présence de BSA permet de limiter le phénomène de bruit de fond lors du dosage de calcium.

- FURA-2/AM (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France)

La solution de FURA-2/AM à 1 mM dans du DMSO est aliquotée puis conservée à -20°C. Cette sonde étant sensible à la lumière, toutes les étapes de l'expérience sont réalisées dans le noir.

- Acide pluronique F-127 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France)

L'acide pluronique F-127 est utilisé pour permettre une meilleure solubilisation de la sonde acétoxyméthylester FURA-2/AM. La solution d'acide pluronique F-127 à 20 % dans du DMSO se conserve à température ambiante pendant 6 mois.

- Ionomycine (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France)

Un milligramme d'ionomycine est repris par 1 ml de DMSO pour obtenir une concentration de 1,41 mM. Cette solution stock est aliquotée puis conservée à +4°C pendant un an. Ce composé étant sensible à la lumière, il est protégé de la lumière lors des manipulations. Avant chaque expérience, une solution à 20 µM est réalisée en diluant 49,6 µl d'ionomycine stock dans 3,5 ml de tampon PSS/BSA. Au cours de l'expérience, 10 µl de cette solution diluée seront ajoutés aux 90 µl de tampon PSS/BSA présents dans chaque puits contenant les cellules afin d'obtenir une concentration finale d'ionomycine à 2 µM dans le puits.

- BAPTA/AM (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France)

Vingt-cinq milligrammes de BAPTA/AM sont repris par 2,5 ml de DMSO. La solution stock à 13 mM ainsi obtenue est aliquotée et se conserve à -20°C pendant un mois. Ce composé étant sensible à la lumière, il est protégé de la lumière lors des manipulations. Avant chaque expérience, un aliquot de la solution stock est dilué au 1/10^{ème} puis 6,1 µl de cette dernière solution sont dilués dans 1 ml de tampon PSS/BSA pour obtenir une solution finale à 8 µM. Des solutions à 2, 4 et 6 µM de BAPTA/AM sont également réalisées dans le tampon PSS/BSA.

C. Protocole.

- Préparation des cellules.

La veille de la manipulation, les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits noire traitée pour la culture (Nunc, VWR, Fontenay sous Bois, France) à une densité de 50.000 cellules par puits et placées dans l'étuve. Le lendemain matin, le milieu est retiré et les puits

sont rincés avec du tampon PSS/BSA. Les cellules sont ensuite incubées en présence de 5 μM de FURA-2/AM et 0,1 % d'acide pluronique F-127 dans le tampon PSS/BSA, pendant 40 minutes à 37°C et 5 % de CO_2 , dans l'obscurité. Après rinçage des cellules avec du tampon PSS/BSA pour enlever l'excès de sonde fluorescente, les cellules sont incubées dans l'étuve 30 minutes supplémentaires dans le tampon PSS/BSA afin d'assurer une dé-estérification complète du FURA-2/AM. Lors des expériences durant lesquelles du BAPTA/AM est utilisé, les cellules sont ensuite incubées en présence de 2, 4, 6 ou 8 μM de BAPTA/AM dans le tampon PSS/BSA pendant 40 minutes à 37°C et 5 % de CO_2 , dans l'obscurité. Après rinçage avec du tampon PSS/BSA, les cellules sont incubées dans l'étuve 30 minutes supplémentaires dans le tampon PSS/BSA afin d'assurer une dé-estérification complète du BAPTA/AM. Pour finir, 90 μl de tampon PSS/BSA sont déposés dans chaque puits pour la mesure de la concentration intracellulaire en calcium par spectrophotométrie.

➤ Mesure de la concentration intracellulaire en calcium par spectrophotométrie.

Les mesures de la variation du calcium intracellulaire sont réalisées à l'aide du spectrophotomètre Mithras LB940 (Berthold Technologies, Thoiry, France) préalablement thermostaté à 37°C. Cet appareil permet de réaliser des mesures de fluorescence en cinétique. La plaque 96 puits est placée dans le lecteur de plaque et le programme suivant est effectué pour chaque puits sélectionné :

- Une phase de lecture de la fluorescence basale émise à 510 nm après excitation de la sonde FURA-2 présente dans les cellules en alternance à 340 et 380 nm, pendant 60 secondes.
- 10 μl d'ionomycine à 20 μM sont injectés dans le puits : la concentration finale en ionomycine dans le puits est alors de 2 μM .
- La plaque est mélangée.
- Une phase de lecture de la fluorescence émise à 510 nm après excitation de la sonde FURA-2 en alternance à 340 et 380 nm, pendant 200 secondes.

Le bruit de fond est déterminé, pour chaque série d'expérience, en mesurant la fluorescence dans un puits contenant des cellules non chargées en FURA-2/AM (cellules incubées avec du tampon PSS/BSA durant toute la phase de préparation des cellules). Dix microlitres d'ionomycine sont également injectés dans ce puits afin de s'assurer que l'ionomycine ajoutée en cours d'expérience n'entraîne pas de modification de la fluorescence des cellules.

Les variations de concentrations intracellulaires en calcium sont ensuite déterminées en calculant le ratio (F340/F380) de fluorescence émise à 510 nm suite à une excitation à 340 et 380 nm pendant la cinétique.

XIV. Détection de protéines par la méthode ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).

A. Principe de la technique.

Cette technique permet de détecter une protéine et de la quantifier dans un échantillon (figure M9). Un anticorps dit de capture dirigé contre la protéine d'intérêt est lié au fond d'une plaque 96 puits. L'échantillon de protéines est alors appliqué à la plaque, puis un anticorps dit de détection est ajouté, et se lie à la protéine d'intérêt. Un anticorps secondaire, dirigé contre l'anticorps de détection, lié à une enzyme est ajouté. Enfin, le substrat de l'enzyme est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme colorée détectable par spectrophotométrie.

B. Protocole.

➤ Préparation des échantillons.

A la fin du traitement des cellules, celles-ci sont décollées de la flasque par grattage dans du PBS (Phosphate Buffered Saline ; Laboratoires PAA, Les Mureaux, France). Après centrifugation à 300 g pendant 5 minutes, le surnageant est éliminé et le culot de cellules est conservé à -80°C.

Une fois décongelé, chaque culot de cellules est repris dans 70 à 100 µl de tampon de lyse (10 mM Tris, pH 7,4 ; 100 mM NaCl ; 1 mM EDTA ; 1 mM EGTA ; 1 mM NaF ; 20 mM Na₄P₂O₇ ; 2 mM Na₃VO₄ ; 1 % Triton X-100 ; 10 % glycerol ; 0,1 % SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) ; 0,5 % deoxycholate) auxquels sont ajoutés au dernier moment du phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) 1 mM final et le volume nécessaire d'antiprotéases 100 X (Protease inhibitor mix, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Orsay, France), afin d'extraire les protéines contenues dans les cellules. Ce mélange est alors conservé à +4°C pendant 30 minutes en le remuant toutes les 10 minutes. Cet extrait cellulaire est ensuite transféré dans des tubes propres et une centrifugation à 13000 g pendant 15 minutes à +4°C

est effectuée. Après centrifugation, le lysat cellulaire contenant les protéines est récupéré et aliquoté puis conservé à -80°C.

➤ Dosages.

Pour ces expériences, les kits CREB (total) human ELISA et CREB [pS133] human ELISA (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ont été utilisés.

Le jour de l'expérience, les aliquots de lysat cellulaire précédemment préparés sont décongelés sur la glace. Une dilution au 1/10^{ème} de ces échantillons est alors réalisée dans du tampon de dilution fourni dans le kit. En parallèle, une gamme de concentrations connues de la protéine CREB ou phosphoCREB, selon l'expérience, est réalisée par dilution en cascade du contenu du tube de standard CREB ou phosphoCREB aux concentrations respectives de 10 ng/ml et 50 unités/ml.

L'expérience est réalisée dans une plaque 96 puits transparente. Cent microlitres d'échantillon ou de gamme sont déposés en duplicats dans les puits au fond desquels est lié l'anticorps de capture. Cent microlitres de tampon de dilution sont également déposés dans deux puits afin de déterminer le bruit de fond au cours du dosage. Après une incubation de 2 heures à température ambiante, la plaque est renversée et chaque puits est lavé 4 fois avec 350 µl de tampon de lavage. Cent microlitres de la solution d'anticorps de détection anti-CREB (ou anti-phosphoCREB) sont déposés dans chaque puits. Après une heure d'incubation à température ambiante, la plaque est renversée et chaque puits est lavé 4 fois avec 350 µl de tampon de lavage. Cent microlitres de la solution d'anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines G de lapin de l'anticorps de détection couplé à la HRP (HorseRadish Peroxidase) sont ensuite déposés dans chaque puits. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante, la plaque est renversée et chaque puits est lavé 4 fois avec 350 µl de tampon de lavage. Cent microlitres de la solution chromogène sont alors déposés dans chaque puits. Le liquide contenu dans les puits devient alors bleu, l'intensité de coloration étant fonction de la quantité de protéine CREB ou phosphoCREB présente dans l'échantillon de départ. Après une incubation de 30 minutes à température ambiante et dans l'obscurité, 100 µl de la solution stop sont ajoutés dans chaque puits. La coloration dans les puits passe alors de bleue à jaune. Pour finir, la plaque est déposée dans le spectrophotomètre SPECTRAFluor Plus (Tecan, Lyon, France) et l'absorbance est lue à 450 nm.

XV. Détection de protéines par Western-Blot.

A. Principe de la technique.

Cette technique permet de déterminer la présence ainsi que la quantité relative d'une protéine dans un échantillon. Le motif antigénique de la protéine d'intérêt est reconnu par un anticorps primaire dirigé contre cette protéine. Un anticorps secondaire (immunoglobuline G non spécifique) couplé à la peroxydase reconnaît ensuite l'anticorps primaire. Pour finir, la révélation du complexe antigène/anticorps se fait par chimioluminescence.

B. Réactifs.

- Tampon Tris-SDS pH 8,8.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tris	1 M	12,12 g
SDS	20 %	0,20 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 100 ml de tampon. Celui-ci est ajusté à pH 8,8 avec de l'HCl 5N puis conservé à +4°C.

- Tampon Tris-SDS pH 6,8.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tris	300 mM	3,63 g
SDS	20 %	0,20 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 100 ml de tampon. Celui-ci est ajusté à pH 6,8 avec de l'HCl 5N puis conservé à +4°C.

- Tampon d'échantillon 2X.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser/volume
Tampon Tris-SDS pH 6,8	100 mM	10 ml
SDS	1,2 %	1,2 g
Glycérol	4,1 M	37,8 g
Bleu de bromophénol 1 %	28,9 μ M	2 mg
2 β Mercapto Ethanol	1,875 M	15 ml

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 100 ml de tampon puis celui-ci est conservé à +4°C.

➤ Tampon d'électrophorèse 10X.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
Tris	250 mM	30,3 g
Glycine	1,92 M	144 g
SDS	1 %	10 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 1000 ml de tampon. Celui-ci est ajusté à pH 8,3 avec de l'HCl 5N puis conservé à +4°C. Ce tampon est dilué au 1/10^{ème} dans de l'eau distillée avant son utilisation.

➤ Tampon de transfert.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser/volume
Tris	20 mM	2,4 g
Glycine	150 mM	11,3 g
Ethanol	20 %	200 ml

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 1000 ml de tampon. Celui-ci est ajusté à pH 8,3 avec de l'HCl 5N puis conservé à +4°C.

➤ Tampon TBS (Tris Buffered Saline) 10X.

Réactif	Concentration finale	Masse à peser
NaCl	1,37 M	81 g
KCl	25,5 mM	1,9 g
Tris	250 mM	30,3 g

De l'eau distillée est ajoutée pour obtenir un volume de 1000 ml de tampon. Celui-ci est ajusté à pH 7,4 avec de l'HCl 5N puis conservé à +4°C. Avant son utilisation, ce tampon est dilué au 1/10^{ème} dans 1000 ml d'eau distillée auxquels 1 ml de Tween 20 (Sigma Aldrich, Lyon, France) est ajouté pour obtenir le tampon TBS/Tween 20.

➤ Anticorps.

Nom	Fournisseur	Dilution finale
Anti-nitrotyrosines	Abcam	1/250ème
α -tubuline	Sigma Aldrich	1/1000ème
OXPHOS	Mitosciences	1/500ème

C. Protocole.

➤ Préparation des échantillons.

Chaque culot cellulaire est repris par 20 μ l d'eau distillée auxquels sont ajoutés 0,2 μ l d'antiprotéases 100X (Protease inhibitor mix, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Orsay, France). La concentration en protéines de chaque échantillon est ensuite dosée à l'aide du Nanodrop ND-1000 qui mesure l'absorbance des protéines à 280 nm. Un volume équivalent à 40 μ g de protéines totales est prélevé et le même volume de tampon d'échantillon 2X y est ajouté. Afin de dénaturer les interactions protéiques, le mélange est ensuite chauffé à 95°C pendant 10 minutes (sauf lorsque l'on veut détecter la protéine COX I car celle-ci est sensible à la chaleur, dans ce cas, l'échantillon n'est pas chauffé) puis déposé sur gel d'acrylamide.

➤ 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 20 kDa à 50 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 % (BioRad, Marnes La Coquette, France) et à 2 ml d'eau distillée. La polymérisation de l'acrylamide est alors déclenchée par ajout de 250 μ l de persulfate d'ammonium (Eurobio, Les Ulis, France) à 10 % et de 12,5 μ l de TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine ; N,N,N',N'-Di-(diméthylamino)ethane ; N,N,N',N'-Tetraméthyl-1-,2-diaminométhane ; Eurobio, Les Ulis, France). Le gel est alors immédiatement coulé entre deux plaques de verres et la surface de chaque gel est lissée par ajout d'1 ml d'isopropanol (Merck, VWR, Fontenay sous Bois, France). 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 à 12,5 % d'acrylamide (environ 30 minutes), l'isopropanol est retiré par renversement du système de coulage des gels. Cent

microlitres de persulfate d'ammonium et 10 μ l 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 à électrophorèse. Environ 500 ml de tampon d'électrophorèse sont ajoutés entre et autour des deux gels et les peignes sont retirés.

➤ Dépôt des échantillons et migration.

Cette étape a pour but de séparer les protéines des échantillons selon leur poids moléculaire. Après dénaturation, les échantillons de protéines sont déposés dans les puits. Un marqueur de poids moléculaire (Precision Plus Protein Dual Color Standards, BioRad, Marnes La Coquette, France) est également déposé pour suivre la migration. La cuve d'électrophorèse (BioRad, Marnes la Coquette, France) est fermée et reliée au générateur (PowerPac HC, BioRad, Marnes la Coquette, France). Une première migration de 20 minutes à 100 V est alors réalisée afin de concentrer les échantillons dans le gel de concentration. Cette étape est suivie par une seconde migration d'1h30 à 140 V afin de séparer les protéines. Celles-ci étant rendues électronégatives par le SDS, elles se sépareront en fonction de leur masse moléculaire et non pas en fonction de leur charge électrique, d'autant plus loin de la ligne de départ que leur masse est faible. Lorsque le front de migration atteint le bas du gel, la migration est stoppée.

➤ Transfert sur membrane de PVDF.

Cette étape permet le transfert des protéines contenues dans le gel sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF) (Amersham Hybond-P, GE Healthcare, Orsay, France). La membrane 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 (Trans-Blot SD, BioRad, Marnes la Coquette, France) sur 3 épaisseurs de papier buvard (Whatman, VWR, Fontenay sous Bois, France) imbibé de tampon de transfert. La membrane est déposée sur le gel et est recouverte à son tour de deux épaisseurs de papier buvard imbibé de tampon de transfert. Le transfert des protéines sur la membrane est alors réalisé par application d'un courant de 260 mA pendant une heure.

➤ Saturation de la membrane.

Afin de saturer les sites de fixation non spécifiques, la membrane est placée dans une solution de saturation composée de 5 % de lait écrémé repris dans du tampon TBS/Tween 20, sous agitation pendant une nuit à +4°C (ou 3 heures à température ambiante).

➤ Incubation de la membrane avec l'anticorps primaire.

La membrane est rincée 3 fois pendant 5 minutes dans un bain de TBS/Tween 20 puis incubée dans la solution d'anticorps primaire (dilué à la concentration voulue dans du TBS/Tween 20/lait 1 %) pendant 3 heures à température ambiante (ou une nuit à +4°C).

➤ Incubation de la membrane avec l'anticorps secondaire.

Après trois rinçages de 5 minutes dans du TBS/Tween 20, la membrane est incubée pendant 2 heures dans la solution d'anticorps secondaire (anticorps dilué au 1/20000^{ème} dans du TBS/Tween 20/lait 1 %) dirigé contre les immunoglobulines G de l'anticorps primaire et couplé à la peroxydase.

➤ Révélation.

L'hybridation des anticorps sur la membrane est révélée par chimioluminescence à l'aide du kit AmershamTM ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Orsay, France). Après incubation avec l'anticorps secondaire, la membrane est rincée deux fois 5 minutes avec du tampon TBS/Tween 20 puis une fois avec du tampon TBS. Un mélange contenant 2 ml de la solution A du kit ECL Plus et 50 µl de la solution B est déposé uniformément sur la membrane. Après 5 minutes d'incubation à l'abri de la lumière, l'excès de réactif est retiré de la membrane et celle-ci est placée dans l'appareil de détection (ChemiDoc XRS, BioRad, Marnes la Coquette, France). Différents temps d'exposition sont réalisés jusqu'à l'obtention de bandes d'intensité satisfaisante mais non saturante.

➤ Quantification.

L'intensité des différentes bandes est quantifiée grâce au logiciel Quantity One (ChemiDoc XRS, BioRad, Marnes la Coquette, France). Les résultats concernant la protéine d'intérêt sont normalisés par rapport à la quantité de la protéine de référence, ici l' α -tubuline.

XVI. Dosage du monoxyde d'azote.

A. Principe de la technique.

Le DAF-2/DA (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France) est un dérivé du 4,5-diaminofluorescéine (DAF-2) qui permet de doser les taux intracellulaires de NO. Ce composé est perméable aux membranes plasmiques cellulaires. Une fois à l'intérieur de la cellule, il est hydrolysé par les estérases cellulaires ce qui libère le DAF-2. Ce dernier, en présence d'oxygène, réagit rapidement avec le NO et non avec les formes oxydées du NO, telles que le NO_2^- et le NO_3^- , ou les espèces réactives de l'oxygène, telles que l'O_2^- , le H_2O_2 , et l'ONOO^- . La réaction du DAF-2, non fluorescent, avec le NO donne un composé fluorescent, le triazolofluorescéine (DAF-2T) (figure M10). Celui-ci émet une fluorescence à 515 nm après excitation à 495 nm.

B. Protocole.

Les cellules sont incubées pendant 30 minutes à 37°C en présence d'une solution de DAF-2/DA à 10 μM dans du PBS (Laboratoires PAA, Les Mureaux, France). Un témoin négatif est également réalisé avec des cellules incubées dans du PBS seul. Les cellules sont ensuite décollées par de la trypsine (Sigma Aldrich, Lyon, France) puis du PBS est ajouté aux cellules en suspension. Après deux lavages dans du PBS suivis de centrifugations à 300 g pendant 5 minutes, le culot cellulaire est repris dans du PBS de manière à obtenir une quantité de 100000 cellules pour 300 μl puis cette suspension cellulaire est conservée à l'abri de la lumière avant analyse par cytométrie en flux. Le dosage est réalisé à l'aide d'un cytomètre FACScan (Becton-Dickinson, le Pont de Claix, France) équipé du logiciel d'analyse des données CellQuest (Becton-Dickinson, le Pont de Claix, France).

XVII. Dosage du potentiel de membrane mitochondrial.

A. Principe de la technique.

Le 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide ou JC-1 (Calbiochem, VWR, Fontenay sous Bois, France) est un colorant cationique fluorescent utilisé comme indicateur du potentiel de membrane mitochondrial. Celui-ci émet une fluorescence rouge (à 590 nm) quand il s'accumule sous forme d'agrégats dans la membrane

mitochondriale de cellules non apoptotiques (membrane intègre et possédant un potentiel de membrane élevé). En revanche, le JC-1 émet une fluorescence verte (à 527 nm) quand il est sous forme de monomères dans les cellules présentant une chute du potentiel de membrane mitochondrial (cellules apoptotiques ou nécrotiques). Le ratio de fluorescence vert/rouge représente donc l'état de dépolarisation de la membrane mitochondriale et ainsi les modifications de fonctionnalité de la mitochondrie.

B. Protocole.

Les cellules sont incubées pendant 20 minutes à 37°C en présence d'une solution de JC-1 à 5 µg/ml dans du PBS (Laboratoires PAA, Les Mureaux, France). Un témoin négatif est également réalisé avec des cellules incubées dans du PBS seul. Les cellules sont ensuite décollées par de la trypsine (Sigma Aldrich, Lyon, France) puis du PBS est ajouté aux cellules en suspension. Après deux lavages dans du PBS suivis de centrifugations à 300 g pendant 5 minutes, le culot cellulaire est repris dans du PBS de manière à obtenir une quantité de 100000 cellules pour 300 µl puis cette suspension cellulaire est conservée à l'abri de la lumière avant analyse par cytométrie en flux. Le dosage est réalisé à l'aide d'un cytomètre FACScan (Becton-Dickinson, le Pont de Claix, France) équipé du logiciel d'analyse des données CellQuest (Becton-Dickinson, le Pont de Claix, France).

XVIII. Statistiques.

Les valeurs statistiques sont données sous la forme de la moyenne ± l'écart-type. Les calculs statistiques sont réalisés avec le logiciel StatView 5.0. Le test statistique utilisé est le test Mann-Whitney. Les données sont considérées comme statistiquement significativement différentes d'un groupe à l'autre à partir de $P < 0,05$.

Résultats et discussion

Article n°1

PGC-1-Related Coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocytic thyroid tumours.

Soazig Le Pennec, Mahatsangy Raharijaona, Julie Poirier, Delphine Mirebeau-Prunier, Clothilde Rouxel, Caroline Jacques, Jean-Fred Fontaine, Yves Malthiery, Rémi Houlgatte, Frédérique Savagner.

PLoS One, Novembre 2009

De par leur implication dans l'homéostasie énergétique, le métabolisme, la signalisation ou encore l'apoptose, les mitochondries jouent un rôle central au sein de la cellule. C'est pourquoi, l'abondance, la morphologie et les propriétés fonctionnelles de la mitochondrie sont finement régulées pour répondre aux demandes spécifiques à chaque type cellulaire en fonction de l'état physiologique de l'organisme. Ceci est particulièrement vrai pour la régulation de la fonction énergétique. Le protéome mitochondrial est constitué d'environ 1000 à 1500 protéines. La très grande majorité de ces protéines est codée par le génome nucléaire alors que le génome mitochondrial code pour 13 protéines essentielles, impliquées dans le mécanisme de phosphorylation oxydative. La masse mitochondriale est largement contrôlée au niveau transcriptionnel ; la biogenèse mitochondriale nécessite donc la coordination de la transcription des gènes présents dans les deux organites. La coordination de ces deux génomes est assurée par des facteurs de transcription, tels que NRF-1, NRF-2, CREB ou ERR α . Leur action transcriptionnelle est fortement contrôlée par la famille PGC-1 de coactivateurs transcriptionnels – PGC-1 α , PGC-1 β et PRC – dont l'expression est dépendante de nombreux signaux environnementaux. PGC-1 α est fortement exprimé dans les tissus où la demande énergétique est élevée alors que l'expression de PRC est ubiquitaire et est induite par les signaux mitogènes. De nombreuses études se sont intéressées à la caractérisation des modes d'action et de régulation du coactivateur PGC-1 α . En revanche, les caractéristiques fonctionnelles de PRC ainsi que ses cibles géniques sont moins connues.

Au laboratoire, des études antérieures ont révélé la surexpression du seul coactivateur PRC dans les tumeurs oncocytaires thyroïdiennes, caractérisées par une très grande richesse en mitochondries fonctionnelles assurant un métabolisme oxydatif (Savagner *et al.*, 2003 ; Baris *et al.*, 2004). La lignée XTC.UC1 est actuellement le seul modèle cellulaire d'oncocytome thyroïdien. En accord avec ce qui est décrit dans les tissus oncocytaires thyroïdiens, nous avons montré que les cellules XTC.UC1 assurent leur production d'énergie principalement par la voie oxydative. Dans ces cellules possédant un grand nombre de mitochondries, l'expression de transcrits nucléaires et mitochondriaux codant pour des sous-unités des différents complexes de la chaîne respiratoire ainsi que le contenu en ADNmt sont plus élevés que dans une lignée de carcinome papillaire thyroïdien B-CPAP (Savagner *et al.*, 2001a ; Baris *et al.*, 2004). Les cellules XTC.UC1 ont également pour particularité une très faible expression de PGC-1 α et représentent donc un modèle particulièrement adapté pour l'étude des facteurs impliqués dans le dialogue nucléo-mitochondrial médié par PRC.

Nisoli et ses collaborateurs ont montré que le monoxyde d'azote entraînait la biogenèse de mitochondries fonctionnelles : l'augmentation de l'expression du cytochrome *c*

et de la sous-unité IV de la COX, dépendante de la GMP cyclique, passe par une augmentation de l'expression des transcrits de PGC-1 α , NRF-1 et TFAM (Nisoli *et al.*, 2003 ; Nisoli *et al.*, 2004). Parmi les différentes NOS, la NOS endothéliale, eNOS, est une enzyme non inductible impliquée dans la régulation de la biogenèse mitochondriale. L'expression de la eNOS et la quantité de NO sont élevées dans les cellules XTC.UC1 comme dans les tumeurs oncocytaires. Dans ce travail, nous avons montré que le SNAP, un donneur de NO, induisait l'expression du coactivateur PRC et des facteurs NRF-1, TFAM, COX5B et ND5, impliqués dans la biogenèse mitochondriale, par l'intermédiaire de la protéine kinase dépendante de la GMPc. Le NO semble donc induire la biogenèse de mitochondries par le biais de la voie PRC/eNOS dans le modèle oncocytaire thyroïdien de façon identique à ce qui est décrit pour la voie PGC-1 α /eNOS dans d'autres modèles.

Nous avons cherché à explorer de façon exhaustive les gènes cibles de PRC par analyse transcriptomique du modèle cellulaire XTC.UC1 invalidé pour ce coactivateur. Le transcriptome est l'ensemble des transcrits issus de l'expression du génome d'un tissu ou d'un type cellulaire, à un temps donné. Il résulte d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation des ARNm et varie en fonction des conditions intra- et extra-cellulaires. La caractérisation à grande échelle du transcriptome permet d'identifier les gènes exprimés, de déterminer les mécanismes de régulation de l'expression des gènes et de définir les réseaux d'expression des gènes. La technique des puces à ADN permet d'acquérir une mesure relative du niveau d'expression d'un grand nombre d'ARNm dans un échantillon cellulaire par rapport à un témoin de référence et de caractériser ainsi des signatures propres à l'échantillon étudié et d'identifier les gènes co-régulés dans certaines réponses cellulaires spécifiques. Nous avons ainsi identifié 8 groupes ou « clusters » de gènes sensibles à PRC, impliqués notamment dans le fonctionnement mitochondrial, la prolifération cellulaire et la voie des MAPKs. Nous avons également établi la cinétique d'action de PRC avec des effets précoces (12 h) et tardifs (48 h) de ce facteur. Ceci est essentiel dans la mesure où ce facteur a été récemment décrit comme facteur de réponse précoce à l'induction du cycle cellulaire lors de la transition G1/S (Vercauteren *et al.*, 2008).

L'étude d'une puce à protéines ciblant les phosphoprotéines de la voie des MAPKs a par ailleurs mis en évidence l'implication de PRC dans la phosphorylation de plusieurs protéines appartenant à la voie contrôlée par ASK1. L'activation de cette protéine par phosphorylation est sensible au statut redox de la cellule et entraîne la prolifération, la différenciation ou l'apoptose des cellules. Cette voie ASK1 est particulièrement sensible au statut redox de la cellule au moment de la transition G2/M du cycle cellulaire. Elle correspond

à une réponse tardive de régulation par le facteur PRC, régulation qui n'a jamais été décrite pour les autres membres de la famille PGC-1.

Le coactivateur PRC régule finement l'expression de gènes codant pour des sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire. Il semble pouvoir réguler l'activité des complexes par un mécanisme de phosphorylation dépendant des MAPKs. Au niveau fonctionnel, l'inhibition de PRC entraîne une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire associée à une diminution de la production d'ATP malgré une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial (donc de la qualité du couplage). Ces données suggèrent que PRC module les fonctions mitochondriales en coordonnant la régulation de la respiration (et en particulier de la COX, accepteur final d'électrons sensible à l'action du NO) à la régulation de l'efficacité du couplage des mitochondries.

En plus de son rôle important dans l'adaptation à la demande énergétique, PRC est impliqué dans les étapes clés du cycle cellulaire (G1/S et G2/M) dans notre modèle de tumeur thyroïdienne riche en mitochondries. Nous proposons donc que PRC coordonne le déroulement du cycle cellulaire selon la demande énergétique et le statut redox, ce qui fait de ce coactivateur une cible thérapeutique de choix dans les tumeurs de métabolisme préférentiellement oxydatif.

PGC-1-Related Coactivator Modulates Mitochondrial-Nuclear Crosstalk through Endogenous Nitric Oxide in a Cellular Model of Oncocytic Thyroid Tumours

Mahatsangy Raharijaona^{1,2,9}, Soazig Le Pennec^{3,4,9}, Julie Poirier^{3,4}, Delphine Mirebeau-Prunier^{3,4,5}, Clothilde Rouxel^{3,4}, Caroline Jacques^{3,4}, Jean-Fred Fontaine^{3,4}, Yves Malthiery^{3,4,5}, Rémi Houlgatte^{1,2}, Frédérique Savagner^{1,3,4,5*}

1 INSERM, UMR 915, l'institut du Thorax, Nantes, France, **2** Université de Nantes, Nantes, France, **3** INSERM, UMR 694, Angers, France, **4** Université d'Angers, Angers, France, **5** CHU Angers, Laboratoire de Biochimie, Angers, France

Abstract

Background: The PGC-1 related coactivator (PRC), which shares structural and functional features with PGC-1 α , is believed to regulate several metabolic pathways as well as mitochondrial biogenesis. Its involvement in the early programming of cell proliferation suggests the existence of finely regulated crosstalk between mitochondrial functions and the cell cycle status.

Methodology/Principal Findings: PRC-regulated pathways were explored in a cell-line model derived from mitochondrial-rich tumours with an essentially oxidative metabolism and specifically high PRC expression. The functional status of mitochondria was compared to the results of microarray analysis under conditions of temporal PRC inhibition. To specify the fine PRC regulation, the expression levels of the genes and proteins involved in the oxidative phosphorylation process were studied by real time quantitative PCR and western blotting. As in earlier studies on PGC-1 α , we investigated the role of nitric oxide in PRC-regulated mitochondrial biogenesis and determined its action in the control of the phosphorylation status of the mitogen-activated protein kinase pathway.

Conclusion/Significance: We found that nitric oxide rapidly influences PRC expression at the transcriptional level. Focusing on mitochondrial energetic metabolism, we observed that PRC differentially controls respiratory chain complexes and coupling efficiency in a time-dependent manner to maintain mitochondrial homeostasis. Our results highlight the key role of PRC in the rapid modulation of metabolic functions in response to the status of the cell cycle.

Citation: Raharijaona M, Le Pennec S, Poirier J, Mirebeau-Prunier D, Rouxel C, et al. (2009) PGC-1-Related Coactivator Modulates Mitochondrial-Nuclear Crosstalk through Endogenous Nitric Oxide in a Cellular Model of Oncocytic Thyroid Tumours. PLoS ONE 4(11): e7964. doi:10.1371/journal.pone.0007964

Editor: Thomas Preiss, Victor Chang Cardiac Research Institute (VCCRI), Australia

Received: July 5, 2009; **Accepted:** October 25, 2009; **Published:** November 23, 2009

Copyright: © 2009 Raharijaona et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from the French Ministry of Research, the Institut National de la Recherche Médicale (INSERM), the University Hospital of Angers and the Ligue Contre le Cancer. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: frederique.savagner@univ-angers.fr.

⁹ These authors contributed equally to this work.

Introduction

Several essential cellular functions of mitochondria depend on a high degree of functional interaction between the nuclear and mitochondrial genomes. Of the hundred structural subunits that make up the oxidative phosphorylation (OXPHOS) complexes, 13 are encoded by the mitochondrial genome. The mechanisms governing the coordination of the multiple transcription factors involved in mitochondrial biogenesis have been partly explained by the discovery of the PGC-1 coactivator family [1]. Three members of this family – PGC1 α , PGC1 β and PRC – regulate several functions, including adaptative thermogenesis, glucidic metabolism, fatty acid oxidation and mitochondrial metabolism, *via* functional interactions with various transcriptional factors. Mitochondrial biogenesis is controlled by PGC mainly through interactions with nuclear respiratory factors, NRF-1 and NRF-2,

and may be induced *via* p38 mitogen-activated protein kinase. In a cell-selective manner, the efficiency of the oxidative phosphorylation process may also be regulated by PGC through the transcriptional control of uncoupling proteins (UCPs) [2].

PGC-1 α is expressed in organs and tissues with high energetic needs, such as heart, liver, skeletal muscle, brown adipose tissue, brain and kidney. In contrast, the expression of the PGC-1 related coactivator (PRC) depends on the cell cycle, and plays a role in the integration of pathways directing the mitochondrial respiratory function and cell growth [3]. PRC shares key structural motifs with PGC-1 α , interacting with and transactivating the promoters of NRF-1 target genes in a similar manner [4,5]. Other transcription factors targeted by PGC-1 α have been studied as potential targets for PRC. Weak interactions between PRC, on one hand, and PPAR γ , TR β and RAR, on the other, reflect the divergence between PRC and PGC-1 α ; however, strong interactions between

PRC and factors such as NRF-2, ERR α and CREB have recently been identified [6,7]. The nuclear transcription factors involved in mitochondrial biogenesis are not exclusive to this process but contribute to integrating the expression of mitochondrial proteins with other cellular functions. Thus, PRC has been shown to control cell growth through mechanisms that seem to be independent of its effects on mitochondrial function [3]. PRC has also been described as a positive regulator of respiratory chain expression; however, the precise role played by PRC in the complex functions involved in mitochondrial biogenesis and cell growth remains to be elucidated.

Deregulation in the functional status of mitochondria can have a feedback effect on nuclear transcriptional machinery [8,9]. It has been suggested that this retrograde signalling influences the bidirectional communication between the nucleus and mitochondria through a PGC-1 dependent pathway [10]. Mitochondrial functions are regulated by complex mechanisms in which nitric oxide (NO) is a key factor. The mitochondrial effect of NO is biphasic depending on its production level. Thus, NO is known to induce the production of reactive oxygen species (ROS) and trigger redox signalling [11]. It directly binds the haem-copper oxidases of complex IV and leads to reversible inhibition of the respiratory chain in an acute response. In a long term effect, a nitric oxide-cGMP-dependent pathway has been shown to control mitochondrial biogenesis through the PGC-1 α pathway [12]. The overexpression of NO, cGMP, or eNOS (endothelial nitric oxide synthase) was found to dramatically increase the number of mitochondria in a range of cell lines. This overexpression, related to a high production of PGC-1 α , leads to the formation of functionally efficient mitochondria in terms of oxidative phosphorylation. Interestingly, constitutive NO synthase – like eNOS – generates a low concentration of NO, which acts mainly as a second messenger to maintain cell homeostasis [13]. Moreover, eNOS was suspected of being one of the target genes of the retrograde signalling [14]. Since PRC presents the characteristics of an early gene product, it is likely to be involved in the rapid response to retrograde signals [7].

We have demonstrated in thyroid oncocyoma, which constitute a model of mitochondrial-rich tumours, a high rate of PRC induction, with no disruption of mitochondrial functions [15]. The PRC-induced effects were confirmed in the XTC.UC1 thyroid cell line, which thus offered a useful model for investigating the coordination of the nuclear and mitochondrial genomes [16,17]. In these mitochondrial-rich cells, we found an increased expression of eNOS, clearly produced by follicular thyroid cells [18,19]. To further appreciate the importance of the nuclear-mitochondrial crosstalk mediated by PRC, we searched for the cellular programs regulated by PRC in the oxidative XTC.UC1 human oncocyotic thyroid cell line, using genome-wide expression profiles of PRC SiRNA *versus* those of negative control cells. We compared the pattern of PRC inhibition with the activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK). We investigated the effect of NO on the induction of PRC in the oncocyotic cells compared to a non-oxidative BCPAP cell line derived from a papillary thyroid carcinoma. We focussed on the various functional features of PRC compared to those of PGC-1 α , especially with respect to the rapid response required to maintain mitochondrial and cell homeostasis.

Results

PRC-Mediated Mitochondrial Biogenesis Depends on the Level of Nitric Oxide Production

At T0, the endogenous NO was significantly higher (4.2 fold on average) in XTC.UC1 cells than in BCPAP cells (Figure 1A). Since

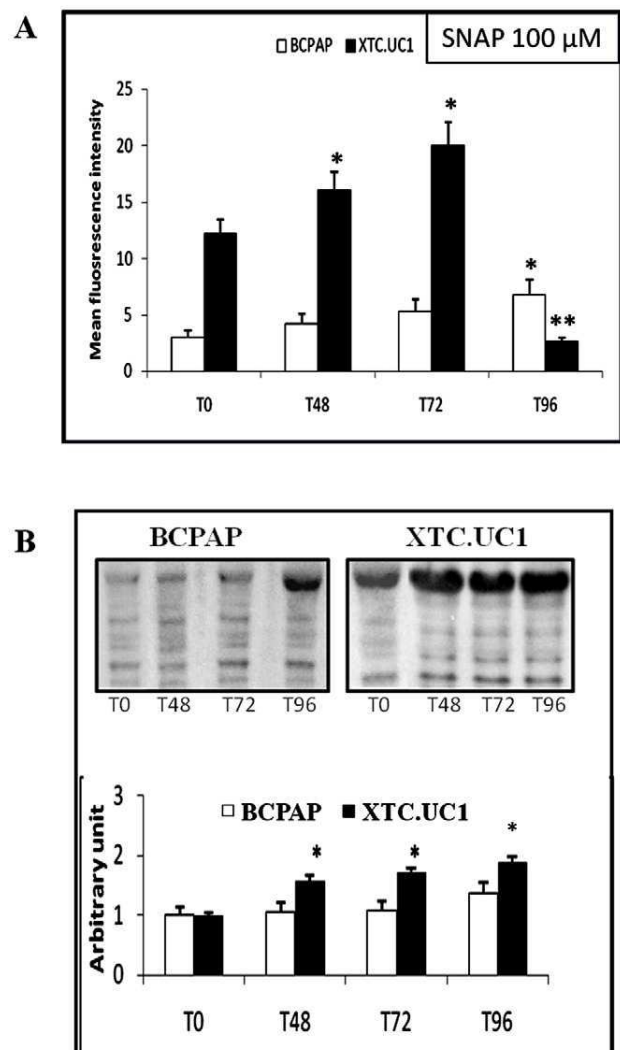


Figure 1. Effect of 100 μ M SNAP treatment during 96 h on XTC.UC1 and BCPAP cell lines ($N=5$ per cell line). 1A: Nitric oxide measurement with the FACScan cytometer (10 μ M final DAF2/DA dye). Results are expressed in arbitrary fluorescent units as mean values \pm SEM. * $P\leq 0.05$ versus T0. ** $P\leq 0.05$ versus T0 and T72. 1B: Evaluation of protein nitration by Western blotting using antibody raised against nitrotyrosine-modified proteins. Immunoblots are quantified by densitometric analysis and expressed in arbitrary units (relative to α -tubulin) as mean values \pm SEM. * $P\leq 0.05$ versus T0. doi:10.1371/journal.pone.0007964.g001

identical results were obtained with the nitric oxide donor SNAP at concentrations of 50 μ M and 100 μ M, we considered only those of SNAP at 100 μ M, this concentration being likely to produce 100 nM equivalent NO during several hours [20]. From T0 to T72, daily SNAP treatment induced comparable NO concentrations in the two cell lines, with a 1.6 fold increase in XTC.UC1 cells and a 1.7 fold increase in BCPAP cells. At T96, the use of the DAF-2/DA dye as an NO probe showed that the NO level decreased sharply for XTC.UC1 cells. This was associated with a 12-fold increase of ROS production, detected with a dihydroethidium probe, for XTC.UC1 cells at T96, whereas ROS production was stable at T48 and T72 (data not shown). The drastic decrease in the NO level measured by the DAF2 dye at T96 could be associated with the complete inhibition of complex IV activity and

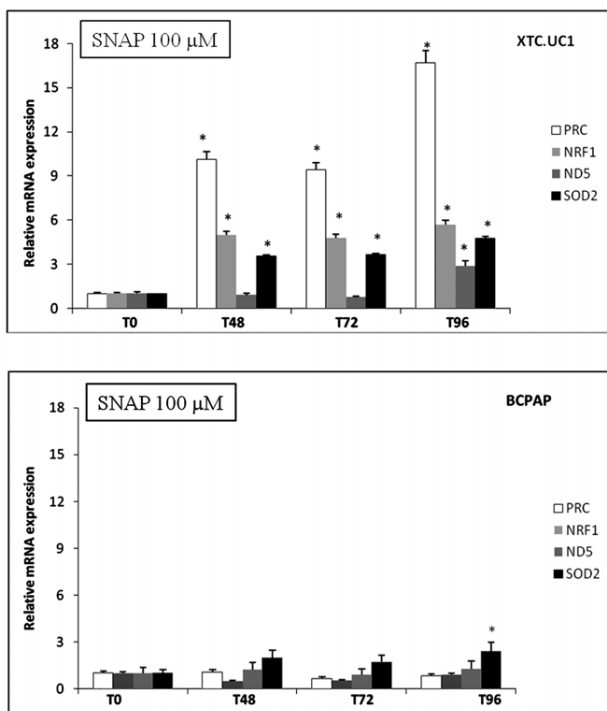


Figure 2. The expression of nuclear genes (PRC, NRF-1 and SOD2) and the mitochondrial gene (ND5) after 100 μM SNAP treatment of XTC.UC1 and BCPAP cells during 96 h. Data are expressed in relative units (mRNA copies number of a specific gene/copy number of β-globin mRNA) and expressed in terms of the T0 ratio as mean values ± SEM. **P* ≤ 0.05 versus T0. *N* = 5 per cell line and time of treatment. doi:10.1371/journal.pone.0007964.g002

to the production of peroxynitrite. Dysfunctions in the respiratory chain could have induced an oxidative stress that, combined with the high NO level, may have produced peroxynitrite. However, contrary to probes measuring oxidative stress, the DAF2 probe was unable to detect peroxynitrite formation [21]. For BCPAP cells, NO production continuously increased at T96 up to 2.2 fold from T0. The profile of nitrotyrosine-modified proteins showed that the 100 μM SNAP treatment induced a significant increase in protein nitration in XTC.UC1 cells from T48 whereas protein nitration had not increased significantly in BCPAP cells at T96 (Figure 1B).

Regarding the mRNA expression of genes involved in mitochondrial biogenesis (NRF-1, ND5 and PRC) and mitochondrial ROS detoxification (SOD2), we showed that the 100 μM SNAP treatment induced nuclear gene expression from T48, whereas mitochondrial gene ND5 expression was significantly induced from T96 in XTC.UC1 cells (Figure 2). No significant induction of genes involved in mitochondrial biogenesis was observed in BCPAP cells up to T96 of SNAP treatment. However, the SOD2 expression level had increased significantly at T96 compared to the T0 level.

PRC Expression Is Regulated at the Transcriptional Level

In XTC.UC1 cells synchronized by serum starvation for two days, we compared the PRC mRNA expression level during 48 h of 20% serum and PRC SiRNA and/or SNAP treatment (Figure 3A). The expression profile during 20% serum treatment was considered as a control. After 48 h of continuous SNAP treatment, there was a 2.2-fold increase of PRC induction

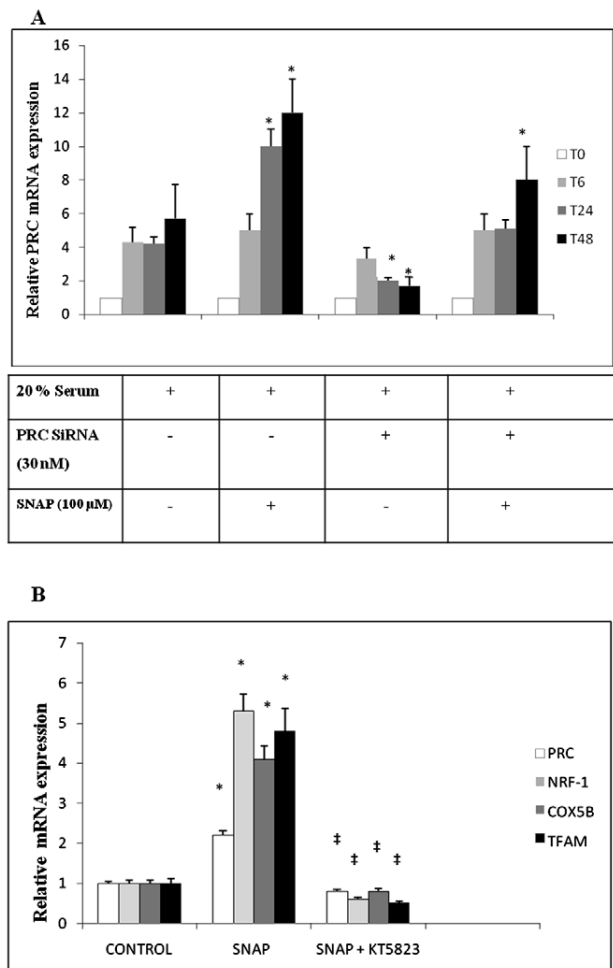


Figure 3. Effects of mRNA expression in XTC.UC1 cells during 20% serum induction and 100 μM SNAP and/or 30 nM PRC SiRNA treatment. Relative units (PRC mRNA copy number/β-globin copy number) expressed in terms of the T0 ratio as mean values ± SEM. *N* = 5 per time of treatment. 3A: The variation of PRC mRNA during 48 h of the different treatments. Except for T48 SiRNA, all samples differed significantly from T0 (*P* ≤ 0.05). **P* ≤ 0.05 versus T6. 3B: The variation of NRF-1, TFAM and COX5B mRNA at T24 of SNAP 100 μM and/or KT5823 1 μM (protein kinase G inhibitor) treatments compared to control T0. All samples differed significantly from T0 (*, *P* ≤ 0.05) or from those with 100 μM SNAP treatment (‡, *P* ≤ 0.05). doi:10.1371/journal.pone.0007964.g003

compared to the 48 h control. SiRNA treatment reduced PRC expression by 70% at 48 h while SiRNA and SNAP used in combination led to PRC re-expression up to 1.4 times the 48 h control value. Moreover, PRC mRNA expression was rapidly re-induced to a significant level after 6 h of treatment with SNAP+SiRNA (5.6 ± 0.6 relative PRC mRNA) compared to the level after 6 h of treatment with SiRNA alone (3.5 ± 0.4 relative PRC mRNA, *P* ≤ 0.05).

The expression of PRC and that of three genes involved in mitochondrial biogenesis (NRF-1, TFAM and COX5B) was significantly down-regulated when the NO/cGMP pathway was inhibited by the protein kinase G (PKG) inhibitor KT5823 at 1 μM (Figure 3B). This showed the involvement of the NO/cGMP pathway in the regulation of PRC expression, which decreased from 2.2 ± 0.1 to 0.8 ± 0.1 relative PRC mRNA with KT5823 treatment (*P* ≤ 0.05).

The Microarray Profile of Kinetic PRC SiRNA Reveals Nuclear-Mitochondrial Crosstalk

We examined the gene expression pattern of PRC SiRNA and control cells during the 48 h SiRNA treatment (Figure 4A). We had previously verified the level of PRC expression during the kinetics of inhibition by comparing PRC expression in SiRNA to a negative control by quantitative RT-PCR. PRC expression was inhibited from 42% (0 h and 12 h) to 70% at 24 h and 74% at 48 h. The absence of difference in the level of PRC inhibition between 0 h and 12 h may be explained by the dependence of PRC expression on cell cycle induction at 12 h even though PRC SiRNA had begun to act. Protein level measurements showed that SiRNA treatment was also able to inhibit PRC to more than 80% of the control after 24 h (Figure S1A).

Eight clusters of genes were differentially expressed between PRC SiRNA and the control during 48 h of 20% serum induction (Figure 4A). Gene ontology identified two clusters, 2 and 8, in

which mitochondrial functions were enriched, and two clusters, 5 and 6, in which the cell cycle functions were enriched (Table 1). The comparison of the significant differential gene expression between PRC SiRNA and the negative control, in each cluster and at each time of treatment (Figure 4B), showed that some genes were negatively regulated by PRC at a given time and positively at another. This suggests that PRC regulates gene transcription through interactions with transcriptional factors in either a positive or a negative manner. We confirmed the differential expression of nine genes selected from clusters 2, 5 and 6 by quantitative RT-PCR analysis on 5 independent SiRNA experiments (Figure S1C). A Pearson correlation of 90% was found between results of microarray analysis and real-time RT-PCR.

We searched for transcriptional factors involved in the PRC-regulating pathway in clusters 2 and 6 where ontological terms were enriched in mitochondrial metabolism and the cell mitotic

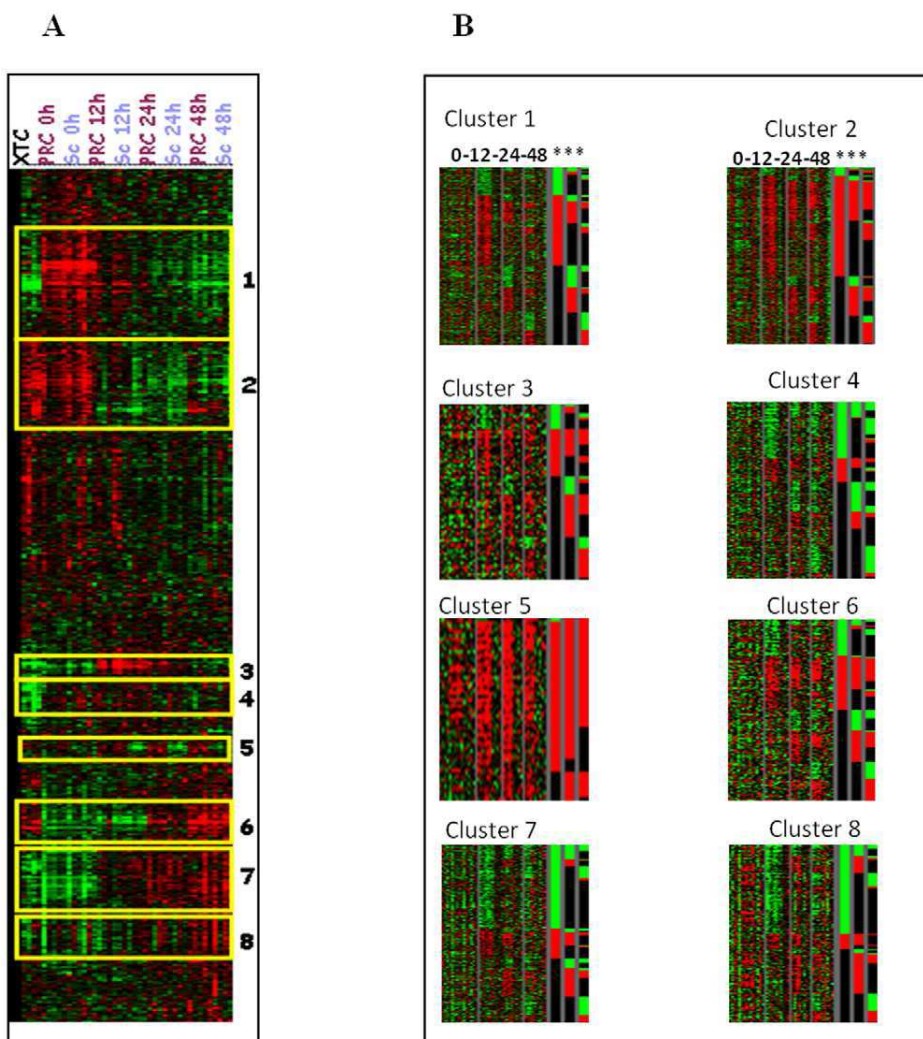


Figure 4. Microarray analysis of the XTC.UC1 cell line after transfection with either PRC SiRNA (PRC) or scramble as a negative control (Sc). The expression profiles were obtained at T12, T24 and T48 after SiRNA transfection and normalized to serum or scramble values ($N=4$ per time). The XTC sample represents the gene expression profile of the cell line before transfection. 4A: Global clustering of PRC SiRNA and negative control (scramble) samples normalized by serum induction. Eight clusters were selected on significant differential genes for all time of SiRNA treatment ($P \leq 0.03$). 4B: Significant over- and under-expressed genes in SiRNA samples compared to negative control (scramble) samples for each of the 8 clusters previously identified by serum centring. At the right side of each cluster (***) are represented the genes differentially expressed (over-expressed in red, and under-expressed in green) at T12, T24 and T48 ($P \leq 0.03$) in PRC SiRNA compared to matched negative controls for time. Grey bars separate times of treatment as T0, T12, T24, and T48. doi:10.1371/journal.pone.0007964.g004

Table 1. Description and gene ontology of the genes from the 8 clusters identified and normalized on serum induction, differentially expressed between PRC siRNA and the negative control.

Cluster Number	Total genes	Differential gene expression PRC vs Negative control ($p \leq 0.05$)		Principal Functional annotations compared to 5225 filtered cDNA probes	P -value
		Over	Under		
1	786	209	127	G-protein activating pathway	0.0013
				Protein kinase and phosphatase activity	0.0017
				Regulation of signal transduction	0.0055
				Regulation of MAPK activity	0.0068
				Regulation of angiogenesis	0.0116
2	538	260	65	Oxidative phosphorylation	0.0001
				Response to stress	0.0001
				Carboxylic acid metabolism	0.0001
				Mitochondrial respiratory chain complex assembly	0.0011
				Fatty acid metabolic process	0.0039
				Nitrogen compound metabolic process	0.0049
3	131	38	23	Mitochondrion organization and biogenesis	0.0245
				Chromatin remodelling	0.0026
				Regulation of cytoskeleton organization	0.0026
				Cell to cell signalling	0.0121
				Cell junction assembly	0.0218
4	243	21	114	Transcription coactivator activity	0.0193
				Ribosome biogenesis and assembly	0.0001
				Vesicle organization and biogenesis	0.0001
				Protein-RNA complex assembly	0.0002
				Nucleic acid metabolic process	0.0006
5	57	48	3	mRNA processing	0.0022
				Protein targeting to membrane	0.0030
				DNA methyl transferase activity	0.0074
				Spindle elongation process	0.0107
				Cell cycle process	0.0302
6	198	91	48	Regulation of S phase of mitotic cycle	0.0318
				Regulation of M phase of cell mitotic cycle	0.0001
				Microtubule cytoskeleton organization	0.0001
				Chromosome segregation	0.0002
				Regulation of cyclin-dependent protein-kinase activity	0.0016
7	386	61	123	Regulation of transcription factor activity	0.0041
				Response to DNA damage	0.0001
				Response to endogenous stimulus	0.0001
				Base excision repair process	0.0006
				Mismatch repair process	0.0006
8	267	35	69	Primary metabolism process	0.0013
				Mitochondrial ribosome assembly	0.0001
				Regulation of RNA splicing	0.0003
				SnRNA binding	0.0062
				RNA modification	0.0062
				Folding	0.0120

doi:10.1371/journal.pone.0007964.t001

cycle, respectively. Cluster 2 showed that PRC-positive regulation operated through NRF-1, NRF-2 and ERR1 interactions, whereas PRC-negative regulation acted mainly through SREBP1, CREB1

and MAZ interactions (Figure 5A). Cluster 6 showed that PRC-positive regulation depended on SP1, CREB1 and YY1 interactions whereas PRC-negative regulation depended on NRF-2 and

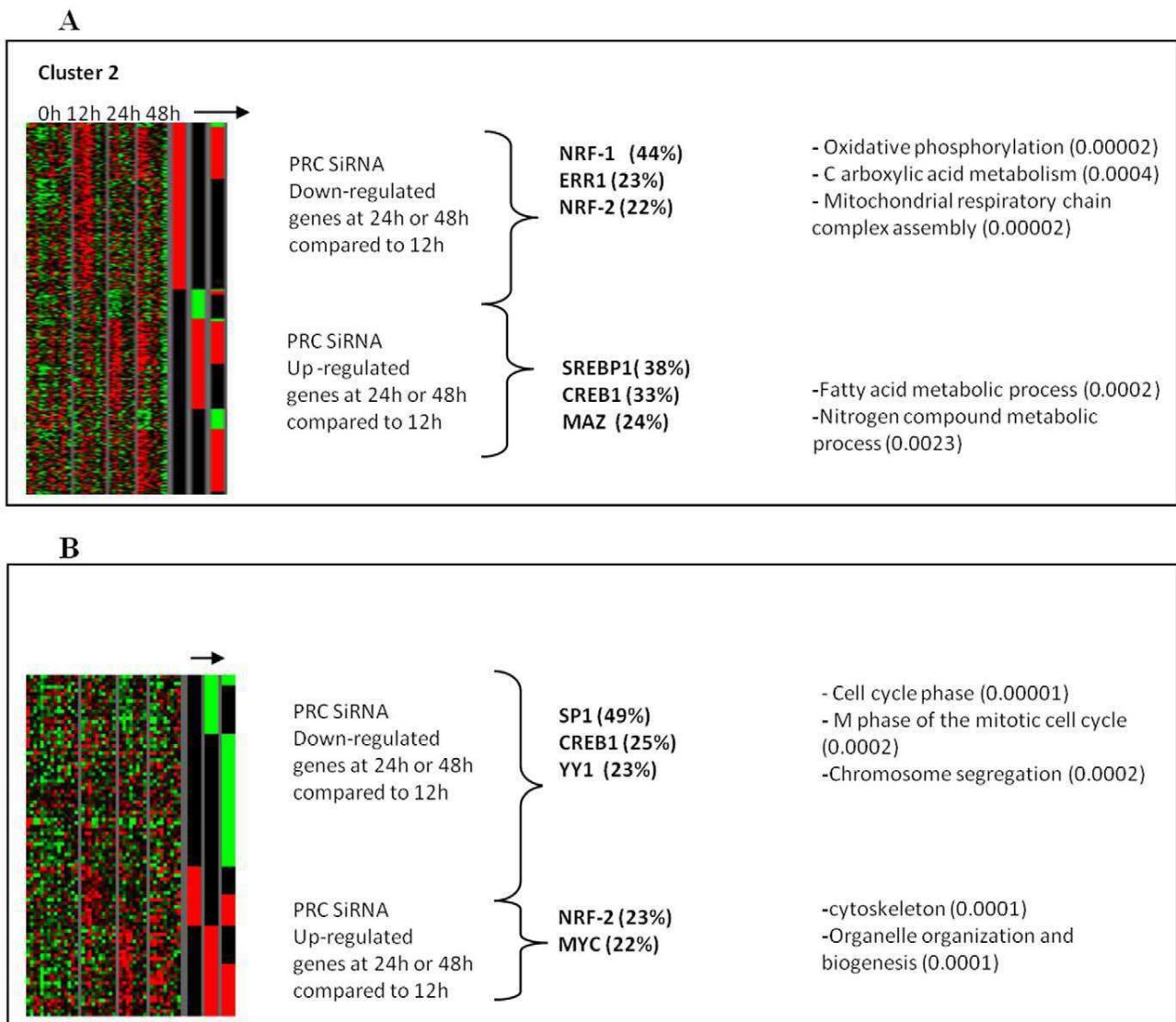


Figure 5. Focus on clusters 2 and 6 for PRC-regulated genes. 5A: PRC-sensitive under- and over-expressed genes in cluster 2. 5B: PRC-sensitive under- and over-expressed genes in cluster 6. The arrow represents the differential genes in SiRNA PRC compared to negative controls at times T12, T24 and T48. Using MSigDB software (GSEA, MIT, MI, USA), the promoters of selected genes, positively or negatively regulated by PRC, were explored for transcription factor motifs. The percentage of genes in which the motif for a selected transcription factor was found is indicated in brackets. Highly significant ontologies are shown ($P \leq 0.01$, GOMiner software [50]).
doi:10.1371/journal.pone.0007964.g005

MYC interactions (Figure 5B). The frequency of these motifs, ranging from 22–49% in the two gene clusters, was relevant of their involvement in the regulation of these genes compared to the relatively low frequency (2–15%) for the other genes of the microarray.

Oxidative Phosphorylation Is Finely Regulated by PRC

Functional analysis of the respiratory chain complexes showed that complexes I and III activities were rapidly down-regulated when PRC inhibition was effective (T24 of SiRNA treatment referred to T12). This was associated with increased complex IV activity and better coupling between respiration and ATP synthesis (Figure 6A). At T48, the activity of each of the four complexes decreased; although the coupling was more efficient compared to that at T24 (JC-1 results), the ATP level was

significantly lower at T48 than at T12. This may be related to a PRC-regulation of UCPs, as described for PGC-1 α [2].

Regarding the expression of selected genes coding for complex IV subunits, the mitochondrial-encoded gene COII was down-regulated at T24, together with a decrease in mtDNA copy number (Figure 6B). The expression of nuclear-encoded complex IV subunit genes was more variable. There was a large variation in the expression of COX15 during PRC inhibition whereas the expression of COX5B decreased proportionally to that of COII. The expression of COX15 at T24 increased by 1.8 fold compared to that at T12, followed by a sharp decrease to 8% of the control value at T48. This may be related to the great difference in complex IV activity observed between T24 and T48. Taken together, these results showed that complexes I, III and IV were primarily regulated by PRC, in particular with regard to the

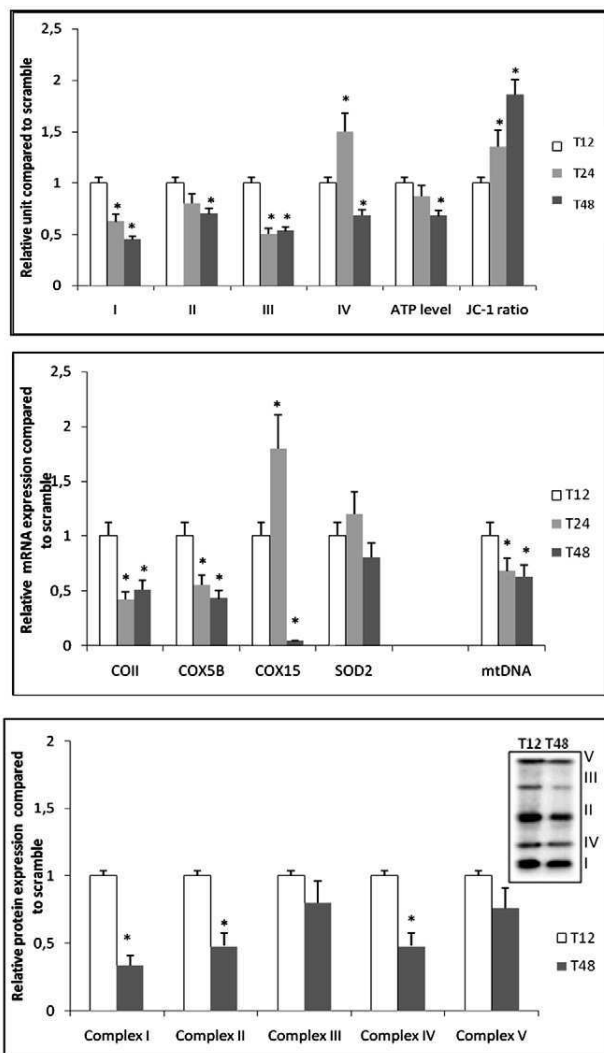


Figure 6. Functional and expression status of oxidative phosphorylation during PRC SiRNA treatment. T12 of serum induction during PRC SiRNA treatment was used as a reference to explore the efficient PRC inhibition at T24 and T48. (*N* = 5; * *P* ≤ 0.05). 6A: Enzymatic activities of four complexes of the respiratory chain (I, II, III and IV), total cell ATP and JC-1 ratios were measured on PRC SiRNA treated cells and related to control scramble cells. The JC-1 ratio represents the coupling efficiency between the respiratory chain and ATP synthesis. 6B: cDNA and mtDNA copy numbers of selected genes during PRC inhibition. The mitochondrial gene (COII) and the nuclear genes (COX5B, COX15) correspond to subunits of complex IV of the respiratory chain. Their expression, associated to mitochondrial SOD2 gene expression and mtDNA copy number were measured at T12, T24 and T48 of PRC SiRNA treatment and referred to the control scramble. 6C: Western blot analysis of subunits from each of the five complexes of OXPHOS using the MS601 antibody cocktail (Mitosciences, Eugene, OR, USA) during SiRNA treatment against PRC. Complex I (NDUFB8, 20 kDa), complex II (lp subunit, 30 kDa); complex III (Core 2:40 kDa); complex IV (COX2, 24 kDa); complex V (ATP synthase F1 α , 58 kDa), relative to α -tubulin (65 kDa). Measurements of SiRNA treatment at T12 and T48 are referred to the negative control.
doi:10.1371/journal.pone.0007964.g006

expression of COX15, which may be associated with the increased activity of the complex IV in the first 12 h of PRC inactivation. Although these changes may have caused a functional default in the respiratory chain inducing oxidative stress, the expression of

SOD2, a gene coding for a protein involved in superoxide detoxification, had not significantly decreased even at T48. However, the extension of the SiRNA treatment beyond T48 led to significantly down-regulated results (data not shown). The protein expression of several subunits from each OXPHOS complex decreased significantly at T48 for the three complexes I, II and IV, but the decrease was not significant for complexes III and V (Figure 6C). However, the gene and protein expressions of the different OXPHOS complexes were correlated so that global down-regulation was observed with PRC inhibition at T48 compared to T12.

PRC Regulates Phosphatase/Kinase Activity

A phosphospecific antibody microarray for the MAPK signalling pathway was set up to compare the phosphorylation status of direct as well as indirect MAPK targets so as to determine whether PRC was required for the phosphorylation of MAPK targets. This antibody array included 93 highly specific and well-characterized phosphospecific antibodies for proteins in the MAPK pathway, each with six replicates (the raw data are shown in Table S1). The paired antibodies for the same, but unphosphorylated, target sites were also included in the array to allow determination of the relative level of phosphorylation. Using a cutoff ratio of 0.8, we identified 11 sites that were hypophosphorylated in PRC SiRNA cells at T48 compared with control cells. These sites were involved in the regulation of the activity of seven proteins: ASK1 (P83 and P966), TP53 (P18 and P46), ATF-2 (P69-51), c-JUN (P63) SAP/JNK (P183), ELK1 (P383 and P389), ESR1 (P167) and Stahmin-1 (P15). Except for Stahmin-1, all these proteins are involved in the redox-sensitive pathway controlled by the activation of Ask1 protein by phosphorylation. A significant decrease in the phosphorylation status of Ask1(Ser83) and Elk1(Ser383) was confirmed by western blot analysis on five independent PRC SiRNA treated cells compared to controls; the decrease was 32% for Ask1 and 58% for Elk1 (*p* < 0.05) (Figure S1B).

Discussion

PRC, a member of the family of PGC1 transcriptional coactivators, is expressed more abundantly in proliferative cells than in growth-arrested cells. Several studies have demonstrated the important role played by these coactivators in modulating tissue energetic resources [22]. In the mitochondrial-rich tumour model we investigated, PGC-1 α expression remained very low, being induced neither by serum nor in compensation to PRC repression.

As reported by other authors [3,6], we showed that the nuclear and mitochondrial genes of the respiratory chain were up-regulated in accordance with PRC induction in a time-dependent manner. We also observed an induction of SOD2 expression that had been previously shown to be regulated by PGC-1 α [23]. However, the rapid action of the PKG inhibitor on both PRC expression and the nuclear genes controlling respiratory chain biosynthesis indicated that, in the XTC.UC1 cell model, mitochondrial biogenesis required the induction of the NO/PRC pathway. The increase in PRC expression observed with combined PRC inactivation and SNAP treatment may be explained by the role of PRC in the rapid response to change in the status of the cell cycle [7]. An activating process by phosphorylation, as described for PGC-1 α , has not so far been reported for PRC. We observed that an activating process by nitration could rapidly modulate PRC expression. This mechanism has also been implicated in the regulation of several transcription factors, such as CREB, c-Myc, Jun or Fos [24,25].

In XTC.UC1 cells, as well as in mitochondrial-rich tumours, we previously reported that the high cellular level of NO was related to the induction of eNOS synthesis in follicular thyroid cells [26]. The activation of eNOS by the PI3K-AKT pathway has been recently implicated in tumour maintenance [27]. This finding may be particularly relevant in the context of mitochondrial-rich tumours characterized by the absence of mutations usually described in thyroid tumours of follicular origin [28]. In contrast, BCPAP cells were unable to activate the PRC pathway, even when NO increased through SNAP treatment. Independently of the mitochondrial quantity and the specific growth media, there was a great difference in the mitochondrial expression profile and functions: while XTC.UC1 cells displayed an oxidative metabolism, BCPAP cells were mainly engaged in a glycolytic process [19]. This suggested that defects of the mitochondrial function in BCPAP cells may have induced a retrograde pathway modifying the status of cell phosphorylation [29]. Thus, the action of PRC in controlling the redox status should be taken into account in relation to cell transformation and cancer.

Our microarray data on PRC inhibition may be compared with the results of a recent study using a PRC ShRNA approach [3]. The use of SiRNA and ShRNA allowed us to distinguish between the different temporal roles played by PRC, with SiRNA revealing the short term effects and ShRNA indicating the chronic action of PRC inhibition. However in both studies, a 50% decrease of PRC mRNA was sufficient to demonstrate the specific regulatory functions of this coactivator with complete inhibition of its protein expression. The effects on the OXPHOS process were severe probably because of the lack of functional compensation by other members of this family of coactivators, as suspected following studies on PGC-1 α and PGC-1 β null mice [30,31]. Contrary to reports on ShRNA PRC knockdown [3], we identified a decrease in mtDNA content that may be primarily related to the decrease in OXPHOS activity. We postulate that long term PRC inhibition by ShRNA could induce compensatory mechanisms to maintain mitochondrial functions used for other cellular metabolisms. Using SiRNA, we have defined the positive as well as the negative regulations mediated by PRC through specific transcription factors. These may represent the direct and indirect transcriptional effects of the PRC coactivator. Thus, the PRC factor should be seen as a physiological integrator of energetic metabolism in other biological processes.

Focusing on clusters ontology, we showed that negative PRC regulation could be exerted on the biogenesis of the cytoskeleton and organelles. This should be compared with the surprising regulation of mitochondrial complex IV activity during SiRNA treatment. While complex IV activity has been previously related to PRC expression [3], the time-related regulation we report has never been described so far. Indeed, the analysis of the expression of some mitochondrial and nuclear-encoded genes of complex IV showed that COX15 expression varied in a manner opposite to that of other genes. This differential expression identified on microarray data was confirmed by real-time quantitative PRC analysis. The role of COX15 in the assembly of human complex IV has recently been emphasized [32]. COX15 was also found to be an essential component of the catalytic centre of the complex. This PRC regulation seems to be independent of a direct NO effect on the haem-copper of complex IV as there is a correlation between the activity of this complex and the expression of COX15 mRNA. We postulate that PRC ensures a rapid adaptation to the cellular environment through the regulation of a few target genes such as COX15. It separately regulates the expression of OXPHOS subunits, leading to a rapid modulation of mitochondrial functionality by integrating the regulation of complex IV activity with coupling efficiency and ROS detoxification processes.

We associated PRC functions with some PGC-1 α regulated functions, such as chromatin remodelling, RNA splicing, translation and angiogenesis [33,34]. Regulation of the cell cycle by PRC could be compared to the regulation of PGC-1 α and PGC-1 β by nutritional and hormonal signals as well as by circadian pacemakers [35]. It has recently been described that the ubiquitous PRC member could support the basal energetic cellular needs when cycling progression from the G1 phase [3,6,36]. The rapid regulation of complexes I and III, as well as the specific modulation of complex IV activity we observed, confirmed the key role of PRC for the rapid adaptation of cellular energy demand. The effects of PRC on the M-phase of the cell cycle have not been described so far. We suggest that PRC coordinates cell-cycle phases with mitochondrial metabolism through both positive and negative interactions with CREB1 and NRF-2 transcription factors. Previous studies have clearly associated CREB1 and NRF2 with the regulation of genes involved in energetic metabolism as well as the cell cycle [37,38]. Even though these results are supported by the frequency of representation for motifs associated with these transcription factors in specific clusters, they need to be confirmed by results obtained with the chromatin-immunoprecipitation technique.

Some pathways, such as those of the phosphatase/kinase activities and vesicle organization, also seem to be specifically related to PRC [3]. Interestingly, the MAPK profile of PRC-inhibited cells showed a significant decline in the phosphorylation level of proteins involved in the ASK1 signalling pathway. ASK1, a serine/threonine protein kinase, is activated by the exposure of cells to various stimuli, including tumour necrosis factor- α , Fas ligand and hydrogen peroxide [39]. It lies upstream of a major redox-sensitive pathway leading not only to the induction of apoptosis but also to cell proliferation and differentiation [40]. The majority of proteins involved in the control of the cell cycle have been shown to be redox-sensitive with functions in the G1 and G2/M phases [41]. Since the G2/M phase is in a more reduced state than the G1 phase, oxidant-sensitive proteins may be temporally regulated by the oscillation of the intracellular redox environment [42]. We postulate that PRC may represent the redox sensor enabling the initiation of the retrograde signalling pathway, especially in a cellular model presenting a balance between the production of nitric oxide and superoxide. Interestingly, eNOS activity has also been shown to be redox-sensitive [43]. Further studies will be needed to clarify the temporal role of PRC in the integrative regulation of cell metabolism.

In conclusion, we have identified several new pathways regulated by the PRC coactivator. Focusing on OXPHOS, we showed that the PRC-regulation of this process differed from that of PGC-1 α . The nuclear OXPHOS genes were tightly controlled by PGC-1 α but less so by PRC. Nevertheless, other genes such as COX15 were found to be more specifically regulated by PRC than by PGC-1 α . This precision control of mitochondrial energy metabolism should be placed in the context of the complex regulation of the cell cycle. Our study showed that the eNOS/PRC signalling pathway can modulate the cell cycle by regulating the intracellular redox status. The action of PRC, complementary to that of other PGC-1 factors, should therefore be further explored, especially in the case of metabolic diseases.

Materials and Methods

Cell Lines and SNAP Treatment

Two human thyroid cell lines, XTC.UC1 and B-CPAP, were used. The XTC.UC1 cell line was established from an oncocytic cell thyroid carcinoma. The growth medium consisted of Dulbecco's

modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% foetal calf serum (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Germany), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL fungizone, and 10 mU/mL thyrotropin (TSH) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The B-CPAP cell line was established from a human papillary thyroid carcinoma cultured in RPMI-1640 medium with 10% foetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, 0.25 mg/mL fungizone. Except for the TSH and the foetal calf serum, all the products were obtained from Gibco BRL (Life Technologies, Paisley, United Kingdom).

The two cell lines were treated once a day for four days with the nitric oxide donor SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine, EMD, San Diego, CA, USA) at a final concentration of either 50 or 100 μM in the selected medium. Except for the microarray analysis, which was performed in quadruplicate (N=4), all the assays were performed in quintuplicate (N=5). To control the mediating effect of NO/cGMP on PRC expression, cells were pre-treated with 1 μM of the protein kinase G inhibitor KT5823 (EMD, San Diego, CA, USA) 30 minutes before SNAP treatment (100 μM) during 24 h.

Flow Cytometry Analysis

XTC.UC1 cells were exposed at 37°C for 20 minutes to 5 μg/mL JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazol-carbocyanine) or for 30 minutes at pH 7 to 10 μM DAF-2/DA (4,5-diaminofluorescein diacetate) before trypsin treatment. The two dyes were purchased from EMD, San Diego, CA, USA.

The cells were then harvested, washed twice with PBS, and analyzed on a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Cultured cells, untreated with dyes, were used as a negative control to determine the FACS gating. JC-1 emits red fluorescence (aggregates) when sequestered in the mitochondrial membrane of healthy cells and emits green fluorescence (monomers) when released into the cytoplasmic compartment of the cell. At the depolarized membrane potential (-100 mV), the JC-1 green monomer emission peaks at about 527 nm. At the hyperpolarized membrane potential (-140 mV) the red emission of the JC-1 aggregates shifts towards 590 nm. The red/green ratio represents the modification of mitochondrial functionality during treatment. DAF-2/DA is a cell-permeable derivative of DAF-2 presenting an emission peak at about 515 nm, and which reacts neither with stable oxidized forms of NO, such as NO₂⁻ and NO₃⁻, nor with other reactive oxygen species, such as O₂⁻, H₂O₂, and ONOO⁻ [44].

Quantitative PCR Analysis

MtDNA and cDNA quantifications were performed on a Chromo4 apparatus (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using SYBR Green I dye as a fluorescent signal (iQ sybrGreen supermix, Bio-Rad), according to the manufacturer's recommendations. For mtDNA quantification, primers were located at the following nucleotide positions: forward, 3254–3277 (in the ND1 gene), and reverse, 3412–3391 (in the tRNA^{Leu} gene). The mtDNA copy number was expressed in terms of the copy number of a 110-bp fragment of the β-globin gene. For cDNA quantification, the expression of 16 selected genes (14 nuclear genes: PRC, PGC-1α, NRF-1, COX5B, COX15, TFAM, SOD2, ALDH6A1, OSGIN2, PRKAA2, CDCA3, CDC14B, CDC25C and β-GLOBIN and two mitochondrial genes, COII and ND5) was measured by real-time quantitative RT-PCR using the protocol previously described [45] and the primers listed in Table 2.

Respiratory Chain Complex Activities and Cellular ATP

Respiratory chain complex activities were measured in cell lysates, thermostatically maintained at 37°C, using a Beckman

Table 2. Primer sequences used for real-time quantitative RT-PCR.

ALDH6A1	Forward	5'- CCA-GTC-CCA-CCT-GGT-ATT-CA-3'
	Reverse	5'- CCC-GAC-CAA-TGA-CCT-CAT-TG-3'
CDCA3	Forward	5'- GTG-GAG-AGC-TCT-CCA-CAG-CC-3'
	Reverse	5'- CCC-TTG-AGG-GCT-TGT-CGG-AG-3'
CDC14B	Forward	5'- CCG-CTG-AAC-TTG-GCA-ATG-GG-3'
	Reverse	5'- GCT-GCA-ATT-TGC-TCT-TTT-TCC-G-3'
CDC25C	Forward	5'- GTC-ACC-TGG-ATT-CTT-CAG-GA-3'
	Reverse	5'- GCA-GAT-GAA-CTA-CAC-ATT-GC-3'
COII	Forward	5'- AAC-AAA-CGA-CCT-AAA-ACC-TG - 3'
	Reverse	5'- GTG-AAC-TAC-GAC-TGC-TAG-AA - 3'
COX5B	Forward	5'- CCA-AAG-GCA-GCT-TCA-GGC-AC - 3'
	Reverse	5'- CAA-GGA-AGA-CCC-TAA-TCT-AG - 3'
COX15	Forward	5'- CCT-CTC-GAT-GGT-AGA-TTG-GC - 3'
	Reverse	5'- CGG-AGG-GAG-TGC-AGT-GAC-AG - 3'
ND5	Forward	5'- GGG-GAT-TGT-GCG-GTG-TGT-G - 3'
	Reverse	5'- CTT-CTC-CTA-TTT-ATG-GGG-GT - 3'
NRF-1	Forward	5'- GGA-GTG-ATG-TCC-GCA-CAG-AA - 3'
	Reverse	5'- CGC-TGT-TAA-GCG-CCA-TAG-TG -3'
OSGIN2	Forward	5'- GAA-ATG-GAC-CCT-CAG-GAA-TA-3'
	Reverse	5'- GGA-CCT-TTA-CCA-AGA-ACT-AC-3'
PGC-1	Forward	5'- ACT-CAA-GTG-GTG-CAG-TGA-CC - 3'
	Reverse	5'- CTG-GGT-ACT-GAG-ACC-ACT-GC - 3'
PRC	Forward	5'- GAT-CAG-AGC-AGC-GCT-GGG - 3'
	Reverse	5'- CAC-TAG-CAG-CTC-TCT-CCC-C - 3'
PRKAA2	Forward	5'- GGA-GAA-CAT-CAA-TTA-ACA-GG-3'
	Reverse	5'- CTG-CTG-AAA-GAG-CCG-CCT-GG-3'
SOD2	Forward	5'- GCT-GCA-CCA-CAG-CAA-GCA-CC - 3'
	Reverse	5'- CCA-GCA-ACT-CCC-CTT-TGG-GT - 3'
TFAM	Forward	5'- CCG-AGG-TGG-TTT-TCA-TCT-GT- 3'
	Reverse	5'- CAG-GAA-GTT-CCC-TCC-AAC-GC-3'
β-GLOBIN	Forward	5'- GGT-GAA-CGT-GGA-TGA-AGT-TG - 3'
	Reverse	5'- GAG-CCA-GGC-CAT-CAC-TAA-AG - 3'

doi:10.1371/journal.pone.0007964.t002

spectrophotometer (DU800, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Cells were resuspended in a cell buffer containing 250 mM saccharose, 20 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA, pH 7.2 (50 μl/10⁶ 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. Complex I activity was immediately assayed on cell lysate (0.5×10⁶ cells) in a KH₂PO₄ buffer (100 mM, pH 7.4), containing 1 mM KCN, 2 mM NaN₃, 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 μM) was then added to determine the background rate. Complex II (succinate ubiquinone reductase) activity was measured as described elsewhere [46], except that the background rate was measured by the addition of thenoyltrifluoroacetone (200 μM). Complex III (after a freeze-thaw cycle), complex IV and citrate synthase (CS) activities were assayed as described previously [47].

Twenty μl of CellTiter-Glo reagent (Promega, Madison, CA, USA) were added to 3.10^5 cells, growing in $200 \mu\text{l}$ of culture medium, to measure the cellular ATP level. An ATP curve was prepared as recommended by the manufacturers. Plates were agitated for 2 min and incubated for 10 min at room temperature before measuring the luminescence (Lumat 9507, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). The ATP level was expressed as ng per mg of total cell protein measured by the BCA method (Pierce, Rockford, IL, USA).

PRC siRNA

To knock down PRC expression in the XTC.UC1 cells, three pre-designed PRC siRNAs (from Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) were tested in comparison to a random negative control siRNA (scramble, #4635). The PRC siRNA (#121729) was chosen for at least 70% of PRC mRNA expression knockdown. For the study, 30 nM of this PRC siRNA were transfected in the XTC.UC1 cells using siPORT NeoFX (Applied Biosystems) as recommended by the manufacturer. To synchronize the cell cycle for SNAP and/or PRC siRNA treatments, the cells were serum-starved for two days before adding siRNA during a 48 h period. After 6 h, 24 h and 48 h serum induction, XTC.UC1 cells were harvested for RNA or phospho-protein isolation. To synchronize the cell cycle for genome-wide expression analysis, the cells were serum-starved during 7 h before replacing the medium with 20% SVF medium for 48 h. After 12 h, 24 h and 48 h serum induction corresponding to 19 h, 31 h and 55 h siRNA treatment, XTC.UC1 cells were harvested for protein, DNA and RNA isolation. We refer to the times of 20% serum induction (T0, T12, T24 and T48) instead of the times of siRNA treatment (T7, T19, T31 and T55) in the figures and the text.

The PRC expression level, analyzed by quantitative RT-PCR, normalized by β -globin expression, was considered relevant when PRC mRNA inhibition reached 70% of that of the negative control (scramble) with a significant effect on COX5B, the PRC-regulated gene.

Microarray Analysis

cDNA microarray slides were prepared at the Transcriptome Core Facility of the University of Nantes (INSERM U915, France), using a set of 20,000 oligonucleotides with full functional characterization and content referencing (Ocimum Biosolutions, Hyderabad, India). RNA amplification, cDNA labelling and hybridization from XTC.UC1 cells were performed using the protocols recommended by the Transcriptome Core Facility (<http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/>). Slides were analyzed with Axon GenePix 4.0 software (Axon, Union City, CA, USA) after scanning on a ScanArray Express II scanner (Packard Bioscience, Billerica, MA, USA). Data are available in the GEO database (GSE 14282) and are confirmed to be MIAME compliant for raw and normalized data as well as for protocols used. The hierarchical clustering of the genes was computed on median-gene-centred and log-transformed data using average linkage and uncentred correlation distances. Computations and visualization were performed using Cluster and TreeView programs [48]. EASE and Gene Set analyses were used to determine the statistical likelihood that *a priori* families of genes were over-represented and differentially expressed [49]. Differentially expressed genes were defined as those well detected in both groups and with absolute PLS (partial least-squares) loadings >3.0 and t-test values of $P < 0.0002$ (FDR = 0.001). In addition, genes with an absolute value of mean expression differences $<40\%$ were excluded from further analyses. Gene ontology enrichments in gene lists were searched for using GOMiner [50]. The most

abundant gene ontology terms, representing at least 5% of the genes in the lists, with P-values lower than 0.05, were considered for interpretation.

The over-representation of transcription-factor binding sites (TFBS) in promoter sequences was investigated with MSignDB software (GSEA, MIT, MI, USA). We added two more position-weight matrices to this collection: for the NRF1 transcriptional factor, we aligned 9 sequences of known NRF-1 binding sites [51]; for the oestrogen-related receptor alpha (ERR1), the position-weight matrix used was that described by Sladek *et al.* [52]. The percentage of representation of a given transcription factor was compared to its representation in the rest of the microarray.

Western Blot Analysis

Cells were mixed with a buffer containing 10 mmol/L HEPES (pH 7.9), 1.5 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L KCl, 0.5% NP-40 and a protease inhibitor cocktail, and then centrifuged at 13,000 g for 5 min. Supernatants were collected and the protein concentration was determined by the BCA method (Pierce, Rockford, IL, USA). Samples containing 30 μg total protein were applied to 12% SDS-PAGE gel electrophoresis and hybridized with a cocktail of five antibodies against human nuclear-encoded subunits of the OXPHOS process: Complex I (NDUFB8, 20 kDa), complex II (Ip subunit, 30 kDa); complex III (Core2, 40 kDa); complex IV (COX2, 24 kDa); complex V (ATP synthase F1 α , 58 kDa), at a dilution of 1/500 (MS 601, MitoSciences, Eugene, OR, USA). The level of nitration-modified protein was measured using a high-activity rabbit polyclonal anti-nitrotyrosine antibody at a dilution of 1/250 (US Biological, Swampscott, MA, USA). The PRC protein level was measured using a rabbit polyclonal antibody at the dilution of 1/5000. This antibody was produced against a human peptide (1520–1534) we had previously selected (Eurogentec, Seraing, Belgium). The antibody revealed a unique 170 kDa band on immunoblots. Ask1 and Elk1 phosphorylation status was evaluated using at the dilution of 1/500, anti-Ask1(Phospho-Ser83) and Elk1(Phospho-Ser383) antibodies and anti-unphosphorylated Ask1 and Elk1 antibodies (all from Abcam, Cambridge, UK).

After overnight incubation with primary antibodies, membranes were washed before incubation with the corresponding horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody, which was detected with a chemiluminescent detection system (ECL Plus, Amersham Biosciences, Fairfield, CT, USA).

Phospho-Specific Protein Microarray Analysis

The phospho-specific protein microarray was obtained from Full Moon Biosystems (Sunnyvale, CA, USA). Protein microarray analysis was carried out using the protocol provided by the manufacturer. Briefly, 100 μg of cell lysate in 50 μl of reaction mixture were labelled with 1.43 μl biotin in 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ N,N-dimethylformamide. The resulting biotin-labelled proteins were diluted 1:20 in a coupling solution before being applied to the array for conjugation. To prepare the antibody microarray, it was first blocked with a blocking solution for 30 min at room temperature, rinsed with Milli-Q grade water for three minutes, and then dried by centrifugation. Finally, the array was incubated with the biotin-labelled cell lysates at room temperature during four hours. After the array slide was washed thrice with 50 ml of 1x wash solution for 10 min each, the conjugated-labelled protein was detected using Cy3-streptavidin.

Data Analysis

Except for the microarray analyses, data are represented as mean values \pm SEM, with N representing the number of experiments. Statistical analyses were performed by a one-way analysis of

variance, the Mann-Whitney *U* test, and Tukey's HSD test. Differences were considered to be statistically significant at $P \leq 0.05$. The Pearson chi-squared test was used to compare quantitative RT-PCR to microarray results.

Supporting Information

Figure S1 Western blot analysis and differential gene expression data during SiRNA treatment against PRC in XTC.UC1 cell line ($N = 5$, $*P \leq 0.05$). S1A: Western blot analysis of PRC expression at T24 and T48 of SiRNA treatment compared to control (β -Tubulin). PRC antibody is raised to the (1520–1534) subregion of the molecule and reveals a unique band near to 170 kDa on immunoblots. S1B: Analysis of phosphorylation status for Ask1 (Phospho-Ser83) and Elk1 (Phospho-Ser383) after 48 h of PRC SiRNA treatment compared to control. For each protein, two antibodies are used raised to phosphorylated and unphosphorylated subregions revealing 155kDa (Ask1) and 46 kDa (Elk1) bands on immunoblots. S1C: Comparison of differential gene expression data obtained by microarrays and real-time RT-PCR after 48 h PRC SiRNA treatment. The upper and lower limits of each box stand for the upper and the lower quartiles, respectively; bold lines represent medians; whiskers represent extreme measurements. Regulation of genes from cluster 2 (TFAM, COX5B, COX15), cluster 5

(LDH6A1, OSGIN2, PPKAA2) and cluster 6 (CDCA3, CDC14B, CDC25C) were confirmed on 5 independent SiRNA experiments. Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007964.s001 (5.52 MB TIF)

Table S1 Phospho-specific Antibody Array analysis of PRC SiRNA XTC.UC1 cells and control. Cell lysates were labeled with Biotin and incubated with antibody array, separately. Arrays were washed and labeled proteins were detected by Cy3-streptavidin. Signal represents the average signal intensity of six replicates. CV: coefficient of variation.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007964.s002 (0.23 MB DOC)

Acknowledgments

We thank Dominique Couturier and Naïg Gueguen for technical help. We thank Marja Steenman and Kanaya Malkani for the critical reading of this paper.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RH FS. Performed the experiments: MR SLP JP DMP CR. Analyzed the data: MR SLP JP DMP CJ JFF FS. Contributed reagents/materials/analysis tools: YM RH FS. Wrote the paper: FS.

References

- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, et al. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92: 829–839.
- Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, et al. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* 98: 115–124.
- Vercauteren K, Gleyzer N, Scarpulla RC (2009) Short Hairpin RNA-mediated Silencing of PRC (PGC-1-related Coactivator) Results in a Severe Respiratory Chain Deficiency Associated with the Proliferation of Aberrant Mitochondria. *J Biol Chem* 284: 2307–2319.
- Andersson U, Scarpulla RC (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21: 3738–3749.
- Gleyzer N, Vercauteren K, Scarpulla RC (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* 25: 1354–1366.
- Vercauteren K, Gleyzer N, Scarpulla RC (2008) PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *J Biol Chem* 283: 12102–12111.
- Vercauteren K, Pasko RA, Gleyzer N, Marino VM, Scarpulla RC (2006) PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol Cell Biol* 26: 7409–7419.
- Biswas G, Adebajo OA, Freedman BD, Anandatheerthavarada HK, Vijayarathy C, et al. (1999) Retrograde Ca²⁺ signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J* 18: 522–533.
- Butow RA, Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol Cell* 14: 1–15.
- Wu H, Kanatous SB, Thurmond FA, Gallardo T, Isotani E, et al. (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science* 296: 349–352.
- Brookes PS, Shiva S, Patel RP, Darley-Usmar VM (2002) Measurement of mitochondrial respiratory thresholds and the control of respiration by nitric oxide. *Methods Enzymol* 359: 305–319.
- Nisoli E, Clementi E, Paolucci C, Cozzi V, Tonello C, et al. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science* 299: 896–899.
- Liaudet L, Soriano FG, Szabo C (2000) Biology of nitric oxide signaling. *Crit Care Med* 28: N37–N52.
- Nisoli E, Carruba MO (2006) Nitric oxide and mitochondrial biogenesis. *J Cell Sci* 119: 2855–2862.
- Savagner F, Mirebeau D, Jacques C, Guyetant S, Morgan C, et al. (2003) PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma. *Biochem Biophys Res Commun* 310: 779–784.
- Savagner F, Franc B, Guyetant S, Rodien P, Reynier P, et al. (2001) Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4920–4925.
- Savagner F, Chevrollier A, Loiseau D, Morgan C, Reynier P, et al. (2001) Mitochondrial activity in XTC.UC1 cells derived from thyroid oncocyoma. *Thyroid* 11: 327–333.
- Patel A, Fenton C, Terrell R, Powers PA, Dinauer C, et al. (2002) Nitrotyrosine, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) are increased in thyroid tumors from children and adolescents. *J Endocrinol Invest* 25: 675–683.
- Baris O, Savagner F, Nasser V, Loriod B, Granjeaud S, et al. (2004) Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genes in thyroid oncocytic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 994–1005.
- Poderoso JJ, Peralta JG, Lisdero CL, Carreras MC, Radisic M, et al. (1998) Nitric oxide regulates oxygen uptake and hydrogen peroxide release by the isolated beating rat heart. *Am J Physiol* 274: C112–C119.
- Wardman P (2007) Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: progress, pitfalls, and prospects. *Free Radic Biol Med* 43: 995–1022.
- Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev* 88: 611–638.
- Borniquel S, Valle I, Cadenas S, Lamas S, Monsalve M (2006) Nitric oxide regulates mitochondrial oxidative stress protection via the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *FASEB J* 20: 1889–1891.
- Contestabile A (2008) Regulation of transcription factors by nitric oxide in neurons and in neural-derived tumor cells. *Prog Neurobiol* 84: 317–328.
- Carreras MC, Poderoso JJ (2007) Mitochondrial nitric oxide in the signaling of cell integrated responses. *Am J Physiol Cell Physiol* 292: C1569–C1580.
- Baris O, Mirebeau-Prunier D, Savagner F, Rodien P, Ballester B, et al. (2005) Gene profiling reveals specific oncogenic mechanisms and signaling pathways in oncocytic and papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 24: 4155–4161.
- Lim KH, Ancrile BB, Kashatus DF, Counter CM (2008) Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature* 452: 646–649.
- Nikiforova MN, Lynch RA, Biddinger PW, Alexander EK, Dorn GW, et al. (2003) RAS point mutations and PAX8-PPAR gamma rearrangement in thyroid tumors: evidence for distinct molecular pathways in thyroid follicular carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2318–2326.
- Scarpulla RC (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 97: 673–683.
- Lin J, Wu PH, Tarr PT, Lindenberg KS, St-Pierre J, et al. (2004) Defects in adaptive energy metabolism with CNS-linked hyperactivity in PGC-1alpha null mice. *Cell* 119: 121–135.
- Lelliott CJ, Medina-Gomez G, Petrovic N, Kis A, Feldmann HM, et al. (2006) Ablation of PGC-1beta results in defective mitochondrial activity, thermogenesis, hepatic function, and cardiac performance. *PLoS Biol* 4: e369.
- Fernandez-Vizcarra E, Tiranti V, Zeviani M (2009) Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim Biophys Acta* 1793: 200–211.
- Arany C, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, et al. (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. *Nature* 451: 1008–1012.

34. Lin JD (2009) Minireview: the PGC-1 coactivator networks: chromatin-remodeling and mitochondrial energy metabolism. *Mol Endocrinol* 23: 2–10.
35. Cam H, Balciunaitė E, Blais A, Spektor A, Scarpulla RC, et al. (2004) A common set of gene regulatory networks links metabolism and growth inhibition. *Mol Cell* 16: 399–411.
36. Schieke SM, McCoy JP Jr, Finkel T (2008) Coordination of mitochondrial bioenergetics with G1 phase cell cycle progression. *Cell Cycle* 7: 1782–1787.
37. Barlow CA, Shukla A, Mossman BT, Lounsbury KM (2006) Oxidant-mediated cAMP response element binding protein activation: calcium regulation and role in apoptosis of lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 7–14.
38. Crook MF, Olive M, Xue HH, Langenickel TH, Boehm M, et al. (2008) GA-binding protein regulates KIS gene expression, cell migration, and cell cycle progression. *FASEB J* 22: 225–235.
39. Chen Z, Seimiya H, Naito M, Mashima T, Kizaki A, et al. (1999) ASK1 mediates apoptotic cell death induced by genotoxic stress. *Oncogene* 18: 173–180.
40. Sayama K, Hanakawa Y, Shirakata Y, Yamasaki K, Sawada Y, et al. (2001) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem* 276: 999–1004.
41. Conour JE, Graham WV, Gaskins HR (2004) A combined in vitro/bioinformatic investigation of redox regulatory mechanisms governing cell cycle progression. *Physiol Genomics* 18: 196–205.
42. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 19: 8469–8478.
43. Tanaka T, Nakamura H, Yodoi J, Bloom ET (2005) Redox regulation of the signaling pathways leading to eNOS phosphorylation. *Free Radic Biol Med* 38: 1231–1242.
44. Kojima H, Nakatsubo N, Kikuchi K, Kawahara S, Kirino Y, et al. (1998) Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal Chem* 70: 2446–2453.
45. Fontaine JF, Mirebeau-Prunier D, Franc B, Triau S, Rodien P, et al. (2008) Microarray analysis refines classification of non-medullary thyroid tumours of uncertain malignancy. *Oncogene* 27: 2228–2236.
46. James AM, Wei YH, Pang CY, Murphy MP (1996) Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* 318 (Pt 2): 401–407.
47. Rustin P, Munnich A, Rotig A (2004) Mitochondrial respiratory chain dysfunction caused by coenzyme Q deficiency. *Methods Enzymol* 382: 81–88.
48. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 14863–14868.
49. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 5116–5121.
50. Zeeberg BR, Feng W, Wang G, Wang MD, Fojo AT, et al. (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol* 4: R28.
51. Au HC, Scheffler IE (1998) Promoter analysis of the human succinate dehydrogenase iron-protein gene—both nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 are required. *Eur J Biochem* 251: 164–174.
52. Sladek R, Bader JA, Giguere V (1997) The orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is a transcriptional regulator of the human medium-chain acyl coenzyme A dehydrogenase gene. *Mol Cell Biol* 17: 5400–5409.

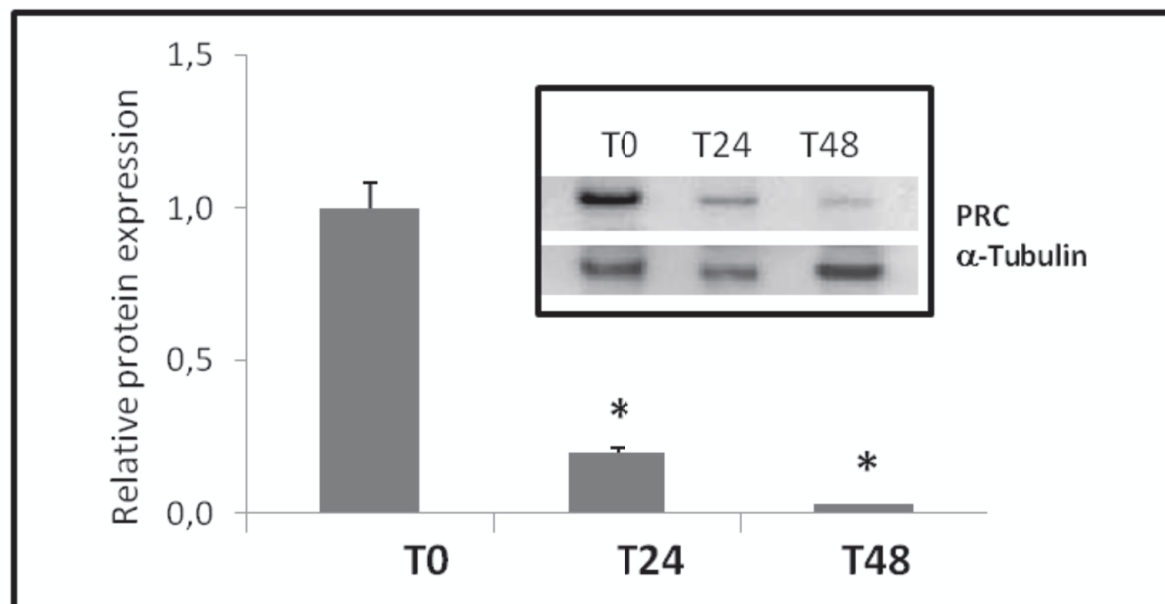
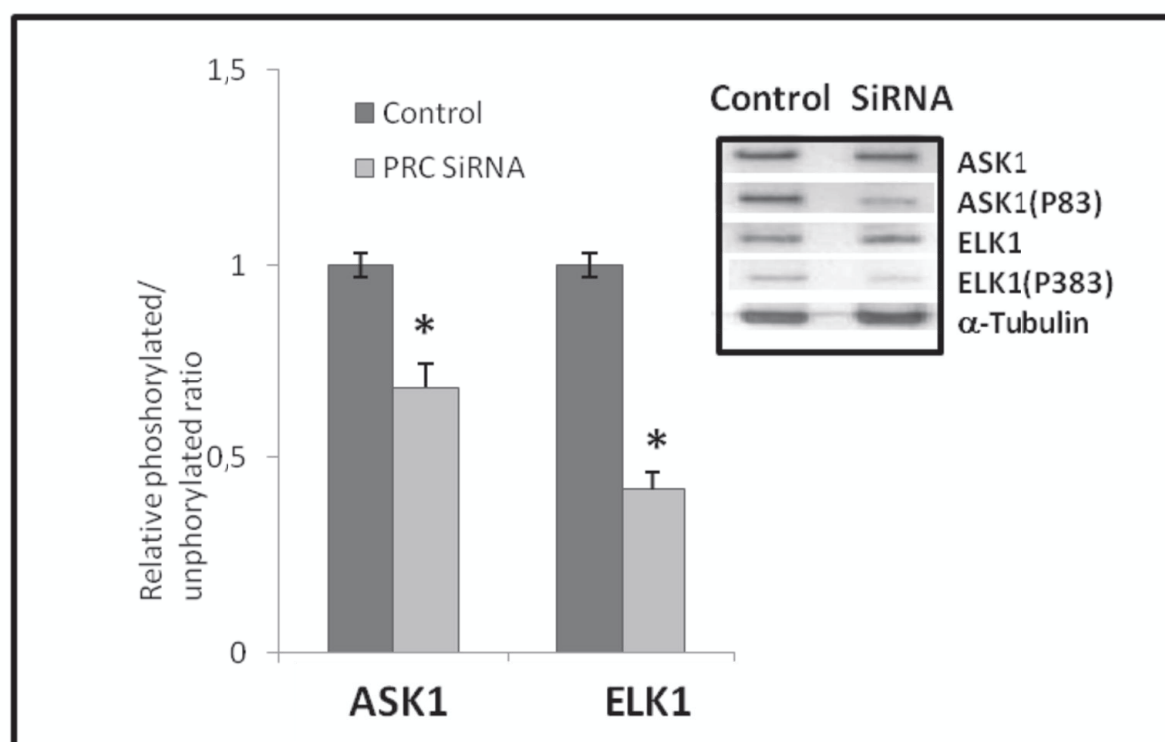
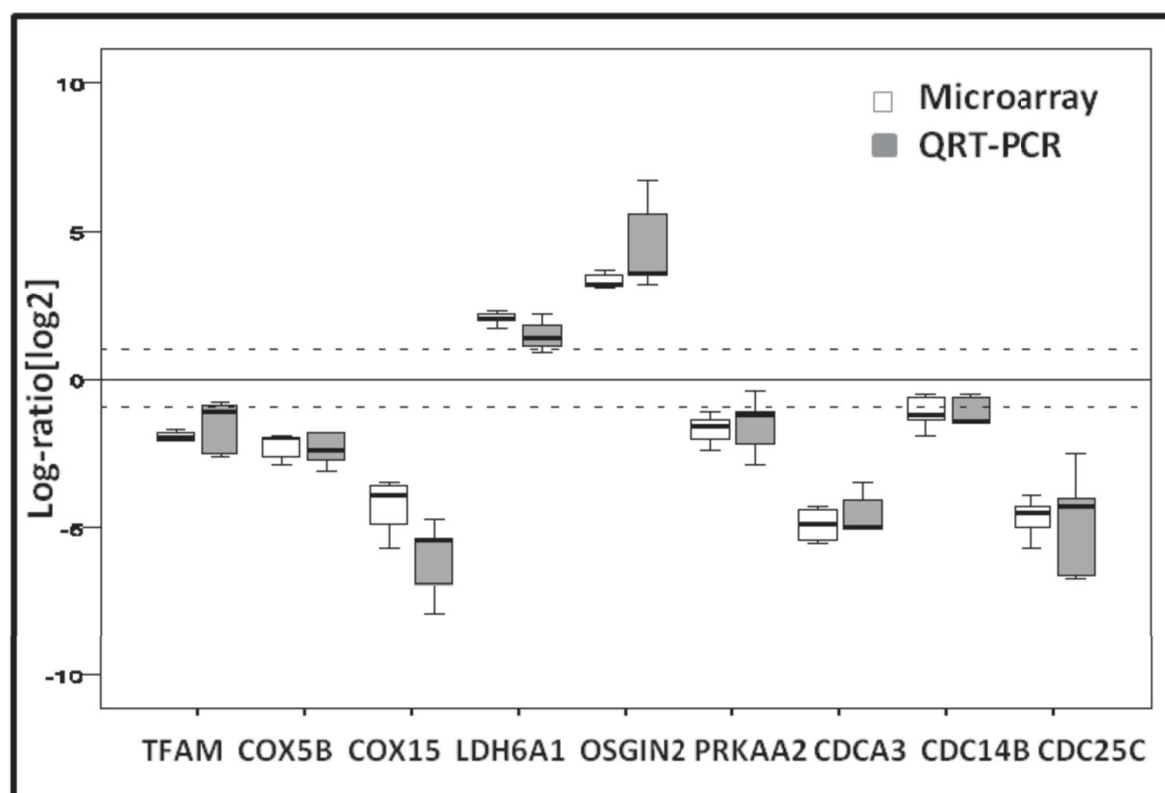
S1A**S1B****S1C**

Table S1 :

Name	control		PRC SiRNA	
	Signal	CV	Signal	CV
4E-BP1(Ab-36)	588	0.07	1155	0.04
4E-BP1(Ab-45)	860	0.04	1206	0.04
4E-BP1(Phospho-Thr36)	1501	0.05	1326	0.05
4E-BP1(Phospho-Thr45)	740	0.04	875	0.04
ASK1(Ab-83)	1270	0.05	1275	0.05
ASK1(Ab-966)	951	0.13	970	0.06
ASK1(Phospho-Ser83)	2784	0.04	1986	0.04
ASK1(Phospho-Ser966)	2912	0.03	2183	0.06
ATF2(Ab-112 or 94)	731	0.05	1415	0.05
ATF2(Ab-62 or 44)	667	0.07	1180	0.07
ATF2(Ab-69 or 51)	651	0.04	1088	0.05
ATF2(Ab-71 or 53)	902	0.06	1029	0.06
ATF2(Ab-73 or 55)	765	0.03	1228	0.03
ATF2(Phospho-Ser112 or 94)	1746	0.09	1515	0.09
ATF2(Phospho-Ser62 or 44)	1549	0.05	1473	0.05
ATF2(Phospho-Thr69 or 51)	2489	0.04	1588	0.04
ATF2(Phospho-Thr71 or 53)	917	0.04	1401	0.04
ATF2(Phospho-Thr73 or 55)	916	0.05	1316	0.05
ATF4(Ab-245)	1210	0.05	1520	0.05
ATF4(Phospho-Ser245)	1121	0.03	1284	0.03
c-Jun (Phospho-Thr239)	737	0.05	1356	0.05
c-Jun(Ab-170)	1138	0.07	1481	0.07
c-Jun(Ab-239)	995	0.03	1441	0.03
c-Jun(Ab-243)	1404	0.05	1372	0.05
c-Jun(Ab-63)	707	0.04	1430	0.04
c-Jun(Ab-73)	2564	0.03	2436	0.03
c-Jun(Ab-91)	671	0.05	1331	0.05
c-Jun(Ab-93)	1144	0.04	1592	0.04
c-Jun(Phospho-Ser243)	1773	0.02	1463	0.02
c-Jun(Phospho-Ser63)	1965	0.04	1544	0.04
c-Jun(Phospho-Ser73)	1295	0.03	1430	0.03
c-Jun(Phospho-Thr91)	844	0.03	1414	0.03
c-Jun(Phospho-Thr93)	2318	0.02	1400	0.02
c-Jun(Phospho-Tyr170)	1916	0.01	1446	0.01
c-Kit(Ab-721)	958	0.08	1076	0.08
c-Kit(Phospho-Tyr721)	1829	0.06	1656	0.06
CREB(Ab-129)	957	0.06	1143	0.06
CREB(Ab-133)	532	0.04	1357	0.05
CREB(Phospho-Ser129)	1477	0.05	1545	0.05
CREB(Phospho-Ser133)	1364	0.05	1321	0.05
eIF2 alpha (Phospho-Ser51)	1214	0.05	1429	0.05
eIF2 alpha(Ab-51)	791	0.07	937	0.01
eIF2 alpha(Phospho-Ser51)	1137	0.02	1313	0.02
eIF2((Phospho-Ser51)	1266	0.05	1317	0.05
eIF4E(Ab-209)	939	0.03	1169	0.03

eIF4E(Phospho-Ser209)	1191	0.02	1435	0.02
Elk-1(Ab-383)	877	0.02	1268	0.02
Elk1(Ab-389)	2061	0.03	1749	0.03
Elk1(Ab-417)	1134	0.01	1368	0.01
Elk-1(Phospho-Ser383)	2571	0.02	1503	0.02
Elk1(Phospho-Ser389)	2382	0.04	1605	0.04
Elk1(Phospho-Thr417)	1658	0.08	1474	0.08
Estrogen Receptor-alpha (Ab-104)	1722	0.02	1175	0.02
Estrogen Receptor-alpha (Ab-106)	4893	0.06	3429	0.06
Estrogen Receptor-alpha (Ab-118)	574	0.04	1229	0.04
Estrogen Receptor-alpha (Ab-167)	1086	0.04	1258	0.04
Estrogen Receptor-alpha (Phospho-Ser104)	1841	0.04	1342	0.04
Estrogen Receptor-alpha (Phospho-Ser106)	1513	0.02	1283	0.02
Estrogen Receptor-alpha (Phospho-Ser118)	1750	0.09	1353	0.09
Estrogen Receptor-alpha (Phospho-Ser167)	2253	0.06	1562	0.06
FAK(Ab-397)	975	0.02	1223	0.02
FAK(Ab-861)	1080	0.05	1132	0.05
FAK(Ab-925)	601	0.03	1102	0.03
FAK(Phospho-Tyr861)	1825	0.05	1487	0.05
FAK(Phospho-Tyr925)	1146	0.03	1221	0.03
GAPDH	581	0.02	1013	0.02
Histone H2A.X(Ab-139)	2386	0.02	2491	0.02
Histone H2A.X(Phospho-Ser139)	1740	0.03	1165	0.03
Histone H3.1(Ab-10)	1187	0.05	1146	0.05
Histone H3.1(Phospho-Ser10)	1930	0.04	1523	0.04
HSF1(Ab-303)	474	0.03	1084	0.03
HSF1(Phospho-Ser303)	1787	0.02	1310	0.02
HSP27(Ab-15)	638	0.05	1078	0.05
HSP27(Ab-78)	561	0.06	985	0.06
HSP27(Ab-82)	1382	0.06	1127	0.06
HSP27(Phospho-Ser15)	1681	0.03	1507	0.03
HSP27(Phospho-Ser78)	1926	0.01	1738	0.01
HSP27(Phospho-Ser82)	1885	0.04	1619	0.04
IRS-1(Ab-307)	613	0.03	1050	0.03
IRS-1(Ab-312)	443	0.06	1231	0.06
IRS-1(Ab-636)	595	0.05	1141	0.05
IRS-1(Ab-639)	4454	0.08	2387	0.08
IRS-1(Phospho-Ser307)	870	0.04	1120	0.04
IRS-1(Phospho-Ser312)	1576	0.02	1359	0.02
IRS-1(Phospho-Ser636)	2296	0.04	1590	0.04
IRS-1(Phospho-Ser639)	1480	0.01	1278	0.01
JunB(Ab-259)	1556	0.04	1223	0.04
JunB(Ab-79)	1003	0.06	1292	0.06
JunB(Phospho-Ser259)	2463	0.01	1456	0.01
JunB(Phospho-Ser79)	1937	0.07	1413	0.07
JunD(Ab-255)	745	0.01	1125	0.01

JunD(Phospho-Ser255)	2403	0.04	1505	0.04
MEF2A(Ab-312)	1758	0.05	1405	0.05
MEF2A(Ab-319)	1354	0.06	1617	0.06
MEF2A(Phospho-Thr312)	1255	0.02	1029	0.02
MEF2A(Phospho-Thr319)	1152	0.25	1316	0.25
MEK1(Ab-217)	917	0.05	1217	0.05
MEK1(Ab-221)	642	0.03	1205	0.03
MEK1(Ab-291)	568	0.02	1076	0.02
MEK1(Phospho-Ser217)	1033	0.02	1244	0.02
MEK1(Phospho-Ser221)	1447	0.04	1432	0.04
MEK1(Phospho-Thr291)	912	0.02	1342	0.02
MEK-2(Ab-394)	1907	0.03	1772	0.03
MEK-2(Phospho-Thr394)	2377	0.04	1154	0.04
Met(Ab-1234)	1705	0.02	1355	0.02
Met(Ab-1349)	1403	0.02	1198	0.02
Met(Phospho-Tyr1234)	2207	0.03	1452	0.03
Met(Phospho-Tyr1349)	404	0.05	891	0.05
MKK3(Ab-189)	779	0.02	1059	0.02
MKK3(Phospho-Ser189)	1694	0.01	1191	0.01
Myc(Ab-358)	1402	0.02	1646	0.02
Myc(Ab-373)	1043	0.02	1591	0.02
Myc(Ab-58)	1348	0.03	1509	0.03
Myc(Phospho-Ser373)	994	0.02	1294	0.02
Myc(Phospho-Thr358)	1415	0.09	1348	0.03
Myc(Phospho-Thr58)	2002	0.03	1547	0.02
P38 MAPK(Ab-182)	880	0.10	1023	0.03
P38 MAPK(Phospho-Thr180)	1140	0.03	1309	0.03
P38 MAPK(Phospho-Tyr182)	1489	0.04	1332	0.04
p44/42 MAP Kinase(Ab-202)	882	0.03	1211	0.03
p44/42 MAP Kinase(Ab-204)	677	0.02	1110	0.02
p44/42 MAP Kinase(Phospho-Thr202)	1320	0.03	1497	0.03
p44/42 MAP Kinase(Phospho-Tyr204)	2019	0.02	1734	0.02
p53(Ab-15)	721	0.01	816	0.01
p53(Ab-18)	595	0.04	804	0.04
p53(Ab-315)	1129	0.02	1172	0.02
p53(Ab-33)	1290	0.02	1184	0.02
p53(Ab-37)	955	0.04	1149	0.04
p53(Ab-46)	865	0.02	1004	0.02
p53(Ab-6)	689	0.06	1083	0.06
p53(Ab-9)	825	0.02	955	0.02
p53(Phospho-Ser15)	1526	0.05	1378	0.05
p53(Phospho-Ser315)	1722	0.04	1481	0.04
p53(Phospho-Ser33)	1556	0.04	1507	0.04
p53(Phospho-Ser37)	1050	0.01	1308	0.01
p53(Phospho-Ser46)	2416	0.03	1707	0.03
p53(Phospho-Ser6)	1734	0.02	1540	0.02

p53(Phospho-Ser9)	1922	0.05	1548	0.05
p53(Phospho-Thr18)	2317	0.06	1754	0.06
PKC delta (Phospho-Ser645)	1585	0.06	1544	0.06
PKC delta(Ab-645)	730	0.03	1087	0.03
PKC theta (Phospho-Ser676)	533	0.01	984	0.01
PKC theta(Ab-676)	614	0.04	1031	0.04
PKC-delta (Phospho-Ser645)	1728	0.03	1562	0.03
PKC-theta(Phospho-Ser676)	509	0.06	994	0.06
Pyk2(Ab-402)	923	0.05	1184	0.05
Pyk2(Phospho-Tyr402)	1093	0.08	1113	0.08
Raf1(Ab-259)	1632	0.04	1624	0.04
Raf1(Ab-338)	2216	0.02	1582	0.02
Raf1(Phospho-Ser259)	2346	0.04	1536	0.04
Raf1(Phospho-Ser338)	1830	0.01	1653	0.01
SAPK/JNK(Ab-183)	1236	0.04	1540	0.04
SAPK/JNK(Ab-185)	982	0.06	1005	0.06
SAPK/JNK(Phospho-Thr183)	1530	0.04	1494	0.04
SAPK/JNK(Phospho-Tyr185)	1625	0.07	1464	0.07
SEK1/MKK4(Ab-261)	901	0.01	1053	0.01
SEK1/MKK4(Phospho-Ser80)	1387	0.04	1418	0.04
SEK1/MKK4(Phospho-Thr261)	2043	0.02	1496	0.02
Src(Ab-418)	1080	0.06	1167	0.05
Src(Ab-529)	1724	0.02	1391	0.02
Src(Phospho-Tyr418)	1856	0.25	1403	0.25
Src(Phospho-Tyr529)	1370	0.05	1354	0.05
Stathmin 1(Ab-15)	959	0.03	1099	0.03
Stathmin 1(Ab-24)	592	0.02	1050	0.02
Stathmin 1(Ab-37)	624	0.02	1255	0.02
Stathmin 1(Phospho-Ser15)	2943	0.04	1647	0.04
Stathmin 1(Phospho-Ser24)	1315	0.02	1351	0.02
Stathmin 1(Phospho-Ser37)	1631	0.03	1325	0.03
Tau(Ab-181)	590	0.04	993	0.04
Tau(Ab-205)	1854	0.02	1135	0.02
Tau(Ab-212)	900	0.02	1179	0.02
Tau(Ab-214)	1090	0.03	1336	0.03
Tau(Ab-231)	1500	0.05	1317	0.03
Tau(Ab-235)	1637	0.02	1345	0.02
Tau(Ab-262)	916	0.01	1200	0.04
Tau(Ab-356)	756	0.02	1053	0.04
Tau(Ab-396)	903	0.02	919	0.02
Tau(Ab-404)	1627	0.03	1273	0.05
Tau(Ab-422)	1476	0.02	1337	0.02
Tau(Phospho-Ser214)	1839	0.09	1249	0.09
Tau(Phospho-Ser235)	1508	0.03	1055	0.03
Tau(Phospho-Ser262)	1731	0.10	1288	0.10
Tau(Phospho-Ser356)	1339	0.03	1410	0.03

Tau(Phospho-Ser396)	1149	0.04	1041	0.04
Tau(Phospho-Ser404)	1218	0.03	1178	0.03
Tau(Phospho-Ser422)	824	0.02	1167	0.02
Tau(Phospho-Thr181)	823	0.03	821	0.03
Tau(Phospho-Thr205)	939	0.02	929	0.02
Tau(Phospho-Thr212)	1627	0.01	1479	0.05
Tau(Phospho-Thr231)	1234	0.04	1152	0.07
Negative control	334	0.01	452	0.02

Article n°2

Estrogen-related receptor α and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria.

Delphine Mirebeau-Prunier, Soazig Le Pennec, Caroline Jacques, Naïg Gueguen, Julie Poirier, Yves Malthièry, Frédérique Savagner.

The FEBS Journal, Janvier 2010

De nombreuses voies biochimiques complexes sont mises en jeu pour répondre de manière adéquate aux changements des besoins métaboliques d'un type cellulaire, d'un organe ou de l'organisme entier. Les récepteurs nucléaires orphelins de la famille ERR jouent un rôle central dans la régulation des métabolismes lipidique et énergétique. L'activité transcriptionnelle des récepteurs nucléaires est dépendante de la présence de protéines corégulatrices. Les ERRs interagissent notamment avec les trois coactivateurs de la famille PGC-1 (Giguère, 2008 ; Vercauteren *et al.*, 2008). Les ERRs régulent l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines impliquées dans tous les aspects du fonctionnement de la mitochondrie en se liant aux promoteurs de leurs gènes cibles par l'intermédiaire des ERREs. Le facteur de transcription $ERR\alpha$ est exprimé de manière ubiquitaire et est trouvé en quantité plus importante que les deux autres isoformes $ERR\beta$ et $ERR\gamma$. Tout comme le coactivateur PGC-1 α , $ERR\alpha$ est fortement exprimé dans les tissus qui requièrent une importante production énergétique oxydative et est impliqué, entre autres, dans l'efficacité du mécanisme de phosphorylation oxydative et dans la biogenèse mitochondriale. Il a été montré que PGC-1 α régulait fortement l'activité transcriptionnelle d' $ERR\alpha$, permettant ainsi l'expression de nombreux gènes codant pour des protéines essentielles au fonctionnement mitochondrial (Schreiber *et al.*, 2003). L'inhibition d' $ERR\alpha$ entraîne, quant à elle, une diminution de l'expression de gènes cibles de PGC-1 α et de la respiration mitochondriale induite par ce coactivateur (Schreiber *et al.*, 2004). Le complexe $ERR\alpha$ -PGC-1 α participe donc activement à la régulation de la biogenèse et du fonctionnement de la mitochondrie. Par ailleurs, tout comme le coactivateur PRC, $ERR\alpha$ est impliqué dans la régulation de la prolifération cellulaire (Bianco *et al.*, 2009) ce qui a motivé notre intérêt pour l'étude du rôle fonctionnel de l'interaction de ces deux facteurs.

Notre étude de PRC dans les tissus oncocytaires thyroïdiens riches en mitochondries ainsi que dans le modèle cellulaire XTC.UC1 a montré l'importance de ce facteur dans la régulation conjointe de la prolifération cellulaire et de la prolifération mitochondriale. Dans le contexte des lignées cancéreuses thyroïdiennes, la richesse en mitochondries ainsi que l'orientation métabolique diffèrent selon le modèle. Ainsi, les lignées cellulaires FTC-133 et RO82 W-1, toutes deux issues de carcinomes folliculaires thyroïdiens, présentent un métabolisme soit principalement oxydatif (FTC-133) soit majoritairement glycolytique (RO82 W-1). Nous avons montré dans cette étude que la quantité d'ADN mitochondrial et l'expression des ARNm de ND5 et du cytochrome *c*, composants de la chaîne respiratoire, sont plus élevées dans les cellules FTC-133 (de façon proche de ce qui est observé pour les cellules XTC.UC1) que dans les cellules RO82 W-1. Ceci s'accompagne d'une expression

plus importante des ARNm de PRC et d'ERR α dans les lignées FTC-133 et XTC.UC1 par rapport à la lignée RO82 W-1.

L'utilisation d'un agoniste inverse d'ERR α , le XCT790, nous a permis de préciser l'implication fonctionnelle de ce facteur de transcription dans les trois lignées thyroïdiennes étudiées. L'inhibition d'ERR α par le XCT790 entraîne une diminution de la prolifération de ces lignées cellulaires, avec un effet plus précoce et plus marqué pour les cellules RO82 W-1. Au niveau de la fonction mitochondriale, l'inhibition d'ERR α diminue à la fois la consommation basale et la consommation maximale d'oxygène dans les cellules les plus oxydatives comme les FTC-133. Il n'y a pas d'effet significatif de cette inhibition dans les cellules les plus glycolytiques (RO82 W-1).

S'il a été montré que PRC pouvait interagir avec ERR α , le rôle fonctionnel du complexe ERR α -PRC n'avait pas été caractérisé jusqu'à présent. Dans le but de préciser l'implication de ce complexe dans le fonctionnement mitochondrial, ces deux acteurs ont été soit surexprimés dans la lignée glycolytique RO82 W-1 présentant une faible expression endogène d'ERR α et de PRC soit inhibés dans la lignée oxydative FTC-133 présentant au contraire une forte expression de ces deux facteurs. Seule l'expression conjointe d'ERR α et de PRC dans la lignée glycolytique permet d'activer efficacement la transcription de gènes dont le promoteur contient un élément de réponse aux œstrogènes ERE et d'augmenter l'expression protéique et l'activité de la COX. Dans les cellules FTC-133, l'inhibition conjointe d'ERR α et de PRC induit une diminution de l'efficacité de la phosphorylation oxydative plus drastique que lorsqu'un seul de ces facteurs est inhibé. De manière similaire à ce qui a été décrit pour le complexe ERR α -PGC-1 α , nos résultats suggèrent qu'ERR α interagit avec PRC pour induire la transcription de gènes cibles d'ERR α et que l'expression conjointe d'ERR α et de PRC est nécessaire au fonctionnement efficace de la phosphorylation oxydative dans nos modèles de tumeurs thyroïdiennes.

Estrogen-related receptor α and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria

Delphine Mirebeau-Prunier¹⁻³, Soazig Le Pennec^{1,2}, Caroline Jacques^{1,2}, Naig Gueguen³, Julie Poirier^{1,2}, Yves Malthiery¹⁻³ and Frédérique Savagner¹⁻³

1 INSERM, UMR694, Angers, France

2 Université d'Angers, France

3 CHU Angers, Laboratoire de Biochimie et Biologie moléculaire, France

Keywords

cell proliferation; estrogen-related receptor α ; mitochondrial biogenesis; PGC-1-related coactivator; respiratory chain

Correspondence

D. Mirebeau-Prunier, INSERM, UMR 694, CHU, 4 rue Larrey, 49033 Angers, France
Fax: +33 241 35 40 17
Tel: +33 241 35 33 14
E-mail: deprunier@chu-angers.fr

(Received 17 September 2009, revised 10 November 2009, accepted 25 November 2009)

doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07516.x

Mitochondrial biogenesis, which depends on nuclear as well as mitochondrial genes, occurs in response to increased cellular ATP demand. The nuclear transcriptional factors, estrogen-related receptor α (ERR α) and nuclear respiratory factors 1 and 2, are associated with the coordination of the transcriptional machinery governing mitochondrial biogenesis, whereas coactivators of the peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) family serve as mediators between the environment and this machinery. In the context of proliferating cells, PGC-1-related coactivator (PRC) is a member of the PGC-1 family, which is known to act in partnership with nuclear respiratory factors, but no functional interference between PRC and ERR α has been described so far. We explored three thyroid cell lines, FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1, each characterized by a different mitochondrial content, and studied their behavior towards PRC and ERR α in terms of respiratory efficiency. Overexpression of PRC and ERR α led to increased respiratory chain capacity and mitochondrial mass. The inhibition of ERR α decreased cell growth and respiratory chain capacity in all three cell lines. However, the inhibition of PRC and ERR α produced a greater effect in the oxidative cell model, decreasing the mitochondrial mass and the phosphorylating respiration, whereas the non-phosphorylating respiration remained unchanged. We therefore hypothesize that the ERR α -PRC complex plays a role in arresting the cell cycle through the regulation of oxidative phosphorylation in oxidative cells, and through some other pathway in glycolytic cells.

Introduction

Mitochondrial biogenesis depends on nuclear transcriptional factors to coordinate the transcriptional machinery, and on transcriptional coactivators to inte-

grate environmental signals into this program of mitochondrial biogenesis. Most studies to date have focused on changes in energy metabolic pathways that

Abbreviations

COX, cytochrome *c* oxidase; CS, citrate synthase; Cyt *c*, cytochrome *c* somatic; ERE, estrogen response element; ERR, estrogen-related receptor; ERRE, estrogen-related receptor response element; ER α , estrogen receptor α ; FCCP, carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazine; HIF, hypoxia-inducible factor; LDH, lactate dehydrogenase; mtDNA, mitochondrial DNA; NRF, nuclear respiratory factor; PGC-1, peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; PRC, PGC-1-related coactivator; siRNA, short interfering RNA.

enable the organism to adapt to its fluctuating nutritional status or to varying environmental conditions. However, the identification of the key factors of mitochondrial biogenesis in the context of proliferating cells should open up promising new lines of research in this field.

The nuclear respiratory factors NRF-1 and NRF-2 and the estrogen-related receptor α (ERR α) are the main nuclear transcriptional factors associated with the expression levels of the majority of respiratory chain genes [1]. Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) is the founding member of the family of transcriptional coactivators, including peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 β (PGC-1 β) and PGC-1-related coactivator (PRC) [2]. Each of these coactivators induces mitochondrial biogenesis in a specific context. PGC-1 α and PGC-1 β have been mainly associated with the modulation of metabolic pathways in tissues that require high oxidative energy production, such as heart and skeletal muscle [3]. Unlike PGC-1 α and PGC-1 β , PRC is ubiquitous and more abundantly expressed in proliferating cells than in growth-arrested cells. PRC is known to interact with NRF-1 and NRF-2 to increase the gene expression of several subunits of respiratory chain complexes [4–6]. However, a subset of respiratory chain subunits does not appear to be regulated by NRF-1 or NRF-2, indicating that other regulatory factors are implicated in the coordination of the expression of the nuclear and mitochondrial genomes.

ERR α is an orphan nuclear receptor that binds to the ERR response element (ERRE) as either a monomer or a dimer, depending on the ERRE sequence. ERR α heterodimers with member 1 and 3 of the signal transducers and activators of transcription family, NRF-1 and cAMP responsive element binding protein have been found in heart cells *in vitro* [7]. ERR α interacts with different coactivators, such as PGC-1 α , to regulate cellular energy metabolism [8]. The interference between ERR α and PRC has been reported recently, but its effect on mitochondrial biogenesis has not been explored [6]. Involved in mitochondrial functions, ERR α participates in mitochondrial biogenesis, oxidative phosphorylation and oxidative stress defense, as well as in mitochondrial dynamics [8–12]. Clinical studies and investigations into the molecular mechanisms of ERR α function have revealed the different roles played by this receptor in tumor proliferation and prognosis. In terms of structure, ERR α , which is similar to estrogen receptor α (ER α), can interfere with estrogen signaling and serve as a prognosticator in breast, ovarian and endometrial cancers [13–16]. In colorectal cancer, ERR α mRNA levels are significantly

higher in tumoral tissue relative to normal tissue, and associated with tumor stage as well as histological grade [17]. In all of these highly proliferative tumors, the cell metabolism is forced to shift to anaerobic glycolysis because of the hypoxic environment of the tumor. In this context, ERRs have been found recently to serve as essential cofactors of hypoxia-inducible factor (HIF) in cancer cell lines [18]. In contrast, in muscle cells, ERR α and PGC-1 α operate either independently of HIF in response to hypoxia, or as regulators of intracellular oxygen availability in a manner dependent on HIF under physiological conditions [19,20]. Thus, ERR α can promote either cell growth or mitochondrial biogenesis according to the status of cellular oxygen.

Our study investigates tumor models in which we determine the interference between PRC and ERR α in the integrative regulation of metabolism involved in mitochondrial and cellular proliferation. Thyroid oncogenic tumors and the cellular XTC.UC1 model have a high rate of mitochondrial biogenesis and oxidative cellular metabolism because of the increased expression of PRC, ERR α and NRF-1 [21–23]. Moreover, in thyroid tissue, PGC-1 α was not induced [23]. In this context, we compared the metabolic status of three thyroid cell lines – FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1 – derived from follicular cell carcinoma. We characterized the basal mitochondrial status of these cell lines according to respiratory chain functionality and gene expression. In two of these lines, selected for their different behavior towards ERR α , we explored the regulation of mitochondrial biogenesis and cell proliferation through the ERR α -PRC pathway via the overexpression or inhibition of the two genes.

Results

Mitochondrial status of FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1

Quantitative PCR was used to evaluate the mitochondrial DNA (mtDNA) level in each cell line (Fig. 1A). mtDNA levels in FTC-133 and XTC.UC1 were 3.9 and 2.4 times higher, respectively, than in RO 82 W-1. Similarly, the expression of ND5 mRNA, encoded by mtDNA, and cytochrome *c* somatic (Cyt *c*) mRNA, encoded by nuclear DNA, was 3.2 and 3.1 times greater, respectively, in FTC-133, and 1.8 and 2.8 times greater, respectively, in XTC.UC1 than in RO 82 W-1 (Fig. 1B).

Quantitative PCR was used to determine the mRNA levels of the main transcriptional factors (ERR α , NRF-1 and NRF-2) and coactivators (PGC-1 α , PGC-1 β , PRC) required for the biogenesis and function of

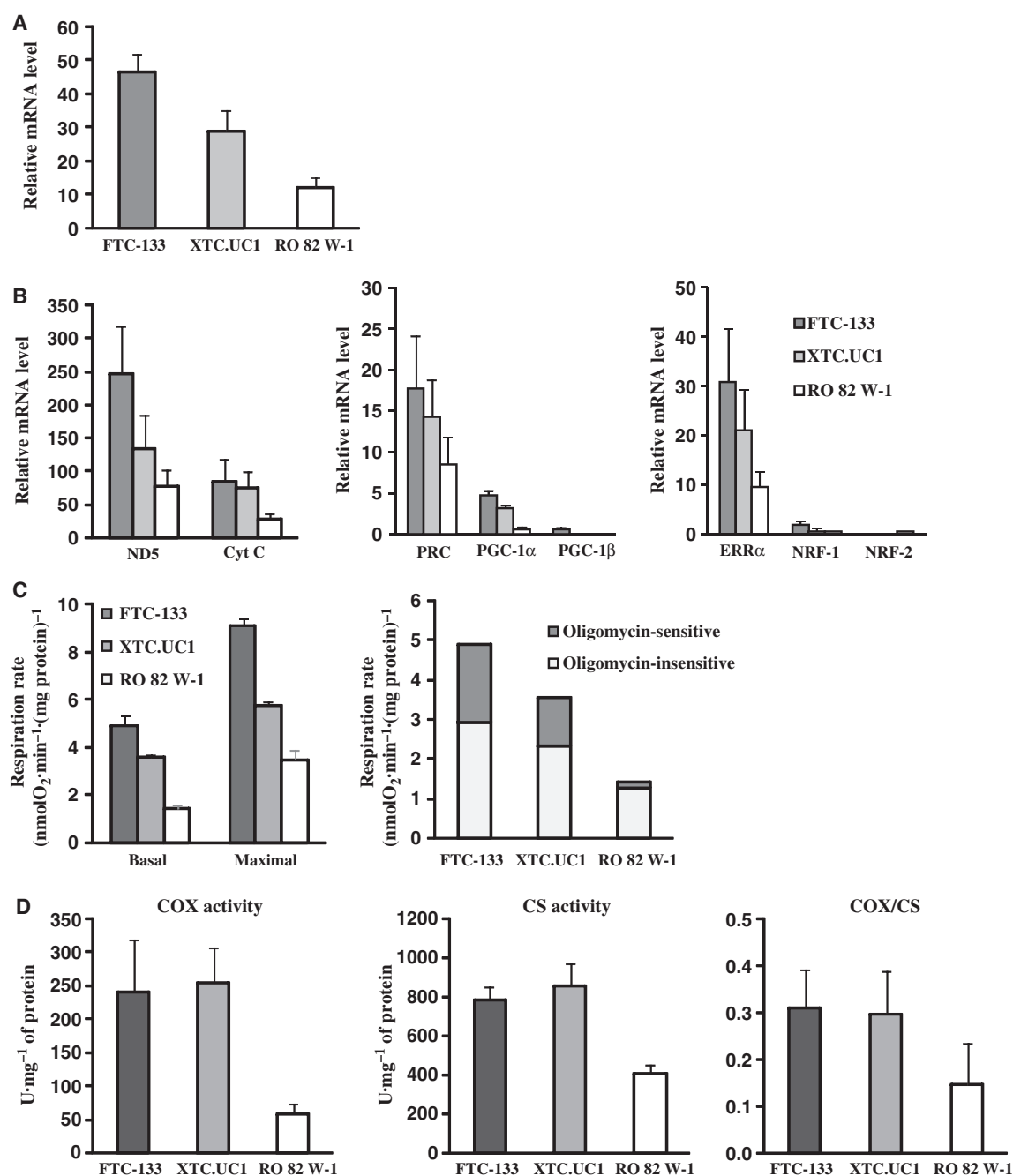


Fig. 1. Mitochondrial status for FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1 cells. (A) Relative levels of mtDNA were determined by quantitative real-time PCR and normalized to β -globin DNA levels (B) Relative expression levels of several genes were determined by quantitative real-time PCR and were normalized against β -globin cDNA levels (C) Oxygen consumption was defined in the basal respiratory condition (basal respiratory), the maximal stimulation condition by the uncoupling of oxidative phosphorylation with FCCP (maximal respiratory) and the nonphosphorylating respiratory condition with oligomycin (oligomycin-insensitive). Phosphorylating respiration (oligomycin-sensitive) was calculated by subtracting nonphosphorylating respiration from basal respiration. (D) Enzymatic activity of COX and CS, and the ratio of COX activity to CS activity. Results are the mean values \pm SD of six experiments.

the mitochondria (Fig. 1B). In our three cell lines, ERR α and PRC were predominantly expressed relative to the other factors, and the expression was signifi-

cantly higher for FTC-133 and XTC.UC1 than for RO 82 W-1. We checked ERR α protein expression in our three cell lines, but not for PRC, because no commer-

cial antibody is currently available for this protein. We confirmed that the ERR α protein levels were higher for FTC-133 and XTC.UC1 than for RO 82 W-1 (data not shown).

We determined the mitochondrial respiratory rate by means of the cellular oxygen consumption in the different cell lines (Fig. 1C). The basal cellular oxygen consumption for FTC-133 and XTC.UC1 was three times higher than that for RO 82 W-1. Mitochondrial complexes I and III were inhibited by rotenone and antimycin, respectively, to check for nonmitochondrial respiration. Relative to the maximal respiration rate, the nonmitochondrial respiration rates amounted to $10 \pm 2\%$ in FTC-133, $19 \pm 2\%$ in XTC.UC1 and $14 \pm 5\%$ in RO 82 W-1. This indicates the predominant (80%) contribution of mitochondria to the total cellular oxygen consumption in our three cell lines. Mitochondrial respiration comprises phosphorylating respiration, which represents the fraction used for ATP synthesis, and nonphosphorylating respiration. The nonphosphorylating respiration rate, i.e. the oligomycin-insensitive fraction, was recorded after the inhibition of ATP synthase with oligomycin, and the phosphorylating respiration rate, i.e. the oligomycin-sensitive fraction, was calculated by subtracting the nonphosphorylating respiration rate from the basal respiration rate. The evaluation of the oligomycin-sensitive oxygen consumption rate showed that FTC-133 and XTC.UC1 used much more oxygen (nearly 40%) for ATP synthesis than did RO 82 W-1 (10%).

To evaluate mitochondrial function, we stimulated cellular oxygen consumption with the uncoupler carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP) to produce maximal mitochondrial respiration. We observed a 40–60% increase in oxygen consumption in the three cell lines (Fig. 1C). We measured the enzymatic activity of mitochondrial complex IV (cytochrome *c* oxidase, COX) to evaluate the direct mitochondrial function and assayed the citrate synthase (CS) level to evaluate the mitochondrial mass. COX activities were three times higher for FTC-133 and XTC.UC1 than for RO 82 W-1, and CS activities were twice as high for FTC-133 and XTC.UC1 than for RO 82 W-1 (Fig. 1D). Comparing the COX activity with the mitochondrial mass using the COX/CS ratio, we found that FTC-133 and XTC.UC1 cells presented twice as much COX activity for the same mitochondrial mass as did RO 82 W-1.

Lastly, we evaluated the glycolytic metabolism by measuring the lactate dehydrogenase (LDH) activity. We measured the LDH activity in FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1. Comparing the LDH

activity with the mitochondrial mass using the LDH/CS ratio, we found that RO 82 W-1 cells presented at least 40% more LDH activity than did FTC-133 and XTC.UC1.

Our results show that FTC-133 and XTC.UC1 cells undergo oxidative metabolism with a high content of efficient mitochondria, whereas RO 82 W-1 metabolism is mainly glycolytic, with mitochondria using little electron transport for phosphorylation.

ERR α is involved in the metabolic regulation of the three thyroid cell lines

We investigated the effects of XCT790, a specific inverse agonist of ERR α . As controls of the inhibitory effect of XCT790 on ERR α , we used the expression of ERR α -validated target genes, such as Cyt *c* and ATP synthase subunit β [8]. Quantitative PCR was used to evaluate the levels of these genes after treatment with $5 \mu\text{M}$ XCT790 for 10 days. The expression of both genes was downregulated by treatment with XCT790 by at least 40% relative to untreated controls. Treatment with $5 \mu\text{M}$ XCT790 for 10 days inhibited cell proliferation in the three cell lines (Fig. 2A). This inhibition began earlier – in less than 4 days – for RO 82 W-1 than for the other two cell lines. Similarly, the inhibition of cell proliferation after 10 days was greater for RO 82 W-1 (60.3%) than for XTC.UC1 (44.2%) or FTC-133 (25.8%). The three cell lines grew differently and, after 10 days, there were four times as many FTC-133 cells as RO 82 W-1 cells. The level of inhibition was probably related to the different proliferative statuses of the cells. Nevertheless, the inhibition of ERR α with XCT790 decreased significantly the basal oxygen consumption and the maximal respiration only in FTC-133 cells (Fig. 2B). Moreover, COX and CS activities were reduced in FTC-133 cells, whereas the COX/CS ratio remained unaltered. In the other two cell lines, XCT790 had no significant effect on cellular oxygen consumption; COX activity decreased significantly for RO 82 W-1 ($P < 0.05$) and consistently for XTC.UC1 ($P = 0.07$), whereas the CS activity was unchanged (Fig. 2C).

In all three cell lines, cell growth and mitochondrial complex IV activity decreased when ERR α was inhibited. ERR α may affect cell growth by a mechanism independent of its effect on mitochondrial respiration in our three cell lines. However, the greatest ERR α regulation of oxidative phosphorylation was observed for FTC-133 cells, with decreased basal oxygen consumption and reduced maximal mitochondrial respiration. We therefore postulated that ERR α influences cell growth through the control of respira-

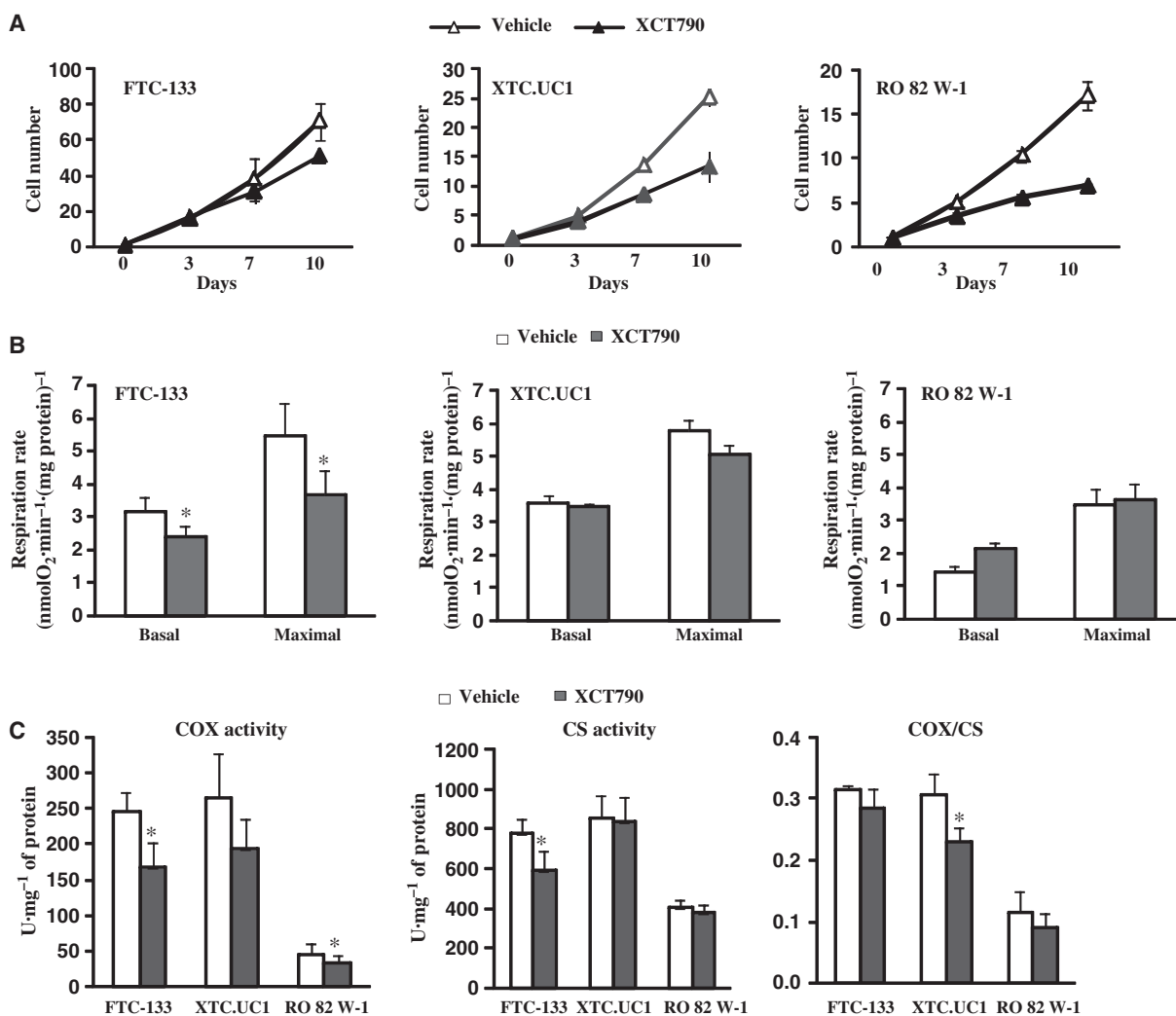


Fig. 2. Inhibition of ERR α with inverse agonist XCT790 in FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1 cells. (A) Analysis of proliferation by direct cell counting in the presence (filled triangles) or absence (open triangles) of 5 μ M XCT790 for 10 days. (B) Basal and maximal mitochondrial respiratory rate in the presence (filled bars) or absence (open bars) of 5 μ M XCT790 for 10 days. (C) COX and CS activity for FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1 cells in the presence (filled bars) or absence (open bars) of 5 μ M XCT790 for 10 days. Results are the mean values \pm SD. * P < 0.05 versus cells in the absence of XCT790.

tory capacity in cells with preferential oxidative metabolism.

The PRC-ERR α complex activates transcription directly through a consensus estrogen response element (ERE)

To determine whether PRC can function as a coactivator of ERR α , transient transfections into RO 82 W-1 cells were performed using the 3X ERE TATA luc reporter construction (Fig. 3A). The reporter plasmid contains three copies of the vitellogenin authentic promoter ERE that have been demonstrated to bind

to ERR α and the complex ERR α -PGC1 α [24,25]. No effect on reporter activity was observed after transfection with PRC alone. Forced overexpression of ERR α , without PRC transfection, probably stimulated reporter construction because of the presence of endogenous ERR α coactivators in these cells. However, 3X ERE TATA luc reporter activity was stimulated to a greater extent when ERR α and PRC were coexpressed. This activation was reduced by at least 50% when transfected cells were incubated for 48 h with XCT790 (Fig. 3B). These findings suggest that ERR α interacts with PRC to induce gene transcription.

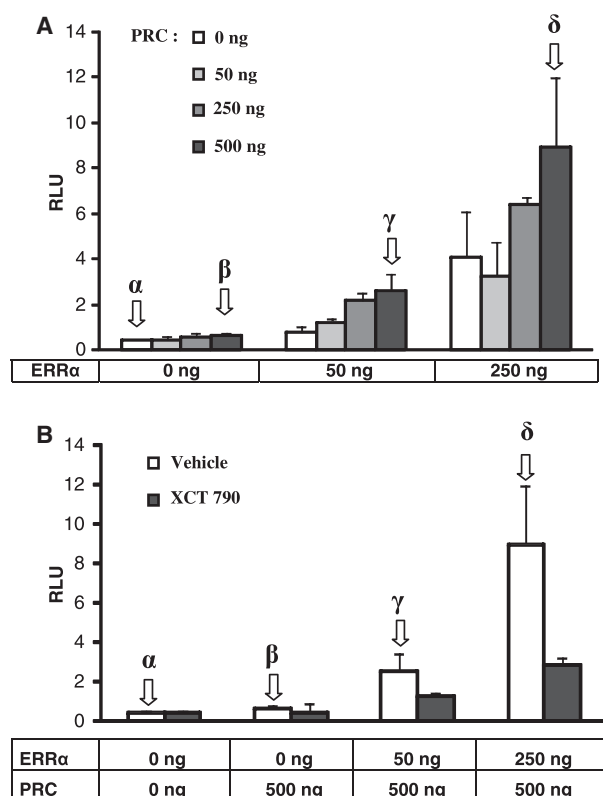


Fig. 3. The ERR α -PRC complex activates transcription directly. RO 82 W-1 cells were transfected with reporter plasmid 3X ERE TATA luc (1 μ g), together with the indicated amount of the expression plasmids of ERR α and PRC. Luciferase activity was determined 48 h after transfection and normalized against renilla luciferase activity. The results are presented in relative LUC units (RLU). (A) In normal medium. (B) In the presence (filled bars) or absence (open bars) of 5 μ M XCT790 for 48 h. The same amounts of expression plasmids of ERR α and PRC were used in (A) and (B). α , control 0 ng ERR α plasmid with 0 ng PRC; β , 0 ng ERR α plasmid with 500 ng PRC; γ , 50 ng ERR α plasmid with 500 ng PRC; δ , 250 ng ERR α plasmid with 500 ng PRC. The results are the mean values \pm SD of three experiments performed in duplicate.

ERR α requires PRC to induce mitochondrial biogenesis

To investigate the functional relationship between ERR α and PRC, we overexpressed both genes in RO 82 W-1 thyroid cancer cells, which have low mitochondrial mass and poor expression of ERR α and PRC. As we have shown (Fig. 3), transfection with 50 ng of ERR α plasmid and 50 ng of PRC plasmid induces gene transcription. Overexpression of these genes was verified by quantitative PCR, and was at least 100-fold. We then evaluated the consequence on direct mitochondrial function by measuring the protein level and enzymatic activity of mitochondrial complex IV (COX activities), and on mitochondrial mass by

measuring the CS activity and mtDNA level. Transfection with PRC or ERR α alone had no significant effect, whereas the coexpression of PRC and ERR α led to increased COX activity ($P = 0.05$), higher protein level of the complex IV subunit ($P \leq 0.05$) and greater CS activity ($P = 0.07$), but no increase in mtDNA (data not shown) (Fig. 4). However, the COX/CS activity ratio remained stable. The overexpression of ERR α and PRC showed that the two factors act together to coordinate COX and CS activities.

We investigated the consequence of ERR α and PRC inhibition using FTC-133 cells, which are strongly regulated by ERR α . FTC-133 cells were treated for 10 days with XCT790 or vehicle and, on the sixth day, the cells were transfected with PRC short interfering RNA (siRNA) or a negative control (scrambled siRNA). We measured the cellular oxygen consumption rates and the COX and CS activities. In the presence of PRC siRNA or XCT790, the basal cellular oxygen consumption was reduced by about 35% and 20%, respectively. When PRC siRNA and XCT790 were placed together in the same flask, the basal cellular oxygen consumption decreased to 50% (Fig. 5A). Oxygen consumption measured in the presence of the uncoupler FCCP (i.e. the maximal respiratory rate) increased to 30% without inhibition of ERR α and PRC, but to only 15% with cells treated with XCT790 and transfected with PRC siRNA. The oxygen fraction used for ATP synthesis, i.e. the oligomycin-sensitive oxygen consumption rate, represented 50% of the basal respiration without inhibition of ERR α and PRC, but only 10% when the cells were treated with XCT790 and transfected with PRC siRNA. These findings showed that, when ERR α and PRC were inhibited, the phosphorylating respiration efficiency decreased (Fig. 5A). COX and CS activities were measured in the same experiments (Fig. 5B). Both activities decreased after the addition of XCT790, but no additional effect was recorded when ERR α and PRC were jointly inhibited. The decrease in COX activity, CS activity and cellular oxygen consumption following the inhibition of ERR α confirmed the effect of this factor on the mitochondrial respiratory chain. Inhibition of both members of the ERR α -PRC complex decreased the cellular oxygen consumption more significantly, but produced no additional effect on COX and CS activities. These findings suggest the involvement of both factors in the regulation of the mitochondrial respiratory chain, independent of COX and CS activities.

Discussion

Mitochondria contribute to the generation of energy through oxidative phosphorylation. The biogenesis of

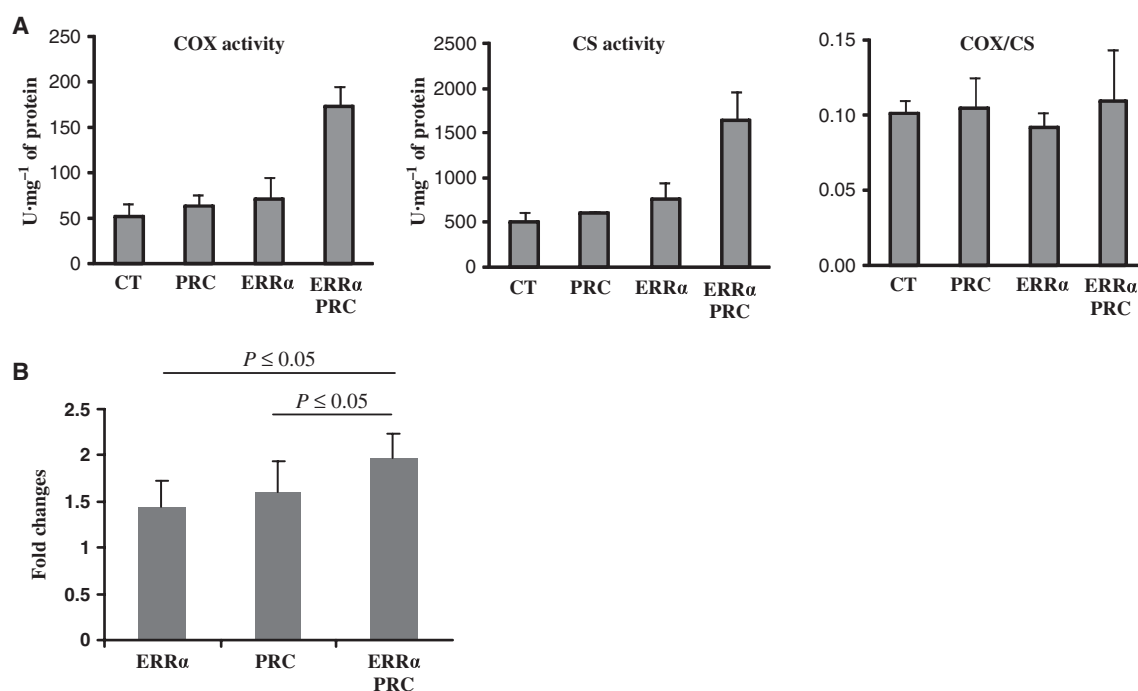


Fig. 4. ERR α -PRC complex-induced mitochondrial function. RO 82 W-1 cells were transfected with 50 ng ERR α and/or 50 ng PRC. Controls were transfected with empty vectors. (A) COX activity, CS activity and the ratio of COX activity to CS activity were determined 48 h after transfection (B) Protein levels of complex IV subunit were determined by western blot and presented relative to the control which was assigned a value of unity. The results are the mean values \pm SD of three experiments performed in duplicate.

functional mitochondria requires the expression of a large number of genes encoded by the nuclear and mitochondrial genetic systems. The coordination of mitochondrial biogenesis depends mainly on a small number of transcription factors (NRF-1, NRF-2 and ERR α) and coactivators (PGC-1 α , PGC-1 β and PRC). There is no unique system controlling oxidative phosphorylation, and the choice of these inducible coactivators is determined at different levels in response to environmental or hormonal stimuli. In this work, we focused on the integration of the regulation of the mitochondrial respiratory apparatus with the genetic program controlling cell proliferation. PRC is induced rapidly by mitogenic signals and stimulates mitochondrial biogenesis through its specific interaction with NRF-1 or NRF-2 [4–6]. The functional interference between ERR α and PRC has not yet been investigated. Nevertheless, ERR α , known to be involved in cellular metabolic regulation, also interacts with key factors of cell growth, such as the tumor suppressor p53 or HIF involved in the transcriptional response to hypoxia [7,18].

Our earlier work on thyroid oncogenic tumors, rich in functional mitochondria, demonstrated a high expression of PRC, NRF-1 and ERR α relative to

normal thyroid tissues [21–23]. We have shown that the thyroid oncogenic cell line, XTC.UC1, is a good model for the study of the PRC-dependent regulation of mitochondrial and cell proliferation. In this study, we show that follicular thyroid tumors represent models in which PRC and ERR α interfere to induce mitochondrial biogenesis. In the three thyroid cell lines used here, i.e. FTC-133, XTC.UC1 and RO 82 W-1, the expression of PRC and ERR α was correlated with the mitochondrial mass, the expression of mitochondrial genes and the activity of the COX and CS enzymes. ERR α has already been shown to regulate COX and CS enzymes [8,12]. To investigate the functional relationship between ERR α and PRC, we modulated the expression and activity of each of these factors: we overexpressed ERR α and PRC by transient transfection, underexpressed PRC with siRNA and inhibited ERR α with an inverse agonist, XCT790. XCT790, an artificial synthetic compound, is known to interfere specifically with the ligand-binding domain of ERR α without affecting estrogen receptor signalling [26], and to induce the degradation of ERR α [27]. In our cell lines, we verified the effects of XCT790 on validated ERR α target genes, such as Cyt *c* and ATP synthase subunit β . As we could not exclude the action of

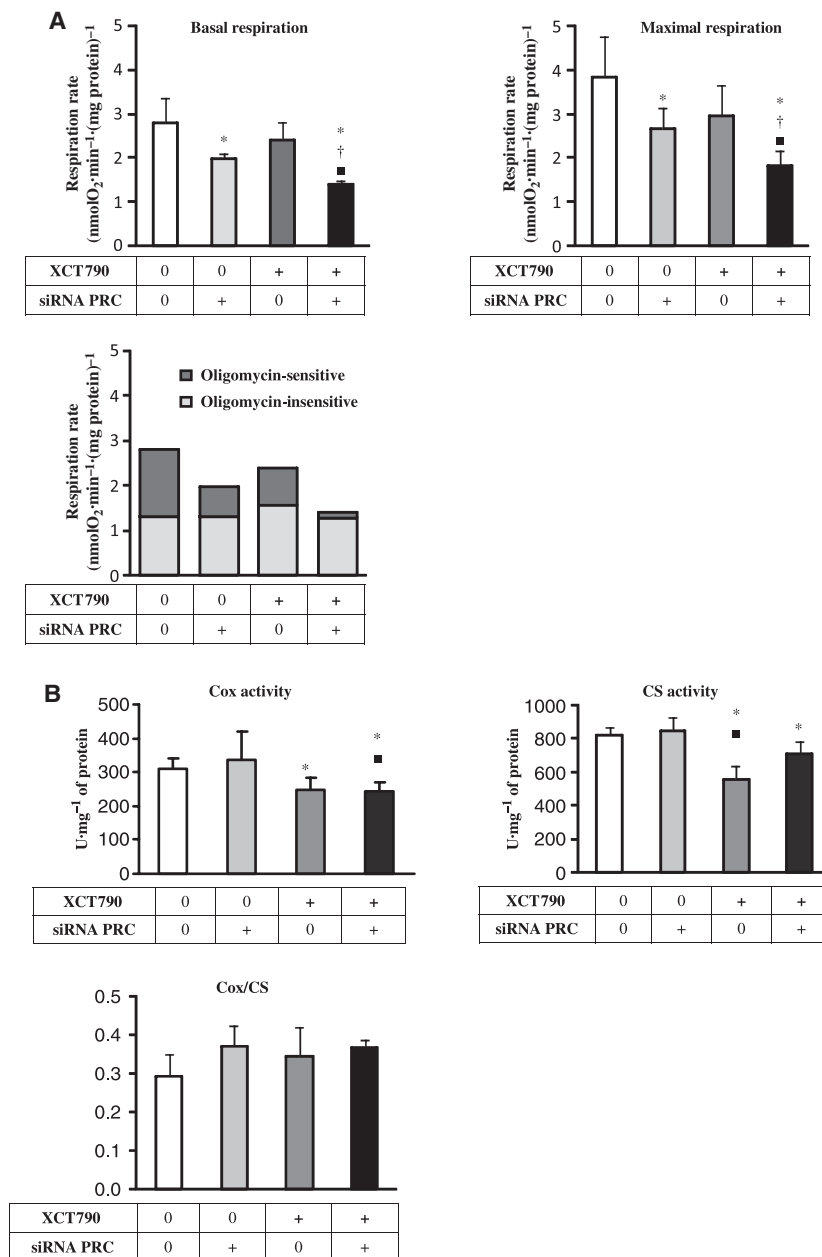


Fig. 5. Dependence of mitochondrial function on the ERR α -PRC complex. FTC-133 cells were treated for 10 days with XCT790 or vehicle. On the sixth day, the cells were transfected with control or PRC siRNA. (A) Oxygen consumption defined in the basal condition (basal respiratory), the maximal stimulation condition by the uncoupling of oxidative phosphorylation with FCCP (maximal respiratory) and the nonphosphorylating respiratory condition with oligomycin (oligomycin-insensitive). Phosphorylating respiration (oligomycin-sensitive) was calculated by subtracting the nonphosphorylating respiration from the basal respiration. (B) Enzymatic activity of COX and CS, and the ratio of COX activity to CS activity. The results are the mean values \pm SD. * $P \leq 0.05$ versus control siRNA-expressing cells in the absence of XCT790; † $P \leq 0.05$ versus control siRNA-expressing cells in the presence of XCT790; ■ $P \leq 0.05$ versus PRC siRNA-expressing cells in the absence of XCT790.

XCT790 on other proteins, these results need to be confirmed by further ERR α siRNA experiments. We explored the effect of ERR α through the regulation of target gene expression via ERREs [7,8,28]. In glycolytic RO 82 W-1 cells, we observed an increase in COX and CS activity when PRC and ERR α were both overexpressed, whereas there was no effect when only one of these factors was overexpressed. This phenomenon has been described previously for the ERR α -PGC-1 α complex, with the inhibition of ERR α impairing the ability of PGC-1 α to enhance mitochondrial gene expression [9]. Thus, as in the case of PGC-1 α , ERR α may be consid-

ered as a PRC effector, mediating cell metabolism through direct and indirect action on several gene promoters. In the thyroid model, the action of ERR α , together with PRC, on other transcription factors, such as NRF-1 and NRF-2, may be suspected. Indeed, NRF-1 expression was proportional to ERR α and PRC levels (Fig. 1), the inhibition of ERR α drastically decreased NRF-1 expression (data not shown), and it was necessary to overexpress PRC as well as ERR α in cells to increase COX and CS activity. In this context, the transcription of NRF-1 seems to be dependent on the expression level of the ERR α -PRC complex.

Surprisingly, the overexpression of PRC and ERR α in glycolytic RO 82 W-1 had no effect on the mtDNA copy number. The lack of correlation between CS and COX activities and mtDNA copy number, described here, is consistent with the apparent independence of the mtDNA copy number and expression of the respiratory chain subunits reported by Vercauteren *et al.* [29]. They modulated the expression of PRC and found the regulation of three mitochondrial transcripts (COX, ND6 and cytochrome *b*), but no change in the mtDNA copy number. This indicates that mtDNA replication is not dependent directly on the ERR α -PRC complex. In our study, we looked for the effect of the ERR α -PRC complex 48 h after overexpression of PRC and ERR α . We suspect that a further period of treatment may be required to reveal the effect of the complex on mtDNA levels.

With regard to the enzymatic and respiratory parameters, we showed that the expression of ERR α and PRC was related to the respiratory capacity and phosphorylating respiration. Inhibition of ERR α and PRC in the oxidative FTC-133 model led to a decrease in respiratory chain capacity (COX activity) and mitochondrial mass (CS activity) in a coordinated manner, as the COX/CS ratio remained stable. The consequence was a diminution in phosphorylating respiration without any change in nonphosphorylating respiration. However, this was not true for the XTC.UC1 model, which presented a greater proportion of nonphosphorylating basal respiration. In this model, the inhibition of ERR α led to a significant decrease in the COX/CS ratio as a result of the diminution of the respiratory chain capacity (COX activity), but not of the mitochondrial mass (CS activity), and without affecting the respiratory parameters. Other studies support the concept of independent pathways for the regulation of CS, COX and mitochondrial respiratory activity. Indeed, serum induction in BALB/3T3 fibroblasts increases mitochondrial respiration, but not CS activity [30]. Moreover, during myogenesis, CS has been shown to be regulated by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway, which is not the case for COX [31]. ERR α is not a unique factor controlling oxidative phosphorylation. As described elsewhere, mice lacking ERR α are viable [10,32] and the inhibition of ERR α in other cell models decreases the respiratory parameter only partially [9]. This suggests that other factors are involved in the control of oxidative phosphorylation, with ERR α playing a role in the regulation of mitochondrial quality through the modification of phosphorylating respiration, rather than in mitochondrial biogenesis.

With regard to the effect of the ERR α -PRC complex on cell proliferation, we found that cell growth

slowed down in each of the three thyroid cell lines investigated when ERR α was inhibited. The involvement of ERRs in the regulation of the cell cycle has been demonstrated previously [7]. Our work suggests that this effect is dependent on the metabolic status of the cell line. In the case of the glycolytic cell line, RO 82 W-1, ERR α inhibition led to an arrest in growth without affecting the respiratory parameter. However, the cells were quiescent, suggesting that the ERR α -PRC complex is involved in the control of the early phase of the cell cycle. This is in accordance with the role played by PRC and ERR α in the transition from the G1 to the S phase of the cell cycle [29,33]. When the cells are mostly involved in an oxidative process, as in the case of the FTC-133 thyroid cell line, the inhibition of ERR α may lead to a slowing down of cell growth, partly by decreasing the respiratory capacity and phosphorylating respiration.

In conclusion, the ERR α -PRC transcriptional complex plays a consistent role in increasing the coupling efficiency of mitochondria in the cell proliferative pathway. Interestingly, ERR α is preferentially used, according to the cellular metabolic status, either to control the cell cycle or to promote the efficiency of oxidative phosphorylation. For cells using the glycolytic pathway, the ERR α -PRC complex plays a role in cell cycle arrest, whereas it acts on the cell cycle as well as on oxidative phosphorylation in the case of oxidative cells. Thus, ERR α should be considered as one of the key targets in the therapy of solid tumors.

Materials and methods

Cell lines and growth conditions

Three human follicular thyroid carcinoma cell lines were used: the XTC.UC1 cells were oncogenic variants kindly provided by O. Clark (Mt. Zion Medical Center of the University of California, San Francisco, CA, USA) [21,34]; the other cell lines, FTC-133 and RO 82 W-1, were obtained from the Interlab Cell Line Collection (National Institute for Cancer Research, Genoa, Italy).

FTC-133 and XTC.UC1 cells were grown in Dulbecco's modified medium (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Seromed, Biochrom AG, Berlin, Germany), 1% L-glutamine (Invitrogen) and 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen). We added 10 mU·mL⁻¹ thyroid-stimulating hormone (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for XTC.UC1.

RO 82 W-1 cells were grown in 60% Dulbecco's modified medium and 30% endothelial basal medium (both from PAA, Pasching, Austria) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin.

In all experiments, XCT790 (Sigma-Aldrich) was used at a final concentration of 5 μ M for a 10 day treatment, replaced with fresh medium every 3 days.

Transient transfections and luciferase assay

Cells were plated 2 days before transfection. We performed transient transfection with lipofectamine (Invitrogen), as described by the manufacturer. Cells were collected and assayed 48 h later.

For experimentation with luciferase activity, each well was transfected with 1 μ g of reporter plasmid 3X ERE TATA luc (Addgene, Cambridge, MA, USA), 0.05–0.5 μ g of plasmid PRC (Origene Technologies, Rockville, MD, USA), 0.05–0.5 μ g of plasmid ERR α (Addgene) and 0.5 μ g of pRL-CMV (Promega, Madison, WI, USA) as internal control of transfection efficiency. After 48 h, cells were harvested for luciferase reporter assay using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). The luciferase activity was normalized to that of the internal control renilla luciferase as relative luciferase units. All assays were performed in duplicate in three separate experiments.

siRNA

To knock down PRC expression, three predesigned PRC siRNAs (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) were tested in comparison with a scrambled negative control siRNA (scrambled siRNA, #4635). The PRC siRNA (#121729) was chosen on at least 50% of PRC mRNA expression knockdown. For this study, 30 nM of this PRC siRNA was transfected using siPORT NeoFX, as recommended by the manufacturer's manual (all from Applied Biosystems). After 48 h, the cells were harvested for assay.

In vitro cell growth assay

Cells were plated at 10⁵ cells per 25 cm² flask and cultured in growth medium for 10 days, replaced with fresh medium every 3 days. The cells were counted every 3 days using a Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). All counts were performed in duplicate and repeated in two independent experiments.

Quantitative PCR analysis

Total RNA was isolated from cultured cells using an RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA integrity was determined using a Bio-Analyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Reverse transcription was performed on 1 μ g of RNA with an Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) following the manufacturer's recommendations.

DNA was isolated using the High Pure PCR Template Preparation Kit as recommended by the manufacturer (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

Real-time quantification was performed in a 96-well plate using IQ SYBR Green supermix and Chromo4 (Biorad, Hercules, CA, USA). Data were normalized to β -globin. The sequences of the primers used in this study were as follows: ERR α : 5'-AAGACAGCAGCCCCAGTGAA-3' and 5'-ACACCCAGCACCAGCACCT-3'; PRC: 5'-CACTGG TTGACCCTGTTCCT-3' and 5'-GTGTTTCAGGGCTTC TCTGC-3'; Cyt *c*: 5'-CCAGTGCCACACCGTTGAA-3' and 5'-TCCCCAGATGATGCCTTTGTT-3'; ATP synthase subunit β : 5'-CCTTCTGCTGTGGGCTATCA-3' and 5'-TCAAGTCATCAGCAGGCACA-3'; ND5: 5'-TAACCCC ACCCTACTAAACC-3' and 5'-GATTATGGGCGTTGA TTAGTAG-3'; β -globin: 5'-CAACTTCATCCACGTTCA CC-3' and 5'-ACACAACCTGTGTTCACTAGC-3'.

Western blot

Cells were rinsed in NaCl/P_i, trypsinized and collected in centrifuge tubes. Proteins (20 μ g) were separated by SDS-PAGE and transferred to poly(vinylidene difluoride) membranes (Hybond-P, Amersham International plc, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) by electroblotting. The membranes were incubated in 5% nonfat milk in TBS-Tween (Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20). The membranes were incubated with dilutions of the following antibodies: monoclonal anti-tubulin (Abcam, Cambridge, UK), monoclonal anti-complex-IV (Mitosciences, Eugene, OR, USA) and polyclonal anti-ERR α (Abcam), overnight. After several washes in TBS-Tween, the membranes were incubated with an appropriate chemiluminescent-labelled horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Jackson ImmunoResearch, WestGrove, PA, USA). The blots were developed using the enhanced chemiluminescence method (ECLplus, Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Signal quantification was performed by nonsaturating picture scanning by a gel Doc 1000 Molecular Analyst apparatus (Biorad).

Respiratory parameters and respiratory ratio in intact cells

Respiratory parameters and the coupling state were investigated in intact cells by polarography using a high-resolution Oroboros O2k oxygraph (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria), as described elsewhere [35,36]. The basal respiration rate, defined as respiration in the cell culture medium without additional substrates or effectors, was determined by measuring the linear rate of oxygen flux in intact cells (3 \times 10⁶ cells placed at 37 °C in 2 mL Dulbecco's modified medium). Mitochondrial respiration comprises coupled and uncoupled respiration,

determined using the ATP synthase inhibitor oligomycin. The ATP synthase was then inhibited with oligomycin (4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and the nonphosphorylating respiration rate was recorded (oligomycin-insensitive). The phosphorylating respiration rate (oligomycin-sensitive) was calculated by subtracting the nonphosphorylating respiration rate from the basal respiration rate. The maximal respiration was recorded by the uncoupling of oxidative phosphorylation by stepwise titration of FCCP (0.2–2.0 μM) up to the optimum. Finally, respiration was inhibited by the sequential addition of 5 μM rotenone and 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ antimycin (complex I and III inhibitors, respectively) to check for nonmitochondrial respiration (all from Sigma-Aldrich).

Enzymatic activities

The activities of CS, COX and LDH were measured on cell lysates at 37 °C in a cell buffer [250 mM saccharose, 20 mM tris(hydroxymethyl)aminomethane, 2 mM EGTA, 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ bovine serum albumin, pH 7.2] using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman Coulter).

COX activity was measured in 50 mM KH_2PO_4 buffer, using 15 μM reduced cytochrome *c* and 2.5 mM β -D-dodecylmaltoside [37]. The CS activity was measured in a reaction medium consisting of 0.1 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), 1 mM oxaloacetic acid, 0.3 mM acetyl-CoA and Triton X-100 (4%), and LDH [35] was assayed by standard procedures. Specific enzymatic activities were expressed in mIU [i.e. nanomoles of cytochrome *c*, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) or NADH per minute per milligram of protein, respectively]. The cellular protein content was determined using the bicinchoninic assay kit (Uptima, Interchim, Montluçon, France) with bovine serum albumin as standard (all from Sigma-Aldrich, except Tris from Eurobio, Les Ulis, France).

Statistical analysis

The results were expressed as the mean values \pm standard deviation (SD). The statistical significance of the observed variations was assessed using the Wilcoxon signed-rank test. Differences were considered to be significant at $P < 0.05$. All analyses were performed using STATVIEW version 5.0 (SAS Institute, Gary, NC, USA).

Acknowledgements

This work was supported by grants from INSERM. We thank D. Couturier and C. Wetterwald for technical assistance, and K. Malkani for critical reading of the manuscript. We thank J.M. Vanacker for kindly providing reporter plasmids and O. Clark for kindly providing XTC.UC1 cells.

References

- Scarpulla RC (2006) Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* **97**, 673–683.
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M & Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**, 829–839.
- Handschin C & Spiegelman BM (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr Rev* **27**, 728–735.
- Andersson U & Scarpulla RC (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol Cell Biol* **21**, 3738–3749.
- Gleyzer N, Vercauteren K & Scarpulla RC (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol Cell Biol* **25**, 1354–1366.
- Vercauteren K, Gleyzer N & Scarpulla RC (2008) PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2 β in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *J Biol Chem* **283**, 12102–12111.
- Dufour CR, Wilson BJ, Huss JM, Kelly DP, Alaynick WA, Downes M, Evans RM, Blanchette M & Giguere V (2007) Genome-wide orchestration of cardiac functions by the orphan nuclear receptors ERR α and γ . *Cell Metab* **5**, 345–356.
- Schreiber SN, Emter R, Hock MB, Knutti D, Cardenas J, Podvinez M, Oakeley EJ & Kralli A (2004) The estrogen-related receptor α (ERR α) functions in PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 6472–6477.
- Mootha VK, Handschin C, Arlow D, Xie X, St Pierre J, Sihag S, Yang W, Altshuler D, Puigserver P, Patterson N *et al.* (2004) Erralpha and γ specify PGC-1 α -dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 6570–6575.
- Villena JA, Hock MB, Chang WY, Barcas JE, Giguere V & Kralli A (2007) Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α is essential for adaptive thermogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**, 1418–1423.
- Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, Ziltener JL, Luthi F, Deriaz O, Zorzano A *et al.* (2005) Mitofusins 1/2 and ERR α expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* **567**, 349–358.
- Rangwala SM, Li X, Lindsley L, Wang X, Shaughnessy S, Daniels TG, Szustakowski J, Nirmala NR, Wu Z & Stevenson SC (2007) Estrogen-related receptor α is

- essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function. *Biochem Biophys Res Commun* **357**, 231–236.
- 13 Ariazi EA, Clark GM & Mertz JE (2002) Estrogen-related receptor α and estrogen-related receptor γ associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer. *Cancer Res* **62**, 6510–6518.
 - 14 Suzuki T, Miki Y, Moriya T, Shimada N, Ishida T, Hirakawa H, Ohuchi N & Sasano H (2004) Estrogen-related receptor α in human breast carcinoma as a potent prognostic factor. *Cancer Res* **64**, 4670–4676.
 - 15 Sun P, Sehoul J, Denkert C, Mustea A, Konsgen D, Koch I, Wei L & Lichtenegger W (2005) Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new tumor biomarkers in ovarian cancer cells. *J Mol Med* **83**, 457–467.
 - 16 Watanabe A, Kinoshita Y, Hosokawa K, Mori T, Yamaguchi T & Honjo H (2006) Function of estrogen-related receptor α in human endometrial cancer. *J Clin Endocrinol Metab* **91**, 1573–1577.
 - 17 Cavallini A, Notarnicola M, Giannini R, Montemurro S, Lorusso D, Visconti A, Minervini F & Caruso MG (2005) Oestrogen receptor-related receptor α (ERR α) and oestrogen receptors (ER α and ER β) exhibit different gene expression in human colorectal tumour progression. *Eur J Cancer* **41**, 1487–1494.
 - 18 Ao A, Wang H, Kamarajugadda S & Lu J (2008) Involvement of estrogen-related receptors in transcriptional response to hypoxia and growth of solid tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 7821–7826.
 - 19 Arany Z, Foo SY, Ma Y, Ruas JL, Bommi-Reddy A, Girnun G, Cooper M, Laznik D, Chinsomboon J, Rangwala SM *et al.* (2008) HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1 α . *Nature* **451**, 1008–1012.
 - 20 O'Hagan KA, Cocchiglia S, Zhdanov AV, Tambawala MM, Cummins EP, Monfared M, Agbor TA, Garvey JF, Papkovsky DB, Taylor CT *et al.* (2009) PGC-1 α is coupled to HIF-1 α -dependent gene expression by increasing mitochondrial oxygen consumption in skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 2188–2193.
 - 21 Savagner F, Chevrollier A, Loiseau D, Morgan C, Reynier P, Clark O, Stepien G & Malthiery Y (2001) Mitochondrial activity in XTC.UC1 cells derived from thyroid oncocyoma. *Thyroid* **11**, 327–333.
 - 22 Savagner F, Franc B, Guyetant S, Rodien P, Reynier P & Malthiery Y (2001) Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J Clin Endocrinol Metab* **86**, 4920–4925.
 - 23 Savagner F, Mirebeau D, Jacques C, Guyetant S, Morgan C, Franc B, Reynier P & Malthiery Y (2003) PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma. *Biochem Biophys Res Commun* **310**, 779–784.
 - 24 Johnston SD, Liu X, Zuo F, Eisenbraun TL, Wiley SR, Kraus RJ & Mertz JE (1997) Estrogen-related receptor α 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol Endocrinol* **11**, 342–352.
 - 25 Huss JM, Kopp RP & Kelly DP (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 α (PGC-1 α) coactivates the cardiac-enriched nuclear receptors estrogen-related receptor- α and $-\gamma$. Identification of novel leucine-rich interaction motif within PGC-1 α . *J Biol Chem* **277**, 40265–40274.
 - 26 Willy PJ, Murray IR, Qian J, Busch BB, Stevens WC Jr, Martin R, Mohan R, Zhou S, Ordentlich P, Wei P *et al.* (2004) Regulation of PPAR γ coactivator 1 α (PGC-1 α) signaling by an estrogen-related receptor α (ERR α) ligand. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**, 8912–8917.
 - 27 Lanvin O, Bianco S, Kersual N, Chalbos D & Vanacker JM (2007) Potentiation of ICI182,780 (Fulvestrant)-induced estrogen receptor- α degradation by the estrogen receptor-related receptor- α inverse agonist XCT790. *J Biol Chem* **282**, 28328–28334.
 - 28 Huss JM, Torra IP, Staels B, Giguere V & Kelly DP (2004) Estrogen-related receptor α directs peroxisome proliferator-activated receptor α signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol Cell Biol* **24**, 9079–9091.
 - 29 Vercauteren K, Gleyzer N & Scarpulla RC (2009) Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria. *J Biol Chem* **284**, 2307–2319.
 - 30 Herzig RP, Scacco S & Scarpulla RC (2000) Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome *c*. *J Biol Chem* **275**, 13134–13141.
 - 31 Kraft CS, LeMoine CM, Lyons CN, Michaud D, Mueller CR & Moyes CD (2006) Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1119–C1127.
 - 32 Luo J, Sladek R, Carrier J, Bader JA, Richard D & Giguere V (2003) Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor α . *Mol Cell Biol* **23**, 7947–7956.
 - 33 Bianco S, Lanvin O, Tribollet V, Macari C, North S & Vanacker JM (2009) Modulating ERR α activity inhibits cell proliferation. *J Biol Chem* **284**, 23286–23292.
 - 34 Zielke A, Tezelman S, Jossart GH, Wong M, Siperstein AE, Duh QY & Clark OH (1998) Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hurthle cell origin. *Thyroid* **8**, 475–483.

- 35 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.
- 36 Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G *et al.* (2007) Mitochondrial coupling defect in Charcot–Marie–Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* **61**, 315–323.
- 37 Rustin P, Lebidois J, Chretien D, Bourgeron T, Piechaud JF, Rotig A, Munnich A & Sidi D (1994) Endomyocardial biopsies for early detection of mitochondrial disorders in hypertrophic cardiomyopathies. *J Pediatr* **124**, 224–228.

Article n°3

Nitric oxide and calcium differently regulate mitochondrial biogenesis in follicular thyroid carcinoma cell lines.

Soazig Le Pennec, Delphine Mirebeau-Prunier, Nathalie Boutet-Bouzamondo, Caroline Jacques, Delphine Guillotin, Rémi Houlgatte, Yves Malthièry, Frédérique Savagner.

Les coactivateurs transcriptionnels de la famille PGC-1 (PGC-1 α , PGC-1 β et PRC) jouent un rôle primordial dans la régulation de la biogenèse mitochondriale. Ils interagissent avec divers facteurs de transcription, tels que NRF-1, CREB ou ERR α , dont l'activité permet la coordination de la transcription de gènes nucléaires et mitochondriaux codant pour des protéines impliquées dans le fonctionnement de la mitochondrie. L'expression de ces coactivateurs est contrôlée par de nombreux signaux endogènes et environnementaux. Le monoxyde d'azote et le calcium, signaux endogènes qui participent fortement au contrôle de la fonction thyroïdienne, sont décrits pour induire l'expression de PGC-1 α .

Le monoxyde d'azote peut se lier à la COX au niveau du site de fixation à l'oxygène et inhiber ainsi la respiration mitochondriale de manière réversible (Cleeter *et al.*, 1994). A plus long terme, le NO entraîne la biogenèse de mitochondries fonctionnelles par le biais de la voie GMPc/PGC-1 α dans différents types cellulaires (Nisoli *et al.*, 2003 ; Nisoli *et al.*, 2004). Les oncocytomes thyroïdiens présentent une très faible expression de PGC-1 α . Les résultats décrits dans l'article n°1 ont mis en évidence que, dans le modèle cellulaire d'oncocytome thyroïdien XTC.UC1, le NO était capable d'induire la biogenèse mitochondriale par le biais de la voie GMPc/PRC (Le Pennec *et al.*, 2009). Dans les modèles cellulaires thyroïdiens, la richesse en mitochondries, le statut métabolique et le ratio d'expression des transcrits de PRC et de PGC-1 α diffèrent selon les lignées. Ces lignées cellulaires constituent donc de bons modèles d'étude des signaux régulant la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire de l'un ou l'autre de ces coactivateurs dans la thyroïde. Dans ce travail, nous avons utilisé deux lignées de carcinomes folliculaires thyroïdiens : les cellules FTC-133, riches en mitochondries, présentent un métabolisme principalement oxydatif alors que la lignée RO82 W-1, pauvre en mitochondries, utilise peu ses mitochondries pour la synthèse d'ATP et présente un ratio d'expression PRC/PGC-1 α supérieur à celui observé dans les cellules FTC-133 (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010).

Nous avons étudié les effets du traitement par un donneur de NO, le SNAP, sur la biogenèse des mitochondries et le fonctionnement de la chaîne respiratoire dans ces deux lignées. Le SNAP (50 μ M) entraîne, après 96 h de traitement, une augmentation de la biogenèse mitochondriale plus importante dans la lignée RO82 W-1 présentant le ratio PRC/PGC-1 α le plus élevé. L'augmentation d'expression des transcrits de PRC, PGC-1 α et NRF-1 est deux fois plus forte dans la lignée glycolytique que dans les cellules FTC-133. L'expression de PRC est par ailleurs plus élevée que celle de PGC-1 α dans ces deux lignées après traitement par le SNAP. De plus, l'expression des ARNm du facteur de transcription ERR α , du cytochrome *c* ainsi que de l'UCP2 est augmentée de manière significative

uniquement dans les cellules RO82 W-1 qui présentent le plus fort niveau d'induction de PRC. Ces résultats suggèrent que, dans les modèles thyroïdiens, le NO induit la biogenèse mitochondriale de manière plus efficace par la voie PRC que par l'intermédiaire du coactivateur PGC-1 α . Cette induction de la biogenèse mitochondriale par le SNAP est accompagnée d'une diminution rapide (dès 24 h) de l'activité de la COX, enzyme terminale de la chaîne respiratoire. Cette inhibition est similaire (environ 20 %) dans les deux lignées après 24 h de traitement par le SNAP (50 μ M). En revanche, après 96 h de traitement, l'activité de la COX est plus fortement diminuée par rapport au contrôle dans la lignée oxydative FTC-133 (environ 50 %) que dans la lignée RO82 W-1 (environ 20 %). Cependant, l'activité basale de la COX est très faible dans la lignée glycolytique ; en conséquence, l'activité résiduelle de la COX après inhibition par le NO à T96 est très faible dans les cellules RO82 W-1 (COX/CS = 0,06) en comparaison de celle des cellules FTC-133 (COX/CS = 0,29). Le niveau d'induction de la biogenèse mitochondriale étant fonction de la faiblesse de l'activité résiduelle de la COX, la biogenèse mitochondriale induite par le NO semble donc être le résultat d'un dialogue rétrograde entre la mitochondrie et le noyau initié en réponse au dysfonctionnement de la mitochondrie. Afin de compenser l'inhibition de la COX par le NO, la voie glycolytique est également activée dans les cellules RO82 W-1 : après 96 h de traitement par le SNAP 50 μ M, l'augmentation de l'expression de LDHAL6A (Lactate DeHydrogenase A-Like 6A), révélée par l'analyse de puces à ADN, s'accompagne d'une tendance à l'augmentation de l'activité de la LDH. L'augmentation de l'activité de la LDH devient significative quand les cellules RO82 W-1 sont traitées par du SNAP 100 μ M.

Le calcium est un autre second messager pouvant moduler la biogenèse des mitochondries et l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, les données disponibles à ce sujet divergent. Certains auteurs ont montré qu'une augmentation de la concentration calcique intracellulaire entraînait une activation de la COX (Papa *et al.*, 1996 ; Bender et Kadenbach, 2000) alors que d'autres décrivent une inhibition de l'activité de cette enzyme par le calcium (Freyssenet *et al.*, 2004 ; Calderón-Cortés *et al.*, 2008). Par ailleurs, il a été montré une régulation positive de l'expression des ARNm de PGC-1 α , de TFAM, du cytochrome *c* et de la sous-unité I de la COX ainsi que de l'activité de liaison à l'ADN des NRFs par le calcium (Ojuka *et al.*, 2002 et 2003 ; Irrcher *et al.*, 2003). En revanche, suite au traitement de myoblastes par un ionophore de calcium, Freyssenet et ses collaborateurs n'ont constaté aucune variation de l'expression des sous-unités nucléaires IV, Vb et VIc de la COX mais une diminution de l'expression des ARNm de TFAM et des sous-unités mitochondriales II et III de la COX (Freyssenet *et al.*, 2004). Afin de caractériser l'influence du calcium dans

la régulation de la biogenèse mitochondriale et le fonctionnement de la chaîne respiratoire dans les cellules thyroïdiennes, nous avons observé les effets d'un ionophore de calcium, l'ionomycine, ainsi que du chélateur de calcium cytoplasmique BAPTA/AM sur l'expression de marqueurs de la biogenèse mitochondriale et sur l'activité de la COX dans le modèle RO82 W-1. Dans ces cellules, l'ionomycine augmente la concentration calcique cytoplasmique $[Ca^{++}]_c$, majoritairement en induisant l'efflux de calcium hors des stocks intracellulaires. Nous avons montré que l'activité de la COX était fortement inhibée (environ 80 %) par l'ionomycine. Cette inhibition est probablement due à une modification du statut de phosphorylation de la COX, et peut-être des autres complexes de la chaîne respiratoire, par des kinases et des phosphatases mitochondriales, en conséquence de la diminution de la concentration calcique intramitochondriale induite par l'ionomycine. Par ailleurs, la variation de $[Ca^{++}]_c$ module la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire du coactivateur PRC dans les cellules RO82 W-1. La chélation du calcium cytoplasmique par le BAPTA/AM augmente l'expression des transcrits de PRC, CREB, NRF-1, $ERR\alpha$, UCP2 et du cytochrome *c* alors que l'augmentation de $[Ca^{++}]_c$ diminue l'expression de ces gènes codant pour des protéines impliquées dans la biogenèse et le fonctionnement de la mitochondrie. En revanche, l'expression de l'ARNm de PGC-1 α ne varie pas dans ces conditions. Ces résultats suggèrent que, dans les cellules RO82 W-1, le calcium module l'activité de cibles cytoplasmiques ce qui entraîne une régulation négative de la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire du coactivateur PRC. L'activité de nombreuses protéines, dont des kinases et des phosphatases, est modulée par le calcium. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer les voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la régulation de la biogenèse mitochondriale induite par le calcium dans les modèles thyroïdiens. En revanche, l'implication de la voie CaMK/NOS semble pouvoir être écartée au vu de cette étude. L'analyse transcriptomique des cellules RO82 W-1 après traitement par l'ionomycine pendant 96 h a également révélé que l'augmentation de $[Ca^{++}]_c$ régula la transcription de gènes impliqués dans le fonctionnement de la COX ainsi que dans la fission mitochondriale. Cependant, ces résultats sont préliminaires et des expériences complémentaires seront nécessaires pour vérifier ces données.

En conclusion, cette étude a montré que le NO et le calcium étaient capables de moduler la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire de PRC dans nos modèles cellulaires, ce qui confirme l'importance de ce coactivateur dans la régulation du fonctionnement mitochondrial dans les lignées cellulaires de carcinomes thyroïdiens.

Nitric oxide and calcium differently regulate mitochondrial biogenesis in follicular thyroid carcinoma cell lines.

**Soazig Le Pennec^{1,2}, Delphine Mirebeau-Prunier^{1,2,3}, Nathalie Boutet-Bouzamondo³,
Caroline Jacques^{1,2}, Delphine Guillotin^{1,2}, Rémi Houlgatte^{4,5}, Yves Malthiery^{1,2,3},
Frédérique Savagner^{1,2,3,5}.**

From : INSERM UMR694¹, Université d'Angers² Angers, Laboratoire de Biochimie³, CHU Angers, F-49033, INSERM UMR915, l'Institut du thorax⁴, Université de Nantes⁵ Nantes, F-44035, France.

Running Head : Endogenous regulators of mitochondrial biogenesis.

Address correspondance : Frédérique Savagner, Inserm UMR 694, Laboratoire de Biochimie, CHU, 4 rue Larrey, 49033 Angers, France, tel : +33 241 35 33 14, Fax : +33 241 35 40 17, Mail : frederique.savagner@univ-angers.fr.

Abstract

Members of the Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1 family (PGC-1 α , PGC-1 β and PGC-1-Related Coactivator (PRC)) are key regulators of mitochondrial biogenesis and function. They serve as mediators between environmental and endogenous signals and the transcriptional machinery governing mitochondrial biogenesis. Follicular thyroid carcinoma cell lines (FTC-133 and RO82 W-1) present different mitochondrial richness, metabolic orientation and expression level for PRC and PGC-1 α that may induce retrograde signaling in response to respiratory dysfunction.

We have investigated the effects of the SNAP nitric oxide (NO) donor on expression of genes involved in mitochondrial biogenesis and function (*CREB1*, *Cyt c*, *ERR α* , *NRF-1*, *PGC-1 α* , *PRC*, *SOD2* and *UCP2*) and on cellular metabolic function by measuring enzymatic activities of lactate dehydrogenase and cytochrome *c* oxidase (COX). We also studied the effects of the calcium ionophore ionomycin and the cytosolic calcium chelator BAPTA/AM on mitochondrial biogenesis and COX activity in RO82 W-1 cells.

In these two cell lines, we found that mitochondrial biogenesis induced by NO was mainly related to PRC expression and to remaining COX activity after SNAP treatment. Our results suggested that NO-mediated mitochondrial biogenesis resulted from a mitochondrial retrograde signaling in response to COX inhibition by NO. We also showed that in RO82 W-1, ionomycin inhibited COX activity and negatively regulated PRC-mediated mitochondrial biogenesis while BAPTA/AM presented opposite effects. Here we showed for the first time that NO and calcium were able to regulate mitochondrial biogenesis preferentially through the PRC pathway in thyroid cell lines.

Key words : mitochondrial biogenesis, respiratory chain, PGC-1-Related Coactivator, nitric oxide, calcium.

Introduction

Mitochondrial proteins of the oxidative phosphorylation (OxPhos) system are encoded by both nuclear and mitochondrial genomes. Mitochondrial energy function requires coordination of transcription of both nuclear genes coding for the majority of OxPhos subunits and mitochondrial genes coding for 13 essential subunits. Several nuclear-encoded transcription factors, like Nuclear Respiratory Factors (NRFs), Estrogen-Related Receptors (ERRs) and cAMP Response Element Binding (CREB), are described to ensure this coordination. Their transcriptional efficiency is controlled by coactivators from the Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1 (PGC-1) family – PGC-1 α , PGC-1 β and PGC-1-Related Coactivator (PRC) – that regulate mitochondrial biogenesis and function depending on several environmental signals (Scarpulla, 2008). The founding member, PGC-1 α , has been identified for its role in adaptative thermogenesis (Puigserver *et al.*, 1998). PGC-1 α and PGC-1 β are highly expressed in oxidative tissues like heart, kidney, muscle, brown adipose tissue and brain. On contrary, PRC is ubiquitously expressed and is considered as a cell growth regulator related to the rapid induction of its expression by serum in proliferating cells (Andersson and Scarpulla, 2001). PGC-1 α and PRC interact with NRF-1, ERR α and CREB and can transactivate promoters of target genes involved in mitochondrial respiration like cytochrome *c* (Gleyzer *et al.*, 2005 ; Vercauteren *et al.*, 2006 ; Vercauteren *et al.*, 2008). However, the crosstalk between nucleus and mitochondria is not unidirectional. A retrograde signaling can be induced from mitochondria to nucleus in response to respiratory dysfunction. Initiating events of this process are not clearly defined but nitric oxide (NO) and calcium have been suspected to mediate this retrograde crosstalk in mammals (Butow and Avadhani, 2004).

NO has dual effects on mitochondria depending on level and duration of its production. Nisoli and collaborators have shown that long-term treatment of different cell types with low level of NO donors induced biogenesis of functional mitochondria through a cyclic Guanosine MonoPhosphate (cGMP)/PGC-1 α pathway (Nisoli *et al.*, 2003 ; Nisoli *et al.*, 2004). Moreover, cold-induced mitochondrial biogenesis and oxygen consumption were reduced in brown adipose tissue of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) null-mutant mice as compared to wild-type animals. In a previous study, we have demonstrated that NO could also mediate mitochondrial biogenesis through the cGMP/PRC pathway in a model of mitochondrial-rich thyroid tumors (Le Pennec *et al.*, 2009). Thus, it appears that PRC and PGC-1 α are able to induce mitochondrial biogenesis when a chronic but low level of NO is

produced by eNOS. This effect must take into account that, as an acute effect, NO may also bind to cytochrome *c* oxidase (COX) and reversibly inhibit mitochondrial chain respiration by competing with oxygen (Cleeter *et al.*, 1994 ; Moncada and Bolaños, 2006).

Calcium is also able to modulate respiratory chain activity and mitochondrial biogenesis. In bovine heart, an increase in Ca^{++} concentration could enhance complex I activity and reverse the allosteric cAMP inhibition of COX, by modulating their phosphorylation status, but could also stimulate ATP synthase activity (Moreno-Sánchez, 1985 ; Harris and Das, 1991 ; Papa *et al.*, 1996 ; Bender and Kadenbach, 2000). In L₆E₉ myotubes in culture and isolated rat brain mitochondria, it has been demonstrated that increase in Ca^{++} concentration was able to inhibit COX activity (Freysenet *et al.*, 2004 ; Calderón-Cortés *et al.*, 2008). Interestingly, COX inhibition may depend on NO production by the Ca^{++} -activated mitochondrial NOS. Increase in cytosolic Ca^{++} concentration using Ca^{++} ionophores A23187 or ionomycin enhances cytochrome *c* expression in muscle cells (Ojuka *et al.*, 2002 ; Ojuka *et al.*, 2003 ; Freysenet *et al.*, 2004). This was associated with an increase in NRF-dependent transcription activity and COX I subunit, PGC-1 α and TFAM overexpression for some studies (Ojuka *et al.*, 2002 ; Ojuka *et al.*, 2003 ; Irrcher *et al.*, 2003) while no variation in the expression of nuclear-encoded COX subunits (COX IV, Vb and VIc) and decreased expression in TFAM and mitochondrial-encoded COX subunits (COX II and III) were revealed in another (Freysenet *et al.*, 2004). In mitochondrial DNA (mtDNA) depleted cells, it has also been shown that mitochondrial biogenesis was stimulated in association with increased cytosolic Ca^{++} concentration and CREB activation (Arnould *et al.*, 2002 ; Mercy *et al.*, 2005).

We have previously demonstrated that XTC.UC1, FTC-133 and RO82 W-1 follicular thyroid carcinoma cell lines present different metabolic status : oxidative metabolism with a high content of efficient mitochondria for XTC.UC1 and FTC-133 cells while RO82 W-1 cells undergo mainly a glycolytic metabolism presenting few mitochondria using limited electron transport for ADP phosphorylation (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). By presenting different ratio in PRC/PGC-1 α mRNA expression, these cellular models may lead to explore compensatory mechanisms to maintain mitochondrial biogenesis through either PRC or PGC-1 α pathways. We investigated the effects of NO on induction of PRC and factors required for mitochondrial biogenesis and function in FTC-133 and RO82 W-1 cells. We also examined the implication of Ca^{++} ions in mitochondrial biogenesis in the glycolytic cell line, in which ionomycin induced increase in cytosolic Ca^{++} concentration by depletion of intracellular Ca^{++} stores. We searched for cellular pathways regulated by these two second

messengers. We also studied the effects of NO and Ca⁺⁺ on respiratory chain function and metabolism by measurement of COX and lactate dehydrogenase (LDH) activities.

Material and methods

Cell lines and growth conditions

Two human follicular thyroid carcinoma cell lines were used : FTC-133 and RO82 W-1. These cells were obtained from the Interlab Cell Line Collection (National Institute for Cancer Research, Genoa, Italy). FTC-133 cells were grown in Dulbecco's modified medium (DMEM-F12) (Jacques Boy, Reims, France), supplemented with 10 % fetal bovine serum (Jacques Boy), 1 % L-glutamine (Dominique Dutscher, Brumath, France) and antibiotic cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). RO82 W-1 cells were grown in 60 % of DMEM-F12 medium, and 30 % of endothelial basal medium (PAA, Pasching, Austria) supplemented with 10 % fetal bovine serum, 1 % L-glutamine, and antibiotic cocktail.

To study the effects of nitric oxide, the two cell lines were treated once a day during four days with the nitric oxide donor SNAP (S-nitroso-N-acetyl-D,L-penicillamine; Merck Calbiochem, Darmstadt, Germany) to a final concentration of 50 or 100 µM in the selected medium or with the equivalent volumes of DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) for the control cells. To study the effects of calcium, RO82 W-1 cells were treated five hours a day during four days with the calcium ionophore ionomycin (Merck Calbiochem) to a final concentration of 2 µM in the selected medium, with the cytosolic calcium chelator BAPTA/AM (Merck Calbiochem) to a final concentration of 2 to 8 µM, with both ionomycin and BAPTA/AM or with the equivalent volumes of DMSO for control cells. To avoid cell death due to toxic effects of intracellular Ca⁺⁺ ions chelation, BAPTA/AM concentration was adjusted to cell density in the flask for each day of treatment : 2 µM the first day, 4 µM the second day, 6 µM the third day and 8 µM the fourth day. After four days, cells were harvested for RNA isolation or enzymatic activities measurement. Cells were counted using Z1 Coulter Particle Counter (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) in duplicate. All the assays were performed in hexaplicate (N=6).

Quantitative RT-PCR analysis

Total RNA was isolated from cultured cells using the RNeasy kit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA integrity was determined using a Bio-Analyzer 2100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany).

Reverse transcription was performed on 2 µg of RNA with Advantage RT-for-PCR kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) following the manufacturer's recommendations.

cDNA real-time quantifications were performed in a 96-wells plate on a chromo4 apparatus (BioRad, Hercules, CA, USA) using SYBR Green I dye as fluorescent signal (iQ sybrGreen supermix, BioRad) and according to manufacturer's recommendations. The expression of eight selected genes (*CREB1*, *Cyt C*, *ERRα*, *NRF-1*, *PGC-1α*, *PRC*, *SOD2* and *UCP2*) was measured. The amount of cDNA for the selected genes was normalized by the quantification of beta 2 microglobulin (*B2M*) cDNA. Each sample was assayed in duplicate. Negative controls were included in the amplification reactions. The specificity of amplification from each primers pair was attested by plotting the melting curves of PCR products using the Opticon software (Biorad). Sequence-specific standard curves were plotted using serial dilutions of standards produced by amplifying cDNA from the XTC.UC1 cell line using the same primers as for quantitative analyses.

The forward and reverse sequences of primers used in this study were :

B2M : 5'-TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3' and 5'-ATCTTGGGCTGTGACAAAGT-3'
CREB1 : 5'-GTGTTACGTGGGGAGAGAA-3' and 5'-GGGCTAATGTGGCAATCTGT-3'
Cyt C : 5'-CCAGTGCCACACCGTTGAA-3' and 5'-TCCCCAGATGATGCCTTTGTT-3'
ERRα : 5'-AAGACAGCAGCCCCAGTGAA-3' and 5'-ACACCCAGCACCAGCACCT-3'
NRF-1 : 5'-TCAAAGGCATACAAAAGGTC-3' and 5'-TACTCTACAGGTCGGGGAAA-3'
PGC-1α : 5'-GTTTCATTACCTACCGTTATAC-3' and 5'-GCCATCCCTCTGTCATCCTC-3'
PRC : 5'-CACTGGTTGACCCTGTTCT-3' and 5'-GTGTTTCAGGGCTTCTCTGC-3'
SOD2 : 5'-GCTGCACCACAGCAAGCAGTCC-3' and 5'-CCAGCAACTCCCCTTTGGGT-3'
UCP2 : 5'-CCAGTGCGCGCTACAGTCA-3' and 5'-GTGGTGCTGCCTGCTAGGAG-3'

Enzymatic activities

The activities of cytochrome *c* oxidase (COX), citrate synthase (CS) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured on cell lysates, at 37°C, in a cell buffer (250 mM saccharose, 20 mM tris[hydroxymethyl]aminomethane (Tris), 2 mM EGTA, 1 mg/ml bovine

serum albumin, pH 7.2) ($50 \mu\text{l}/10^6$ cells) using a Beckman U 640B spectrophotometer (Beckman Coulter). COX activity was measured in a 100 mM KH_2PO_4 buffer containing 1 mg/ml bovine serum albumin using 15 μM reduced cytochrome *c* and 2.5 mM β -D dodecylmaltoside (Rustin *et al.*, 1994). The CS activity was measured in a reaction medium consisting of 0.15 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), 0.5 mM oxaloacetic acid, 0.3 mM acetyl CoA and Triton X-100 (0.1 %). The LDH activity was measured in a reaction medium consisting of 95 mM Tris, 10 mM pyruvate, and Triton X-100 (0.25 %) using 300 μM NADH. Specific enzymatic activities were expressed in mIU (i.e. nanomoles of cytochrome *c*, DTNB, NADH/min/mg protein, respectively). The cellular protein content was determined using the Bicinchoninic assay kit (Uptima, Interchim, Montluçon, France) with bovine serum albumin as standard. All reagents are issued from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) except for Tris and saccharose (from Eurobio, Les Ulis, France).

Measurement of free intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ using FURA-2/AM

Cells were seeded in a 96-wells plate (Nunc, Thermo Fisher Scientific) to a density of 50,000 cells per well 15 hours before the experiment and were grown in the selected medium. Then, cells were loaded with 5 μM of Fura-2/AM (Merck Calbiochem) and 0.1 % of pluronic acid F-127 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) at 37°C for 40 minutes in PSS buffer (140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 330 μM NaH_2PO_4 , 10 mM Hepes, 11.1 mM glucose, pH 7.4) with or without 2 mM CaCl_2 (PSS 2 or 0 mM Ca^{++}), supplemented with 0.1 % of bovine serum albumin (PSS/BSA). Cells were washed once with PSS/BSA and incubated 30 minutes at 37°C in 200 μl of PSS/BSA to allow the complete de-esterification of the dye. The buffer was then removed and cells were loaded with 2 to 8 μM of BAPTA/AM (Merck Calbiochem) at 37°C for 40 minutes in PSS/BSA. Cells were washed once with PSS/BSA and incubated 30 minutes at 37°C in 200 μl of PSS/BSA. The buffer was then removed and 90 μl of PSS/BSA was added in each well before kinetic measurement of fluorescence intensity using Mithras LB940 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany) spectrophotometer at 37°C. For each well, cell preparation was alternatively excited during 30 seconds at two wavelengths (340 and 380 nm) and the fluorescence emission was detected at 510 nm, with a counting time of 150 ms. Then, ionomycin solution was injected to lead to 2 μM final concentration per well and the plate was shaken before measurement of fluorescence intensity at 510 nm for 160 seconds. The background was determined by measuring the fluorescence of a well loaded without FURA-2/AM and BAPTA/AM. The

fluorescence intensity ratio, F340/F380, was used to evaluate variations in cytosolic calcium concentration ($[Ca^{++}]_c$).

Microarray analysis

cDNA preparations issued from RO82 W-1 cells after SNAP, ionomycin and BAPTA/AM treatments were hybridized in duplicate on human 4x44K expression chips (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) after RNA amplification and cDNA labeling using Cy3/Cy5 dyes according to manufacturer's recommendations. Slides were analyzed with the Axon GenePix4.0 software after scanning on a ScanArray Express II scanner (Packard Bioscience, Billerica, MA, USA). Data are available in the GEO database (GSE XXXX). The hierarchical clustering of the genes was computed on median-gene-centered and log-transformed data using average linkage and uncentered correlation distances. Computations and visualization were performed using Cluster and Tree View software (Eisen *et al.*, 1998). EASE and Gene Set analyses were used to likelihood that *a priori* families of genes were determine the statistical over represented and differentially expressed (Tusher *et al.*, 2001). Differentially expressed genes were defined as those well detected in both groups and with absolute PLS (Partial least-squared) loadings > 3.0 and t-test $P < 0.0002$ (FDR = 0.001). In addition, genes with an absolute value of mean expression differences $< 40\%$ were also excluded for further analyses. Gene ontology enrichments in gene lists were searched for using GOMiner (Zeeberg *et al.*, 2003). Most abundant gene ontology terms, representing at least 5 % of the genes in the lists, with significant P-values lower than 0.05, were considered for interpretation.

Statistical analysis

Except for microarray analyses, data are represented as mean values \pm standard deviation (SD), N represents the number of experiments. The statistical significance of observed variations was assessed using the Mann-Whitney test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. All analyses were performed using StatView version 5.0 (SAS Institute, Gary, NC, USA).

Results

Effects of nitric oxide on cell proliferation and mitochondrial function of FTC-133 and RO82 W-1 thyroid cells.

We investigated the functional effects of the NO donor SNAP, on FTC-133 and RO82 W-1 cells. Daily treatment with 50 μ M SNAP significantly inhibited cell proliferation from 24 h for FTC-133 (-20.8 %) and from 48 h for RO82 W-1 (figure 1A). After 96 h of SNAP treatment, cell proliferation significantly decreased by 46.8 % (50 μ M SNAP) or 74.6 % (100 μ M SNAP) for FTC-133 and by 56.4 % (50 μ M SNAP) or 82.5 % (100 μ M SNAP) for RO82 W-1. Thus, NO action on cell proliferation was relative to NO level and was more effective on the glycolytic RO82 W-1 cell line.

To evaluate the effects of SNAP on mitochondrial function and glycolytic metabolism, we measured the enzymatic activities of mitochondrial complex IV (COX) and lactate dehydrogenase (figure 1B). After 24 h of SNAP treatment, COX activity was similarly inhibited relative to controls in the two cell lines : -19.8 % and -26.7 % with 50 μ M SNAP, -46.8 % and -43.7 % with 100 μ M SNAP for FTC-133 and RO82 W-1 respectively. However, at T96, the two concentrations of SNAP differently affected COX activity in FTC-133 and RO82 W-1 cells. In FTC-133, the inhibition of COX activity was proportional to treatment duration and SNAP concentration. However, the decrease in respiratory chain activity did not led to a glycolytic shift as no increase in LDH activity was observed. Thus, considering the cell number, mitochondrial activity was able to maintain an oxidative metabolism in FTC-133 cells after 50 μ M SNAP treatment during 96 h. For RO82 W-1 cells the decrease in COX activity was not proportional. After 96 h of 100 μ M SNAP treatment we observed a toxic effect of NO with a complete inhibition of the complex IV activity by competing with O₂. Considering 96 h of 50 μ M SNAP treatment, the COX activity was maintained to 75.8 % of the control. However, the LDH activity was significantly increased after 100 μ M SNAP treatment in relation to low efficiency of mitochondrial function and a glycolytic metabolism we previously described for this cell line (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010).

Thus, 50 μ M SNAP was able to induce a decrease in COX activity at T96 greater in the FTC-133 cell line depending on oxidative phosphorylation to produce energy. In this cell line, the decrease in cell proliferation was relative to the decrease in COX activity while decrease in RO82 W-1 cells proliferation could not be only related to changes in mitochondrial metabolism.

Effects of nitric oxide on mitochondrial biogenesis in FTC-133 and RO82 W-1 cells.

To determine the role of the NO/PRC pathway in the induction of mitochondrial biogenesis we investigated the effects of SNAP treatment on transcription efficiency for several genes involved in mitochondrial function, transcriptional regulation and coactivation (figure 2). As 100 μ M SNAP led to toxic effect after 96 h of treatment on RO82 W-1 cells, we only explored the NO-effect on gene expression for 50 μ M SNAP.

In the two cell lines, after 96 h of SNAP treatment, PRC expression was significantly increased compared to the control. This increase was more important in RO82 W-1 cells (+108.5 %) than in FTC-133 cells (+48 %). PGC-1 α mRNA expression was also enhanced after 96 h of SNAP treatment, but to a lower level than for PRC : +72.8 % in RO82 W-1 and +27.6 % in FTC-133. This should be related to a basal mRNA PRC/PGC-1 α ratio twice over important in RO82 W-1 than in FTC-133 cells (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). Considering the transcription factors CREB, NRF1 and ERR α , known to be involved in either PGC-1 α or PRC-dependent mitochondrial biogenesis, we observed that NRF-1 and ERR α were significantly overexpressed in RO82 W-1 cells at T96 while CREB and NRF-1 were increased in FTC-133 cells. Interestingly, ERR α mRNA expression was enhanced (+58.7 % at T96) by SNAP only in RO82 W-1 cells in which PRC/PGC-1 α as well as PRC induction were the highest. Considering cytochrome *c* and UCP2 (uncoupling protein 2) as gene markers for mitochondrial biogenesis and coupling, respectively, we showed that their expression were significantly increased by SNAP treatment at T96 in RO82 W-1 (+89.2 % and +44.9 %, respectively). We therefore propose that in these thyroid cell lines, NO induced mitochondrial biogenesis more efficiently through PRC than through PGC-1 α coactivator.

Effect of ionomycin and BAPTA/AM on $[Ca^{++}]_c$ in FTC-133 and RO82 W-1 thyroid cell lines.

We measured the intracellular calcium response to the calcium ionophore, ionomycin, in FTC-133 and RO82 W-1 cells (figure 3). Ionomycin injection (2 μ M) led to a rapid increase in cytosolic calcium concentration. Ionomycin increases $[Ca^{++}]_c$ either by generating Ca⁺⁺-permeable pores in the plasma membrane, allowing Ca⁺⁺ influx from extracellular medium, or by inducing Ca⁺⁺ efflux from intracellular stores. When cells were incubated in PSS 2 mM Ca⁺⁺, the calcium peak was 1.7-fold higher in FTC-133 than in RO82 W-1, while in PSS 0 mM Ca⁺⁺ (allowing to show the part of ionomycin induced- $[Ca^{++}]_c$ increase due to intracellular stores efflux), the calcium peak was similar for FTC-133 and RO82 W-1 (figure

3A). Thus, in FTC-133 the increase in $[Ca^{++}]_c$ after ionomycin injection was equally due to Ca^{++} efflux from intracellular stores and to extracellular Ca^{++} entry. On the contrary, in RO82 W-1 cells ionomycin mainly induced Ca^{++} efflux from intracellular stores.

When RO82 W-1 cells were pre-incubated with the cytosolic calcium chelator BAPTA/AM (figure 3B), the response to 2 μ M ionomycin was partly (using 2 μ M BAPTA/AM) or strongly diminished (using 4, 6 or 8 μ M BAPTA/AM). Conversely, in FTC-133 cells, pre-incubation with BAPTA/AM (2 to 8 μ M) failed to efficiently reduce the response to 2 μ M ionomycin. This could be explained by the higher $[Ca^{++}]_c$ in response to ionomycin injection in FTC-133 than in RO82 W-1.

Effects of calcium on biogenesis and function of mitochondria in RO82 W-1 thyroid cell line.

We looked for the consequences of cytosolic Ca^{++} level variation on transcription of genes involved in mitochondrial biogenesis and function (figure 4A). After 4 days of intermittent treatment, ionomycin significantly reduced PRC expression by 15 % compared to the control while cytosolic calcium chelation by BAPTA/AM induced opposite effects as PRC expression was significantly increased by 58.5 %. Conversely, neither ionomycin nor BAPTA/AM influenced the PGC-1 α mRNA expression. In addition, mRNA expression of the transcription factors CREB and NRF-1 significantly decreased by 13.9 % and 22.1 % respectively after ionomycin treatment while ERR α expression was unchanged. On contrary, BAPTA/AM induced a significant rise in CREB (+25 %) and ERR α (+33.6 %) expression. Moreover, ionomycin decreased cytochrome *c* expression by 15.7 % while BAPTA/AM increased it by 48.3 %. These results showed that increased $[Ca^{++}]_c$ negatively regulated mitochondrial biogenesis at the transcriptional level for RO82 W-1 cells in an independent manner of PGC-1 α . Moreover, we showed that UCP2 mRNA expression was decreased by 19 % after ionomycin treatment while BAPTA/AM increased it (+24.2 %). Similarly to that observed after BAPTA/AM treatment, PRC, ERR α , cytochrome *c* and UCP2 mRNA expression was significantly increased after treatment of RO82 W-1 cells with both ionomycin and BAPTA/AM (data not shown). Interestingly, the expression of SOD2 (superoxide dismutase 2), involved in detoxification of mitochondrial reactive oxygen species (ROS), significantly increased (+24.2 %) compared to control cells only when both treatments are added to RO82 W-1 cells.

Expression decrease induced by ionomycin treatment for genes involved in mitochondrial biogenesis was associated to a drastic inhibition (-73.5 %) of COX activity in

RO82 W-1 cells while chelation of cytosolic Ca^{++} by BAPTA/AM had no significant effect on COX activity (figure 4B). After treatment with both ionomycin and BAPTA/AM, COX activity was strongly decreased, similarly to that observed after ionomycin treatment. Thus, our results suggested that COX activity was closely dependent on Ca^{++} stores in RO82 W-1 cells.

Cellular programs regulated by nitric oxide and $[\text{Ca}^{++}]_c$ variations in RO82 W-1 thyroid cells.

We examined gene expression pattern after daily treatment of RO82 W-1 cells by SNAP 50 μM or intermittent treatment by ionomycin or BAPTA/AM during 96 h. As summarized in figure 5, after SNAP treatment, 256 genes were differentially expressed compared to control ($P < 0.001$) : 190 were up-regulated and 66 were down-regulated. Gene ontology identified significant functions for up-regulated genes related to apoptosis regulation ($P = 0.022$) and regulation of biological process ($P = 0.027$). Interestingly, LDHAL6A gene expression involved in glycolytic metabolism was highly stimulated by SNAP treatment. In RO82 W-1 cells, 84 genes were differentially expressed ($P < 0.001$) after ionomycin treatment and 176 genes were differentially expressed ($P < 0.001$) after BAPTA/AM treatment. Ionomycin mainly induced up-regulation of genes (82) involved in mitochondrial respiratory chain complex IV ($P = 0.0011$), mitochondrial fission ($P = 0.014$) and G1/S transition of mitotic cell cycle ($P = 0.008$). BAPTA/AM treatment has mainly induced up-regulation of genes (159) involved in signal transduction ($P = 0.0011$) and cell communication ($P = 0.0002$).

Discussion

Mitochondria are involved in several essential cellular functions and their number and functioning are finely regulated. Coactivators of the PGC-1 family are key regulators of mitochondrial biogenesis and function. We have explored two follicular thyroid carcinoma cell lines for their differential mitochondrial richness, metabolic status and PRC/PGC-1 α expression ratio that may constitute suitable models to explore the modulation of mitochondrial biogenesis through both PRC and PGC-1 α pathways.

Here we showed that PRC, PGC-1 α and NRF-1 mRNA expression was increased after 96 h of 50 μM SNAP treatment in both FTC-133 and RO82 W-1 cells. However, this increase was more important in the glycolytic RO82 W-1 cell line than in the oxidative FTC-133 cell

line presenting the lowest basal PRC/PGC-1 α ratio. In addition, PRC expression was more sensitive to NO induction than PGC-1 α . We have previously shown that both ERR α and PRC were necessary to activate gene transcription and mitochondrial biogenesis in these two cell lines (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). Interestingly, SNAP treatment significantly increased ERR α and cytochrome *c* expression in RO82 W-1 presenting the highest level of PRC expression. Considering this model, we postulate that NO-dependent mitochondrial biogenesis was more efficiently induced by PRC, especially when interacting with ERR α . It has been shown that PGC-1 α (Schreiber *et al.*, 2003 ; Mootha *et al.*, 2004 ; Laganière *et al.*, 2004) and PRC (Le Pennec *et al.*, 2009) coactivators were able to induce transcription of *ERR* α . To our knowledge, regulation of transcription of *ERR* α by NO has never been described before.

By competing with oxygen, NO can rapidly and reversibly inhibit COX activity, the terminal enzyme of mitochondrial respiratory chain (Cleeter *et al.*, 1994 ; Moncada and Bolaños, 2006). After 24 h of 50 μ M SNAP treatment, COX activity was similarly reduced in the two thyroid cell lines compared to controls while inhibition was highest in the oxidative cell line at T96. Nevertheless, both basal (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010) and remaining NO-treated COX activities were higher in FTC-133 compared to RO82 W-1. Then, the higher induction of expression of genes involved in mitochondrial biogenesis noticed in RO82 W-1 should be related to the activation of the retrograde pathway by primary defect in mitochondrial ATP production (Butow and Avadhani, 2004). However, if mitochondrial biogenesis induction was higher in the glycolytic cell line presenting very low COX activity, this was not associated with an increase in mitochondrial function as high level of LDH activity persisted after SNAP treatment. Then, if NO was able to preferentially induce mitochondrial biogenesis through a PRC/ERR α pathway in a glycolytic cell line it could not reverse the metabolic pathway of the cells that should confer a relevant growth advantage (Isidoro *et al.*, 2005 ; Lopez-Rios *et al.*, 2007 ; Sánchez-Aragó *et al.*, 2010).

We investigated the effects of intracellular Ca⁺⁺ variations in the glycolytic RO82 W-1 cells. Here, we demonstrated that ionomycin mainly increased [Ca⁺⁺]_c by inducing efflux from the intracellular stores. COX activity was strongly inhibited after ionomycin treatment while unchanged after treatment with the BAPTA/AM cytoplasmic Ca⁺⁺ chelator (Tsien, 1980 ; Michelangeli *et al.*, 1989). Interestingly, COX inhibition was similar when ionomycin or both ionomycin and BAPTA/AM were added, suggesting that ionomycin mainly exerted its effect on calcium store from the mitochondrial matrix. The role of mitochondrial Ca⁺⁺-dependent kinases and phosphatases in the modulation of respiratory complexes activity

have been clearly demonstrated, acting on the phosphorylation status of COX and/or other respiratory complexes (Bender and Kadenbach, 2000 ; Miyazaki *et al.*, 2003). Inhibition of COX by ionomycin in RO82 W-1 cells may result from deregulation of the phosphorylation status. Interestingly, we have previously demonstrated that PRC was able to regulate phosphorylation level of several MAPK (Le Pennec *et al.*, 2009). Our study also revealed that variation in $[Ca^{++}]_c$ level modulated mitochondrial biogenesis through the PRC pathway in RO82 W-1 cells. Chelating cytosolic Ca^{++} by BAPTA/AM increased mRNA expression of PRC, CREB, NRF-1, $ERR\alpha$ and cytochrome *c* whereas ionomycin had transcriptional inhibitory effects. By contrast, PGC-1 α mRNA expression did not vary. Similar results were observed after treatment with ionomycin or both ionomycin and BAPTA/AM. This suggested that in RO82 W-1 cells, calcium may induce decrease in mitochondrial biogenesis by modulating the activity of cytosolic targets which then regulate nuclear genes expression. A rise in $[Ca^{++}]_c$ may activate several Ca^{++} -dependent kinases and phosphatases that ultimately activated a wide variety of transcription factors to produce appropriate cell-specific transcriptional response (Butow and Avadhani, 2004). Among kinases affected by Ca^{++} , Ca^{++} /calmodulin-dependent protein kinase IV (CaMKIV) has been described to regulate PGC-1 α -mediated mitochondrial biogenesis in muscle (Wu *et al.*, 2002). Calcium and CaMK also contribute to activate constitutive NOS like eNOS and subsequently increase NO production. In another cellular model as L₆E₉ myotubes, sarcoplasmic calcium release partly increased mitochondrial biogenesis via NOS pathway (McConell *et al.*, 2010). Here, we showed that treatment of RO82 W-1 thyroid cells with the SNAP NO donor increased mitochondrial biogenesis whereas the rise in $[Ca^{++}]_c$ induced by ionomycin decreased it. This suggested that the CaMK/NOS pathway was not involved in the modulation of mitochondrial biogenesis by calcium. In addition, SNAP was able to increase expression of both PRC and PGC-1 α coactivators while variations in $[Ca^{++}]_c$ only modulated PRC expression. If further studies should be necessary to precise the actors, our results suggested that independent intracellular signaling cascades were involved in the NO and calcium-dependent modulation of mitochondrial biogenesis in thyroid cells.

It has been described that PGC-1 α stimulated mitochondrial biogenesis and respiration in muscle through induction of *UCP2* (Wu *et al.*, 1999). In a previous microarray study on PRC inhibition by siRNA, we noticed that transcription of *UCP2* was positively regulated by PRC in the thyroid oncocytic cell line XTC.UC1 (Le Pennec *et al.*, 2009). Here, in thyroid models expressing both PRC and PGC-1 α , *UCP2* mRNA expression was related to PRC mRNA expression after modulation of NO and calcium intracellular levels. *UCP2* expression

was increased by SNAP only in RO82 W-1 cells presenting the highest level of PRC induction. Variation in $[Ca^{++}]_c$ similarly modulated PRC and UCP2 expression while PGC-1 α expression was unchanged after treatment of RO82 W-1 cells with ionomycin or BAPTA/AM. These results suggested that in follicular thyroid carcinoma cells, the efficiency of the oxidative phosphorylation process may be regulated rather by PRC than by PGC-1 α when endogenous signals like NO and calcium were activated. We have previously shown that the ERR α -PRC complex played a key role in regulation of mitochondrial function in thyroid cells (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). Then, ERR α should be involved in the transcription of *UCP2* mediated by PRC.

In conclusion, our work pointed out a role for nitric oxide and calcium as regulators of the PRC-dependent mitochondrial biogenesis and function, suggesting that these PRC regulating pathways could be potential therapeutic targets for solid tumors presenting metabolic alterations.

Bibliography

- Andersson,U. and Scarpulla,R.C. (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.*, **21**, 3738-3749.
- 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**, 53-63.
- 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**, 130-134.
- Butow,R.A. and Avadhani,N.G. (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol.Cell*, **14**, 1-15.
- Calderon-Cortes,E., Cortes-Rojo,C., Clemente-Guerrero,M., Manzo-Avalos,S., Villalobos-Molina,R., Boldogh,I., and Saavedra-Molina,A. (2008) Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age. *Mitochondrion.*, **8**, 262-272.
- 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**, 50-54.
- Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O., and Botstein,D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **95**, 14863-14868.
- Freyssenet,D., Irrcher,I., Connor,M.K., Di Carlo,M., and Hood,D.A. (2004) Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **286**, C1053-C1061.
- Gleyzer,N., Vercauteren,K., and Scarpulla,R.C. (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol.Cell Biol.*, **25**, 1354-1366.
- Harris,D.A. and Das,A.M. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem.J.*, **280 (Pt 3)**, 561-573.
- Irrcher,I., Adhietty,P.J., Sheehan,T., Joseph,A.M., and Hood,D.A. (2003) PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **284**, C1669-C1677.
- Isidoro,A., Casado,E., Redondo,A., Acebo,P., Espinosa,E., Alonso,A.M., Cejas,P., Hardisson,D., Fresno Vara,J.A., Belda-Iniesta,C., Gonzalez-Baron,M., and Cuezva,J.M. (2005) Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis*, **26**, 2095-2104.

- Laganiere, J., Tremblay, G.B., Dufour, C.R., Giroux, S., Rousseau, F., and Giguere, V. (2004) A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) promoter dictates peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha control of ERRalpha expression. *J.Biol.Chem.*, **279**, 18504-18510.
- Le Pennec, S., Raharijaona, M., Poirier, J., Mirebeau-Prunier, D., Rouxel, C., Jacques, C., Fontaine, J.F., Malthiery, Y., Houlgatte, R., and Savagner, F. (2009) PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocytic thyroid tumours. *PLoS.One.*, **4**, e7964.
- Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A.D., Berrendero, J.R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C., and Cuezva, J.M. (2007) Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.*, **67**, 9013-9017.
- McConnell, G.K., Ng, G.P., Phillips, M., Ruan, Z., Macaulay, S.L., and Wadley, G.D. (2010) Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. *J.Appl.Physiol*, **108**, 589-595.
- Mercy, L., Pauw, A., Payen, L., Tejerina, S., Houbion, A., Demazy, C., Raes, M., Renard, P., and Arnould, T. (2005) Mitochondrial biogenesis in mtDNA-depleted cells involves a Ca²⁺-dependent pathway and a reduced mitochondrial protein import. *FEBS J.*, **272**, 5031-5055.
- Michelangeli, F., Ruiz, M.C., Fernandez, E., and Ciarrocchi, A. (1989) Role of Ca²⁺ in H⁺ transport by rabbit gastric glands studied with A23187 and BAPTA, an incorporated Ca²⁺ chelator. *Biochim.Biophys.Acta*, **983**, 82-90.
- Mirebeau-Prunier, D., Le Pennec, S., Jacques, C., Gueguen, N., Poirier, J., Malthiery, Y., and Savagner, F. (2010) Estrogen-related receptor alpha and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria. *FEBS J.*, **277**, 713-725.
- 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**, 709-718.
- Moncada, S. and Bolanos, J.P. (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J.Neurochem.*, **97**, 1676-1689.
- Mootha, V.K., Handschin, C., Arlow, D., Xie, X., St-Pierre, J., Sihag, S., Yang, W., Altshuler, D., Puigserver, P., Patterson, N., Willy, P.J., Schulman, I.G., Heyman, R.A., Lander, E.S., and Spiegelman, B.M. (2004) Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101**, 6570-6575.
- Moreno-Sanchez, R. (1985) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **260**, 12554-12560.
- Nisoli, E., Clementi, E., Paolucci, C., Cozzi, V., Tonello, C., Sciorati, C., Bracale, R., Valerio, A., Francolini, M., Moncada, S., and Carruba, M.O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, **299**, 896-899.

- Nisoli,E., Falcone,S., Tonello,C., Cozzi,V., Palomba,L., Fiorani,M., Pisconti,A., Brunelli,S., Cardile,A., Francolini,M., Cantoni,O., Carruba,M.O., Moncada,S., and Clementi,E. (2004) Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 16507-16512.
- 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 Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, **283**, E1040-E1045.
- Ojuka,E.O., Jones,T.E., Han,D.H., Chen,M., and Holloszy,J.O. (2003) Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.*, **17**, 675-681.
- Papa,S., Sardanelli,A.M., Cocco,T., Speranza,F., Scacco,S.C., and Technikova-Dobrova,Z. (1996) The nuclear-encoded 18 kDa (IP) AQDQ subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.*, **379**, 299-301.
- Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., and Spiegelman,B.M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, **92**, 829-839.
- Rustin,P., Munnich,A., and Rotig,A. (2004) Mitochondrial respiratory chain dysfunction caused by coenzyme Q deficiency. *Methods Enzymol.*, **382**, 81-88.
- Sanchez-Arago,M., Chamorro,M., and Cuezva,J.M. (2010) Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis*, **31**, 567-576.
- Scarpulla,R.C. (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.*, **88**, 611-638.
- Schreiber,S.N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T., and Kralli,A. (2003) The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J.Biol.Chem.*, **278**, 9013-9018.
- Tsien,R.Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, **19**, 2396-2404.
- Tusher,V.G., Tibshirani,R., and Chu,G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 5116-5121.
- Vercauteren,K., Pasko,R.A., Gleyzer,N., Marino,V.M., and Scarpulla,R.C. (2006) PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol.Cell Biol.*, **26**, 7409-7419.
- Vercauteren,K., Gleyzer,N., and Scarpulla,R.C. (2008) PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *J.Biol.Chem.*, **283**, 12102-12111.

Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., and Williams,R.S. (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, **296**, 349-352.

Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., and Spiegelman,B.M. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98** , 115-124.

Zeeberg,B.R., Feng,W., Wang,G., Wang,M.D., Fojo,A.T., Sunshine,M., Narasimhan,S., Kane,D.W., Reinhold,W.C., Lababidi,S., Bussey,K.J., Riss,J., Barrett,J.C., and Weinstein,J.N. (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.*, **4**, R28.

Figure 1 :

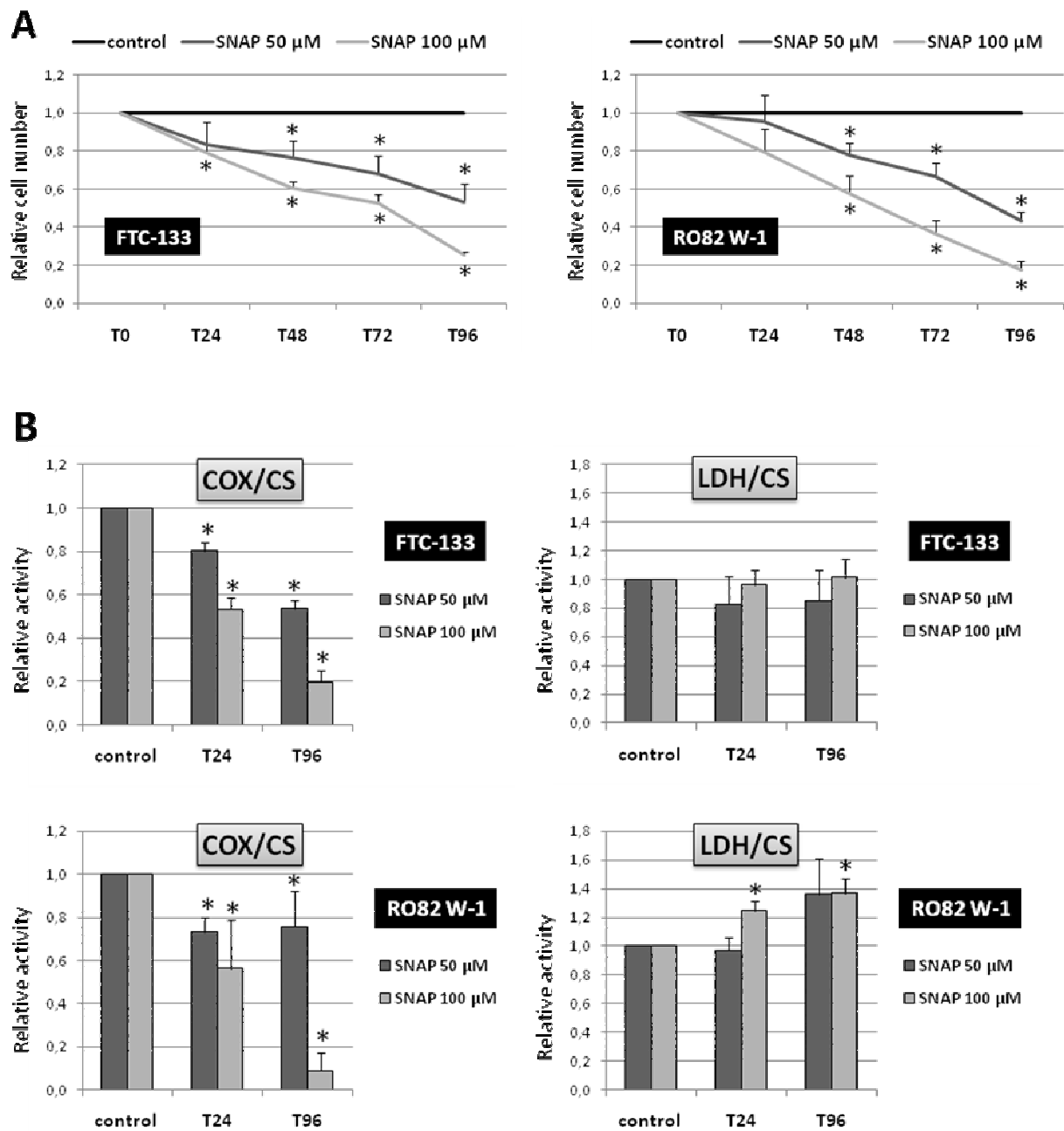


Figure 2 :

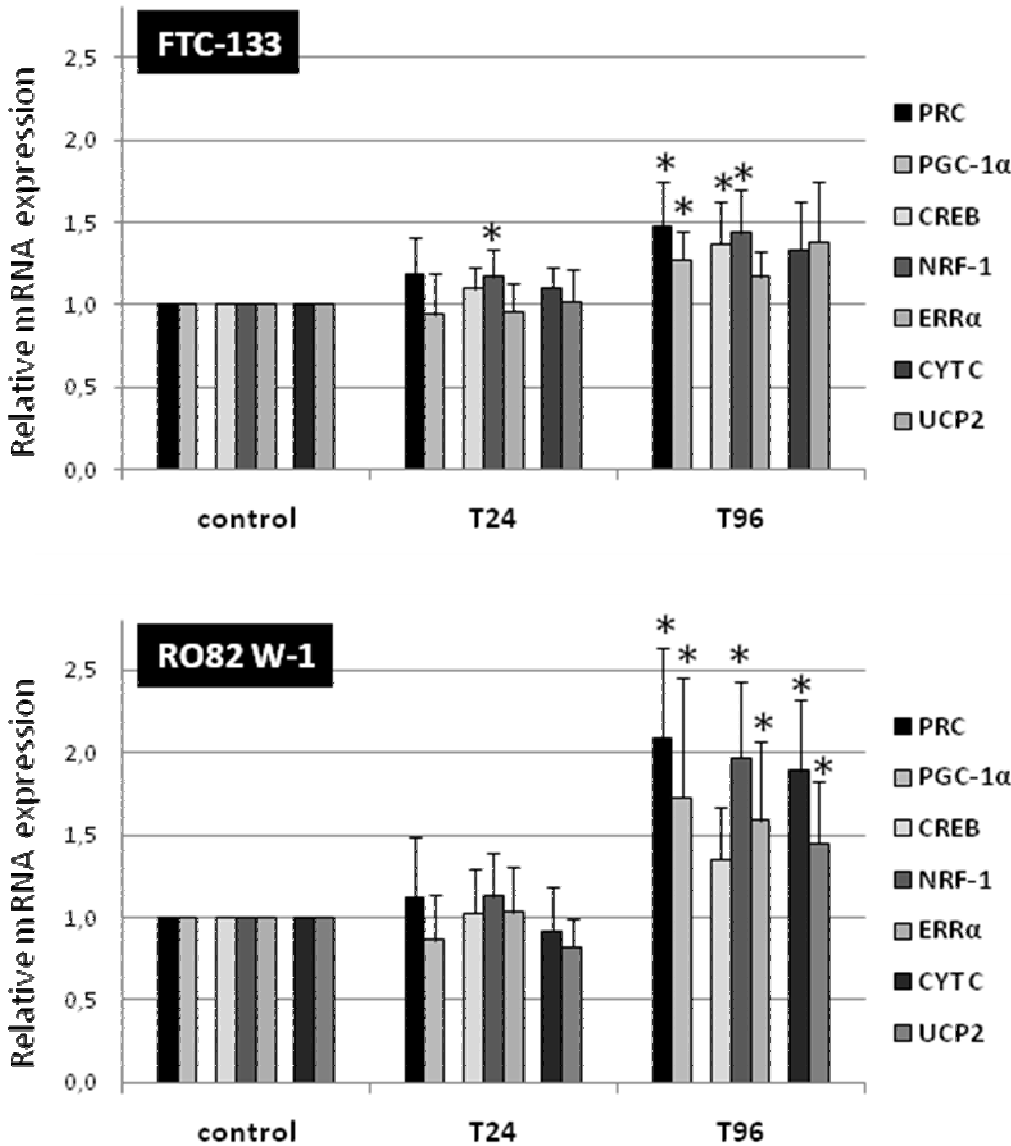


Figure 3 :

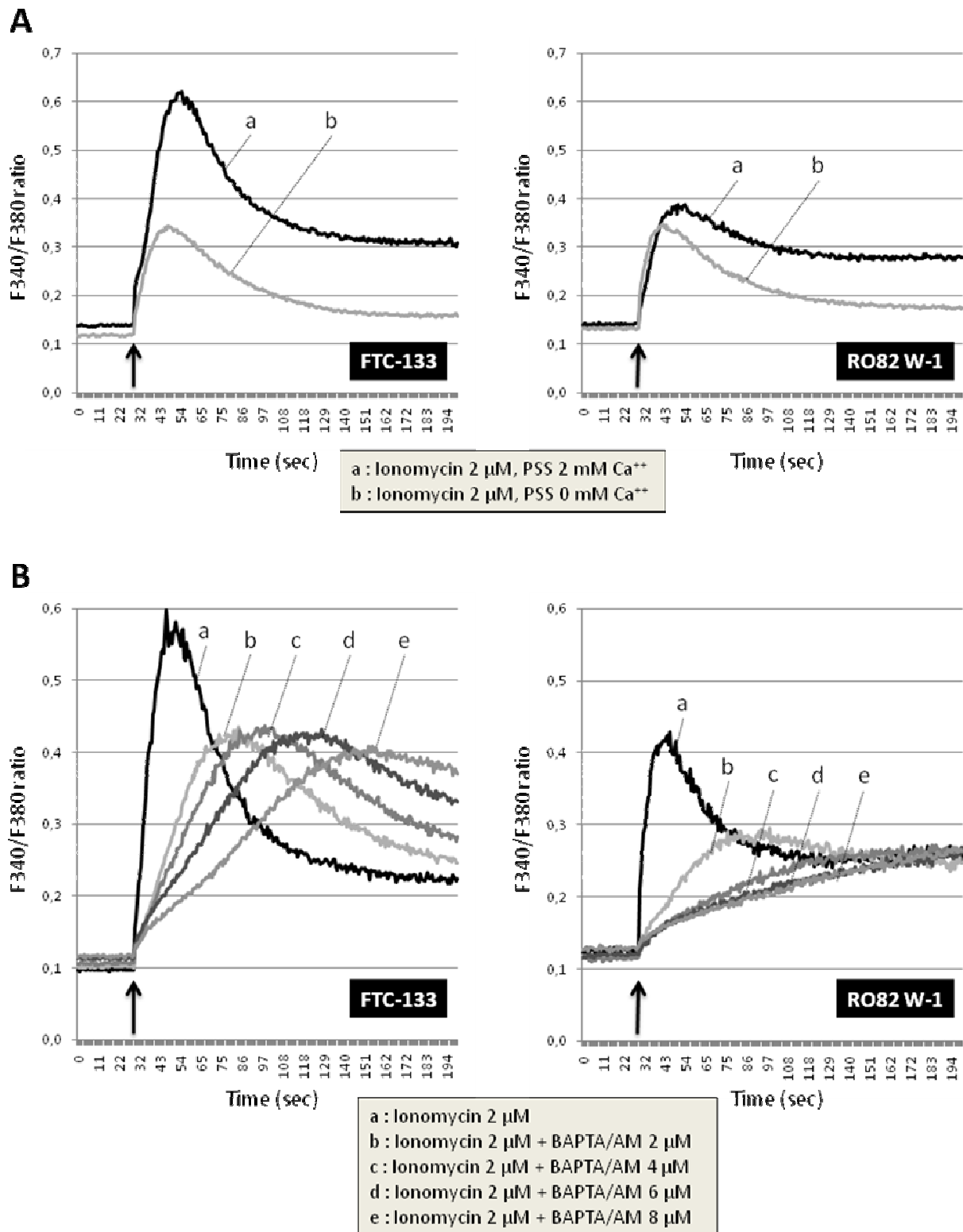


Figure 4 :

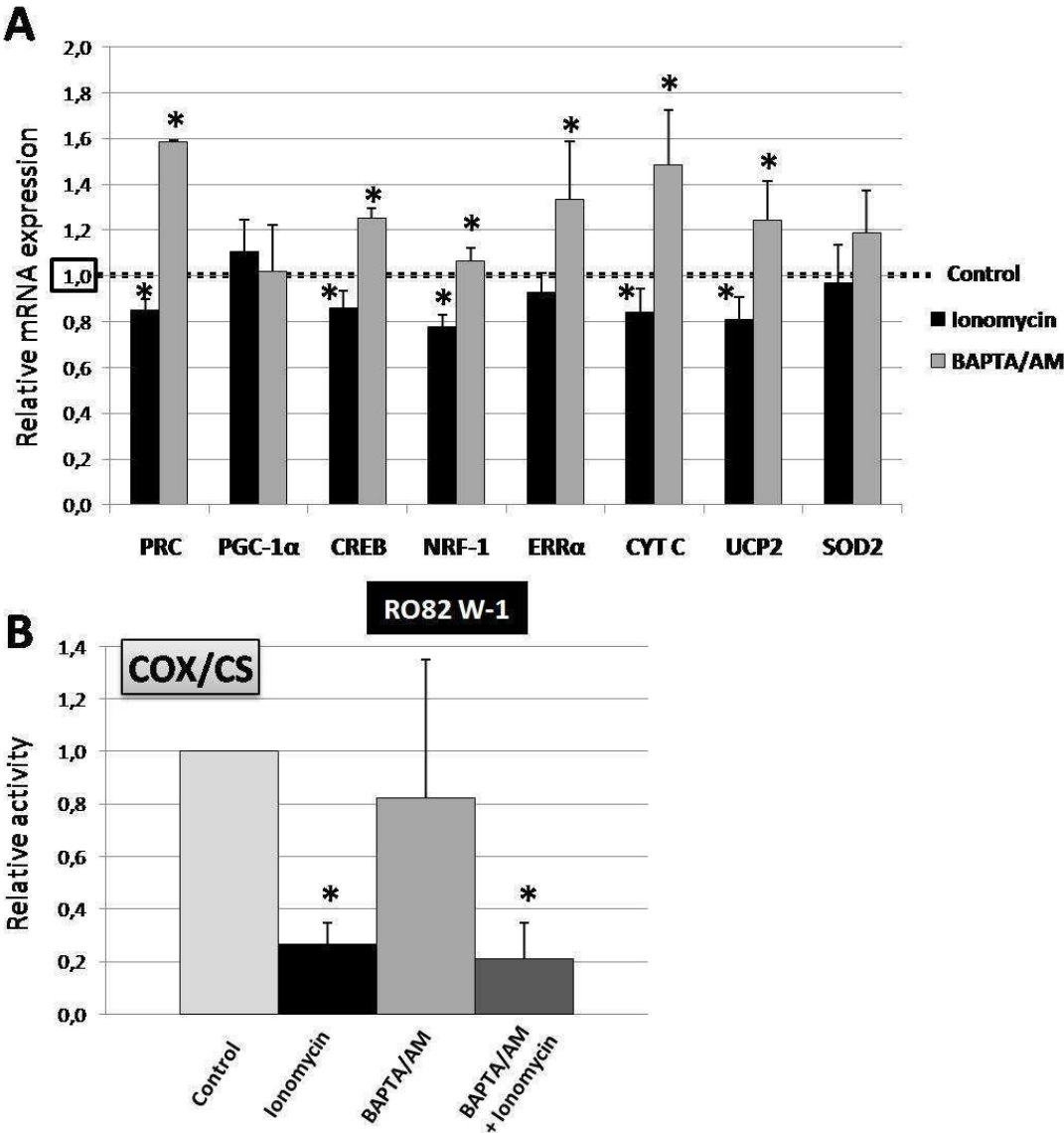
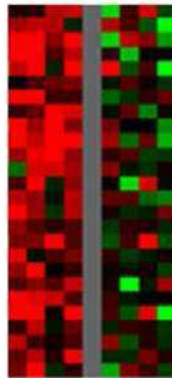


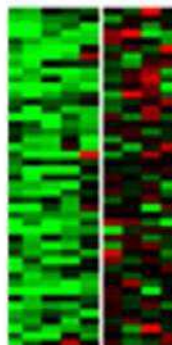
Figure 5 :

SNAP control



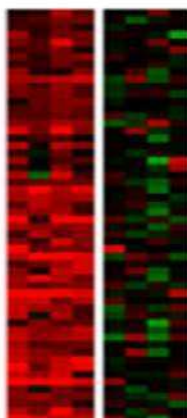
Functional annotations	P-value
Regulation of apoptosis	0.022
Regulation of biological process	0.027
Cellular development process	0.038
Response to endogenous stimuli	0.045

Control Ionomycin



Functional annotations	P-value
Telomere maintenance via recombination	0.0011
Mitochondrial respiratory chain complex IV	0.0011
G1 phase of mitotic cell cycle	0.008
Mitochondrial fission	0.014
Phospholipase C activation	0.012
Response to stress	0.014
Negative regulation of angiogenesis	0.012

BAPTA/AM control



Functional annotations	P-value
Cell activation	0.0001
Cell communication	0.0002
Signal transduction	0.0011
Positive regulation of biological process	0.014
Calcium dependent protein binding	0.012

Figure 1 : Cell proliferation and enzymatic activities of COX and LDH after SNAP treatment of FTC-133 and RO82 W-1 cells.

FTC-133 and RO82 W-1 cells were treated once a day with SNAP 50 μ M, SNAP 100 μ M or the equivalent volumes of DMSO (control) during 24 h to 96 h.

A : Cell proliferation was analyzed by direct cells counting. Data are expressed relative to the control, assigned to the value of 1. Values are the averages \pm SEM for six separate determinations. * $P < 0.05$ versus control.

B : Enzymatic activities of COX and LDH were measured and values were normalized to enzymatic activity of CS and expressed relative to the control, assigned to the value of 1. Values are the averages \pm SEM for at least five separate determinations. * $P < 0.05$ versus control.

Figure 2 : Genes expression after 50 μ M SNAP treatment of FTC-133 and RO82 W-1 cells.

FTC-133 and RO82 W-1 cells were treated once a day with SNAP 50 μ M or the equivalent volume of DMSO (control) during 24 h or 96 h. Nuclear genes expression was monitored by quantitative real time PCR. The genes examined represent coactivators (PRC and PGC-1 α), transcription factors (CREB, NRF-1 and ERR α), cytochrome *c* (CYT C) and UCP2. Data are expressed in relative units (mRNA copies number of a specific gene normalized to beta 2 microglobulin mRNA copies number) and expressed relative to the control, assigned to the value of 1. Values are the averages \pm SEM for six separate determinations. * $P < 0.05$ versus control.

Figure 3 : Free intracellular Ca⁺⁺ measurement in FTC-133 and RO82 W-1 cells.

Cells were loaded with 5 μ M of fura-2/AM and 0.1 % of pluronic acid F-127 in PSS/BSA buffer during 40 minutes at 37°C, and cell fluorescence was then measured.

A : Cell fluorescence was measured before and after ionomycin injection (arrows represent ionomycin injection) in cells incubated in PSS containing 2 (a) or 0 mM Ca⁺⁺ (b).

B : Cell fluorescence was measured before and after ionomycin injection (arrows represent ionomycin injection) in cells incubated in PSS 2 mM Ca⁺⁺ without (a) or with BAPTA/AM (b, c, d, e) treatment during 40 minutes.

Data are expressed as ratio of fluorescence intensity, F340/F380, and are representative of 6 independent experiments.

Figure 4 : Genes expression and COX activity after ionomycin or BAPTA/AM treatments of RO82 W-1 cells.

RO82 W-1 cells were incubated with either 2 μ M ionomycin, 2 to 8 μ M BAPTA/AM, or both treatments compared to equivalent volumes of DMSO (control) five hours a day during 4 days. To avoid cell death due to toxic effects of intracellular Ca^{++} ions chelation, BAPTA/AM concentration was adjusted to cell density for each day of treatment : 2 μ M the first day, 4 μ M the second day, 6 μ M the third day and 8 μ M the fourth day.

A : Nuclear genes expression was monitored by quantitative real time PCR. The genes explored represent coactivators (PRC and PGC-1 α), transcription factors (CREB, NRF-1 and ERR α), cytochrome *c* (CYT C), UCP2 and SOD2. Data are expressed in relative units (mRNA copies number of a specific gene normalized to beta 2 microglobulin mRNA copies number) and expressed relative to the control, assigned to the value of 1. Values are the averages \pm SEM for at least three separate determinations. * $P < 0.05$ versus control.

B : Enzymatic activity of COX was measured and values were normalized to enzymatic activity of CS and expressed relative to the control, assigned to the value of 1. Values are the averages \pm SEM for at least five separate determinations. * $P < 0.05$ versus control.

Figure 5 : Differential genes and ontologies associated with SNAP, ionomycin and BAPTA/AM treatments of RO82 W-1 cells.

RO82 W-1 cells were daily incubated with 50 μ M SNAP or incubated five hours a day with either 2 μ M ionomycin or 2 to 8 μ M BAPTA/AM compared to equivalent volumes of DMSO (control) during 4 days. To avoid cell death due to toxic effects of intracellular Ca^{++} ions chelation, BAPTA/AM concentration was adjusted to cell density for each day of treatment : 2 μ M the first day, 4 μ M the second day, 6 μ M the third day and 8 μ M the fourth day. For each treatment, differential genes (EASE and gene set analyses, $P < 0.0002$) and ontologies (GoMiner) between treated cells and control are indicated.

Travail complémentaire

La TSH joue un rôle primordial dans le contrôle de la fonction thyroïdienne. La fixation de cette hormone à son récepteur, le TSHR, participe à la différenciation et à la prolifération des thyrocytes. Le facteur de transcription CREB est impliqué dans cette réponse proliférative. De nombreux stimuli peuvent induire l'activation de cette protéine suite à sa phosphorylation au niveau de la sérine 133 par le biais de kinases telles que la PKA (activée par l'AMPc) et la PKC (Johannessen *et al.*, 2004). Par le biais des coactivateurs PGC-1 α et PRC, CREB régule également l'expression de gènes codant pour des protéines mitochondriales telles que le cytochrome *c* (Vercauteren *et al.*, 2006 ; Scarpulla, 2008a). Nous avons montré que l'expression de CREB et de divers facteurs induisant la biogenèse mitochondriale était modulée par les seconds messagers NO et Ca⁺⁺ dans les lignées de carcinomes folliculaires thyroïdiens étudiées au laboratoire. Dans ce contexte, nous avons étudié les effets éventuels de la TSH sur l'induction de la biogenèse mitochondriale dans le modèle thyroïdien FTC-133.

Les cellules XTC.UC1 répondent à la présence de TSH par une augmentation de la concentration intracellulaire en AMPc ainsi que par l'invasion et la prolifération cellulaires (Zielke *et al.*, 1998). De plus, nous avons constaté que la culture de cette lignée sous 10 mU/ml de TSH permettait de conserver la polarité des cellules avec formation de follicules (figure R5). La lignée XTC.UC1 présente donc les caractéristiques d'un carcinome thyroïdien bien différencié riche en mitochondries. Au laboratoire, afin de conserver ces caractéristiques, les cellules XTC.UC1 sont cultivées dans du milieu additionné de TSH (10 mU/ml). En revanche, les cellules FTC-133 et RO82 W-1 sont cultivées en absence de TSH, en accord avec les recommandations de l'institut nous ayant fourni ces cellules. Nous avons alors voulu étudier les effets de la TSH sur ces deux lignées, en particulier la capacité de cette hormone à induire la biogenèse mitochondriale.

L'ajout de faibles concentrations de TSH induit l'invasion et la prolifération des cellules FTC-133 (Hoelting *et al.*, 1993). Cependant, cette action de la TSH semble impliquer la kinase PKC plutôt que la PKA. Demeure et ses collaborateurs ont montré que, malgré la présence de l'ARNm du TSHR et l'absence de mutation en position 201 de G_{as}, le taux d'AMPc intracellulaire et l'expression de la protéine G_{as} ne sont pas modifiés par la TSH dans les cellules FTC-133, suggérant que la voie de signalisation TSH/G_{as}/AMPc n'est pas fonctionnelle dans cette lignée (Demeure *et al.*, 1997). En revanche, à notre connaissance,

aucune donnée n'est disponible à ce sujet concernant les cellules RO82 W-1. Après avoir vérifié la présence du transcrite et de la protéine TSHR, par RT-PCR quantitative et Western-Blot, nous avons donc voulu, dans un premier temps, nous assurer de la fonctionnalité du récepteur à la TSH dans ces lignées. Pour cela, nous avons évalué le niveau de phosphorylation de CREB (par quantification de la forme phosphorylée au niveau de la sérine en position 133 et de la forme non phosphorylée de cette protéine, par la méthode ELISA) suite à l'incubation des cellules avec de la TSH (10 mU/ml) pendant 24 heures. L'ajout de TSH induit une augmentation significative du ratio phospho-CREB(pSer¹³³)/CREB uniquement dans les cellules FTC-133 (+22,6 %) (figure R6A). Le récepteur à la TSH ne semble donc pas fonctionnel dans les cellules RO82 W-1. C'est pourquoi, nous avons poursuivi notre étude exclusivement sur les cellules FTC-133.

Afin de déterminer si la TSH régule la biogenèse mitochondriale dans ce modèle de carcinome folliculaire thyroïdien humain, nous avons incubé les cellules FTC-133 en présence de TSH (10 mU/ml) pendant 4 jours. Suite à ce traitement, le niveau d'expression de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale et la détoxification des EROs a été quantifié par RT-PCR quantitative. L'ajout de TSH n'a entraîné aucune modification significative de l'expression des transcrits des coactivateurs PRC et PGC-1 α , des facteurs de transcription CREB, NRF-1 et ERR α ainsi que du cytochrome *c* par rapport aux cellules « contrôle » non traitées (figure R6B). Dans les cellules thyroïdiennes normales, en réponse à la TSH, la synthèse des hormones thyroïdiennes induit la production de grandes quantités de peroxyde d'hydrogène H₂O₂ et d'EROs. Les thyrocytes possèdent de nombreux systèmes de défense contre les EROs. Kim et ses collaborateurs ont montré que, dans les cellules de rat FRTL-5, la TSH régule l'expression du TSA (Thiol-Specific Antioxidant) au niveau transcriptionnel (Kim *et al.*, 2001). Les protéines UCP2 et SOD2 jouent un rôle important dans la détoxification des EROs produits par la mitochondrie. Dans notre étude, l'ajout de TSH aux cellules FTC-133 n'a entraîné aucune variation significative de l'expression des ARNm de l'UCP2 et de la SOD2 (figure R6B). Des expériences complémentaires ont été réalisées en utilisant différentes concentrations de TSH (1, 10 et 100 mU/ml) pendant une période plus longue (10 jours). Aucune variation de l'expression des transcrits des facteurs jouant un rôle dans la biogenèse mitochondriale n'a été observée suite aux différents traitements dans les cellules FTC-133. Ces résultats suggèrent donc que la TSH n'influence pas la transcription de gènes impliqués dans la biogenèse mitochondriale dans le modèle cellulaire thyroïdien FTC-133.

Conclusions et perspectives

Le but de mon projet de thèse était de mieux caractériser les voies de régulation de la fonction mitochondriale dans les modèles de tumeurs thyroïdiennes. Les coactivateurs de la famille PGC-1 (PGC-1 α , PGC-1 β et PRC) sont les régulateurs majeurs de la biogenèse et du fonctionnement des mitochondries. Dans les lignées cellulaires thyroïdiennes, PGC-1 α est très faiblement exprimé par rapport au coactivateur PRC. Si le niveau d'expression de ces deux coactivateurs est proportionnel à la masse mitochondriale, leur ratio d'expression (PRC/PGC-1 α) varie selon le modèle cellulaire (Mirebeau-Prunier *et al.*, 2010). Les lignées thyroïdiennes constituent donc de bons modèles d'étude des facteurs et des voies de signalisation intracellulaire impliqués dans le dialogue nucléo-mitochondrial.

Le coactivateur PGC-1 α a été largement étudié par de nombreuses équipes. En revanche, les propriétés de PRC et les fonctions cellulaires auxquelles il participe sont nettement moins connues. Dans le modèle oncocytaire thyroïdien XTC.UC1 riche en mitochondries, l'expression de PGC-1 α est très faible et n'est pas induite lorsque l'expression de PRC est réprimée. Dans la première partie de mon travail sur la lignée XTC.UC1, l'analyse des modifications transcriptionnelles et fonctionnelles suite à l'inhibition de PRC par siRNA, a permis de préciser les fonctions régulées par ce coactivateur. Notre étude a montré notamment le rôle clef de PRC dans le processus de phosphorylation oxydative. En effet, l'inhibition de PRC entraîne une baisse rapide (dès 24 h) de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire associée à une diminution importante de l'expression protéique de sous-unités des complexes I, II et IV ainsi qu'à la diminution de la quantité d'ATP cellulaire. L'expression du gène mitochondrial *COII* et du gène nucléaire *COX5B* codant pour des sous-unités du complexe IV est également diminuée de moitié dès 24 h de traitement par le siRNA PRC. Ces résultats sont en accord avec les données de l'équipe de Scarpulla obtenues après avoir inhibé PRC de manière chronique par shRNA dans des cellules d'ostéosarcome humain U2OS dépourvues de PGC-1 α (Vercauteren *et al.*, 2009), impliquant PRC comme régulateur majeur du fonctionnement et de la biogenèse des mitochondries dans les cellules où PGC-1 α est absent ou très faiblement exprimé. L'expression du gène nucléaire *COX15*, codant pour une sous-unité du complexe IV impliquée dans l'assemblage et la fonction catalytique de ce complexe, est corrélée à l'activité de la COX : une augmentation est observée après 24 h alors que la diminution de l'activité du complexe IV après 48 h de traitement est associée à une diminution drastique de l'expression de l'ARNm de COX15 dans les cellules XTC.UC1. De plus, l'inhibition de PRC par siRNA induit une diminution de la quantité d'ADNmt. Par ailleurs, suite à l'inhibition de PRC, la diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et de la quantité d'ATP s'accompagne d'un accroissement important du potentiel

de membrane mitochondrial, suggérant que, tout comme le coactivateur PGC-1 α (Puigserver *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 1999), PRC régule l'efficacité de la phosphorylation oxydative en modulant la transcription de gènes codant pour des protéines découplantes. Cette hypothèse a été vérifiée par l'analyse transcriptomique de l'inhibition de PRC par siRNA : l'expression d'*UCP2* est diminuée dès 24 h de traitement. Mootha et ses collaborateurs ont montré que PGC-1 α régulait fortement l'expression de très nombreux gènes impliqués dans le fonctionnement de la phosphorylation oxydative (Mootha *et al.*, 2003). Nos résultats indiquent que PRC semble moduler le fonctionnement de la chaîne respiratoire de manière plus fine, en régulant plus spécifiquement la transcription de certains gènes clefs, tels que *COX15* et *UCP2*, codant pour des protéines essentielles au fonctionnement de la phosphorylation oxydative.

Contrairement à PGC-1 α , l'expression de PRC est ubiquitaire et est induite par des signaux mitotiques (Andersson et Scarpulla, 2001). L'inhibition de PRC par siRNA entraîne une diminution de la prolifération des cellules XTC.UC1. De plus, deux groupes de gènes exprimés de manière différentielle entre le contrôle et le siRNA PRC sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (progression du cycle cellulaire, régulation de la phase S et régulation de la phase M notamment), confirmant le rôle de PRC dans la régulation du cycle cellulaire. Actuellement, le mécanisme par lequel l'inhibition de PRC perturbe le déroulement du cycle cellulaire n'est pas bien compris. Cela pourrait toucher des régulateurs du cycle cellulaire contrôlant la progression des transitions G1/S et G2/M tels que les protéines kinases dépendantes des cyclines. Il a été montré que la cycline D1 coordonnait la réplication de l'ADN et la fonction mitochondriale (Wang *et al.*, 2007). La cycline D1 inhibe en effet l'expression et l'activité de NRF-1 par l'intermédiaire de la kinase dépendante de cette cycline qui phosphoryle NRF-1 au niveau de la sérine en position 47. D'autres études ont associé CREB et les NRFs à la régulation de gènes impliqués à la fois dans le métabolisme énergétique et le cycle cellulaire (Vercauteren *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2007 ; Crook *et al.*, 2008). Au cours de notre travail, une étude par bioinformatique de prédiction des facteurs de transcription pouvant réguler des « clusters » de gènes a révélé la présence de sites de reconnaissance pour NRF-1, NRF-2, CREB et ERR α avec une fréquence élevée au niveau des promoteurs des gènes corégulés par PRC. Ces « clusters » de gènes étaient impliqués dans le fonctionnement mitochondrial et le déroulement du cycle cellulaire. Les résultats de notre étude suggèrent donc que PRC coordonne les phases du cycle cellulaire selon le métabolisme mitochondrial, par des interactions avec ces différents facteurs de transcription. La technique de ChIP-chip (Chromatin ImmunoPrecipitation on chip), qui combine la technique

d'immunoprécipitation de la chromatine et la technique des puces à ADN, permet de mettre en évidence la fixation de différents facteurs de transcription au niveau des promoteurs de gènes. Des expériences de ChIP-chip sont en cours au sein de l'unité INSERM U915 (Rémi Houlgatte, Nantes) afin de valider les interactions physiques entre les facteurs de transcription NRF-1, NRF-2, CREB et ERR α , le coactivateur PRC et les gènes impliqués dans les voies de régulation de la prolifération mitochondriale et du cycle cellulaire.

Au laboratoire, une première étude a permis d'observer une forte corrélation de l'expression de PRC et d'ERR α après induction par le sérum dans des cellules thyroïdiennes en culture. Vercauteren et ses collaborateurs ont montré qu'ERR α pouvait interagir avec le coactivateur PRC (Vercauteren *et al.*, 2008). L'analyse transcriptomique de l'inhibition de PRC par siRNA a par ailleurs révélé que, tout comme PGC-1 α (Schreiber *et al.*, 2003 ; Mootha *et al.*, 2004 ; Laganière *et al.*, 2004), PRC régulait positivement la transcription d'ERR α . Toutes ces données suggèrent un rôle de PRC en partenariat privilégié avec le facteur de transcription ERR α pour réguler le fonctionnement mitochondrial. Les résultats obtenus dans la deuxième partie de ce travail ont confirmé cette hypothèse. En effet, dans les cellules thyroïdiennes RO82 W-1 pauvres en mitochondries et présentant une faible expression de PRC et d'ERR α , la surexpression d'ERR α induit la transcription de gènes beaucoup plus efficacement quand PRC est également surexprimé. De plus, l'induction conjointe d'ERR α et de PRC est nécessaire pour augmenter significativement l'activité de la COX ainsi que l'expression protéique de la sous-unité COXII de cette enzyme. La surexpression de ces facteurs induit aussi une augmentation de l'activité de la citrate synthase, enzyme du cycle de Krebs souvent utilisée dans la littérature comme marqueur de la masse mitochondriale. Ces deux facteurs agissent donc ensemble pour coordonner les activités de la COX et de la citrate synthase. Dans les cellules thyroïdiennes FTC-133 riches en mitochondries, présentant une expression élevée de PRC et d'ERR α et synthétisant leur ATP principalement par le biais de la phosphorylation oxydative, l'inhibition conjointe d'ERR α et de PRC diminue de moitié la consommation basale d'oxygène. Cette diminution est due à une baisse de l'efficacité de la respiration phosphorylante, c'est à dire de la proportion d'oxygène utilisée pour la synthèse d'ATP. Le complexe ERR α -PRC agit donc comme un régulateur clef de la phosphorylation oxydative. Nous avons vu que le complexe ERR α -PRC activait la transcription génique ; il serait intéressant de vérifier si la régulation du fonctionnement de la chaîne respiratoire par ce complexe passe par une modulation de l'ensemble des complexes et des acteurs impliqués dans la biogenèse mitochondriale ou par la régulation de gènes cibles

codant pour des protéines clefs de la respiration mitochondriale telles que le cytochrome *c* ou certaines sous-unités de la COX.

Un des objectifs de mon travail était d'identifier les signaux endogènes contrôlant l'expression du coactivateur PRC. Les résultats présentés dans les articles 1 et 3 indiquent que, dans les modèles de carcinomes folliculaires thyroïdiens, le monoxyde d'azote est capable d'activer la biogenèse mitochondriale par le biais du facteur PRC. Le traitement des cellules XTC.UC1 avec le donneur de NO SNAP, nous a permis de mettre en évidence que le NO pouvait, par son action activatrice sur la PKG, induire la transcription de *PRC*, *NRF-1*, *TFAM* et *COX5B*, impliqués dans la biogenèse mitochondriale. La NOS endothéliale est capable de libérer de faibles concentrations de NO. Il a été montré que le NO produit de manière endogène par la eNOS jouait un rôle dans la biogenèse mitochondriale dépendante de la GMPc (Nisoli *et al.*, 2003). Dans les oncocytes et les cellules XTC.UC1, riches en mitochondries, la eNOS est la seule NOS surexprimée (Savagner *et al.*, 2003 ; Baris *et al.*, 2004 ; Baris *et al.*, 2005), suggérant que le NO produit par la eNOS puisse jouer un rôle majeur dans la prolifération mitochondriale de ces tumeurs. Cette hypothèse pourra être vérifiée en étudiant les conséquences d'une réduction de l'expression de la eNOS (par siRNA) ou d'une inhibition de l'activité de cette enzyme (grâce au L-NAME) sur la prolifération mitochondriale dans les cellules XTC.UC1.

La voie rétrograde de dialogue entre la mitochondrie et le noyau semble également être impliquée dans l'induction de la biogenèse mitochondriale par le NO. Après 96 h de traitement par le SNAP, l'expression des transcrits de PRC, PGC-1 α et NRF-1 est augmentée dans les lignées FTC-133 et RO82 W-1, l'induction de PRC étant plus importante que celle de PGC-1 α . Néanmoins, l'expression de ces facteurs est deux fois plus importante dans la lignée glycolytique RO82 W-1 que dans la lignée oxydative FTC-133. Ceci est accompagné d'une augmentation significative de l'expression des ARNm du cytochrome *c*, composant essentiel au fonctionnement de la chaîne respiratoire, et du facteur de transcription ERR α uniquement dans les cellules RO82 W-1 pour lesquelles le ratio d'expression basale PRC/PGC-1 α est le plus élevé (deux fois plus que dans la lignée FTC-133). Dans ces lignées, le NO semble donc induire la biogenèse mitochondriale plus efficacement par le biais de PRC que de PGC-1 α . Le traitement des cellules FTC-133 et RO82 W-1 par le SNAP entraîne également une inhibition de la COX dès 24 h de traitement, avec un effet inhibiteur plus important par rapport au contrôle après 96 h dans la lignée oxydative FTC-133 que dans la lignée glycolytique RO82 W-1. Cependant, l'activité basale de la COX ainsi que son activité résiduelle après inhibition par le NO sont beaucoup plus faibles dans les cellules RO82 W-1 que dans les

FTC-133. Le niveau d'induction de la biogenèse mitochondriale étant fonction de la « faiblesse » de l'activité résiduelle de la COX, la biogenèse mitochondriale induite par le NO semble donc être le résultat d'un dialogue rétrograde entre la mitochondrie et le noyau. En inhibant l'activité de la COX, le NO peut augmenter l'état de réduction de la chaîne de transport des électrons, intensifiant ainsi les niveaux de fuite d'électrons et la production de superoxyde (Brookes *et al.*, 2002). Au sein de la matrice mitochondriale, le superoxyde peut être dismuté en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ par la superoxyde dismutase SOD2 ou encore réagir avec le NO pour former du peroxynitrite ONOO⁻. Une fois dans le cytoplasme, ces espèces réactives peuvent induire l'activation de voies de signalisation sensibles au statut redox de la cellule et modifier ainsi l'expression de facteurs contrôlant le nombre et l'activité des mitochondries. L'activité de NRF-1 et NRF-2 notamment est modulée par de telles modifications du statut redox (Finley et Haigis, 2009). Au cours de ce travail, j'ai observé une augmentation significative de l'expression de la SOD2 suite au traitement des lignées thyroïdiennes par le SNAP (cette augmentation étant plus importante dans les cellules RO82 W-1 que dans les cellules FTC-133), suggérant la production d'espèces réactives. Cette production pourrait constituer, au moins en partie, le signal d'initiation de la voie rétrograde du dialogue nucléo-mitochondrial conduisant à l'induction, par l'intermédiaire de PRC, de la biogenèse mitochondriale observée dans notre étude. Les résultats de notre première étude renforcent cette hypothèse. En effet, nous avons montré que la transcription de gènes modulant l'activité des MAPKs et le statut de phosphorylation – et donc d'activation – de ces protéines étaient régulés par le coactivateur PRC. Parmi les cibles hypophosphorylées suite à l'inhibition de PRC par siRNA figurent des protéines impliquées dans la voie de signalisation impliquant la kinase ASK1 dont l'activité est induite par le stress oxydant (Matsuzawa et Ichijo, 2008). Ceci suggère que l'expression et l'activité de PRC puissent être sensibles au statut redox de la cellule.

Un des objectifs initiaux de ce travail de thèse était d'étudier l'influence de la variation intracellulaire du ratio d'EROs et de NO sur la modulation de l'expression de PRC et sur la biogenèse mitochondriale dans les modèles de carcinomes thyroïdiens. L'ajout de composés connus pour leur action pro- ou anti-oxydante dans le milieu de culture de nos lignées thyroïdiennes a eu pour conséquence une mortalité cellulaire très importante. De nombreuses voies de signalisation intracellulaire sont régulées par les EROs, ce qui peut expliquer les effets délétères observés sur la survie cellulaire. De plus, un manque de reproductibilité dans les dosages des EROs par cytométrie en flux à l'aide de la sonde fluorescente dihydroéthidium m'a conduit à ne pas continuer cette étude. Toutefois, au vu des résultats

évoqués précédemment, il sera intéressant de poursuivre, par de nouvelles approches, l'étude des modifications du statut redox de la cellule sur la régulation de la biogenèse mitochondriale médiée par PRC. D'autres méthodes de dosage (telles que le dosage par colorimétrie des taux de glutathion réduit et oxydé GSH/GSSG ou de l'activité superoxyde dismutase) devront être utilisées pour estimer la variation des taux intracellulaires des EROs.

La TSH est un régulateur majeur de la fonction thyroïdienne. L'interaction de cette hormone avec son récepteur, le TSHR, stimule spécifiquement la prolifération des cellules folliculaires, l'expression de plusieurs des acteurs de la biosynthèse hormonale tels que la TG, la TPO et le NIS ainsi que la libération des hormones thyroïdiennes dans le sang. Nous avons cherché à savoir si la TSH pouvait également jouer un rôle dans le contrôle de la biogenèse mitochondriale dans les lignées thyroïdiennes. Dans le modèle FTC-133, le TSHR semble fonctionnel puisque l'ajout de TSH à 10 mU/ml dans le milieu de culture de ces cellules entraîne une augmentation de la phosphorylation du facteur de transcription CREB au niveau de la sérine 133. En revanche, nous n'avons constaté aucune modification significative de l'expression des transcrits des coactivateurs PRC et PGC-1 α , des facteurs de transcription CREB, NRF-1 et ERR α ainsi que du cytochrome *c* suite à l'ajout de TSH pendant 4 ou 10 jours. Ceci suggère que la TSH ne constitue pas un signal modulant la biogenèse mitochondriale dans le modèle cellulaire thyroïdien FTC-133. Toutefois, la TSH semble pouvoir réguler la fonction mitochondriale. Une étude récente a en effet montré que la TSH (10 mU/ml) était capable d'augmenter l'abondance des mitochondries et l'activité des complexes I et IV de la chaîne respiratoire dans de l'épiderme humain normal *in situ* (Poeggeler *et al.*, 2010). Cette étude n'a cependant pas déterminé si ces effets de la TSH étaient médiés par le récepteur de la TSH exprimé dans l'épiderme. Nous ne pouvons donc pas exclure une influence de la TSH sur la biogenèse mitochondriale dans des modèles thyroïdiens autres que les cellules FTC-133. Il serait intéressant de renouveler notre expérience dans des cellules thyroïdiennes primaires en culture, qui présentent des caractéristiques fonctionnelles plus proches du tissu thyroïdien que les lignées établies.

Le calcium est un autre signal endogène pouvant moduler la biogenèse des mitochondries et l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale. C'est pourquoi, nous avons étudié l'influence de la variation des taux de calcium intracellulaire sur la biogenèse et le fonctionnement de la mitochondrie dans les cellules RO82 W-1. Nos expériences de dosage du calcium cytoplasmique ont montré que, dans ces cellules, l'augmentation de la $[Ca^{++}]_c$ induite par l'ionomycine était en majeure partie due à l'efflux du Ca^{++} hors des stocks intracellulaires. Au niveau fonctionnel, le traitement des cellules RO82 W-1 par de

l'ionomycine diminue drastiquement l'activité de la COX alors que celle-ci ne varie pas de manière significative après traitement par le chélateur de calcium intracellulaire BAPTA/AM. En revanche, pour les cellules traitées par de l'ionomycine et du BAPTA/AM, l'activité de la COX est inhibée de manière similaire à ce observé après traitement par l'ionomycine seule. Or, le BAPTA/AM diminue la $[Ca^{++}]_c$ en chélatant le calcium présent dans le cytoplasme, ce qui suggère un rôle majeur de la baisse du taux de calcium initialement stocké dans la matrice mitochondriale. En effet, l'activité des complexes de la chaîne respiratoire est modulée par le calcium. Bender et Kadenbach ont montré que la déphosphorylation de la sous-unité COXI, sous l'action du calcium, était capable d'abolir l'inhibition allostérique de la COX par l'AMPc (Bender et Kadenbach, 2000). Dans les ostéoclastes, la phosphorylation de COXII par la kinase c-Src augmente l'activité de la COX (Miyazaki *et al.*, 2003). L'inhibition de la COX par l'ionomycine dans les cellules RO82 W-1 pourrait donc être due à la modulation du statut de phosphorylation de la COX et des autres complexes de la chaîne respiratoire par les kinases ou phosphatases mitochondriales dépendantes du calcium. Cette hypothèse pourra être vérifiée en réalisant des expériences d'électrophorèse en deux dimensions après traitement ou non des cellules par l'ionomycine. La technique BN-PAGE (Blue-Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) est adaptée à l'étude des structures complexes enchâssées dans les membranes hydrophobes. Après séparation des protéines en conditions non dénaturantes dans la première dimension puis par SDS-PAGE dans la deuxième dimension, les protéines mitochondriales seront transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane sera ensuite incubée d'une part avec un anticorps ciblant les phosphoprotéines (phospho-sérines ou phospho-tyrosines) et d'autre part avec des anticorps ciblant des sous-unités de la COX afin de déterminer si la phosphorylation de certaines sous-unités de la COX est sensible à l'ionomycine. Même si l'inhibition de la COX induite par l'ionomycine suggère que cet ionophore de calcium agit au moins en partie en permettant l'efflux de calcium hors de la mitochondrie, il serait intéressant de déterminer la part de l'augmentation de la $[Ca^{++}]_c$ due au relargage des stocks de calcium intracellulaires à partir de la mitochondrie et/ou du réticulum endoplasmique. Le dosage du calcium cytoplasmique après traitement des cellules par de la thapsigargine (un inhibiteur de l'ATPase calcique du réticulum endoplasmique) et par l'ionomycine dans un milieu ne contenant pas de calcium permettra ainsi de préciser les proportions de l'efflux de calcium produit à partir des stocks du réticulum endoplasmique. Notre étude a également révélé que la variation de la $[Ca^{++}]_c$ modulait la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire de PRC dans la lignée RO82 W-1. La chélation du calcium cytoplasmique par le BAPTA/AM augmente l'expression des ARNm de PRC, CREB, NRF-1,

ERR α et du cytochrome *c* alors que l'élévation de la $[Ca^{++}]_c$ par l'ionomycine a un effet inhibiteur sur la transcription de ces gènes codant pour des protéines impliquées dans la biogenèse et la fonction mitochondriales. Toutefois, l'expression du transcrit de PGC-1 α ne varie pas. Dans les cellules RO82 W-1, le calcium semble donc induire une diminution de la biogenèse mitochondriale en modulant l'activité de protéines cytosoliques qui participent à la régulation de la transcription de gènes nucléaires. L'augmentation de la $[Ca^{++}]_c$ active de nombreuses kinases et phosphatases dépendantes du calcium entraînant l'activation de nombreux facteurs de transcription qui induisent une réponse transcriptionnelle spécifique (Mellström *et al.*, 2008). Parmi les kinases dont l'activité est modulée par le calcium, la CaMKIV régule la biogenèse mitochondriale en activant PGC-1 α dans le muscle (Wu *et al.*, 2002). Le calcium et les CaMKs contribuent également à l'activation des NOS constitutives et par conséquent à l'induction de la production de NO. Dans les myotubes L₆E₉, l'efflux de calcium sarcoplasmique induit par la caféine augmente la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire, au moins en partie, d'interactions avec les NOS (McConell *et al.*, 2010). Dans le modèle RO82 W-1, le SNAP augmente la biogenèse mitochondriale alors que celle-ci est diminuée suite à l'élévation de la $[Ca^{++}]_c$ induite par l'ionomycine. Ces résultats inverses suggèrent que la modulation de la biogenèse mitochondriale par le calcium n'implique certainement pas la voie CaMK/NOS. Des expériences complémentaires seront nécessaires pour déterminer les éléments de signalisation intracellulaire impliqués dans la mise en place des adaptations transcriptionnelles observées dans les cellules RO82 W-1 en réponse à l'augmentation de la concentration calcique cytoplasmique. La régulation négative de la transcription de gènes modulant la biogenèse mitochondriale induite par le calcium ne semble cependant pas être un phénomène spécifique du modèle RO82 W-1. En effet, des résultats préliminaires indiquent que dans les cellules FTC-133, le traitement par l'ionomycine diminue également l'expression du transcrit du cytochrome *c*. Il serait intéressant de vérifier si ce phénomène est une caractéristique des tumeurs d'origine thyroïdienne. Par ailleurs, des résultats préliminaires indiquent que l'augmentation de la $[Ca^{++}]_c$ induite par l'ionomycine module l'expression de gènes impliqués dans la régulation de la fission mitochondriale. Des expériences complémentaires (marquage du réseau mitochondrial par le Mitotracker red CMX Ros (Fluoprobes) et du réseau du réticulum endoplasmique par l'ER-Tracker Green (Fluoprobes) puis observation par microscopie à fluorescence des cellules traitées ou non par l'ionomycine ou le BAPTA/AM) sont en cours afin de vérifier si la concentration calcique intracellulaire influence l'organisation du réseau mitochondrial et du réseau du réticulum endoplasmique.

De nombreuses altérations du métabolisme énergétique cellulaire sont décrites dans les tumeurs. Selon le tissu et le type de tumeur, les cellules cancéreuses peuvent présenter une répression ou une augmentation du métabolisme mitochondrial. Dans des cellules de carcinome du colon, il a été montré que la progression tumorale nécessitait la sélection de cellules cancéreuses présentant une répression de la biogenèse et de l'activité des mitochondries (Sánchez-Aragó *et al.*, 2010). Le traitement de ces cellules cancéreuses avec du dichloroacétate, un activateur de la décarboxylation mitochondriale du pyruvate, diminue les taux de glycolyse aérobie, restaure en partie l'ultrastructure mitochondriale et entraîne une régression de la tumeur après implantation de ces cellules cancéreuses dans des souris. Par ailleurs, l'utilisation de thérapies adjuvantes aux chimiothérapies par ciblage de la chaîne respiratoire mitochondriale ou du statut redox des cellules a permis d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses résistantes aux chimiothérapies classiques (Don et Hogg, 2004). Le ciblage thérapeutique du métabolisme mitochondrial semble donc être une piste prometteuse de lutte contre le cancer. L'expression des différentes NOS est élevée dans de nombreuses tumeurs (Baris *et al.*, 2005 ; Guida *et al.*, 2009 ; Mozet *et al.*, 2009) ce qui a conduit de nombreuses équipes à étudier le rôle des NOS et du NO dans la pathologie cancéreuse. Le NO et les NOS ont été associés à l'initiation et à la progression tumorales (Lim *et al.*, 2008 ; Leung *et al.*, 2010) mais également à la diminution de la prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose de cellules cancéreuses (Cook *et al.*, 2004 ; Hirst et Robson, 2010). Notre travail sur les lignées cellulaires de carcinomes folliculaires thyroïdiens a mis en évidence que le NO modulait d'une part l'expression de PRC et de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la biogenèse mitochondriale ainsi que l'activité de la chaîne respiratoire et la production d'ATP d'autre part. Il sera donc intéressant de déterminer si les effets pro- ou anti-tumoraux du NO dépendent de l'orientation métabolique des tumeurs. Dans ce but, des cultures primaires de cellules thyroïdiennes provenant de tumeurs présentant un métabolisme principalement oxydatif (tumeurs folliculaires) ou principalement glycolytique (tumeurs papillaires) pourront être réalisées. Les effets du traitement par des donneurs de NO ou des inhibiteurs de la eNOS sur les voies de prolifération et d'apoptose dans ces cellules seront analysés en fonction des modifications métaboliques observées et selon leur impact sur la biogenèse mitochondriale. Nous pourrions envisager dans le futur de tester de nouvelles thérapeutiques adaptées aux modifications du métabolisme tumoral en ciblant le NO comme « senseur métabolique » ou les facteurs « clefs » (tels que PRC) impliqués dans la régulation ou l'adaptation de ce métabolisme aux modifications environnementales.

Bibliographie

- Akimoto,T., Pohnert,S.C., Li,P., Zhang,M., Gumbs,C., Rosenberg,P.B., Williams,R.S., et Yan,Z. (2005) Exercise stimulates Pgc-1alpha transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway. *J.Biol.Chem.*, **280**, 19587-19593.
- Allgeier,A., Offermanns,S., Van Sande,J., Spicher,K., Schultz,G., et Dumont,J.E. (1994) The human thyrotropin receptor activates G-proteins Gs and Gq/11. *J.Biol.Chem.*, **269**, 13733-13735.
- Amuthan,G., Biswas,G., Ananadatheerthavarada,H.K., Vijayasathy,C., Shephard,H.M., et Avadhani,N.G. (2002) Mitochondrial stress-induced calcium signaling, phenotypic changes and invasive behavior in human lung carcinoma A549 cells. *Oncogene*, **21**, 7839-7849.
- Andersson,U. et Scarpulla,R.C. (2001) Pgc-1-related coactivator, a novel, serum-inducible coactivator of nuclear respiratory factor 1-dependent transcription in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.*, **21**, 3738-3749.
- Aranda,A. et Pascual,A. (2001) Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiol Rev.*, **81**, 1269-1304.
- Arany,Z., Lebrasseur,N., Morris,C., Smith,E., Yang,W., Ma,Y., Chin,S., et Spiegelman,B.M. (2007) The transcriptional coactivator PGC-1beta drives the formation of oxidative type IIX fibers in skeletal muscle. *Cell Metab*, **5**, 35-46.
- Arnould,T., Vankoningsloo,S., Renard,P., Houbion,A., Ninane,N., Demazy,C., Remacle,J., et Raes,M. (2002) CREB activation induced by mitochondrial dysfunction is a new signaling pathway that impairs cell proliferation. *EMBO J.*, **21**, 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., et 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**, 435-439.
- Atherton,P.J., Babraj,J., Smith,K., Singh,J., Rennie,M.J., et Wackerhage,H. (2005) Selective activation of AMPK-PGC-1alpha or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation. *FASEB J.*, **19**, 786-788.
- Au,H.K., Yeh,T.S., Kao,S.H., Shih,C.M., Hsieh,R.H., et Tzeng,C.R. (2005) Calcium-dependent up-regulation of mitochondrial electron transfer chain gene expressions in human luteinized granulosa cells. *Fertil.Steril.*, **84 Suppl 2**, 1104-1108.
- Azzone,G.F., Zoratti,M., Petronilli,V., et Pietrobon,D. (1985) The stoichiometry of H⁺ pumping in cytochrome oxidase and the mechanism of uncoupling. *J.Inorg.Biochem.*, **23**, 349-356.
- Baar,K., Wende,A.R., Jones,T.E., Marison,M., Nolte,L.A., Chen,M., Kelly,D.P., et Holloszy,J.O. (2002) Adaptations of skeletal muscle to exercise: rapid increase in the transcriptional coactivator PGC-1. *FASEB J.*, **16**, 1879-1886.
- Babcock,G.T. et Wikstrom,M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature*, **356**, 301-309.

- Baris,O., Savagner,F., Nasser,V., Loriol,B., Granjeaud,S., Guyetant,S., Franc,B., Rodien,P., Rohmer,V., Bertucci,F., Birnbaum,D., Malthiery,Y., Reynier,P., et Houlgatte,R. (2004) Transcriptional profiling reveals coordinated up-regulation of oxidative metabolism genes in thyroid oncocyctic tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **89**, 994-1005.
- Baris,O., Mirebeau-Prunier,D., Savagner,F., Rodien,P., Ballester,B., Loriol,B., Granjeaud,S., Guyetant,S., Franc,B., Houlgatte,R., Reynier,P., et Malthiery,Y. (2005) Gene profiling reveals specific oncogenic mechanisms and signaling pathways in oncocyctic and papillary thyroid carcinoma. *Oncogene*, **24**, 4155-4161.
- Bassett,J.H., Nordstrom,K., Boyde,A., Howell,P.G., Kelly,S., Vennstrom,B., et Williams,G.R. (2007) Thyroid status during skeletal development determines adult bone structure and mineralization. *Mol.Endocrinol.*, **21**, 1893-1904.
- Basu,A., Lenka,N., Mullick,J., et 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**, 5899-5908.
- Bender,E. et Kadenbach,B. (2000) The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett.*, **466**, 130-134.
- Bergeron,R., Ren,J.M., Cadman,K.S., Moore,I.K., Perret,P., Pypaert,M., Young,L.H., Semenkovich,C.F., et Shulman,G.I. (2001) Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, **281**, E1340-E1346.
- Bianchi,C., Genova,M.L., Parenti,C.G., et Lenaz,G. (2004) The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *J.Biol.Chem.* , **279**, 36562-36569.
- Bianco,S., Lanvin,O., Tribollet,V., Macari,C., North,S., et Vanacker,J.M. (2009) Modulating estrogen receptor-related receptor-alpha activity inhibits cell proliferation. *J.Biol.Chem.*, **284**, 23286-23292.
- Bizhanova,A. et Kopp,P. (2009) Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. *Endocrinology*, **150**, 1084-1090.
- Block,M.L. (2008) NADPH oxidase as a therapeutic target in Alzheimer's disease. *BMC.Neurosci.*, **9 Suppl 2**, S8.
- Bonora,E., Porcelli,A.M., Gasparre,G., Biondi,A., Ghelli,A., Carelli,V., Baracca,A., Tallini,G., Martinuzzi,A., Lenaz,G., Rugolo,M., et Romeo,G. (2006) Defective oxidative phosphorylation in thyroid oncocyctic carcinoma is associated with pathogenic mitochondrial DNA mutations affecting complexes I and III. *Cancer Res.*, **66**, 6087-6096.
- Brahimi-Horn,M.C., Chiche,J., et Pouyssegur,J. (2007) Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **19**, 223-229.
- Brand,M.D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Keilin Memorial Lecture*, Glasgow.

- Brand,M.D. et Esteves,T.C. (2005) Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, **2**, 85-93.
- Brookes,P.S. (2005) Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation : An odd couple. *Free Radical Biology & Medicine*, **38**, 12-23.
- Brookes,P.S., Rolfe,D.F., et Brand,M.D. (1997) The proton permeability of liposomes made from mitochondrial inner membrane phospholipids: comparison with isolated mitochondria. *J.Membr.Biol.*, **155**, 167-174.
- Brookes,P.S., Levonen,A.L., Shiva,S., Sarti,P., et Darley-Usmar,V.M. (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic.Biol.Med.*, **33**, 755-764.
- Brown,G.C. et Borutaite,V. (2007) Nitric oxide and mitochondrial respiration in the heart. *Cardiovasc.Res.*, **75**, 283-290.
- Buratta,M., Piccotti,L., Giannini,S., Gresele,P., Roberti,R., et Corazzi,L. (2006) Selective cytochrome c displacement by phosphate and Ca(2+) in brain mitochondria. *J.Membr.Biol.*, **212**, 199-210.
- Butow,R.A. et Avadhani,N.G. (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol.Cell*, **14** , 1-15.
- Cadenas,S., Buckingham,J.A., St-Pierre,J., Dickinson,K., Jones,R.B., et Brand,M.D. (2000) AMP decreases the efficiency of skeletal-muscle mitochondria. *Biochem.J.*, **351 Pt 2**, 307-311.
- Calderon-Cortes,E., Cortes-Rojo,C., Clemente-Guerrero,M., Manzo-Avalos,S., Villalobos-Molina,R., Boldogh,I., et Saavedra-Molina,A. (2008) Changes in mitochondrial functionality and calcium uptake in hypertensive rats as a function of age. *Mitochondrion.*, **8**, 262-272.
- Calebiro,D., Tiziana de Filippis T., Lucchi,S., Martinez,F., Porazzi,P., Trivellato,R., Locati,M., Beck-Peccoz,P., et Persani,L. (2006) Selective modulation of protein kinase A I and II reveals distinct roles in thyroid cell gene expression and growth. *Mol.Endocrinol.*, **20** , 3196-3211.
- Camello-Almaraz,C., Gomez-Pinilla,P.J., Pozo,M.J., et Camello,P.J. (2006) Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **291**, C1082-C1088.
- Cao,W., Daniel,K.W., Robidoux,J., Puigserver,P., Medvedev,A.V., Bai,X., Floering,L.M., Spiegelman,B.M., et Collins,S. (2004) p38 mitogen-activated protein kinase is the central regulator of cyclic AMP-dependent transcription of the brown fat uncoupling protein 1 gene. *Mol.Cell Biol.* , **24**, 3057-3067.
- Capitanio,N., Capitanio,G., Demarinis,D.A., De Nitto,N.E., Massari,S., et Papa,S. (1996) Factors affecting the H⁺/e⁻ stoichiometry in mitochondrial cytochrome c oxidase: influence of the rate of electron flow and transmembrane delta pH. *Biochemistry*, **35**, 10800-10806.
- Cassina,A. et Radi,R. (1996) Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch.Biochem.Biophys.*, **328**, 309-316.

- Chen,J.Q., Cammarata,P.R., Baines,C.P., et Yager,J.D. (2009) Regulation of mitochondrial respiratory chain biogenesis by estrogens/estrogen receptors and physiological, pathological and pharmacological implications. *Biochim.Biophys.Acta*, **1793**, 1540-1570.
- Chiamolera,M.I. et Wondisford,F.E. (2009) Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*, **150**, 1091-1096.
- Ciampi,R. et Nikiforov,Y.E. (2007) RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*, **148**, 936-941.
- Cleeter,M.W., Cooper,J.M., Darley-USmar,V.M., Moncada,S., et 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**, 50-54.
- Cook,T., Wang,Z., Alber,S., Liu,K., Watkins,S.C., Vodovotz,Y., Billiar,T.R., et Blumberg,D. (2004) Nitric oxide and ionizing radiation synergistically promote apoptosis and growth inhibition of cancer by activating p53. *Cancer Res.*, **64**, 8015-8021.
- Cooper,C.E. et Davies,N.A. (2000) Effects of nitric oxide and peroxynitrite on the cytochrome oxidase K(m) for oxygen: implications for mitochondrial pathology. *Biochim.Biophys.Acta*, **1459**, 390-396.
- Couto,J.P., Prazeres,H., Castro,P., Lima,J., Maximo,V., Soares,P., et Sobrinho-Simoes,M. (2009) How molecular pathology is changing and will change the therapeutics of patients with follicular cell-derived thyroid cancer. *J.Clin.Pathol.*, **62**, 414-421.
- Criscuolo,F., Gonzalez-Barroso,M.M., Le Maho,M.Y., Ricquier,D., et Bouillaud,F. (2005) Avian uncoupling protein expressed in yeast mitochondria prevents endogenous free radical damage. *Proc.Biol.Sci.*, **272**, 803-810.
- Crook,M.F., Olive,M., Xue,H.H., Langenickel,T.H., Boehm,M., Leonard,W.J., et Nabel,E.G. (2008) GA-binding protein regulates KIS gene expression, cell migration, and cell cycle progression. *FASEB J.*, **22**, 225-235.
- Cruciat,C.M., Brunner,S., Baumann,F., Neupert,W., et 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**, 18093-18098.
- Cunningham,J.T., Rodgers,J.T., Arlow,D.H., Vazquez,F., Mootha,V.K., et Puigserver,P. (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature*, **450**, 736-740.
- D'Souza,A.D., Parikh,N., Kaech,S.M., et Shadel,G.S. (2007) Convergence of multiple signaling pathways is required to coordinately up-regulate mtDNA and mitochondrial biogenesis during T cell activation. *Mitochondrion.*, **7**, 374-385.
- Dai,G., Levy,O., et Carrasco,N. (1996) Cloning and characterization of the thyroid iodide transporter. *Nature*, **379**, 458-460.
- Damante,G., Tell,G., et Di Lauro,R. (2001) A unique combination of transcription factors controls differentiation of thyroid cells. *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.*, **66**, 307-356.

- Davies,T., Marians,R., et Latif,R. (2002) The TSH receptor reveals itself. *J.Clin.Invest*, **110**, 161-164.
- Davies,T.F., Ando,T., Lin,R.Y., Tomer,Y., et Latif,R. (2005) Thyrotropin receptor-associated diseases: from adenomata to Graves disease. *J.Clin.Invest*, **115**, 1972-1983.
- Davis,P.J., Leonard,J.L., et Davis,F.B. (2008) Mechanisms of nongenomic actions of thyroid hormone. *Front Neuroendocrinol.*, **29**, 211-218.
- De Deken,X., Wang,D., Many,M.C., Costagliola,S., Libert,F., Vassart,G., Dumont,J.E., et Miot,F. (2000) Cloning of two human thyroid cDNAs encoding new members of the NADPH oxidase family. *J.Biol.Chem.*, **275**, 23227-23233.
- De Deken,X., Wang,D., Dumont,J.E., et Miot,F. (2002) Characterization of ThOX proteins as components of the thyroid H₂O₂-generating system. *Exp.Cell Res.*, **273**, 187-196.
- De Gregorio,G., Coppa,A., Cosentino,C., Ucci,S., Messina,S., Nicolussi,A., D'Inzeo,S., Di Pardo,A., Avvedimento,E.V., et Porcellini,A. (2007) The p85 regulatory subunit of PI3K mediates TSH-cAMP-PKA growth and survival signals. *Oncogene*, **26**, 2039-2047.
- Demeure,M.J., Doffek,K.M., et Wilson,S.D. (1997) Defective thyrotropin receptor G-protein cyclic adenosine monophosphate signaling mechanism in the FTC human follicular thyroid cancer cell line. *Surgery*, **122**, 1195-1201.
- Desbiens,K.M., Deschesnes,R.G., Labrie,M.M., Desfosses,Y., Lambert,H., Landry,J., et Bellmann,K. (2003) c-Myc potentiates the mitochondrial pathway of apoptosis by acting upstream of apoptosis signal-regulating kinase 1 (Ask1) in the p38 signalling cascade. *Biochem.J.*, **372**, 631-641.
- Devin,A. et Rigoulet,M. (2007) Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **292**, C52-C58.
- Dey,R. et Moraes,C.T. (2000) Lack of oxidative phosphorylation and low mitochondrial membrane potential decrease susceptibility to apoptosis and do not modulate the protective effect of Bcl-x(L) in osteosarcoma cells. *J.Biol.Chem.*, **275**, 7087-7094.
- Diallo,E.M., Wilhelm,K.G.Jr., Thompson,D.L., et Koenig,R.J. (2007) Variable RXR requirements for thyroid hormone responsiveness of endogenous genes. *Mol.Cell Endocrinol.*, **264**, 149-156.
- Don,A.S. et Hogg,P.J. (2004) Mitochondria as cancer drug targets. *Trends Mol.Med.*, **10**, 372-378.
- Donohoe,M.E., Zhang,X., McGinnis,L., Biggers,J., Li,E., et Shi,Y. (1999) Targeted disruption of mouse Yin Yang 1 transcription factor results in peri-implantation lethality. *Mol.Cell Biol.*, **19**, 7237-7244.
- Dremier,S., Coulonval,K., Perpete,S., Vandeput,F., Fortemaison,N., Van Keymeulen,A., Deleu,S., Ledent,C., Clement,S., Schurmans,S., Dumont,J.E., Lamy,F., Roger,P.P., et Maenhaut,C. (2002) The role of cyclic AMP and its effect on protein kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **968**, 106-121.

- Dremier,S., Milenkovic,M., Blancquaert,S., Dumont,J.E., Doskeland,S.O., Maenhaut,C., et Roger,P.P. (2007) Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate (cAMP)-dependent protein kinases, but not exchange proteins directly activated by cAMP (Epac), mediate thyrotropin/cAMP-dependent regulation of thyroid cells. *Endocrinology*, **148**, 4612-4622.
- Dudkina,N.V., Sunderhaus,S., Boekema,E.J., et Braun,H.P. (2008) The higher level of organization of the oxidative phosphorylation system: mitochondrial supercomplexes. *J.Bioenerg.Biomembr.*, **40**, 419-424.
- Eisen,M.B., Spellman,P.T., Brown,P.O., et Botstein,D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **95**, 14863-14868.
- Erol,A. (2005) Retrograde regulation due to mitochondrial dysfunction may be an important mechanism for carcinogenesis. *Med.Hypotheses*, **65**, 525-529.
- Evans,M.J. et 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**, 14361-14368.
- Evans,M.J. et Scarpulla,R.C. (1990) NRF-1: a trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev.*, **4**, 1023-1034.
- Fantin,V.R., St-Pierre,J., et Leder,P. (2006) Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell*, **9**, 425-434.
- Fernandez-Vizarra,E., Tiranti,V., et Zeviani,M. (2009) Assembly of the oxidative phosphorylation system in humans: what we have learned by studying its defects. *Biochim.Biophys.Acta*, **1793**, 200-211.
- Finley,L.W. et Haigis,M.C. (2009) The coordination of nuclear and mitochondrial communication during aging and calorie restriction. *Ageing Res.Rev.*, **8**, 173-188.
- Fleming,I. et Busse,R. (1999) Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc.Res.*, **43**, 532-541.
- Fontaine,J.F., Mirebeau-Prunier,D., Raharijaona,M., Franc,B., Triau,S., Rodien,P., Goeau-Brissonniere,O., Karayan-Tapon,L., Mello,M., Houlgatte,R., Malthiery,Y., et Savagner,F. (2009) Increasing the number of thyroid lesions classes in microarray analysis improves the relevance of diagnostic markers. *PLoS.One.*, **4**, e7632.
- Freyssenet,D., Irrcher,I., Connor,M.K., Di Carlo,M., et Hood,D.A. (2004) Calcium-regulated changes in mitochondrial phenotype in skeletal muscle cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **286**, C1053-C1061.
- Frezza,C. et Gottlieb,E. (2009) Mitochondria in cancer: not just innocent bystanders. *Semin.Cancer Biol.*, **19**, 4-11.
- Fusco,A. et Santoro,M. (2007) 20 years of RET/PTC in thyroid cancer: clinico-pathological correlations. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.*, **51**, 731-735.

- Garcia-Jimenez,C. et Santisteban,P. (2007) TSH signalling and cancer. *Arq Bras.Endocrinol.Metabol.*, **51**, 654-671.
- Garcia-Rostan,G., Zhao,H., Camp,R.L., Pollan,M., Herrero,A., Pardo,J., Wu,R., Carcangiu,M.L., Costa,J., et Tallini,G. (2003) ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J.Clin.Oncol.*, **21**, 3226-3235.
- Garcia-Rostan,G., Costa,A.M., Pereira-Castro,I., Salvatore,G., Hernandez,R., Hermsem,M.J., Herrero,A., Fusco,A., Cameselle-Teijeiro,J., et Santoro,M. (2005) Mutation of the PIK3CA gene in anaplastic thyroid cancer. *Cancer Res.*, **65**, 10199-10207.
- Giguere,V. (2008) Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr.Rev.*, **29**, 677-696.
- Giordano,T.J., Au,A.Y., Kuick,R., Thomas,D.G., Rhodes,D.R., Wilhelm,K.G.Jr., Vinco,M., Misek,D.E., Sanders,D., Zhu,Z., Ciampi,R., Hanash,S., Chinnaiyan,A., Clifton-Bligh,R.J., Robinson,B.G., Nikiforov,Y.E., et Koenig,R.J. (2006) Delineation, functional validation, and bioinformatic evaluation of gene expression in thyroid follicular carcinomas with the PAX8-PPARG translocation. *Clin.Cancer Res.*, **12**, 1983-1993.
- Gleyzer,N., Vercauteren,K., et Scarpulla,R.C. (2005) Control of mitochondrial transcription specificity factors (TFB1M and TFB2M) by nuclear respiratory factors (NRF-1 and NRF-2) and PGC-1 family coactivators. *Mol.Cell Biol.*, **25**, 1354-1366.
- Goglia,F. (2005) Biological effects of 3,5-diiodothyronine (T(2)). *Biochemistry (Mosc.)*, **70**, 164-172.
- Gopalakrishnan,L. et Scarpulla,R.C. (1994) Differential regulation of respiratory chain subunits by a CREB-dependent signal transduction pathway. Role of cyclic AMP in cytochrome c and COXIV gene expression. *J.Biol.Chem.*, **269**, 105-113.
- Gottlieb,E. et Tomlinson,I.P. (2005) Mitochondrial tumour suppressors: a genetic and biochemical update. *Nat.Rev.Cancer*, **5**, 857-866.
- Graier,W.F., Frieden,M., et Malli,R. (2007) Mitochondria and Ca(2+) signaling: old guests, new functions. *Pflugers Arch.*, **455**, 375-396.
- Graier,W.F., Trenker,M., et Malli,R. (2008) Mitochondrial Ca²⁺, the secret behind the function of uncoupling proteins 2 and 3? *Cell Calcium*, **44**, 36-50.
- Grover,G.J., Marone,P.A., Koetzner,L., et Seto-Young,D. (2008) Energetic signalling in the control of mitochondrial F1F0 ATP synthase activity in health and disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **40**, 2698-2701.
- Gugneja,S. et Scarpulla,R.C. (1997) Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J.Biol.Chem.*, **272**, 18732-18739.
- Guida,G., Culla,B., Scirelli,T., Bellone,G., Sciascia,S., Brussino,L., Novero,D., Palestro,G., Heffler,E., Gavarotti,P., Rolla,G., et Bucca,C. (2009) Exhaled nitric oxide and nitric oxide synthase expression in Hodgkin's disease. *Int.J.Immunopathol.Pharmacol.*, **22**, 1027-1034.

- Gulick,T., Cresci,S., Caira,T., Moore,D.D., et Kelly,D.P. (1994) The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **91**, 11012-11016.
- Gutsaeva,D.R., Carraway,M.S., Suliman,H.B., Demchenko,I.T., Shitara,H., Yonekawa,H., et Piantadosi,C.A. (2008) Transient hypoxia stimulates mitochondrial biogenesis in brain subcortex by a neuronal nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J.Neurosci.*, **28**, 2015-2024.
- Handschin,C., Rhee,J., Lin,J., Tarr,P.T., et Spiegelman,B.M. (2003) An autoregulatory loop controls peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1alpha expression in muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **100**, 7111-7116.
- Handschin,C., Lin,J., Rhee,J., Peyer,A.K., Chin,S., Wu,P.H., Meyer,U.A., et Spiegelman,B.M. (2005) Nutritional regulation of hepatic heme biosynthesis and porphyria through PGC-1alpha. *Cell*, **122**, 505-515.
- Hao,H.X., Khalimonchuk,O., Schraders,M., Dephoure,N., Bayley,J.P., Kunst,H., Devilee,P., Cremers,C.W., Schiffman,J.D., Bentz,B.G., Gygi,S.P., Winge,D.R., Kremer,H., et Rutter,J. (2009) SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma. *Science*, **325**, 1139-1142.
- Harris,D.A. et Das,A.M. (1991) Control of mitochondrial ATP synthesis in the heart. *Biochem.J.*, **280 (Pt 3)**, 561-573.
- Hatipoglu,B.A. et Schneider,A.B. (1999) Selective endocytosis of thyroglobulin: a review of potential mechanisms for protecting newly synthesized molecules from premature degradation. *Biochimie*, **81**, 549-555.
- Herzig,R.P., Scacco,S., et Scarpulla,R.C. (2000) Sequential serum-dependent activation of CREB and NRF-1 leads to enhanced mitochondrial respiration through the induction of cytochrome c. *J.Biol.Chem.*, **275**, 13134-13141.
- Hirst,D.G. et Robson,T. (2010) Nitrosative stress as a mediator of apoptosis: implications for cancer therapy. *Curr.Pharm.Des*, **16**, 45-55.
- Hochbaum,D., Hong,K., Barila,G., Ribeiro-Neto,F., et Altschuler,D.L. (2008) Epac, in synergy with cAMP-dependent protein kinase (PKA), is required for cAMP-mediated mitogenesis. *J.Biol.Chem.*, **283**, 4464-4468.
- Hock,M.B. et Kralli,A. (2009) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu.Rev.Physiol*, **71**, 177-203.
- Hoelting,T., Tezelman,S., Siperstein,A.E., Duh,Q.Y., et Clark,O.H. (1993) Thyrotropin stimulates invasion and growth of follicular thyroid cancer cells via PKC- rather than PKA-activation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, **195**, 1230-1236.
- Horton,T.M., Petros,J.A., Heddi,A., Shoffner,J., Kaufman,A.E., Graham,S.D., Jr., Gramlich,T., et Wallace,D.C. (1996) Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes.Cancer*, **15**, 95-101.

- Huang, Y.H., Tsai, M.M., et Lin, K.H. (2008) Thyroid hormone dependent regulation of target genes and their physiological significance. *Chang Gung Med. J.*, **31**, 325-334.
- Huo, L. et Scarpulla, R.C. (2001) Mitochondrial DNA instability and peri-implantation lethality associated with targeted disruption of nuclear respiratory factor 1 in mice. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 644-654.
- Huss, J.M., Imahashi, K., Dufour, C.R., Weinheimer, C.J., Courtois, M., Kovacs, A., Giguere, V., Murphy, E., et Kelly, D.P. (2007) The nuclear receptor ERRalpha is required for the bioenergetic and functional adaptation to cardiac pressure overload. *Cell Metab.*, **6**, 25-37.
- Huttemann, M., Lee, I., Samavati, L., Yu, H., et Doan, J.W. (2007) Regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation through cell signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 1701-1720.
- Huttemann, M., Lee, I., Pecinova, A., Pecina, P., Przyklenk, K., et Doan, J.W. (2008) Regulation of oxidative phosphorylation, the mitochondrial membrane potential, and their role in human disease. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 445-456.
- Irrcher, I., Adhietty, P.J., Sheehan, T., Joseph, A.M., et Hood, D.A. (2003) PPARgamma coactivator-1alpha expression during thyroid hormone- and contractile activity-induced mitochondrial adaptations. *Am. J. Physiol Cell Physiol*, **284**, C1669-C1677.
- Ishikawa, K., Takenaga, K., Akimoto, M., Koshikawa, N., Yamaguchi, A., Imanishi, H., Nakada, K., Honma, Y., et Hayashi, J. (2008) ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis. *Science*, **320**, 661-664.
- Isidoro, A., Casado, E., Redondo, A., Acebo, P., Espinosa, E., Alonso, A.M., Cejas, P., Hardisson, D., Fresno Vara, J.A., Belda-Iniesta, C., Gonzalez-Baron, M., et Cuezva, J.M. (2005) Breast carcinomas fulfill the Warburg hypothesis and provide metabolic markers of cancer prognosis. *Carcinogenesis*, **26**, 2095-2104.
- Jezek, P. et Hlavata, L. (2005) Mitochondria in homeostasis of reactive oxygen species in cell, tissues, and organism. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 2478-2503.
- Jhiang, S.M., Cho, J.Y., Furminger, T.L., Sagartz, J.E., Tong, Q., Capen, C.C., et Mazzaferri, E.L. (1998) Thyroid carcinomas in RET/PTC transgenic mice. *Recent Results Cancer Res.*, **154**, 265-270.
- Johannessen, M., Delghandi, M.P., et Moens, U. (2004) What turns CREB on? *Cell Signal.*, **16**, 1211-1227.
- Junge, W., Panke, O., Cherepanov, D.A., Gumbiowski, K., Muller, M., et Engelbrecht, S. (2001) Inter-subunit rotation and elastic power transmission in F0F1-ATPase. *FEBS Lett.*, **504**, 152-160.
- Kadenbach, B. (2003) Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1604**, 77-94.
- Kallen, J., Schlaeppli, J.M., Bitsch, F., Filipuzzi, I., Schilb, A., Riou, V., Graham, A., Strauss, A., Geiser, M., et Fournier, B. (2004) Evidence for ligand-independent transcriptional activation of the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha): crystal structure of ERRalpha ligand

- binding domain in complex with peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1alpha. *J.Biol.Chem.*, **279**, 49330-49337.
- Kim,H., Park,S., Suh,J.M., Chung,H.K., Shong,M., et Kwon,O.Y. (2001) Thyroid-stimulating hormone transcriptionally regulates the thiol-specific antioxidant gene. *Cell Physiol Biochem.*, **11**, 247-252.
- Kimura,T., Van Keymeulen,A., Golstein,J., Fusco,A., Dumont,J.E., et Roger,P.P. (2001) Regulation of thyroid cell proliferation by TSH and other factors: a critical evaluation of in vitro models. *Endocr.Rev.*, **22**, 631-656.
- King,A., Selak,M.A., et Gottlieb,E. (2006) Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase: linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*, **25**, 4675-4682.
- Kleihues,P. et Sobin,L.H. (2004) Tumours of the thyroid and parathyroid. In: Pathology and genetics of tumours of the endocrine organs. Dellelis RA, Lloyd RV, Heitz PU, Eng C (Eds). WHO classification of tumours. *IARC Press*, Lyon, France.
- Knauf,J.A., Ma,X., Smith,E.P., Zhang,L., Mitsutake,N., Liao,X.H., Refetoff,S., Nikiforov,Y.E., et Fagin,J.A. (2005) Targeted expression of BRAFV600E in thyroid cells of transgenic mice results in papillary thyroid cancers that undergo dedifferentiation. *Cancer Res.*, **65**, 4238-4245.
- Kopp,P. (1999) Pendred's syndrome: identification of the genetic defect a century after its recognition. *Thyroid*, **9**, 65-69.
- Kopp,P., Pesce,L., et Solis-S,J.C. (2008) Pendred syndrome and iodide transport in the thyroid. *Trends Endocrinol.Metab*, **19**, 260-268.
- Kraft,C.S., LeMoine,C.M., Lyons,C.N., Michaud,D., Mueller,C.R., et Moyes,C.D. (2006) Control of mitochondrial biogenesis during myogenesis. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **290**, C1119-C1127.
- Lacroix,L., Michiels,S., Mian,C., Arturi,F., Caillou,B., Filetti,S., Schlumberger,M., et Bidart,J.M. (2006) HEX, PAX-8 and TTF-1 gene expression in human thyroid tissues: a comparative analysis with other genes involved in iodide metabolism. *Clin.Endocrinol.(Oxf)*, **64**, 398-404.
- Laganiere,J., Tremblay,G.B., Dufour,C.R., Giroux,S., Rousseau,F., et Giguere,V. (2004) A polymorphic autoregulatory hormone response element in the human estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) promoter dictates peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha control of ERRalpha expression. *J.Biol.Chem.*, **279**, 18504-18510.
- Le Pennec,S., Raharijaona,M., Poirier,J., Mirebeau-Prunier,D., Rouxel,C., Jacques,C., Fontaine,J.F., Malthiery,Y., Houlgatte,R., et Savagner,F. (2009) PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide in a cellular model of oncocytic thyroid tumours. *PLoS.One.*, **4**, e7964.
- Lee,H.C. et Wei,Y.H. (2005) Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **37**, 822-834.

- Leonard, J.L. (2008) Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development. *Steroids*, **73**, 1008-1012.
- Leung, E.L., Wong, J.C., Johlfs, M.G., Tsang, B.K., et Fiscus, R.R. (2010) Protein Kinase G Type I alpha Activity in Human Ovarian Cancer Cells Significantly Contributes to Enhanced Src Activation and DNA Synthesis/Cell Proliferation. *Mol. Cancer Res.*
- Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J.W., Yustein, J.T., Lee, L.A., et Dang, C.V. (2005) Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 6225-6234.
- Liaw, D., Marsh, D.J., Li, J., Dahia, P.L., Wang, S.I., Zheng, Z., Bose, S., Call, K.M., Tsou, H.C., Peacocke, M., Eng, C., et Parsons, R. (1997) Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome. *Nat. Genet.*, **16**, 64-67.
- Lim, K.H., Ancrile, B.B., Kashatus, D.F., et Counter, C.M. (2008) Tumour maintenance is mediated by eNOS. *Nature*, **452**, 646-649.
- Lin, C.S. et Klingenberg, M. (1980) Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria. *FEBS Lett.*, **113**, 299-303.
- Lin, J., Puigserver, P., Donovan, J., Tarr, P., et Spiegelman, B.M. (2002) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1beta (PGC-1beta), a novel PGC-1-related transcription coactivator associated with host cell factor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 1645-1648.
- Liu, C., Yang, J., Wang, F., Wu, C., et Zhou, M. (2010) United detection GNAS and TSHR mutations in subclinical toxic multinodular goiter. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, **267**, 281-287.
- Lopez-Rios, F., Sanchez-Arago, M., Garcia-Garcia, E., Ortega, A.D., Berrendero, J.R., Pozo-Rodriguez, F., Lopez-Encuentra, A., Ballestin, C., et Cuezva, J.M. (2007) Loss of the mitochondrial bioenergetic capacity underlies the glucose avidity of carcinomas. *Cancer Res.*, **67**, 9013-9017.
- Lui, W.O., Foukakis, T., Liden, J., Thoppe, S.R., Dwight, T., Hoog, A., Zedenius, J., Wallin, G., Reimers, M., et Larsson, C. (2005) Expression profiling reveals a distinct transcription signature in follicular thyroid carcinomas with a PAX8-PPAR(gamma) fusion oncogene. *Oncogene*, **24**, 1467-1476.
- Marusich, M.F., Robinson, B.H., Taanman, J.W., Kim, S.J., Schillace, R., Smith, J.L., et 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**, 145-159.
- Mason, M.G., Nicholls, P., Wilson, M.T., et Cooper, C.E. (2006) Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 708-713.
- Matsuzawa, A. et Ichijo, H. (2008) Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**, 1325-1336.

Maximo,V., Sores,P., Rocha,A.S., et Sobrinho-Simoes,M. (1998) The common deletion of mitochondrial DNA is found in goiters and thyroid tumors with and without oxyphil cell change. *Ultrastruct.Pathol.*, **22**, 271-273.

Maximo,V., Botelho,T., Capela,J., Soares,P., Lima,J., Taveira,A., Amaro,T., Barbosa,A.P., Preto,A., Harach,H.R., Williams,D., et Sobrinho-Simoes,M. (2005) Somatic and germline mutation in GRIM-19, a dual function gene involved in mitochondrial metabolism and cell death, is linked to mitochondrion-rich (Hurthle cell) tumours of the thyroid. *Br.J.Cancer*, **92**, 1892-1898.

McConell,G.K., Ng,G.P., Phillips,M., Ruan,Z., Macaulay,S.L., et Wadley,G.D. (2010) Central role of nitric oxide synthase in AICAR and caffeine-induced mitochondrial biogenesis in L6 myocytes. *J.Appl.Physiol*, **108**, 589-595.

McCormack,J.G. et Denton,R.M. (1990) The role of mitochondrial Ca²⁺ transport and matrix Ca²⁺ in signal transduction in mammalian tissues. *Biochim.Biophys.Acta*, **1018**, 287-291.

Meirhaeghe,A., Crowley,V., Lenaghan,C., Lelliott,C., Green,K., Stewart,A., Hart,K., Schinner,S., Sethi,J.K., Yeo,G., Brand,M.D., Cortright,R.N., O'Rahilly,S., Montague,C., et Vidal-Puig,A.J. (2003) Characterization of the human, mouse and rat PGC1 beta (peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma co-activator 1 beta) gene in vitro and in vivo. *Biochem.J.*, **373**, 155-165.

Melillo,R.M., Castellone,M.D., Guarino,V., De Falco,V., Cirafici,A.M., Salvatore,G., Caiazzo,F., Basolo,F., Giannini,R., Kruhoffer,M., Orntoft,T., Fusco,A., et Santoro,M. (2005) The RET/PTC-RAS-BRAF linear signaling cascade mediates the motile and mitogenic phenotype of thyroid cancer cells. *J.Clin.Invest*, **115**, 1068-1081.

Mellstrom,B., Savignac,M., Gomez-Villafuertes,R., et Naranjo,J.R. (2008) Ca²⁺-operated transcriptional networks: molecular mechanisms and in vivo models. *Physiol Rev.*, **88**, 421-449.

Mercy,L., Pauw,A., Payen,L., Tejerina,S., Houbion,A., Demazy,C., Raes,M., Renard,P., et Arnould,T. (2005) Mitochondrial biogenesis in mtDNA-depleted cells involves a Ca²⁺-dependent pathway and a reduced mitochondrial protein import. *FEBS J.*, **272**, 5031-5055.

Michelangeli,F., Ruiz,M.C., Fernandez,E., et Ciarrocchi,A. (1989) Role of Ca²⁺ in H⁺ transport by rabbit gastric glands studied with A23187 and BAPTA, an incorporated Ca²⁺ chelator. *Biochim.Biophys.Acta*, **983**, 82-90.

Miranda,S., Foncea,R., Guerrero,J., et Leighton,F. (1999) Oxidative stress and upregulation of mitochondrial biogenesis genes in mitochondrial DNA-depleted HeLa cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **258**, 44-49.

Mirebeau-Prunier,D., Guyetant,S., Rodien,P., Franc,B., Baris,O., Rohmer,V., Reynier,P., Tourmen,Y., Malthiery,Y., et Savagner,F. (2004) Decreased expression of thyrotropin receptor gene suggests a high-risk subgroup for oncocytic adenoma. *Eur.J.Endocrinol.*, **150**, 269-276.

Mirebeau-Prunier,D., Le Pennec,S., Jacques,C., Gueguen,N., Poirier,J., Malthiery,Y., et Savagner,F. (2010) Estrogen-related receptor alpha and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria. *FEBS J.*, **277**, 713-725.

- Miyagi,E., Braga-Basaria,M., Hardy,E., Vasko,V., Burman,K.D., Jhiang,S., Saji,M., et Ringel,M.D. (2004) Chronic expression of RET/PTC 3 enhances basal and insulin-stimulated PI3 kinase/AKT signaling and increases IRS-2 expression in FRTL-5 thyroid cells. *Mol.Carcinog.*, **41**, 98-107.
- Miyazaki,T., Neff,L., Tanaka,S., Horne,W.C., et Baron,R. (2003) Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J.Cell Biol.*, **160**, 709-718.
- Moncada,S. et Bolanos,J.P. (2006) Nitric oxide, cell bioenergetics and neurodegeneration. *J.Neurochem.*, **97**, 1676-1689.
- Mootha,V.K., Lindgren,C.M., Eriksson,K.F., Subramanian,A., Sihag,S., Lehar,J., Puigserver,P., Carlsson,E., Ridderstrale,M., Laurila,E., Houstis,N., Daly,M.J., Patterson,N., Mesirov,J.P., Golub,T.R., Tamayo,P., Spiegelman,B., Lander,E.S., Hirschhorn,J.N., Altshuler,D., et Groop,L.C. (2003) PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat.Genet.*, **34**, 267-273.
- Mootha,V.K., Handschin,C., Arlow,D., Xie,X., St-Pierre,J., Sihag,S., Yang,W., Altshuler,D., Puigserver,P., Patterson,N., Willy,P.J., Schulman,I.G., Heyman,R.A., Lander,E.S., et Spiegelman,B.M. (2004) Erralpha and Gabpa/b specify PGC-1alpha-dependent oxidative phosphorylation gene expression that is altered in diabetic muscle. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 6570-6575.
- Moreno-Sanchez,R. (1985) Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **260**, 12554-12560.
- Morrish,F., Giedt,C., et Hockenbery,D. (2003) c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes. *Genes Dev.*, **17**, 240-255.
- Mozet,C., Marin,D.G., Bertolini,J., Tannapfel,A., Wichmann,G., et Dietz,A. (2009) Nitric oxide synthase (NOS2/3) expression in head and neck squamous cell carcinomas in correlation with clinical patterns. *Onkologie.*, **32**, 655-660.
- Murakami,T., Shimomura,Y., Yoshimura,A., Sokabe,M., et Fujitsuka,N. (1998) Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim.Biophys.Acta*, **1381**, 113-122.
- Navarro,A. et Boveris,A. (2008) Mitochondrial nitric oxide synthase, mitochondrial brain dysfunction in aging, and mitochondria-targeted antioxidants. *Adv.Drug Deliv.Rev.*, **60**, 1534-1544.
- Nguyen,L.Q., Kopp,P., Martinson,F., Stanfield,K., Roth,S.I., et Jameson,J.L. (2000) A dominant negative CREB (cAMP response element-binding protein) isoform inhibits thyrocyte growth, thyroid-specific gene expression, differentiation, and function. *Mol.Endocrinol.*, **14**, 1448-1461.
- Nisoli,E., Clementi,E., Paolucci,C., Cozzi,V., Tonello,C., Sciorati,C., Bracale,R., Valerio,A., Francolini,M., Moncada,S., et Carruba,M.O. (2003) Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. *Science*, **299**, 896-899.

- Nisoli,E., Falcone,S., Tonello,C., Cozzi,V., Palomba,L., Fiorani,M., Pisconti,A., Brunelli,S., Cardile,A., Francolini,M., Cantoni,O., Carruba,M.O., Moncada,S., et Clementi,E. (2004) Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **101**, 16507-16512.
- Ohta,K., Pang,X.P., Berg,L., et Hershman,J.M. (1997) Growth inhibition of new human thyroid carcinoma cell lines by activation of adenylate cyclase through the beta-adrenergic receptor. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **82**, 2633-2638.
- Ojuka,E.O., Jones,T.E., Han,D.H., Chen,M., Wamhoff,B.R., Sturek,M., et Holloszy,J.O. (2002) Intermittent increases in cytosolic Ca²⁺ stimulate mitochondrial biogenesis in muscle cells. *Am.J.Physiol Endocrinol.Metab*, **283**, E1040-E1045.
- Ojuka,E.O., Jones,T.E., Han,D.H., Chen,M., et Holloszy,J.O. (2003) Raising Ca²⁺ in L6 myotubes mimics effects of exercise on mitochondrial biogenesis in muscle. *FASEB J.*, **17**, 675-681.
- Ojuka,E.O. (2004) Role of calcium and AMP kinase in the regulation of mitochondrial biogenesis and GLUT4 levels in muscle. *Proc.Nutr.Soc.*, **63**, 275-278.
- Oki,N., Takahashi,S.I., Hidaka,H., et Conti,M. (2000) Short term feedback regulation of cAMP in FRTL-5 thyroid cells. Role of PDE4D3 phosphodiesterase activation. *J.Biol.Chem.*, **275**, 10831-10837.
- Ongwijitwat,S., Liang,H.L., Graboyes,E.M., et Wong-Riley,M.T. (2006) Nuclear respiratory factor 2 senses changing cellular energy demands and its silencing down-regulates cytochrome oxidase and other target gene mRNAs. *Gene*, **374**, 39-49.
- Palos-Paz,F., Perez-Guerra,O., Cameselle-Teijeiro,J., Rueda-Chimeno,C., Barreiro-Morandeira,F., Lado-Abeal,J., Araujo,V.D., Argueso,R., Barca,O., Botana,M., Cabezas-Agricola,J.M., Catalina,P., Dominguez,G.L., Fernandez,T., Mato,A., Nuno,A., Penin,M., et Victoria,B. (2008) Prevalence of mutations in TSHR, GNAS, PRKAR1A and RAS genes in a large series of toxic thyroid adenomas from Galicia, an iodine-deficient area in NW Spain. *Eur.J.Endocrinol.*, **159**, 623-631.
- Papa,S., Sardanelli,A.M., Cocco,T., Speranza,F., Scacco,S.C., et Technikova-Dobrova,Z. (1996) The nuclear-encoded 18 kDa (IP) AQDQ subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.*, **379**, 299-301.
- Papa,S., Guerrieri,F., et Capitano,N. (1997) A possible role of slips in cytochrome C oxidase in the antioxygen defense system of the cell. *Biosci.Rep.*, **17**, 23-31.
- Papa,S., Lorusso,M., et Di Paola.M. (2006) Cooperativity and flexibility of the protonmotive activity of mitochondrial respiratory chain. *Biochim.Biophys.Acta*, **1757**, 428-436.
- Papandreou,I., Cairns,R.A., Fontana,L., Lim,A.L., et Denko,N.C. (2006) HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, **3**, 187-197.

- Perez-Campo,R., Lopez-Torres,M., Cadenas,S., Rojas,C., et Barja,G. (1998) The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J.Comp Physiol B*, **168**, 149-158.
- Peyssonnaud,C. et Eychene,A. (2001) The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biol.Cell*, **93**, 53-62.
- Poderoso,J.J., Carreras,M.C., Lisdero,C., Riobo,N., Schopfer,F., et Boveris,A. (1996) Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch.Biochem.Biophys.*, **328**, 85-92.
- Poeggeler,B., Knuever,J., Gaspar,E., Bir,T., Klinger,M., Bod,E., Wiesner,R.J., Wenzel,B.E., et Paus,R. (2010) Thyrotropin powers human mitochondria. *FASEB J.*
- Polyak,K., Li,Y., Zhu,H., Lengauer,C., Willson,J.K., Markowitz,S.D., Trush,M.A., Kinzler,K.W., et Vogelstein,B. (1998) Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat.Genet.*, **20**, 291-293.
- Powell,D.J.Jr., Russell,J., Nibu,K., Li,G., Rhee,E., Liao,M., Goldstein,M., Keane,W.M., Santoro,M., Fusco,A., et Rothstein,J.L. (1998) The RET/PTC3 oncogene: metastatic solid-type papillary carcinomas in murine thyroids. *Cancer Res.*, **58**, 5523-5528.
- Psarra,A.M. et Sekeris,C.E. (2009) Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochim.Biophys.Acta*, **1787**, 431-436.
- Puigserver,P., Wu,Z., Park,C.W., Graves,R., Wright,M., et Spiegelman,B.M. (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*, **92**, 829-839.
- Quintero,M., Brennan,P.A., Thomas,G.J., et Moncada,S. (2006) Nitric oxide is a factor in the stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in cancer: role of free radical formation. *Cancer Res.*, **66**, 770-774.
- Rangwala,S.M., Li,X., Lindsley,L., Wang,X., Shaughnessy,S., Daniels,T.G., Szustakowski,J., Nirmala,N.R., Wu,Z., et Stevenson,S.C. (2007) Estrogen-related receptor alpha is essential for the expression of antioxidant protection genes and mitochondrial function. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **357**, 231-236.
- Rasbach,K.A., Green,P.T., et Schnellmann,R.G. (2008) Oxidants and Ca²⁺ induce PGC-1alpha degradation through calpain. *Arch.Biochem.Biophys.*, **478**, 130-135.
- Reddi,H.V., McIver,B., Grebe,S.K., et Eberhardt,N.L. (2007) The paired box-8/peroxisome proliferator-activated receptor-gamma oncogene in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology*, **148**, 932-935.
- Reinecke,F., Smeitink,J.A., et van der Westhuizen,F.H. (2009) OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders. *Biochim.Biophys.Acta*, **1792**, 1113-1121.
- Reznick,R.M. et Shulman,G.I. (2006) The role of AMP-activated protein kinase in mitochondrial biogenesis. *J.Physiol*, **574**, 33-39.
- Richards,J.S. (2001) New signaling pathways for hormones and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate action in endocrine cells. *Mol.Endocrinol.*, **15**, 209-218.

- Rigutto,S., Hoste,C., Grasberger,H., Milenkovic,M., Communi,D., Dumont,J.E., Corvilain,B., Miot,F., et De Deken,X. (2009) Activation of dual oxidases Duox1 and Duox2: differential regulation mediated by camp-dependent protein kinase and protein kinase C-dependent phosphorylation. *J.Biol.Chem.*, **284**, 6725-6734.
- Ringel,M.D., Hayre,N., Saito,J., Saunier,B., Schuppert,F., Burch,H., Bernet,V., Burman,K.D., Kohn,L.D., et Saji,M. (2001) Overexpression and overactivation of Akt in thyroid carcinoma. *Cancer Res.*, **61**, 6105-6111.
- Rivas,M. et Santisteban,P. (2003) TSH-activated signaling pathways in thyroid tumorigenesis. *Mol.Cell Endocrinol.*, **213**, 31-45.
- Rocha,A.S., Paternot,S., Coulonval,K., Dumont,J.E., Soares,P., et Roger,P.P. (2008) Cyclic AMP inhibits the proliferation of thyroid carcinoma cell lines through regulation of CDK4 phosphorylation. *Mol.Biol.Cell*, **19**, 4814-4825.
- Rogounovitch,T., Saenko,V., et Yamashita,S. (2004) Mitochondrial DNA and human thyroid diseases. *Endocr.J.*, **51**, 265-277.
- Rolfe,D.F. et Brown,G.C. (1997) Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev.*, **77**, 731-758.
- Rosenberg,D., Groussin,L., Jullian,E., Perlemoine,K., Bertagna,X., et Bertherat,J. (2002) Role of the PKA-regulated transcription factor CREB in development and tumorigenesis of endocrine tissues. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **968**, 65-74.
- Rossignol,R., Gilkerson,R., Aggeler,R., Yamagata,K., Remington,S.J., et Capaldi,R.A. (2004) Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.*, **64**, 985-993.
- Royaux,I.E., Suzuki,K., Mori,A., Katoh,R., Everett,L.A., Kohn,L.D., et Green,E.D. (2000) Pendrin, the protein encoded by the Pendred syndrome gene (PDS), is an apical porter of iodide in the thyroid and is regulated by thyroglobulin in FRTL-5 cells. *Endocrinology*, **141**, 839-845.
- Russell,A.P., Hesselink,M.K., Lo,S.K., et Schrauwen,P. (2005) Regulation of metabolic transcriptional co-activators and transcription factors with acute exercise. *FASEB J.*, **19**, 986-988.
- Rustin,P., Munnich,A., et Rotig,A. (2002) Succinate dehydrogenase and human diseases: new insights into a well-known enzyme. *Eur.J.Hum.Genet.*, **10**, 289-291.
- Sanchez-Arago,M., Chamorro,M., et Cuezva,J.M. (2010) Selection of cancer cells with repressed mitochondria triggers colon cancer progression. *Carcinogenesis*, **31**, 567-576.
- Savagner,F., Chevrollier,A., Loiseau,D., Morgan,C., Reynier,P., Clark,O., Stepien,G., et Malthiery,Y. (2001a) Mitochondrial activity in XTC.UC1 cells derived from thyroid oncocyoma. *Thyroid*, **11**, 327-333.
- Savagner,F., Franc,B., Guyetant,S., Rodien,P., Reynier,P., et Malthiery,Y. (2001b) Defective mitochondrial ATP synthesis in oxyphilic thyroid tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **86**, 4920-4925.

- Savagner,F., Mirebeau,D., Jacques,C., Guyetant,S., Morgan,C., Franc,B., Reynier,P., et Malthiery,Y. (2003) PGC-1-related coactivator and targets are upregulated in thyroid oncocyoma. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **310**, 779-784.
- Scarpulla,R.C. (2002) Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene*, **286**, 81-89.
- Scarpulla,R.C. (2008a) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol Rev.*, **88**, 611-638.
- Scarpulla,R.C. (2008b) Nuclear control of respiratory chain expression by nuclear respiratory factors and PGC-1-related coactivator. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1147**, 321-334.
- Schagger,H. et Pfeiffer,K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.*, **19**, 1777-1783.
- Schreiber,S.N., Knutti,D., Brogli,K., Uhlmann,T., et Kralli,A. (2003) The transcriptional coactivator PGC-1 regulates the expression and activity of the orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha (ERRalpha). *J.Biol.Chem.*, **278**, 9013-9018.
- Schreiber,S.N., Emter,R., Hock,M.B., Knutti,D., Cardenas,J., Podvinec,M., Oakeley,E.J., et Kralli,A. (2004) The estrogen-related receptor alpha (ERRalpha) functions in PPARgamma coactivator 1alpha (PGC-1alpha)-induced mitochondrial biogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, **101**, 6472-6477.
- Schweppe,R.E., Klopper,J.P., Korch,C., Pugazhenti,U., Benezra,M., Knauf,J.A., Fagin,J.A., Marlow,L.A., Copland,J.A., Smallridge,R.C., et Haugen,B.R. (2008) Deoxyribonucleic acid profiling analysis of 40 human thyroid cancer cell lines reveals cross-contamination resulting in cell line redundancy and misidentification. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **93**, 4331-4341.
- Seelan,R.S. et 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**, 10175-10181.
- Sennequier,N. et Vadon-Le Goff,S. (1998) Biosynthèse du monoxyde d'azote (NO) : mécanisme, régulation et contrôle. *Médecine sciences*. ISSN 0767-0974, 14, **11**, 1185-1195.
- Shabalina,I.G., Kramarova,T.V., Nedergaard,J., et 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**, 405-414.
- Sharpe,M.A. et Cooper,C.E. (1998) Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity. *J.Biol.Chem.*, **273**, 30961-30972.
- Shinohara,M., Chung,Y.J., Saji,M., et Ringel,M.D. (2007) AKT in thyroid tumorigenesis and progression. *Endocrinology*, **148**, 942-947.
- Silva,J.E. (1995) Thyroid hormone control of thermogenesis et energy balance. *Thyroid*, **5**, 481-492.

- Singh,S.P., McDonald,D., Hope,T.J., et Prabhakar,B.S. (2004) Upon thyrotropin binding the thyrotropin receptor is internalized and localized to endosome. *Endocrinology*, **145**, 1003-1010.
- Smanik,P.A., Liu,Q., Furminger,T.L., Ryu,K., Xing,S., Mazzaferri,E.L., et Jhiang,S.M. (1996) Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **226**, 339-345.
- Sonoda,J., Laganriere,J., Mehl,I.R., Barish,G.D., Chong,L.W., Li,X., Scheffler,I.E., Mock,D.C., Bataille,A.R., Robert,F., Lee,C.H., Giguere,V., et Evans,R.M. (2007) Nuclear receptor ERR alpha and coactivator PGC-1 beta are effectors of IFN-gamma-induced host defense. *Genes Dev.*, **21**, 1909-1920.
- Spitzweg,C., Joba,W., Eisenmenger,W., et Heufelder,A.E. (1998) Analysis of human sodium iodide symporter gene expression in extrathyroidal tissues and cloning of its complementary deoxyribonucleic acids from salivary gland, mammary gland, and gastric mucosa. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **83**, 1746-1751.
- St-Pierre,J., Lin,J., Krauss,S., Tarr,P.T., Yang,R., Newgard,C.B., et Spiegelman,B.M. (2003) Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *J.Biol.Chem.*, **278**, 26597-26603.
- St-Pierre,J., Drori,S., Uldry,M., Silvaggi,J.M., Rhee,J., Jager,S., Handschin,C., Zheng,K., Lin,J., Yang,W., Simon,D.K., Bachoo,R., et Spiegelman,B.M. (2006) Suppression of reactive oxygen species and neurodegeneration by the PGC-1 transcriptional coactivators. *Cell*, **127**, 397-408.
- Stankov,K., Biondi,A., D'Aurelio,M., Gasparre,G., Falasca,A., Romeo,G., et Lenaz,G. (2006) Mitochondrial activities of a cell line derived from thyroid Hurthle cell tumors. *Thyroid*, **16**, 325-331.
- Stewart,L., Glenn,G.M., Stratton,P., Goldstein,A.M., Merino,M.J., Tucker,M.A., Linehan,W.M., et Toro,J.R. (2008) Association of germline mutations in the fumarate hydratase gene and uterine fibroids in women with hereditary leiomyomatosis and renal cell cancer. *Arch.Dermatol.*, **144**, 1584-1592.
- Stewart,V.C. et Heales,S.J. (2003) Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration. *Free Radic.Biol.Med.*, **34**, 287-303.
- Stiburek,L., Hansikova,H., Tesarova,M., Cerna,L., et Zeman,J. (2006) Biogenesis of eukaryotic cytochrome c oxidase. *Physiol Res.*, **55 Suppl 2**, S27-S41.
- Suzuki,H., Kumagai,T., Goto,A., et 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**, 542-545.
- Terada,S., Goto,M., Kato,M., Kawanaka,K., Shimokawa,T., et Tabata,I. (2002) Effects of low-intensity prolonged exercise on PGC-1 mRNA expression in rat epitrochlearis muscle. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **296**, 350-354.

- Trenker,M., Malli,R., Fertschai,I., Levak-Frank,S., et Graier,W.F. (2007) Uncoupling proteins 2 and 3 are fundamental for mitochondrial Ca²⁺ uniport. *Nat.Cell Biol.*, **9**, 445-452.
- Tsien,R.Y. (1980) New calcium indicators and buffers with high selectivity against magnesium and protons: design, synthesis, and properties of prototype structures. *Biochemistry*, **19**, 2396-2404.
- Tusher,V.G., Tibshirani,R., et Chu,G. (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **98**, 5116-5121.
- Uyttersprot,N., Costagliola,S., Dumont,J.E., et Miot,F. (1999) Requirement for cAMP-response element (CRE) binding protein/CRE modulator transcription factors in thyrotropin-induced proliferation of dog thyroid cells in primary culture. *Eur.J.Biochem.*, **259**, 370-378.
- Valero,R.A., Senovilla,L., Nunez,L., et Villalobos,C. (2008) The role of mitochondrial potential in control of calcium signals involved in cell proliferation. *Cell Calcium*, **44**, 259-269.
- Valko,M., Leibfritz,D., Moncol,J., Cronin,M.T., Mazur,M., et Telser,J. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, **39**, 44-84.
- van Staveren,W.C., Solis,D.Y., Hebrant,A., Detours,V., Dumont,J.E., et Maenhaut,C. (2009) Human cancer cell lines: Experimental models for cancer cells in situ? For cancer stem cells? *Biochim.Biophys.Acta*, **1795**, 92-103.
- Vega,R.B., Huss,J.M., et Kelly,D.P. (2000) The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor alpha in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol.Cell Biol.*, **20**, 1868-1876.
- Vercauteren,K., Pasko,R.A., Gleyzer,N., Marino,V.M., et Scarpulla,R.C. (2006) PGC-1-related coactivator: immediate early expression and characterization of a CREB/NRF-1 binding domain associated with cytochrome c promoter occupancy and respiratory growth. *Mol.Cell Biol.*, **26**, 7409-7419.
- Vercauteren,K., Gleyzer,N., et Scarpulla,R.C. (2008) PGC-1-related coactivator complexes with HCF-1 and NRF-2beta in mediating NRF-2(GABP)-dependent respiratory gene expression. *J.Biol.Chem.*, **283**, 12102-12111.
- Vercauteren,K., Gleyzer,N., et Scarpulla,R.C. (2009) Short hairpin RNA-mediated silencing of PRC (PGC-1-related coactivator) results in a severe respiratory chain deficiency associated with the proliferation of aberrant mitochondria. *J.Biol.Chem.*, **284**, 2307-2319.
- Villena,J.A., Hock,M.B., Chang,W.Y., Barcas,J.E., Giguere,V., et Kralli,A. (2007) Orphan nuclear receptor estrogen-related receptor alpha is essential for adaptive thermogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* , **104**, 1418-1423.
- Villena,J.A. et Kralli,A. (2008) ERRalpha: a metabolic function for the oldest orphan. *Trends Endocrinol.Metab*, **19**, 269-276.

- Virbasius,J.V., Virbasius,C.A., et Scarpulla,R.C. (1993) Identity of GABP with NRF-2, a multisubunit activator of cytochrome oxidase expression, reveals a cellular role for an ETS domain activator of viral promoters. *Genes Dev.*, **7**, 380-392.
- Vlaeminck-Guillem,V. (2003) Structure et physiologie thyroïdiennes. *Encycl. Méd. Chir.,Endocrinologie-Nutrition*, 10-002-B-10.
- Vonck,J. et Schafer,E. (2009) Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. *Biochim.Biophys.Acta*, **1793**, 117-124.
- Walford,G. et Loscalzo,J. (2003) Nitric oxide in vascular biology. *J.Thromb.Haemost.*, **1**, 2112-2118.
- Wallberg,A.E., Yamamura,S., Malik,S., Spiegelman,B.M., et Roeder,R.G. (2003) Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol.Cell*, **12**, 1137-1149.
- Wang,C., Li,Z., Lu,Y., Du,R., Katiyar,S., Yang,J., Fu,M., Leader,J.E., Quong,A., Novikoff,P.M., et Pestell,R.G. (2006) Cyclin D1 repression of nuclear respiratory factor 1 integrates nuclear DNA synthesis and mitochondrial function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **103**, 11567-11572.
- Wang,H. et Morais,R. (1997) Up-regulation of nuclear genes in response to inhibition of mitochondrial DNA expression in chicken cells. *Biochim.Biophys.Acta*, **1352**, 325-334.
- Weitzel,J.M., Iwen,K.A., et Seitz,H.J. (2003) Regulation of mitochondrial biogenesis by thyroid hormone. *Exp.Physiol*, **88**, 121-128.
- Woloshin,P.I., Walton,K.M., Rehfuss,R.P., Goodman,R.H., et Cone,R.D. (1992) 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulated enhancer binding (CREB) activity is required for normal growth and differentiated phenotype in the FRTL5 thyroid follicular cell line. *Mol.Endocrinol.*, **6**, 1725-1733.
- Wright,D.C., Geiger,P.C., Han,D.H., Jones,T.E., et 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**, 18793-18799.
- Wu,G., Mambo,E., Guo,Z., Hu,S., Huang,X., Gollin,S.M., Trink,B., Ladenson,P.W., Sidransky,D., et Xing,M. (2005) Uncommon mutation, but common amplifications, of the PIK3CA gene in thyroid tumors. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, **90**, 4688-4693.
- Wu,H., Kanatous,S.B., Thurmond,F.A., Gallardo,T., Isotani,E., Bassel-Duby,R., et Williams,R.S. (2002) Regulation of mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by CaMK. *Science*, **296**, 349-352.
- Wu,Z., Puigserver,P., Andersson,U., Zhang,C., Adelmant,G., Mootha,V., Troy,A., Cinti,S., Lowell,B., Scarpulla,R.C., et Spiegelman,B.M. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell*, **98** , 115-124.
- Xing,M. (2007) BRAF mutation in papillary thyroid cancer: pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. *Endocr.Rev.*, **28**, 742-762.

- Yan, Y., Wei, C.L., Zhang, W.R., Cheng, H.P., et Liu, J. (2006) Cross-talk between calcium and reactive oxygen species signaling. *Acta Pharmacol.Sin.*, **27**, 821-826.
- Yang, Z.F., Mott, S., et Rosmarin, A.G. (2007) The Ets transcription factor GABP is required for cell-cycle progression. *Nat.Cell Biol.*, **9**, 339-346.
- Yeh, J.J., Lunetta, K.L., van Orsouw, N.J., Moore, F.D.Jr., Mutter, G.L., Vijg, J., Dahia, P.L., et Eng, C. (2000) Somatic mitochondrial DNA (mtDNA) mutations in papillary thyroid carcinomas and differential mtDNA sequence variants in cases with thyroid tumours. *Oncogene*, **19**, 2060-2066.
- Yeh, T.S., Ho, J.D., Yang, V.W., Tzeng, C.R., et Hsieh, R.H. (2005) Calcium stimulates mitochondrial biogenesis in human granulosa cells. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, **1042**, 157-162.
- Yen, P.M. (2001) Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiol Rev.*, **81**, 1097-1142.
- Yen, P.M., Ando, S., Feng, X., Liu, Y., Maruvada, P., et Xia, X. (2006) Thyroid hormone action at the cellular, genomic and target gene levels. *Mol.Cell Endocrinol.*, **246**, 121-127.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., Newgard, C.B., et Spiegelman, B.M. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 131-138.
- Yoon, J.C., Puigserver, P., Chen, G., Donovan, J., Wu, Z., Rhee, J., Adelmant, G., Stafford, J., Kahn, C.R., Granner, D.K., Newgard, C.B., et Spiegelman, B.M. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, **413**, 131-138.
- Yoshioka, T., Inagaki, K., Noguchi, T., Sakai, M., Ogawa, W., Hosooka, T., Iguchi, H., Watanabe, E., Matsuki, Y., Hiramatsu, R., et Kasuga, M. (2009) Identification and characterization of an alternative promoter of the human PGC-1 α gene. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, **381**, 537-543.
- Zaballos, M.A., Garcia, B., et Santisteban, P. (2008) Gbetagamma dimers released in response to thyrotropin activate phosphoinositide 3-kinase and regulate gene expression in thyroid cells. *Mol.Endocrinol.*, **22**, 1183-1199.
- Zeeberg, B.R., Feng, W., Wang, G., Wang, M.D., Fojo, A.T., Sunshine, M., Narasimhan, S., Kane, D.W., Reinhold, W.C., Lababidi, S., Bussey, K.J., Riss, J., Barrett, J.C., et Weinstein, J.N. (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biol.*, **4**, R28.
- Zhang, J., Jin, B., Li, L., Block, E.R., et Patel, J.M. (2005) Nitric oxide-induced persistent inhibition and nitrosylation of active site cysteine residues of mitochondrial cytochrome-c oxidase in lung endothelial cells. *Am.J.Physiol Cell Physiol*, **288**, C840-C849.
- Zhang, P., Zuo, H., Nakamura, Y., Nakamura, M., Wakasa, T., and Kakudo, K. (2006) Immunohistochemical analysis of thyroid-specific transcription factors in thyroid tumors. *Pathol.Int.*, **56**, 240-245.

Zielke,A., Tezelman,S., Jossart,G.H., Wong,M., Siperstein,A.E., Duh,Q.Y., et Clark,O.H. (1998) Establishment of a highly differentiated thyroid cancer cell line of Hurthle cell origin. *Thyroid*, **8**, 475-483.

Zong,H., Ren,J.M., Young,L.H., Pypaert,M., Mu,J., Birnbaum,M.J., et Shulman,G.I. (2002) AMP kinase is required for mitochondrial biogenesis in skeletal muscle in response to chronic energy deprivation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, **99**, 15983-15987.

Publications

Publications :

- **PGC-1-related coactivator modulates mitochondrial-nuclear crosstalk through endogenous nitric oxide**, PLoS ONE, 2009.

Soazig Le Pennec, Mahatsangy Raharijaona, Julie Poirier, Delphine Mirebeau-Prunier, Clothilde Rouxel, Caroline Jacques, Jean-Fred Fontaine, Yves Malthièry, Rémi Houlgatte, Frédérique Savagner.

- **Estrogen-related receptor alpha and PGC-1-related coactivator constitute a novel complex mediating the biogenesis of functional mitochondria**, FEBS, 2010.

Delphine Mirebeau-Prunier, Soazig Le Pennec, Caroline Jacques, Naïg Gueguen, Julie Poirier, Yves Malthièry, Frédérique Savagner.

Posters :

- Poster présenté au **congrès FEBS**, Prague, juillet 2009 :

Modulation of the nuclear-mitochondrial crosstalk through endogenous nitric oxide / PGC-1-related coactivator pathway.

Soazig Le Pennec, Raharijaona Mahatsangy, Julie Poirier, Delphine Mirebeau-Prunier, Caroline Jacques, Jean-Fred Fontaine, Yves Malthièry, Remi Houlgatte, Frédérique Savagner.

- Poster présenté au **congrès ETA**, Lisbonne, septembre 2009 :

Nitric oxide signalling as a central pathway controlling the oxidative metabolism of follicular thyroid carcinoma.

Soazig Le Pennec, Caroline Jacques, Julie Poirier, Yves Malthièry, Frédérique Savagner, Delphine Mirebeau-Prunier.

Résumé :

L'énergie indispensable au fonctionnement de la cellule est produite principalement par la mitochondrie grâce au mécanisme de phosphorylation oxydative impliquant des protéines codées par le génome nucléaire et celui de la mitochondrie. La coordination transcriptionnelle de ces génomes est nécessaire à la biogenèse de mitochondries fonctionnelles, et est assurée par divers facteurs de transcription, tels que les NRFs (Nuclear Respiratory Factors) et les ERRs (Estrogen-Related Receptors). Leur efficacité transcriptionnelle est contrôlée par les coactivateurs de la famille PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1) – PGC-1 α , PGC-1 β et PRC (PGC-1-Related Coactivator) – dont l'expression dépend de signaux endogènes ou environnementaux. Afin de préciser le rôle de PRC dans le dialogue nucléo-mitochondrial, nous avons utilisé plusieurs modèles cellulaires de carcinomes folliculaires thyroïdiens humains (RO82 W-1, FTC-133 et XTC.UC1) présentant une richesse en mitochondries, une orientation métabolique et des niveaux d'expression de PRC et de PGC-1 α différents. Ce travail a mis en évidence le rôle clef du complexe ERR α -PRC dans la biogenèse de mitochondries fonctionnelles. PRC semble par ailleurs coordonner les phases du cycle cellulaire selon l'efficacité du métabolisme énergétique mitochondrial et le statut redox de la cellule. Dans ces modèles, notre travail a mis en évidence un rôle du monoxyde d'azote et du calcium comme régulateurs de la biogenèse et de la fonction mitochondriales PRC-dépendantes. L'ensemble de ces données fait du coactivateur PRC et des voies qui régulent sa fonction des cibles thérapeutiques potentielles dans les tumeurs.

Mots clés : biogenèse mitochondriale, chaîne respiratoire, PGC-1-Related Coactivator, monoxyde d'azote, calcium.

Abstract :

The main source of energy in the cell derives from the mitochondria through the oxidative phosphorylation process involving proteins coded by both nuclear and mitochondrial genomes. The transcriptional coordination of these genomes is necessary for the biogenesis of functional mitochondria, and is managed by several transcription factors, such as NRFs (Nuclear Respiratory Factors) and ERRs (Estrogen-Related Receptors). Their transcriptional efficiency is controlled by the coactivators of the PGC-1 (Peroxisome proliferator-activated receptor γ Coactivator-1) family – PGC-1 α , PGC-1 β and PRC (PGC-1-Related Coactivator) – their expression depending on endogenous or environmental signals. In order to specify the role of PRC in the nucleo-mitochondrial crosstalk, we used several cellular models of human follicular thyroid carcinomas (RO82 W-1, FTC-133 and XTC.UC1) presenting different mitochondrial richness, metabolic orientation and expression level for PRC and PGC-1 α . This work highlighted the key role of the ERR α -PRC complex in the biogenesis of functional mitochondria. Moreover, PRC seems to coordinate cellular cycle phases with the efficiency of mitochondrial energetic metabolism and the cellular redox status. In these models, our work pointed out a role for nitric oxide and calcium as regulators of the PRC-dependent mitochondrial biogenesis and function. All these data suggest that PRC coactivator and its regulating pathways could be potential therapeutic targets for solid tumors.

Key words : mitochondrial biogenesis, respiratory chain, PGC-1-Related Coactivator, nitric oxide, calcium.

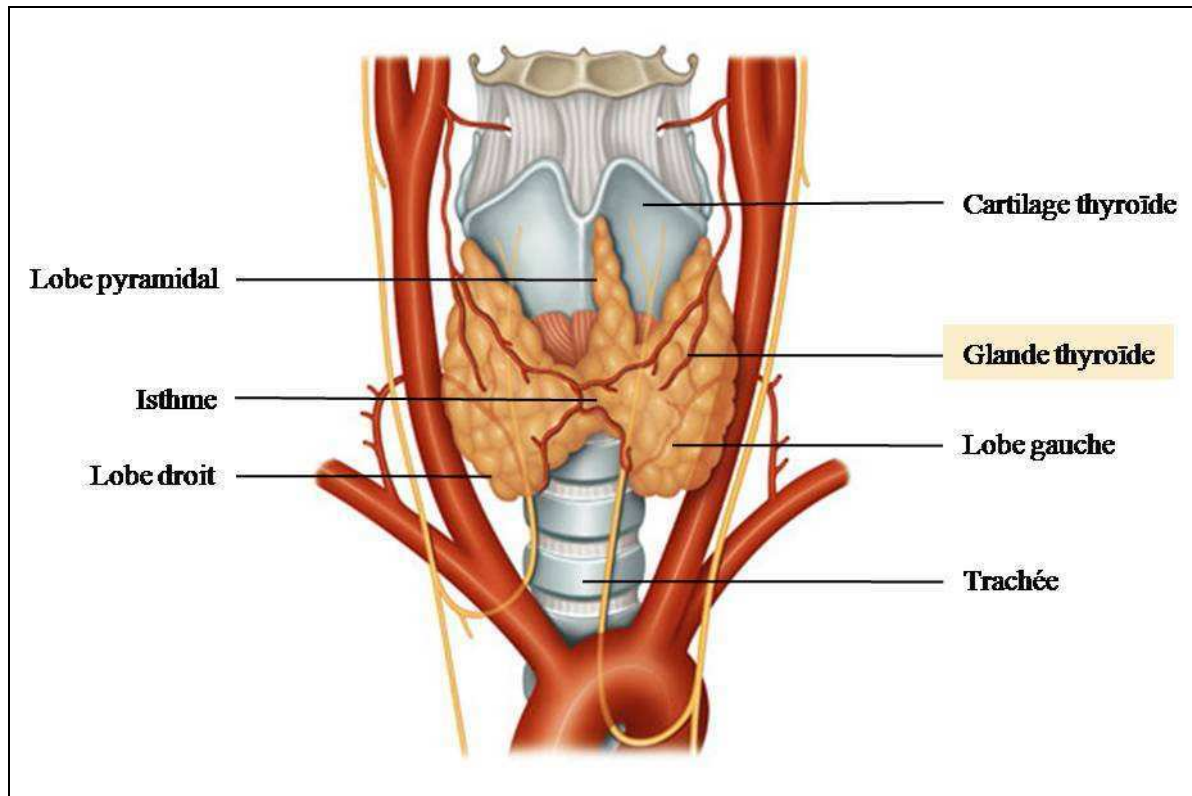


Figure I1 : Localisation anatomique et structure de la glande thyroïde.

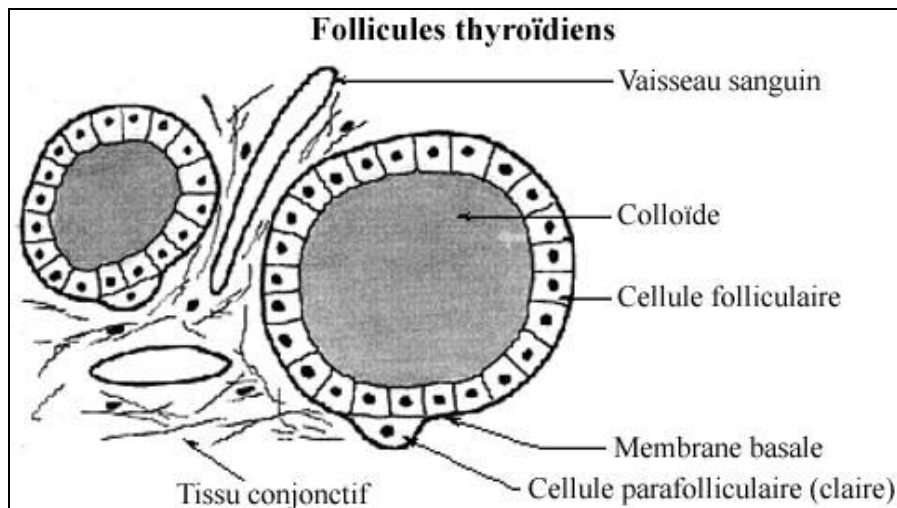


Figure I2 : Histologie thyroïdienne.

L'unité fonctionnelle de la thyroïde est le follicule thyroïdien. Il est formé d'une couronne de cellules folliculaires (ou thyrocytes), dédiées à la biosynthèse des hormones thyroïdiennes (HT) et de cellules plus claires, les cellules C, dédiées à la biosynthèse de la calcitonine. La colloïde, centrale, constitue le stock d'HT. (D'après Vlaeminck-Guillem, 2003).

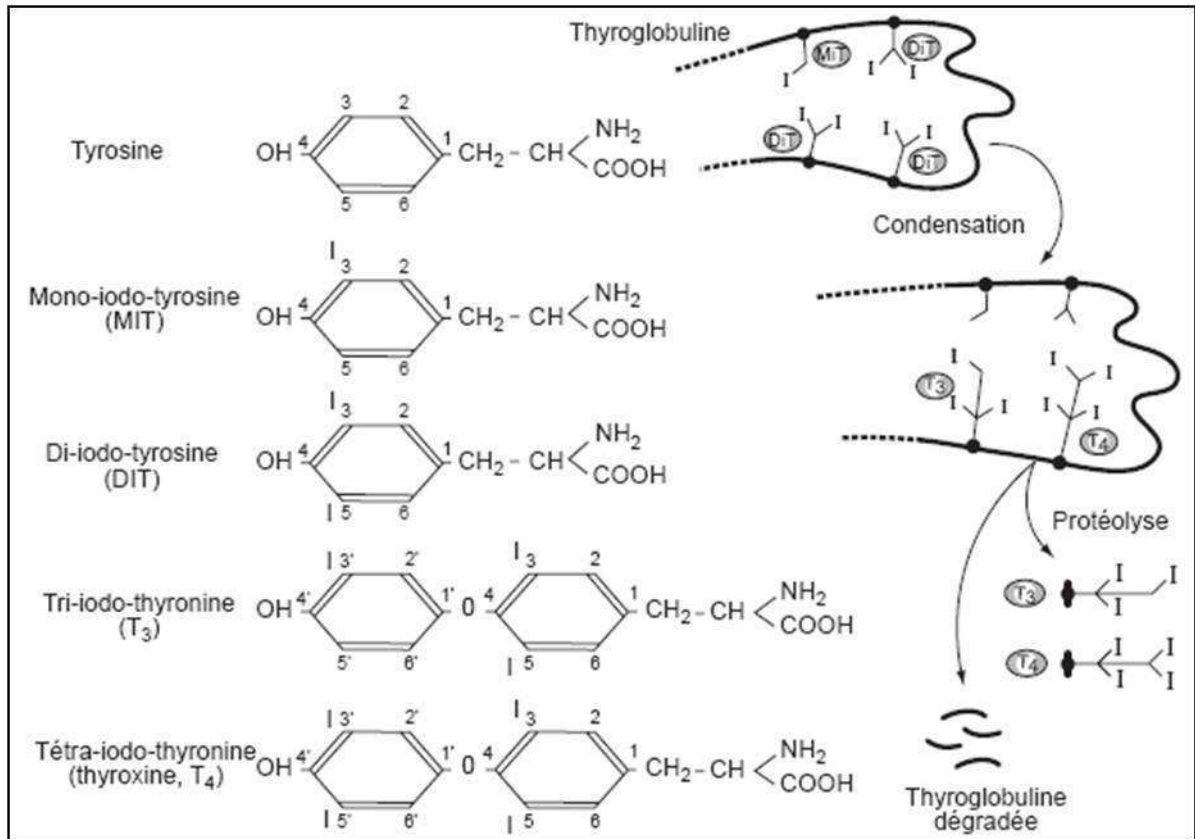


Figure I3 : Les hormones thyroïdiennes et leur libération à partir de la thyroglobuline.

Les hormones thyroïdiennes dérivent des résidus tyrosines contenus dans la thyroglobuline. Un ou deux atomes d'iode sont inclus dans ces résidus aboutissant à la formation des iodo-tyrosines. Par un mécanisme de condensation, les iodo-thyronines sont formées à partir de deux résidus di-iodo-tyrosines (T₄ ou thyroxine ou tétra-iodo-thyronine) ou d'un résidu mono-iodo-tyrosine et d'un résidu di-iodo-tyrosine (T₃ ou tri-iodo-thyronine). Dans les lysosomes, la thyroglobuline est clivée par plusieurs enzymes de façon à libérer les hormones thyroïdiennes. (D'après Vlaeminck-Guillem, 2003).

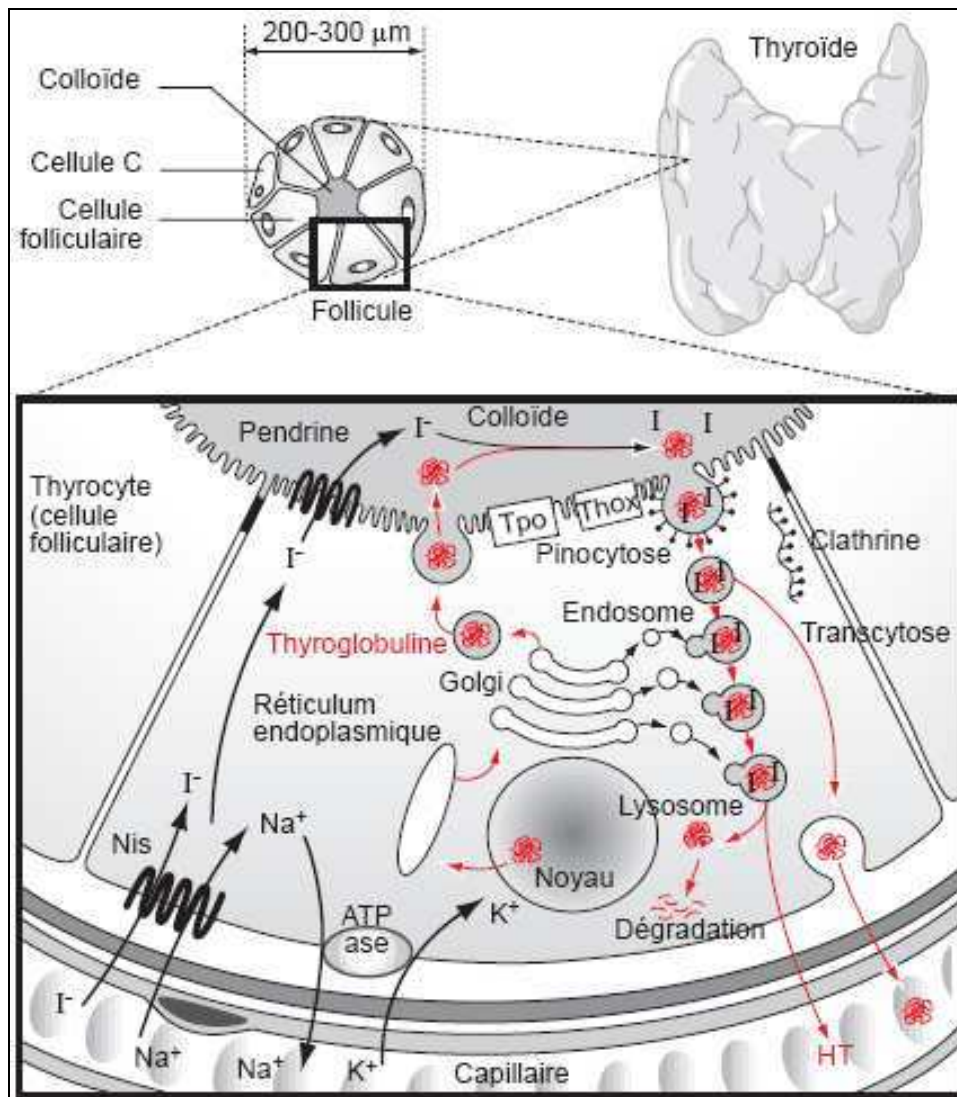


Figure I4 : Biosynthèse des hormones thyroïdiennes.

Dans le thyrocyte, la biosynthèse des hormones thyroïdiennes (HT) dépend du captage de l'ion iodure (I^-) à la membrane basolatérale. Ce captage est assuré par le symporteur du sodium et de l'iodure (NIS) grâce à un gradient de Na^+ entretenu par une adénosine triphosphatase (ATPase) membranaire. Au pôle apical, l'iodure est transporté vers la colloïde grâce à un transporteur spécifique, la pendrine. Sous l'action d'enzymes membranaires, la thyroperoxydase (Tpo) et le système générateur de peroxyde d'hydrogène (la thyroïde oxydase ou Thox), l'iodure est incorporé dans la thyroglobuline (TG) qui contient les précurseurs non iodés des HT. La TG est alors internalisée par pinocytose sous forme de vésicules recouvertes de clathrine. Après libération du manteau de clathrine, la gouttelette de colloïde est successivement fusionnée avec des organites intracytoplasmiques, les endosomes précoces et tardifs puis les lysosomes. Sous l'action des enzymes lysosomiales, les HT sont libérées et sécrétées tandis que la TG est progressivement dégradée. Quelques gouttelettes de colloïde échappent à la fusion avec les lysosomes, traversent la cellule (transcytose) et sécrètent la TG, plus ou moins fortement iodée, dans la circulation générale. (D'après Vlaeminck-Guillem, 2003).

K^+ : ion potassium ; Na^+ : ion sodium.

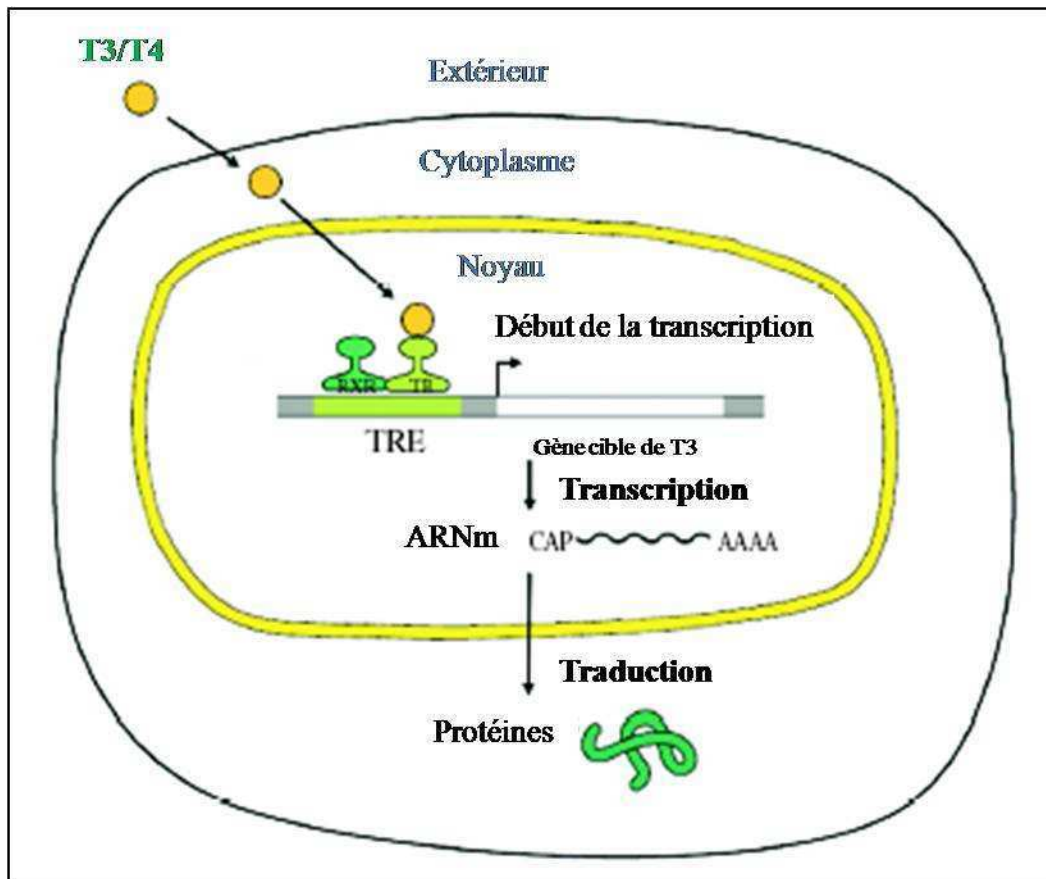


Figure I5 : Modèle d'action des récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans le noyau.

En absence de la T3, les récepteurs aux hormones thyroïdiennes (TRs) présents dans le noyau sous forme de dimères (le plus souvent avec RXR, l'un des récepteurs de l'acide rétinoïque) au niveau des éléments de réponse aux hormones thyroïdiennes (TRE), inhibent l'expression des gènes cibles en liant un complexe multiprotéique répresseur. La liaison de la T3 sur les TRs chasse le complexe répresseur, autorise la fixation d'un complexe multiprotéique activateur et stimule ainsi l'expression des gènes cibles. (D'après Huang *et al.*, 2008).

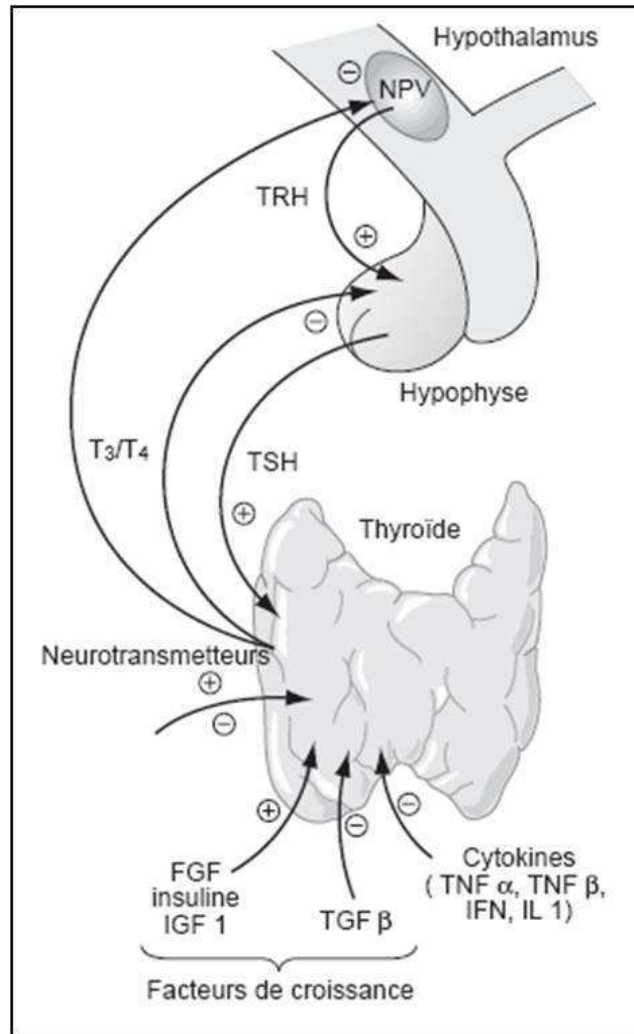


Figure I6 : Contrôle de la fonction thyroïdienne.

La fonction thyroïdienne est contrôlée à plusieurs niveaux. Le tripeptide hypothalamique TRH, produit principalement à partir du noyau paraventriculaire, stimule la production de TSH par l'antéhypophyse. À son tour, la TSH stimule la prolifération des cellules folliculaires thyroïdiennes et la production des hormones thyroïdiennes (T3 et T4). En retour, celles-ci inhibent la sécrétion hypothalamique de TRH et la sécrétion hypophysaire de TSH. De plus, de multiples afférences neuronales stimulent ou inhibent la libération de la TRH dans le NPV. D'autres facteurs agissent directement sur la thyroïde comme les neurotransmetteurs produits par les extrémités axonales des nerfs du système nerveux végétatif, certaines cytokines, qui sont plutôt inhibitrices, ou certains facteurs de croissance. (D'après Vlaeminck-Guillem, 2003).

FGF : Fibroblast Growth Factor ; IFN : Interféron ; IGF-1 : Insulin-like Growth Factor 1 ; IL1 : Interleukine 1 ; NPV : Noyau paraventriculaire ; T₃ : 3,5,3' tri-iodo-thyronine ; T₄ : 3,5,3',5' tétra-iodo-thyronine ; TGFβ : Transforming Growth Factor β ; TNF : Tumor Necrosing Factor ; TRH : Thyrotropin-Releasing Hormone ; TSH : Thyroid Stimulating Hormone.



Figure I7 : Structure du récepteur à la TSH.

Ce modèle informatique de structure du récepteur à la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) montre les sept domaines transmembranaires (TMD) en spirales enchâssés dans la membrane plasmique et une courte partie cytoplasmique qui forment ensemble la sous-unité β/B . La région clivée longue de cinquante acides aminés (316-366) est indiquée en gris. Les neuf répétitions riches en leucines (LRRs), constituées chacune de 20 à 24 acides aminés, décrivent des spirales (hélices α et feuilletts β) au niveau de l'ectodomaine du récepteur et constituent la majeure partie de la sous-unité α/A . Les LRRs ont une forme de fer à cheval avec une surface interne concave. (D'après Davies *et al.*, 2005).

C : C-terminal ; N : N-terminal.

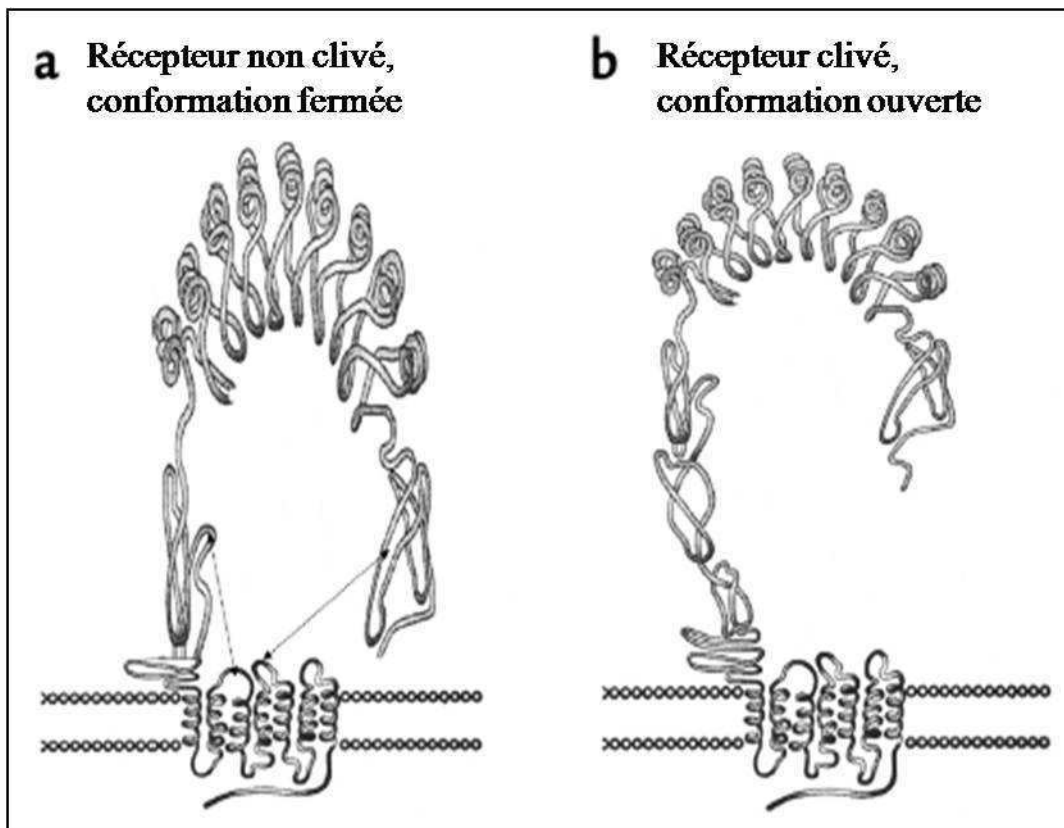


Figure I8 : Conformations structurales du récepteur à la TSH.

Le récepteur à la TSH (Thyroid Stimulating Hormone) non clivé (a) présente une conformation fermée résultant d'interactions entre l'ectodomaine et les domaines transmembranaires. Le clivage du récepteur à ce niveau induit une conformation ouverte (b), étape importante pour la relocalisation et l'activité du récepteur. (D'après Davies *et al.*, 2002).

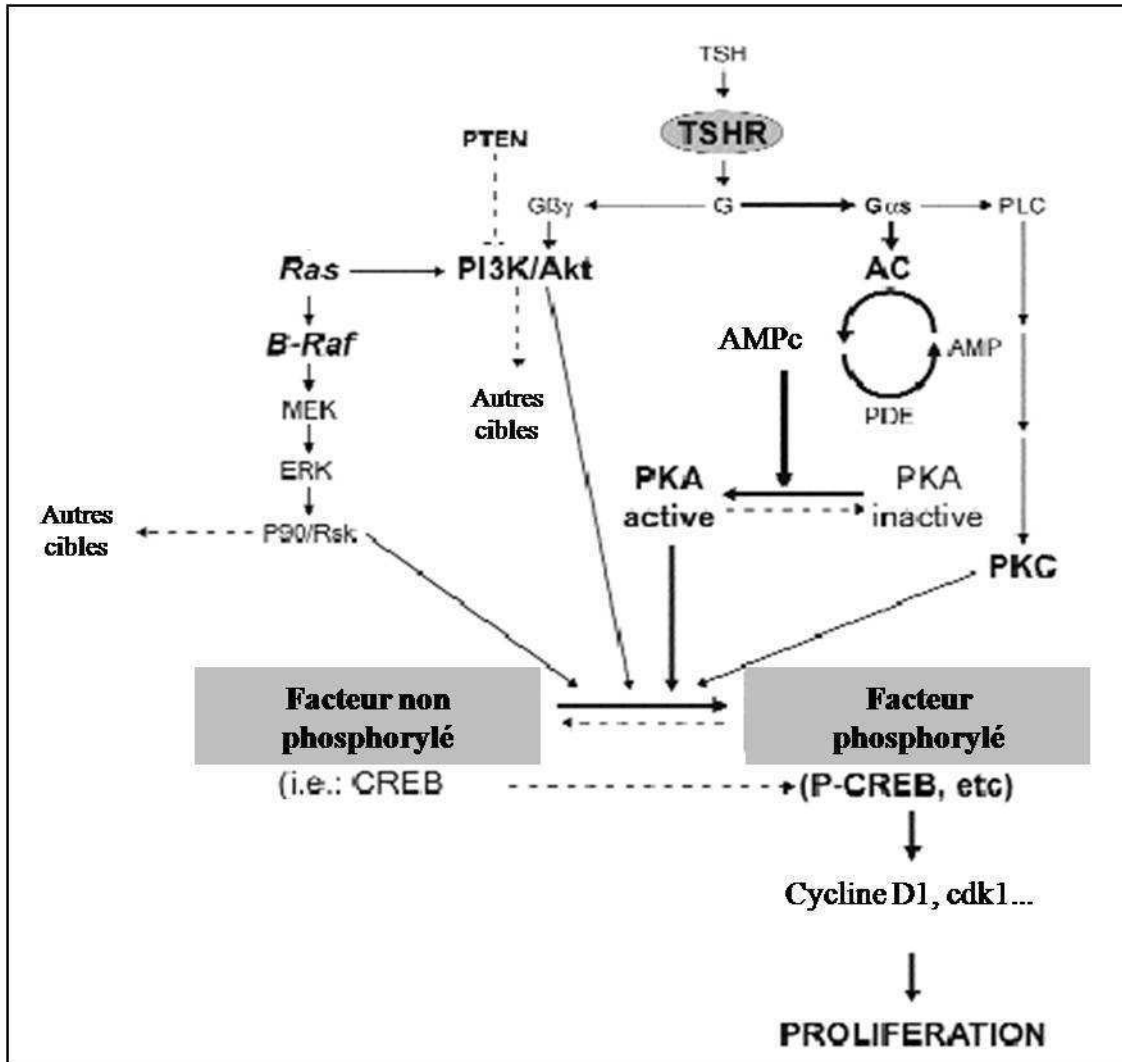


Figure I9 : Voies de signalisation induites par l'activation du TSHR conduisant à la prolifération des thyrocytes humains.

Ce schéma décrit les voies impliquées dans la prolifération des thyrocytes : la voie de signalisation classique du récepteur à la TSH (TSHR) (flèches en gras) et les molécules appartenant aux voies de signalisation associées (flèches normales). Les flèches en pointillés représentent d'autres cibles qui peuvent être liées ou non à ces voies. (D'après García-Jiménez et Santisteban., 2007).

AC : Adénylate Cyclase ; AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique ; cdk1 : cyclin-dependent kinase 1 ; CREB : cAMP Response-Element Binding protein ; ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase ; G : protéines G ; PDE : PhosphoDiEstérases ; PI3K : PhosphatidylInositol 3-Kinase ; PKA : Protéine Kinase A ; PKC : Protéine Kinase C ; PLC : PhosphoLipase C ; PTEN : Phosphatase and TENsin homolog ; TSH : Thyroid Stimulating Hormone.

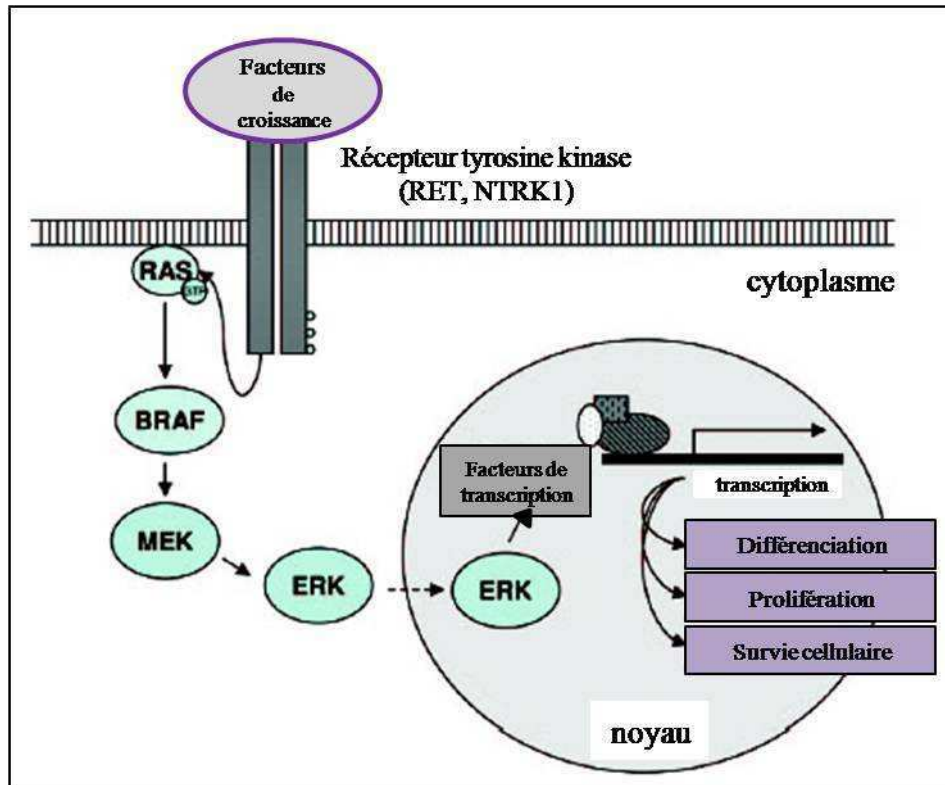


Figure I10 : Voie de signalisation des MAPKs.

Physiologiquement, la liaison de facteurs de croissance à un récepteur à activité tyrosine kinase, tel que RET et NTRK1 (Neurotrophic Tyrosine Kinase Receptor 1), entraîne la dimérisation et l'activation du récepteur par le biais de l'autophosphorylation de résidus tyrosines dans son domaine intracellulaire. Ceci conduit à l'activation de RAS situé au niveau de la face interne de la membrane plasmique par substitution d'un GDP avec un GTP. La protéine RAS liée au GTP recrute les protéines RAF (principalement BRAF dans les cellules folliculaires thyroïdiennes) à la membrane plasmique. BRAF activé peut phosphoryler et activer MEK, qui à son tour phosphoryle et active ERK (Extracellular signal-Regulated Kinase). Une fois activé, ERK phosphoryle des protéines cytoplasmiques et est transloqué dans le noyau où il régule la transcription de gènes impliqués dans la différenciation, la prolifération et la survie cellulaires. (D'après Ciampi et Nikiforov, 2007).

GDP : Guanosine DiPhosphate ; GTP : Guanosine TriPhosphate ; MAPKs : Mitogen-Activated Protein Kinases.

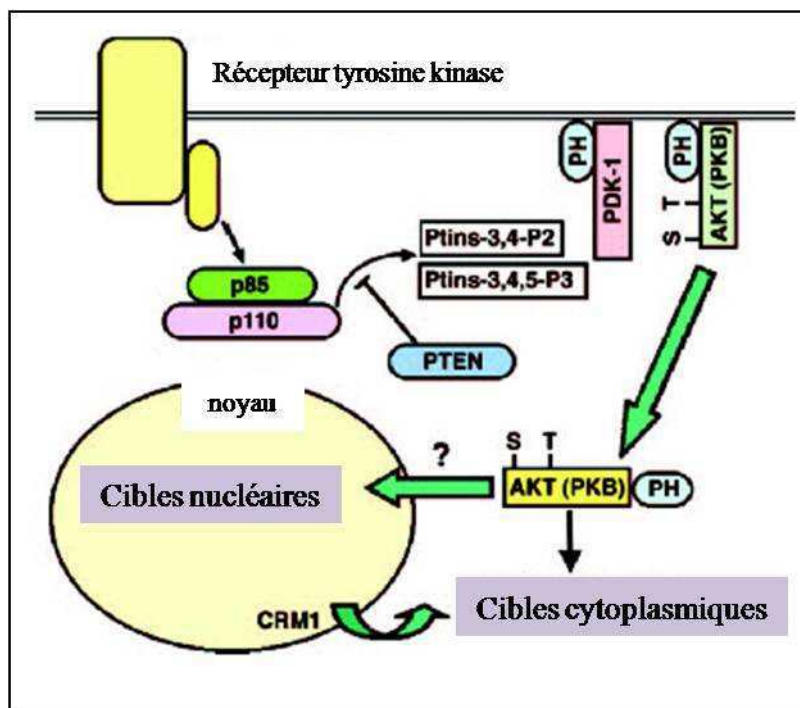


Figure I11 : Activation d'AKT.

Le facteur AKT, aussi appelé PKB (Protéine Kinase B), est une molécule centrale dans la voie de la PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase ; constituée des sous-unités p85 et p110). Son activation implique des interactions entre le domaine d'homologie pleckstrin (PH) d'AKT et les phosphoinositols (Ptins-3,4-P2 et Ptins-3,4,5-P3) générés par l'activité de la PI3K. Ces interactions entraînent la relocalisation d'AKT à la membrane et sa phosphorylation au niveau de la thréonine 308 (T) par la PDK-1 (Phosphoinositide Dependent Kinase 1) et de la sérine 473 (S) par autophosphorylation et d'autres kinases pour une activation maximale. La protéine PTEN (Phosphatase and TENSin homolog) possède une activité lipides phosphatase qui enlève les groupements 3'-OH des phosphoinositols, réduisant ainsi la relocalisation cytoplasmique d'AKT et en conséquence son activation. Une augmentation de l'activité de la PI3K ou une diminution de celle de PTEN entraîne donc une augmentation de l'activité d'AKT. Une fois activée, la protéine AKT phosphoryle de nombreuses cibles dans le cytoplasme ou le noyau. AKT est exportée du noyau grâce à des interactions avec la protéine CRM1 (Chromosome Region Maintenance-1) au niveau d'une séquence d'export nucléaire localisée dans son domaine kinase. (D'après Shinohara *et al.*, 2007).

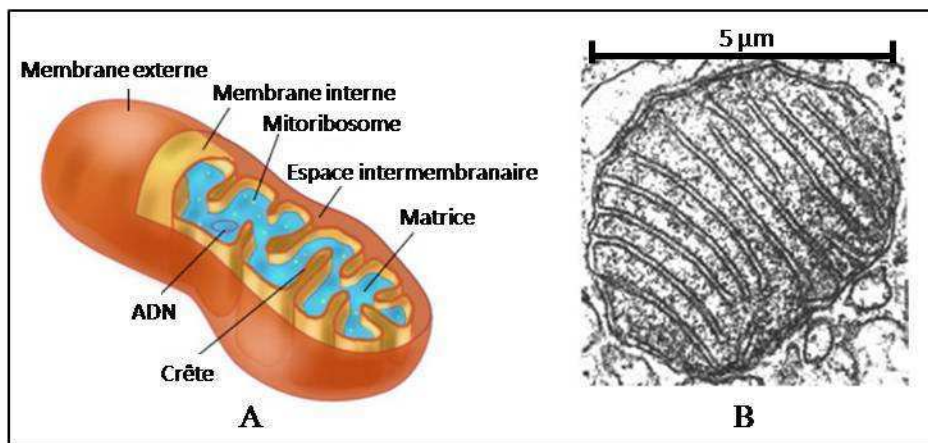


Figure I12 : Ultrastructure mitochondriale.

A : Représentation schématique d'une mitochondrie.

B : Une mitochondrie observée au microscope électronique.

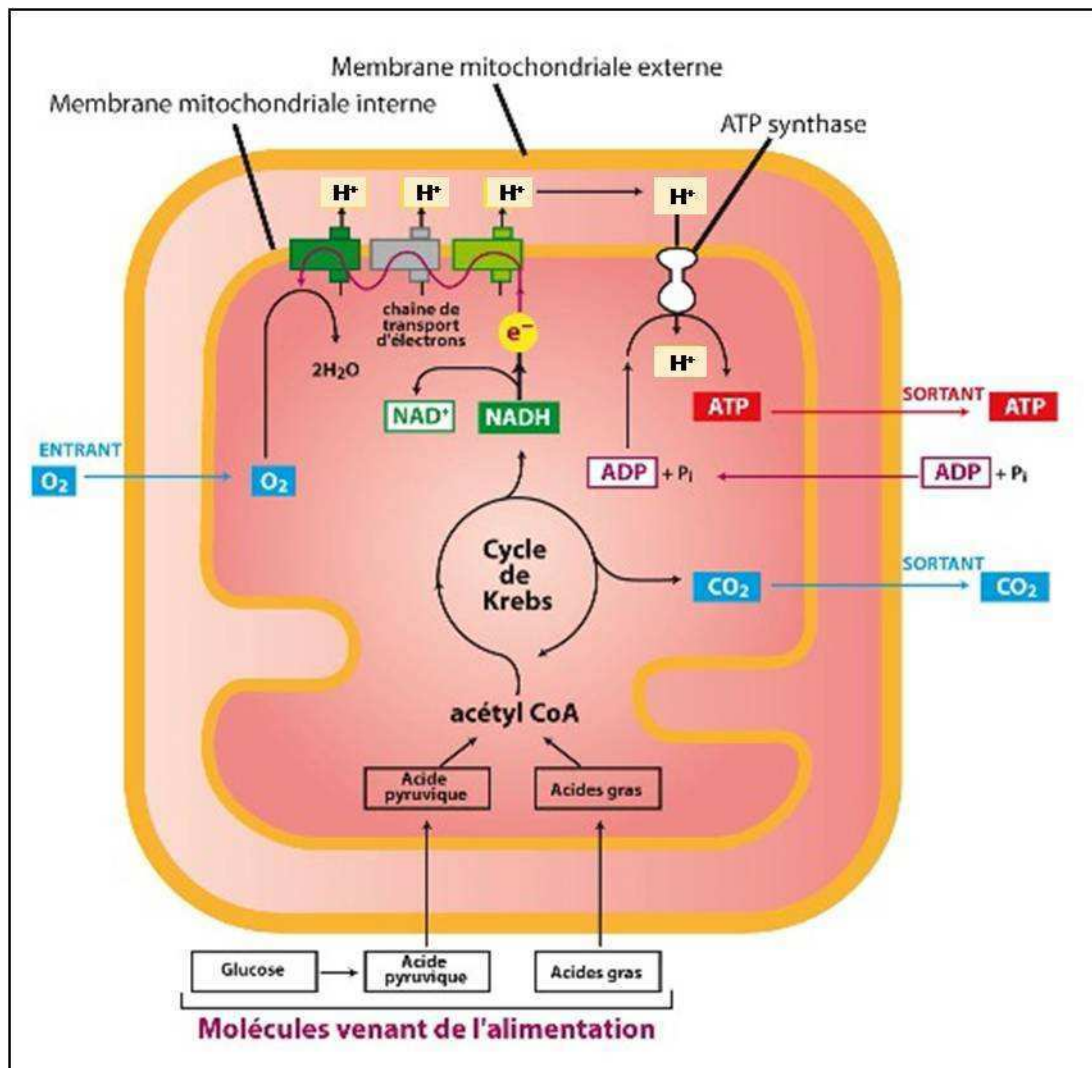


Figure I13 : Métabolisme énergétique mitochondrial.

L'acétyl coenzyme A (acétyl coA) est le composé final commun du catabolisme des glucides et des acides gras. Au niveau de la matrice mitochondriale, ce composé est oxydé au cours du cycle de Krebs qui aboutit à la formation de dioxyde de carbone (CO₂), d'Adénosine TriPhosphate (ATP) et des coenzymes réduits NADH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné) et FADH₂ (Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée). Ces équivalents réduits alimentent ensuite le processus de phosphorylation oxydative au cours duquel le passage des électrons (e⁻) des coenzymes vers l'oxygène (O₂) entraîne la formation d'un gradient de protons (H⁺) de la matrice vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie. En retour, le passage des protons accumulés dans l'espace intermembranaire vers la matrice permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. L'ATP synthétisée, accumulée dans la matrice, va être échangée avec de l'Adénosine DiPhosphate (ADP) grâce à l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT), transporteur membranaire de type antiport qui assure la diffusion facilitée des deux molécules en sens inverse l'une de l'autre. (Schéma provenant du site internet <http://lamaisondalzaz.com/2009/08/16/flux-et-cycles-dans-la-biosphère/>).

P_i : phosphate inorganique.

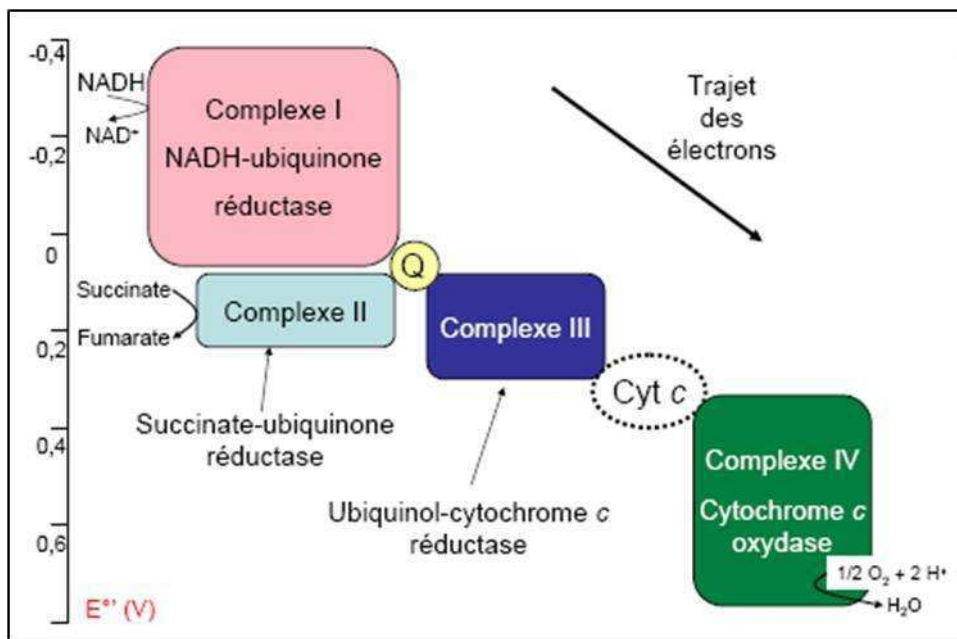


Figure I14 : Transfert des électrons au sein de la chaîne respiratoire en fonction de leur potentiel d'oxydo-réduction E (V).

Cyt *c* : cytochrome *c* ; H⁺ : protons ; H₂O : eau ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; O₂ : dioxygène ; Q : ubiquinone.

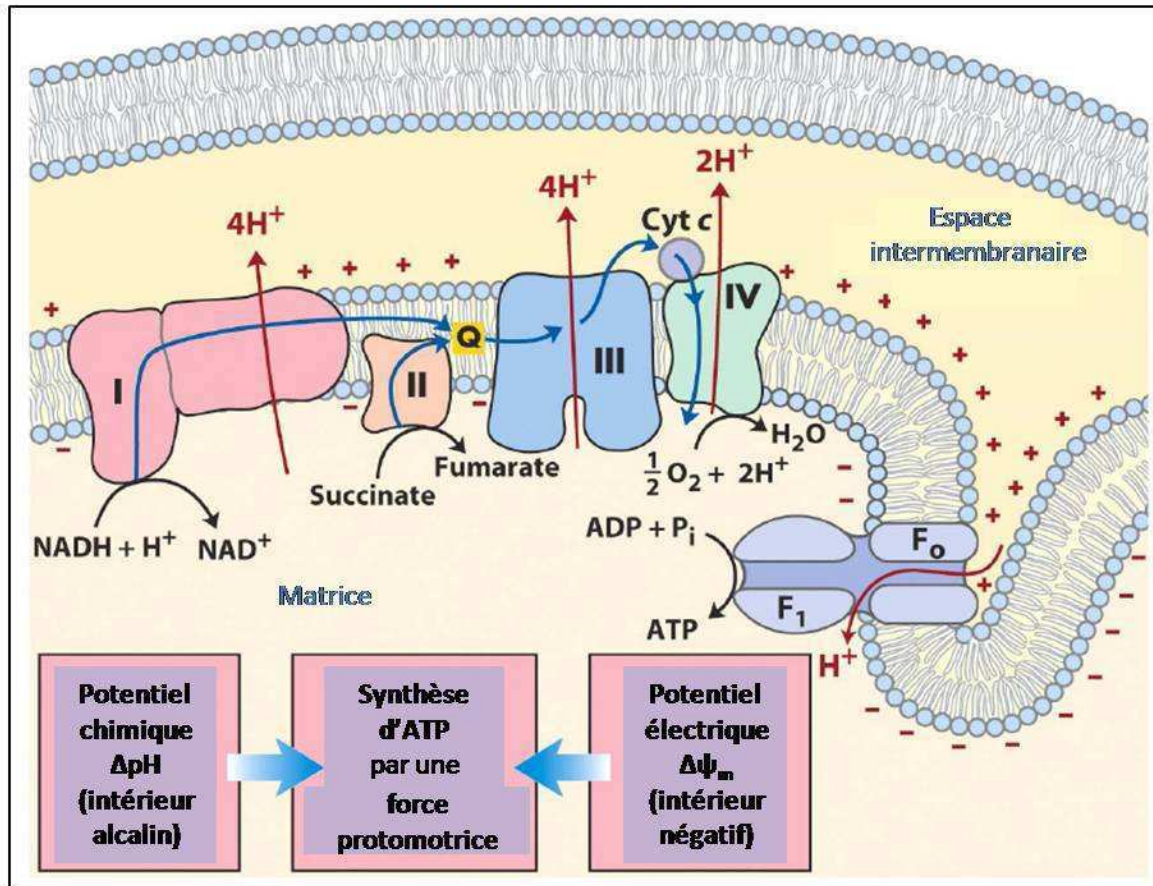


Figure I15 : Système de phosphorylation oxydative.

La chaîne de transport des électrons consiste en une série de transporteurs d'électrons (ubiquinone et cytochrome *c*) associés à des protéines (complexes I, II, III et IV) imbriquées dans la membrane interne mitochondriale. Le NADH et le FADH₂ transfèrent leurs électrons (flèches bleues) et les ions hydrogènes (H⁺) associés (flèches rouges) à la chaîne de transport des électrons. Les électrons, en passant d'un transporteur à l'autre, cèdent de l'énergie qui permet le transport des ions H⁺ vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie par l'intermédiaire des complexes I, III et IV. L'accumulation de ces ions crée un gradient d'énergie chimique résultant des différences de concentration d'hydrogène (ΔpH) de chaque côté de la membrane interne ainsi qu'un gradient électrique (Δψ_m) à travers la membrane interne mitochondriale. L'ATP est formée à partir d'ADP et de phosphate inorganique (P_i) lors du retour des protons vers la matrice par le biais de l'ATP synthase, constituée des sous-unités F₀ et F₁, grâce à la force protomotrice créée par les gradients électrique et chimique.

ADP : Adénosine DiPhosphate ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; Cyt *c* : Cytochrome *c* ; FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; O₂ : dioxygène ; Q : ubiquinone ou coenzyme Q.

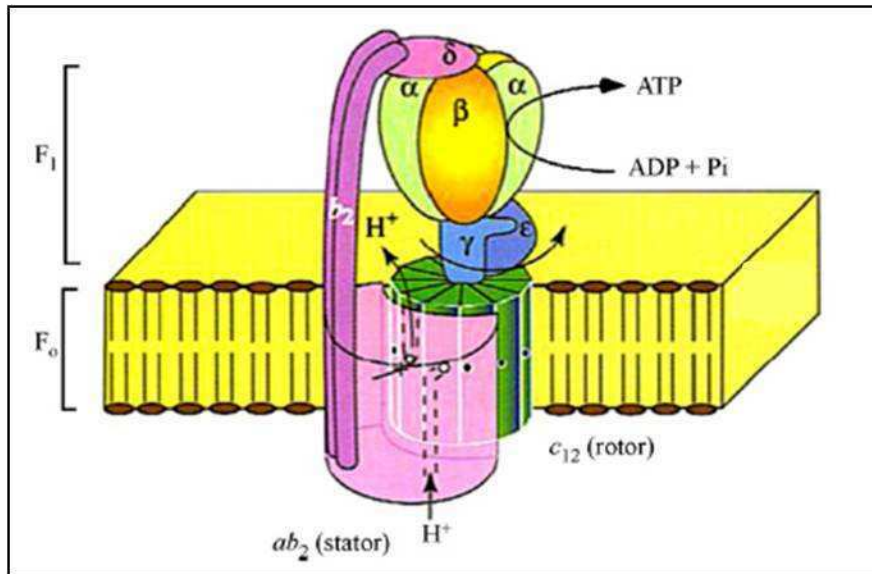


Figure I16 : Structure de l'ATP synthase F₁F₀ mitochondriale.

L'ATP synthase est constituée de deux parties principales : l'une polaire et enchâssée dans la membrane apolaire, notée F₀, l'autre globulaire et au contact de la matrice mitochondriale, notée F₁. F₀ comprend un nombre variable selon les espèces de sous-unités membranaires c (12 chez l'homme) ainsi que les sous-unités a et b. F₁ comprend 3 sous-unités β catalytiques responsables de la synthèse d'ATP, 3 sous-unités α structurales, ainsi que les sous-unités ε, γ et δ. Ces différentes sous-unités constituent le « rotor » (partie mobile : sous-unités γεc₁₂) et le « stator » (partie fixe : sous-unités α₃β₃δ du segment F₁ et ab₂ de F₀). (D'après Grover *et al.*, 2008).

ADP : Adénosine DiPhosphate ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; H⁺ : protons ; P_i : phosphate inorganique.

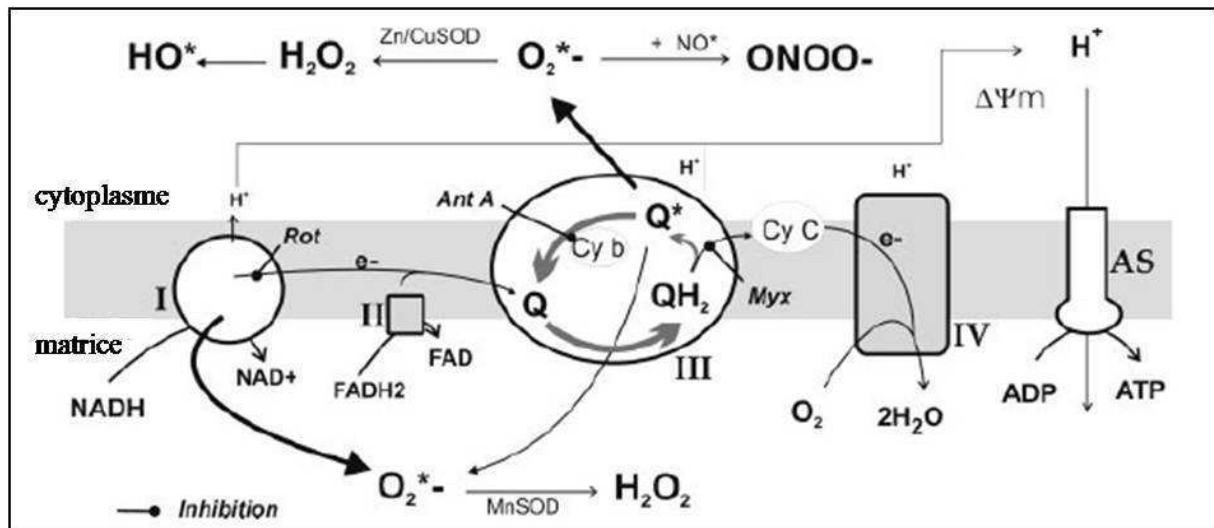


Figure I17 : Principaux mécanismes de formation d'espèces réactives de l'oxygène par la mitochondrie.

Les substrats réduits synthétisés par l'intermédiaire des voies métaboliques fournissent des électrons (e⁻) aux complexes I et II de la chaîne de transport des électrons. Les principaux centres de formation du superoxyde (O₂^{*-}) sont les complexes I et III, bien que de petites quantités puissent être formées au niveau des complexes II et IV. L'ubiquinone (Q) qui transfère les électrons vers le complexe III est réduite en ubiquinol (QH₂), qui transfère un électron vers le cytochrome *c* (Cy C) par l'intermédiaire d'une protéine ferrique inhibée par le myxothiazol (Myx). La semi-ubiquinone résultante (Q^{*}) est oxydée en retour en ubiquinone par le cytochrome *b* (Cy b) et peut également transférer des électrons à l'oxygène pour former du superoxyde. Le myxothiazol diminue la production d'O₂^{*-} car il bloque la formation de Q^{*}, alors que l'antimycine A (Ant A) augmente cette production en élevant les niveaux de Q^{*}. La roténone (Rot) inhibe le flux d'électrons et augmente la production d'O₂^{*-}. Les principales voies de transformation d'O₂^{*-} sont représentées sur ce schéma. (D'après Camello-Almaraz *et al.*, 2006).

ADP : Adénosine DiPhosphate ; AS : ATP synthase ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; ΔΨ_m : potentiel de membrane mitochondrial ; FAD : Flavine Adénine Dinucléotide oxydée ; FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée ; H⁺ : protons ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide oxydé ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; NO : monoxyde d'azote ; O₂ : dioxygène ; ONOO⁻ : peroxyneutre ; SOD : superoxyde dismutase.

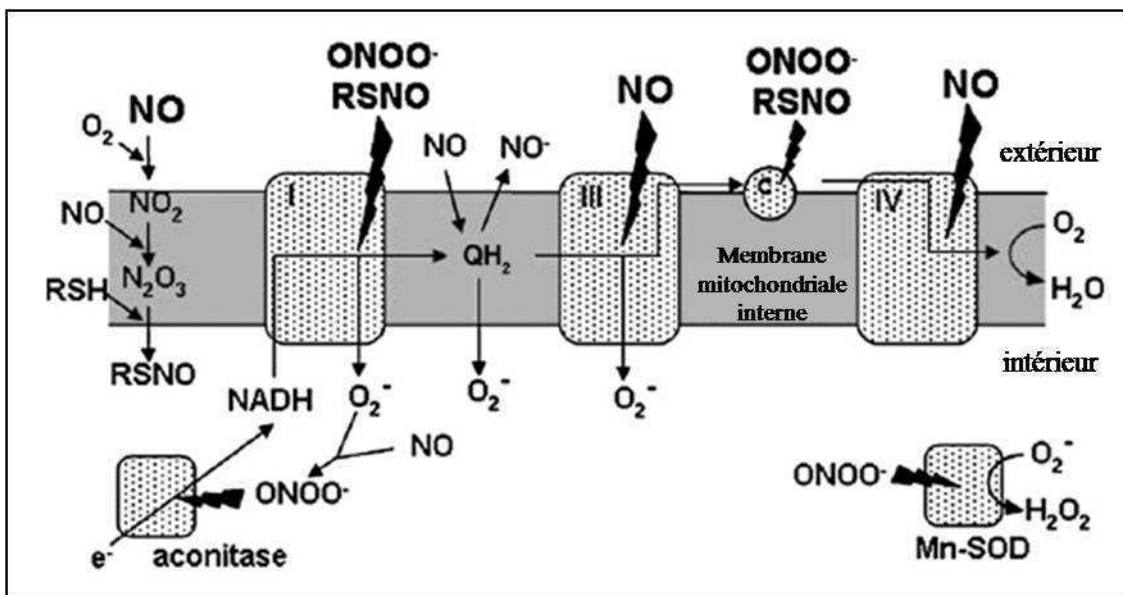


Figure I18 : Interactions du monoxyde d'azote, des espèces réactives de l'azote, des espèces réactives de l'oxygène et de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Le monoxyde d'azote (NO) réagit avec le dioxygène (O₂) dans la membrane interne de la mitochondrie pour produire du nitrite (NO₂) et du trioxyde de diazote (N₂O₃), lequel peut réagir avec les thiols (RSH) pour produire des S-Nitrosothiols (RSNO). Le NO et les espèces réactives de l'azote inhibent les complexes respiratoires I, III et IV, entraînant la production de superoxyde (O₂⁻) qui réagit avec le NO pour donner le peroxynitrite (ONOO⁻), qui inhibe à son tour la chaîne respiratoire, l'aconitase et la Superoxyde Dismutase à Manganèse (Mn-SOD). (D'après Brown et Borutaite, 2007).

c : cytochrome c ; e⁻ : électrons ; H₂O : eau ; H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; QH₂ : ubiquinol.

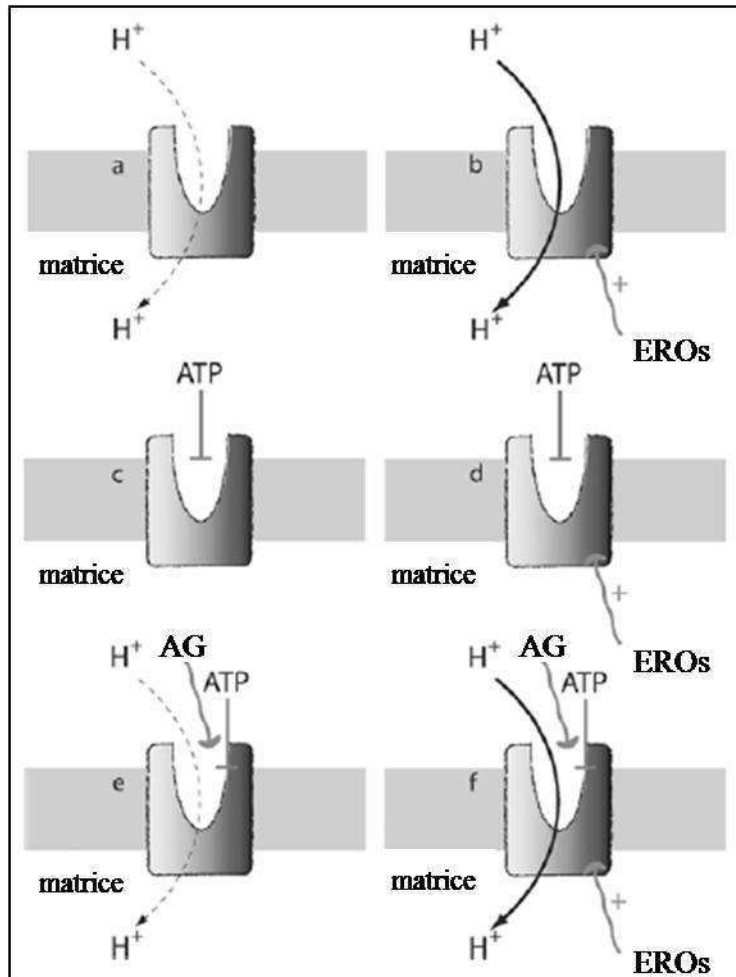


Figure I19 : Modèle de régulation des UCPs.

En absence de concentrations physiologiques d'Adénosine TriPhosphate (ATP), la conductance des protons (H⁺) est modeste pour la protéine découplante 1 (UCP1) ou très faible pour les autres UCPs (a), mais peut être activée par les espèces réactives de l'oxygène (EROs) (b). En présence d'ATP, la conductance des protons est inhibée en absence (c) ou en présence (d) d'EROs. Les acides gras (AG) préviennent l'inhibition par l'ATP ; par conséquent, en présence d'ATP et d'AG, la conductance des protons est modeste ou absente (e) à moins que des EROs soient présents et permettent l'activité des UCPs (f). D'après ce modèle, à des concentrations physiologiques d'ATP, les UCPs peuvent découpler seulement si des EROs ainsi que des AG sont présents (f). (D'après Brand, 2005).

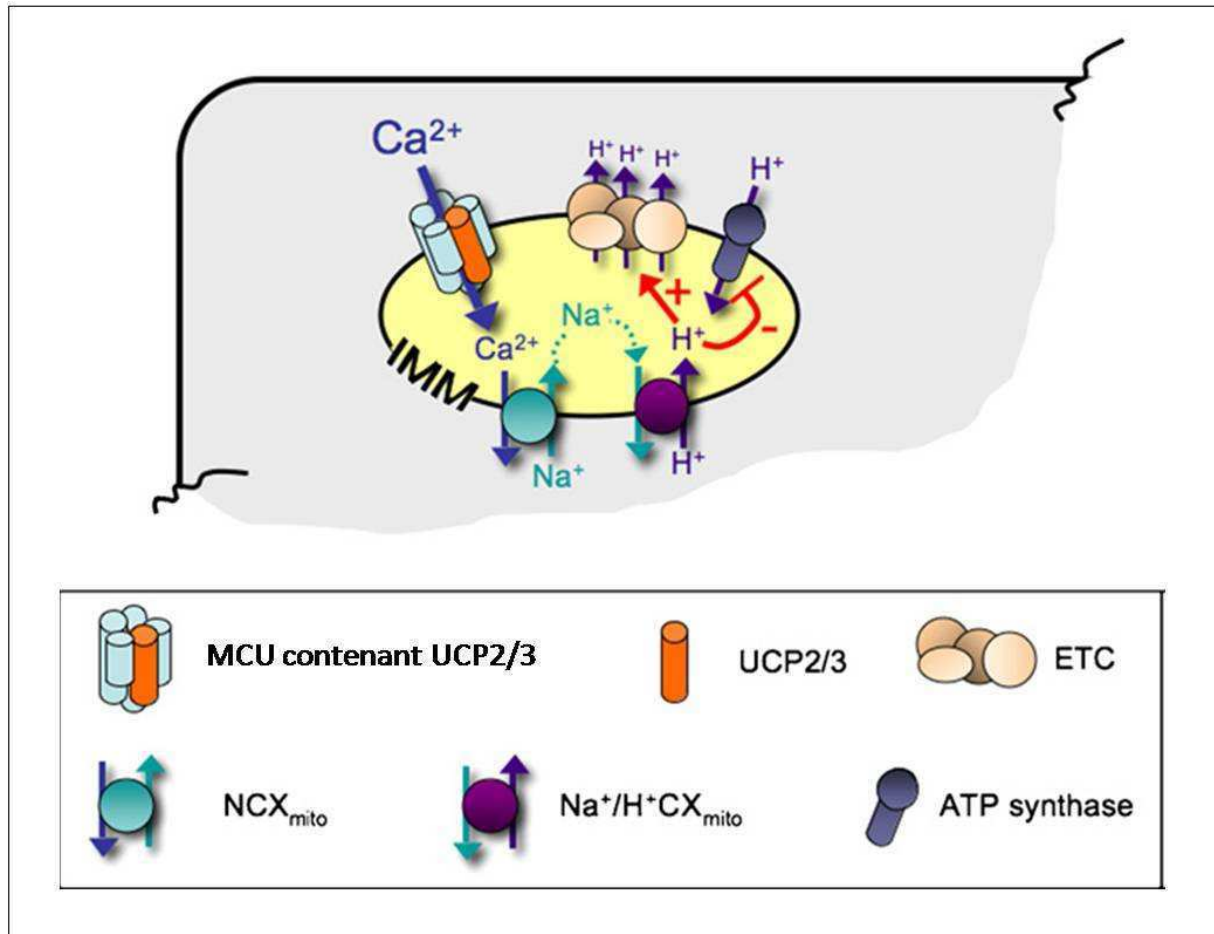


Figure I20 : Modèle d'action des protéines UCP2 et UCP3 au sein de l'uniport calcique mitochondrial.

Les protéines UCP2 et UCP3 semblent participer à l'entrée de calcium dans la mitochondrie par le biais de l'uniport calcique mitochondrial (MCU). Alors que le calcium active la production mitochondriale d'ATP par son effet stimulateur sur de nombreuses déshydrogénases, une séquestration mitochondriale excessive de Ca^{2+} entraîne une acidification de la matrice et une dépolarisation de la membrane interne mitochondriale (IMM) en raison de l'activation des échangeurs mitochondriaux $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX_{mito}) et Na^+/H^+ ($\text{Na}^+/\text{H}^+\text{CX}_{\text{mito}}$) suite à l'élévation de la concentration calcique mitochondriale. Une séquestration mitochondriale excessive de Ca^{2+} peut de ce fait entraîner un découplage entre l'activité de la chaîne de transport des électrons (ETC) et la synthèse d'ATP en conséquence de la mise en place de mécanismes qui diminuent la concentration calcique matricielle afin d'éviter le déclenchement de la mort cellulaire initiée par la mitochondrie. (D'après Graier *et al.*, 2008).

Ca^{2+} : ion calcium ; H^+ : ion hydrogène ou protons ; Na^+ : ion sodium ; UCP : UnCoupling Protein.

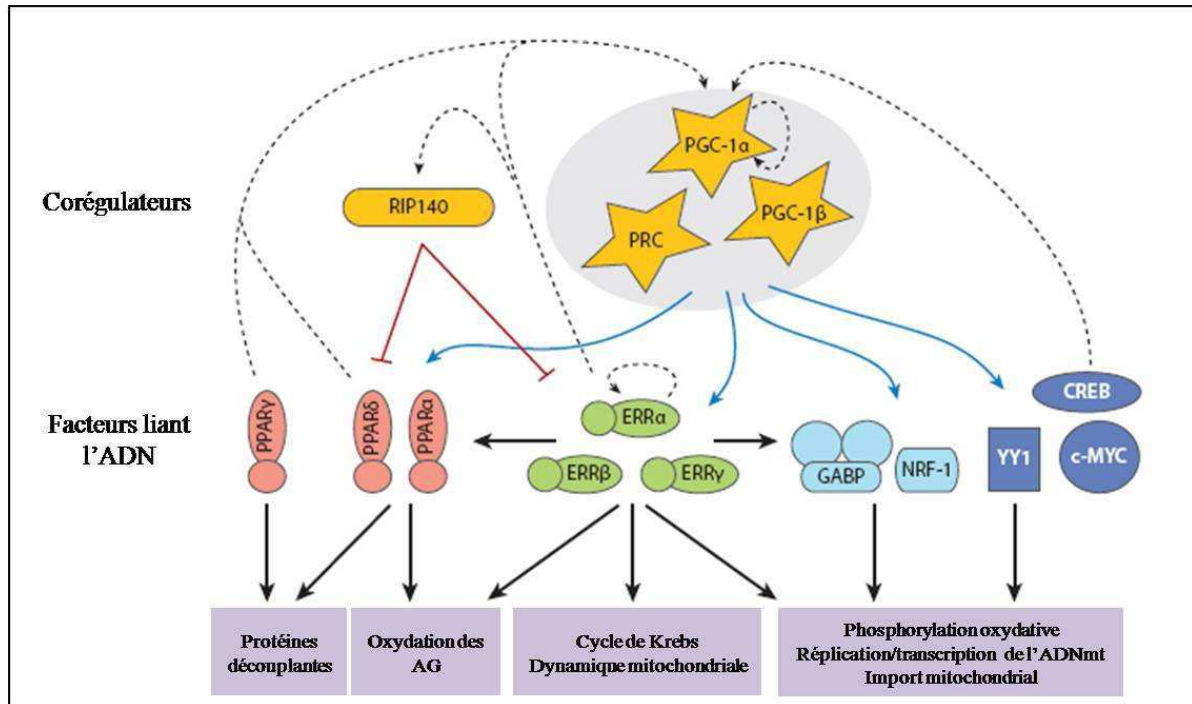


Figure I21 : Réseau transcriptionnel contrôlant l'expression de gènes codant pour des protéines de la mitochondrie.

Les facteurs de transcription (PPARs, ERRs, GABP, NRF-1, CREB, YY1, c-MYC) régulent de nombreux gènes codant pour des protéines de la mitochondrie (flèches pleines noires). Les niveaux d'expression et d'activité de ces facteurs dans différents tissus ou en réponse à des signaux peuvent donner naissance à des mitochondries ayant des fonctions spécialisées. Les corégulateurs (PGC-1 α , PGC-1 β , PRC et RIP140) interagissent avec de multiples facteurs de transcription pour coordonner la régulation de nombreuses classes de gènes codant pour des protéines mitochondriales (les flèches bleues indiquent les coactivations et les flèches rouges les corépressions). Les niveaux d'expression et d'activité de ces corégulateurs sont des déterminants majeurs de la biogenèse mitochondriale. Plusieurs boucles d'autorégulation ou de rétrocontrôle (flèches pointillées) contrôlent l'activité de ce réseau. (D'après Hock et Kralli, 2009).

ADNmt : ADN mitochondrial ; AG : acides gras ; CREB : cAMP Response-Element Binding protein ; ERR : Estrogen-Related Receptor ; GABP : GA-Binding Protein ; NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor-1 ; PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor ; PGC-1 : PPAR γ Coactivator-1 ; PRC : PGC-1-Related Coactivator ; RIP140 : Receptor-Interacting Protein 140 ; YY1 : Yin Yang 1.

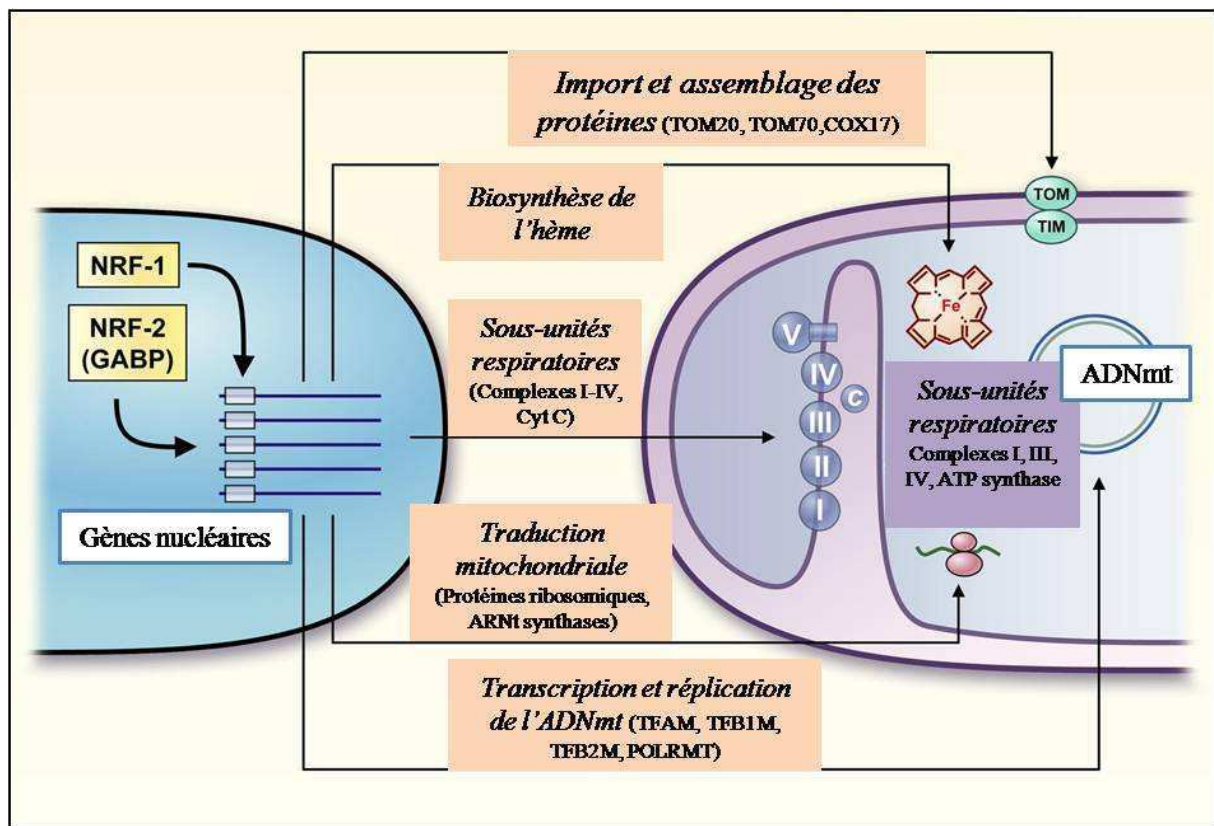


Figure I22 : Contrôle nucléaire des fonctions mitochondriales par NRF-1 et NRF-2.

Les NRFs contribuent directement et indirectement à l'expression de nombreux gènes nécessaires pour la maintenance et le fonctionnement de l'appareil respiratoire mitochondrial. Les NRFs agissent sur des gènes codant pour le cytochrome *c*, la majorité des sous-unités nucléaires des complexes de la chaîne respiratoire et l'enzyme limitante de la biosynthèse de l'hème, la 5-aminolevulinate. De plus, les NRFs induisent l'expression de facteurs clés de la machinerie de transcription et de traduction qui sont nécessaires pour la production des sous-unités respiratoires codées par le génome mitochondrial. Parmi eux, TFAM, TFB1M, TFB2M et de nombreuses protéines ribosomiques et ARNt synthases. Les NRFs sont également impliqués dans l'expression de facteurs clés de la machinerie d'import et d'assemblage des protéines. (D'après Scarpulla, 2008a).

ADNmt : ADN mitochondrial ; COX17 : sous-unité 17 de la Cytochrome *c* OXydase ; CytC/*c* : Cytochrome *c* ; GABP : GA-Binding Protein ; NRFs : Nuclear Respiratory Factors ; POLRMT : POLymerase (RNA) MiTochondrial ; TFAM : Transcription Factor A, Mitochondrial ; TFB1/2M : Transcription Factor B1/2, Mitochondrial ; TIM : Translocase of the Inner Membrane ; TOM : Translocase of the Outer Membrane.

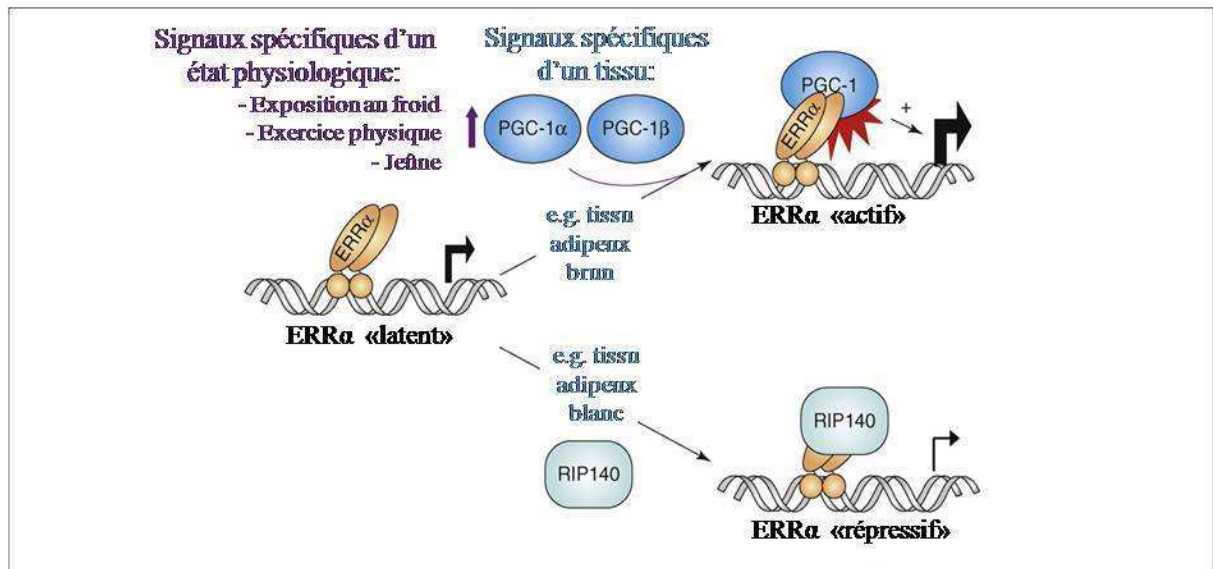


Figure I23 : Régulation d'ERRα par des interactions protéine-protéine avec des corégulateurs.

La capacité d'ERRα à moduler l'expression de gènes est contrôlée par son association avec des corégulateurs tels que les coactivateurs PGC-1α et PGC-1β et le corépresseur RIP140. En conséquence, l'activité d'ERRα est régulée par les signaux, spécifiques du tissu et de l'état physiologique, qui contrôlent le niveau d'expression et l'activité de ces corégulateurs. (D'après Villena et Kralli, 2008).

ERRα : Estrogen-Related Receptor α ; PGC-1 : PPARγ Coactivator-1 ; RIP140 : Receptor-Interacting Protein 140.

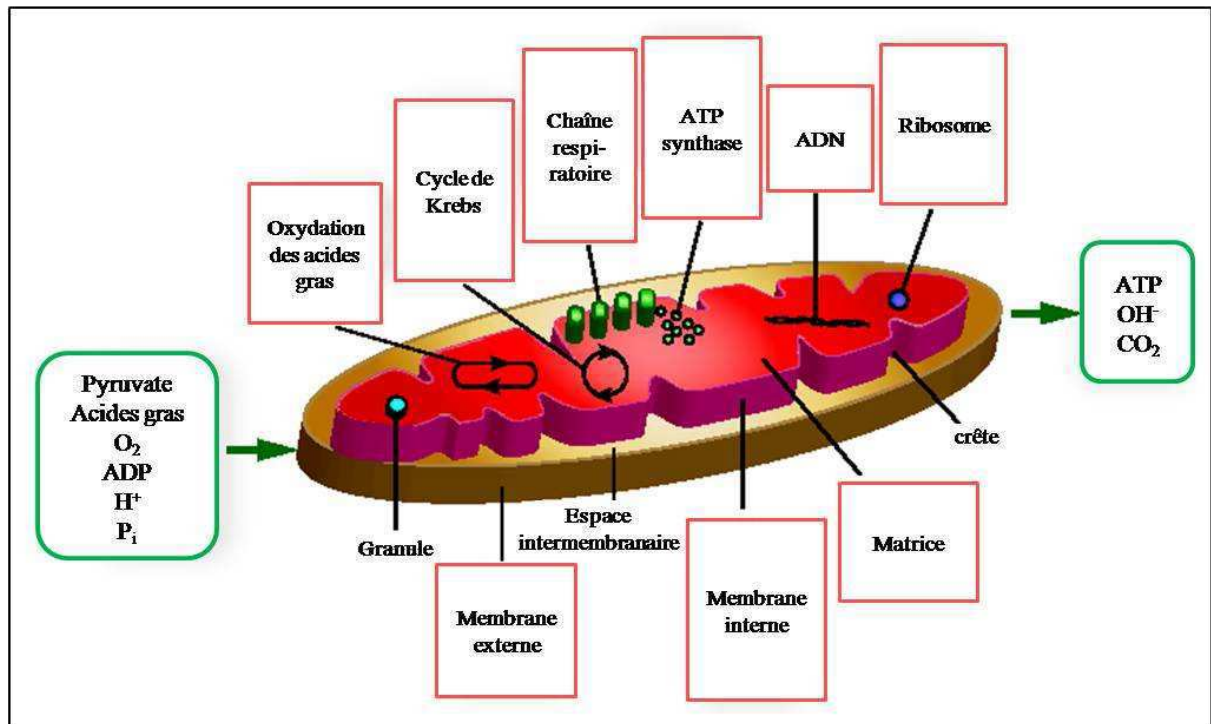


Figure I24 : Les ERRs régulent l'expression de gènes codés par le noyau dont les produits sont impliqués dans tous les aspects des fonctions mitochondriales.

La localisation de protéines codées par des gènes dont les promoteurs sont liés à $ERR\alpha$ et $ERR\beta$ ainsi que les fonctions auxquelles participent ces protéines sont indiquées dans les encadrés rouges. Les métabolites et molécules impliqués dans la production d'énergie sont indiqués dans les encadrés verts. (D'après Giguère, 2008).

ADP : Adénosine DiPhosphate ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; CO_2 : dioxyde de carbone ; ERR : Estrogen-Related Receptor ; H^+ : protons ; H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène ; O_2 : dioxygène ; OH^- : hydroxyle ; P_i : phosphate inorganique.

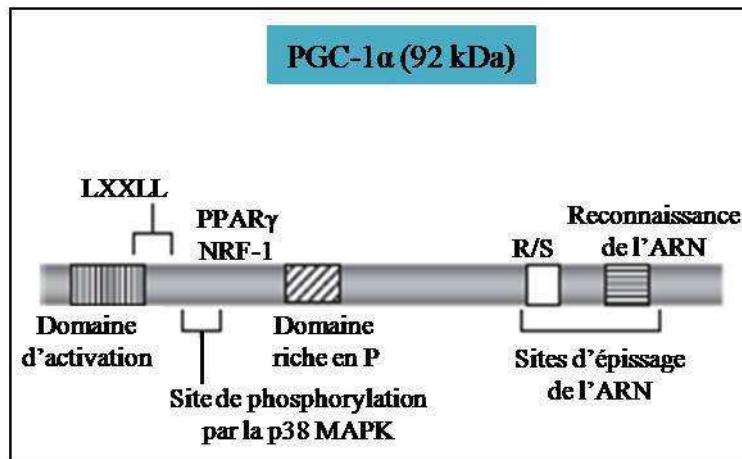


Figure I25 : Domaines fonctionnels de la protéine PGC-1 α .

Cette représentation linéaire de PGC-1 α indique les domaines fonctionnels clés de la protéine. Le domaine d'activation NH₂-terminal (hachures verticales) est le site d'interactions avec les cofacteurs modifiant les histones tels que SRC-1 et CBP/p300. Les positions approximatives pour l'interaction avec PPAR γ et NRF-1 ainsi que la région centrale riche en prolines (P) (hachures diagonales) et le domaine COOH-terminal – comprenant le domaine riche en arginines et en sérines (R/S) et le motif de reconnaissance de l'ARN (hachures horizontales) – sont indiqués. Les régions contenant les sites de phosphorylation par la protéine p38 MAPK et le motif LXXLL, site d'interactions protéiques, sont également inscrites. (D'après Scarpulla, 2008a).

CBP : CREB Binding Protein ; MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase ; NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor 1 ; PPAR γ : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ ; PGC-1 α : PPAR γ Coactivator-1 α ; SRC-1 : Steroid Receptor Coactivator 1.

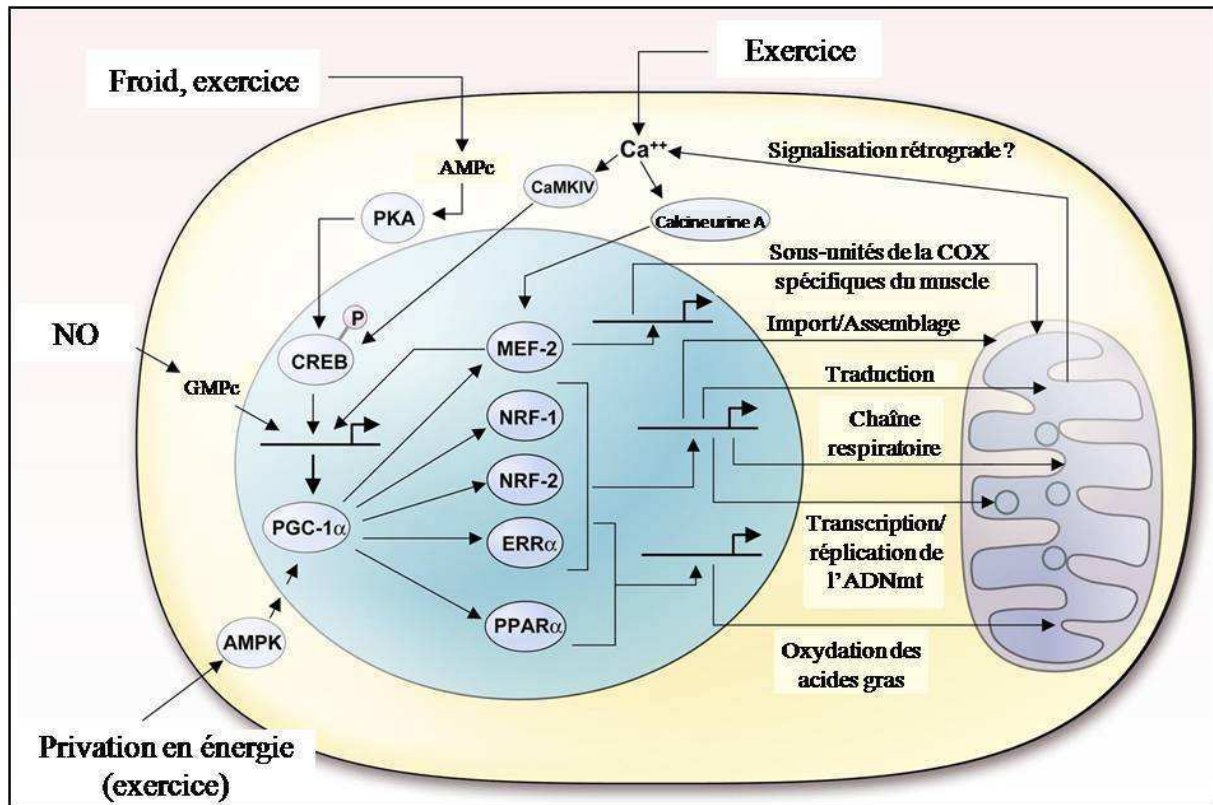


Figure I26 : Voies médiées par PGC-1 α gouvernant le fonctionnement et la biogenèse des mitochondries.

Les facteurs de transcription NRF-1, NRF-2, ERR α , PPAR α et MEF-2 sont des cibles du coactivateur PGC-1 α qui agissent sur l'expression de gènes nucléaires gouvernant les fonctions mitochondriales indiquées sur ce schéma. De nombreuses voies effectrices physiologiques modulant l'expression et l'activité de PGC-1 α ainsi que la voie de signalisation rétrograde impliquant le calcium sont également indiquées. (D'après Scarpulla, 2008a).

ADNmt : ADN mitochondrial ; AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique ; AMPK : AMP-Activated Protein Kinase ; Ca⁺⁺ : Ions calcium ; CaMKIV : Calmoduline Kinase IV ; COX : Cytochrome *c* OXYdase ; CREB : cAMP Response-Element Binding protein ; ERR α : Estrogen-Related Receptor α ; GMPc : Guanosine MonoPhosphate cyclique ; MEF-2 : Myocyte Enhancer Factor-2 ; NO : monoxyde d'azote ; NRF : Nuclear Respiratory Factor ; PKA : Protéine Kinase A ; PPAR α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α ; PGC-1 α : PPAR γ Coactivator-1 α .

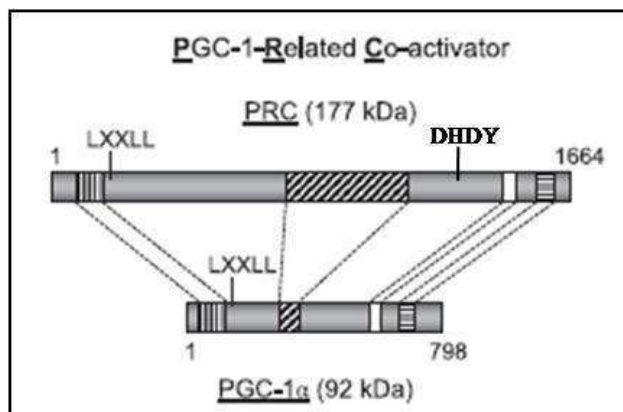


Figure I27 : Comparaison des motifs conservés entre PRC (PGC-1-Related Coactivator) et PGC-1 α (PPAR γ Coactivator-1 α).

Les lignes pointillées joignent les similarités de séquence entre le domaine d'activation (hachures verticales), la région riche en prolines (hachures diagonales), le domaine riche en arginines et en sérines R/S (blanc) et le motif de reconnaissance de l'ARN (hachures horizontales). Les motifs LXXLL, site d'interactions protéiques, et DHDY, site de fixation de HCF-1 (Host Cell Factor-1), sont également indiqués. (D'après Scarpulla, 2008a).

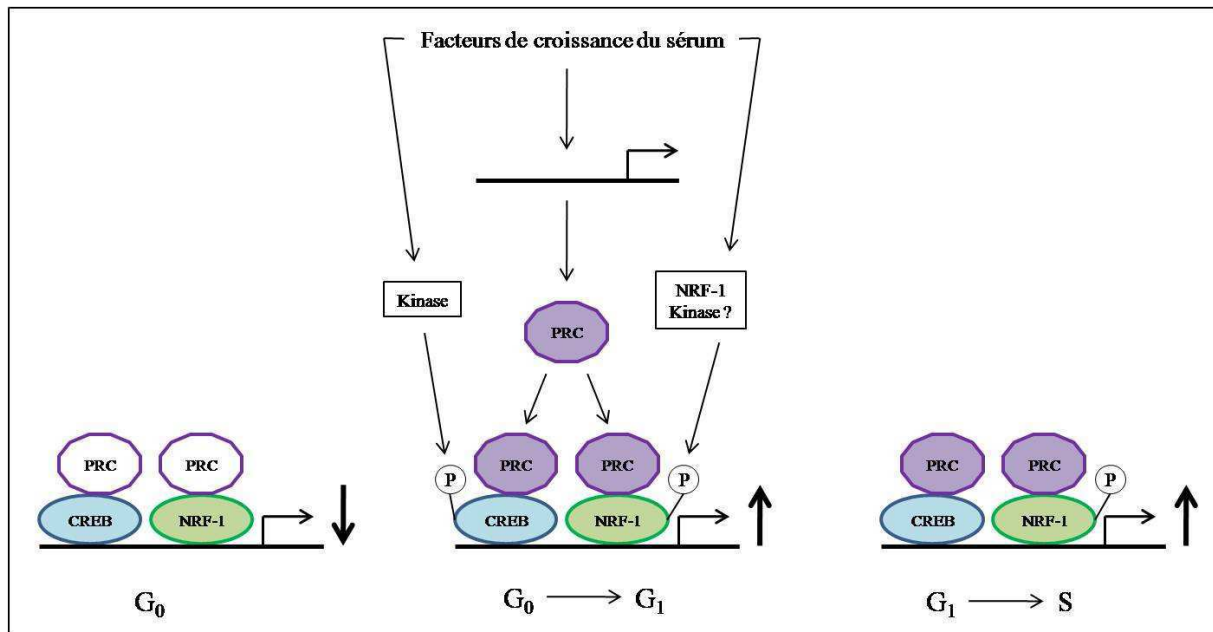


Figure I28 : Rôle présumé de PRC dans la transition de cellules de la quiescence à la croissance proliférative.

Les cellules qui quittent le cycle cellulaire par inhibition de contact ou par privation de sérum (G₀) présentent une faible expression de l'ARNm et de la protéine PRC (PGC-1-Related Coactivator) ; ceci coïncide avec une diminution de l'occupation du promoteur du cytochrome *c* dépendant de NRF-1 (Nuclear Respiratory Factor-1) et de CREB (cAMP Response-Element Binding protein). Dans des cellules en phase G₀ stimulées par le sérum, une augmentation rapide (et non influencée par le cycloheximide) de l'induction du transcrite de PRC est observée durant la transition des phases G₀ à G₁. La stimulation par le sérum entraîne une augmentation de l'expression de la protéine PRC et de l'occupation du promoteur du cytochrome *c* par celle-ci. Ceci est accompagné de la phosphorylation (P) de CREB et de NRF-1. La phosphorylation de CREB est rapide et transitoire alors que celle de NRF-1 est plus lente et persiste dans des cellules en prolifération présentant un niveau d'expression de PRC élevé. (D'après Scarpulla, 2008a).

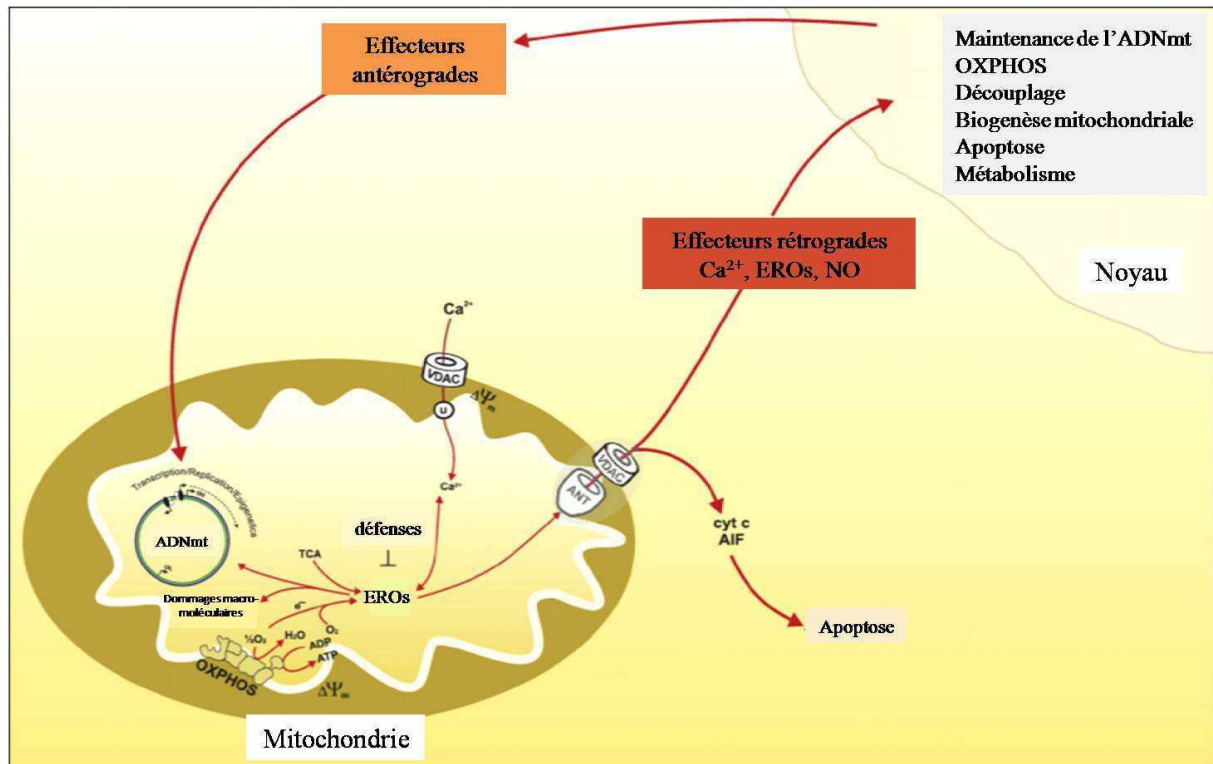


Figure I29 : Interactions mitochondrie-noyau contrôlant l'expression des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative.

Des changements de l'homéostasie des espèces réactives de l'oxygène (EROs), du Ca^{2+} ou du ratio ATP/ADP contrôlent le pore de transition de perméabilité mitochondriale (incluant l'ANT et VDAC). De tels changements peuvent conduire à l'induction de l'apoptose par la voie intrinsèque ou par des voies secondaires de signalisation (par le biais d'effecteurs rétrogrades) ainsi qu'à l'induction de l'expression de gènes nucléaires impliqués dans la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et dans d'autres fonctions mitochondriales. La transcription et la réplication de l'ADN mitochondrial (ADNmt) sont principalement contrôlées par des éléments codés par le noyau mais également, de manière indirecte, par la signalisation rétrograde. (D'après Reinecke *et al.*, 2009).

ADP : Adénosine DiPhosphate ; AIF : Apoptosis Inducing Factor ; ANT : Adenine Nucleotide Translocase ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; cyt c : cytochrome *c* ; $\Delta\psi_m$: potentiel de membrane mitochondriale ; e^- : électrons ; H_2O : eau ; NO : monoxyde d'azote ; O_2 : dioxygène ; TCA : cycle de Krebs ; VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel.

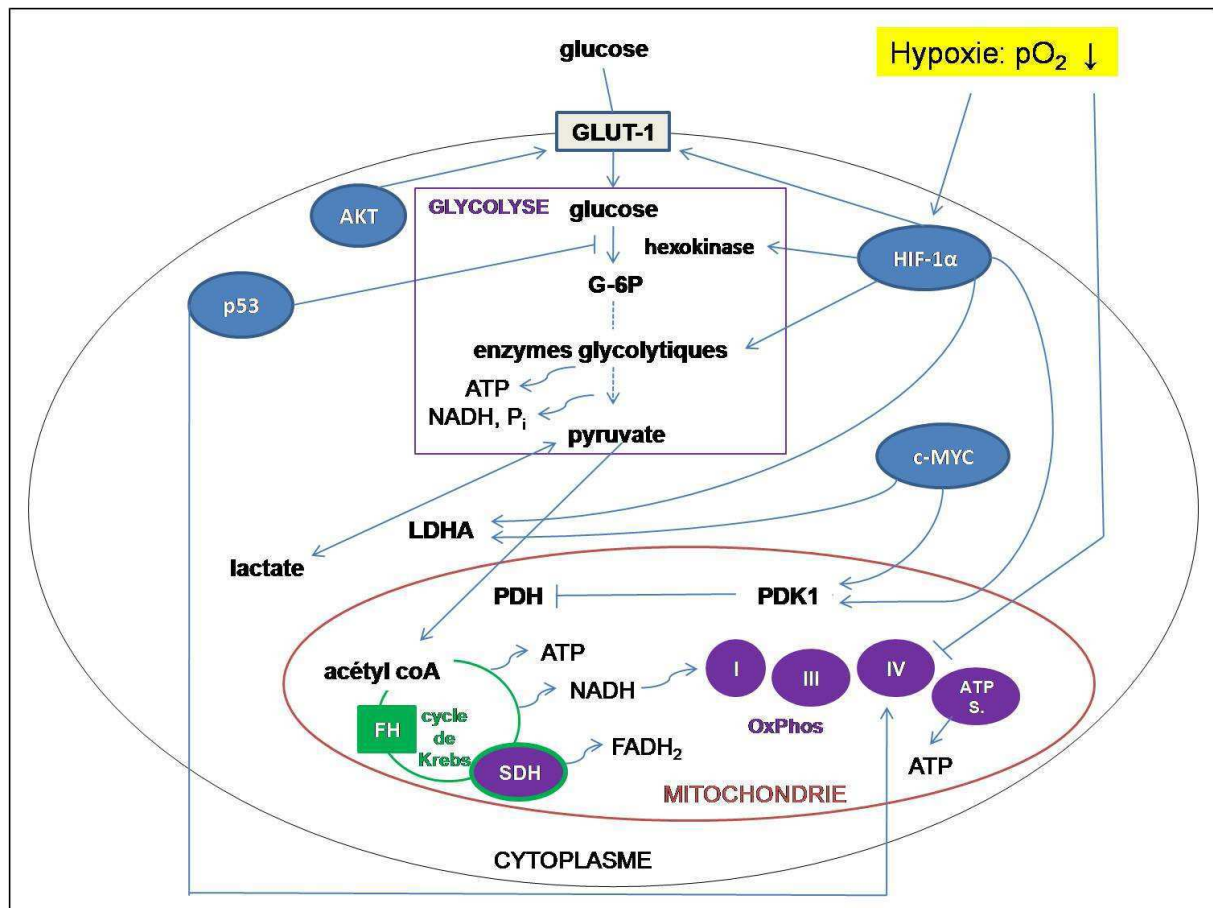


Figure I30 : Métabolisme dans les cellules cancéreuses.

Les cellules tumorales répondent à un environnement hypoxique en augmentant l'expression du transporteur de glucose GLUT-1 (GLUCOSE Transporter 1) et des enzymes de la glycolyse. Dans les cellules normales, le pyruvate généré est métabolisé au sein de la mitochondrie au cours du cycle de Krebs dont le bon fonctionnement permet à la phosphorylation oxydative (OxPhos) de produire l'ATP de manière efficace. Cependant, en conditions hypoxiques, le pyruvate est converti en lactate en raison de l'augmentation de l'expression de la lactate déshydrogénase A (LDHA) et de l'inhibition de la pyruvate déshydrogénase (PDH) engendrée par l'augmentation de l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase 1 (PDK1) dépendante de HIF-1 α (Hypoxia-Inducible Factor-1 α). L'énergie libre nécessaire pour produire l'ATP implique l'oxydation du NADH et du FADH₂ par la chaîne de transport des électrons. La conversion du lactate étant moins efficace que la phosphorylation oxydative pour produire de l'ATP, les cellules cancéreuses compensent en augmentant leur consommation de glucose, ce qui résulte en une production excessive de lactate. Certaines altérations génétiques peuvent participer à la modification du degré de glycolyse dans la cellule cancéreuse. Ainsi, la perte de gènes codant pour des enzymes du cycle de Krebs, la fumarate hydratase (FH) et la succinate déshydrogénase (SDH) du complexe II, entraîne des conditions de pseudo-hypoxie et une augmentation de la glycolyse en présence d'oxygène. Une dérégulation de facteurs tels que c-MYC, p53 ou AKT participe également à l'augmentation du métabolisme du glucose.

ATP : Adénosine TriPhosphate ; ATP S. : ATP synthase ; FADH₂ : Flavine Adénine Dinucléotide Hydrogénée ; G-6P : Glucose 6 phosphate ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; O₂ : dioxygène ; P_i : phosphate inorganique.

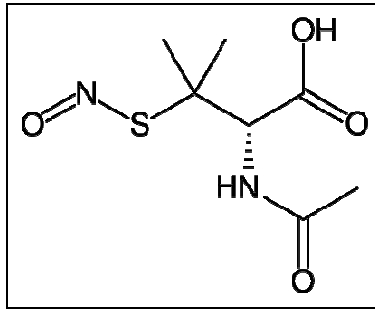


Figure M1 : Formule du SNAP.

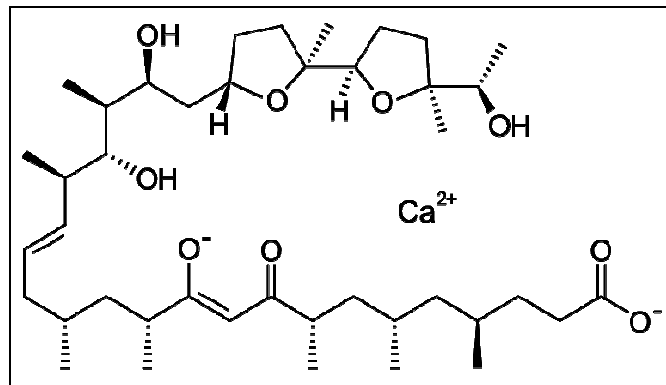


Figure M2 : Formule de l'ionomycine.

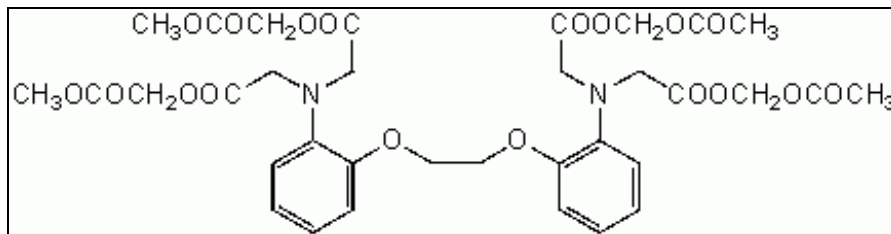


Figure M3 : Formule du BAPTA/AM.

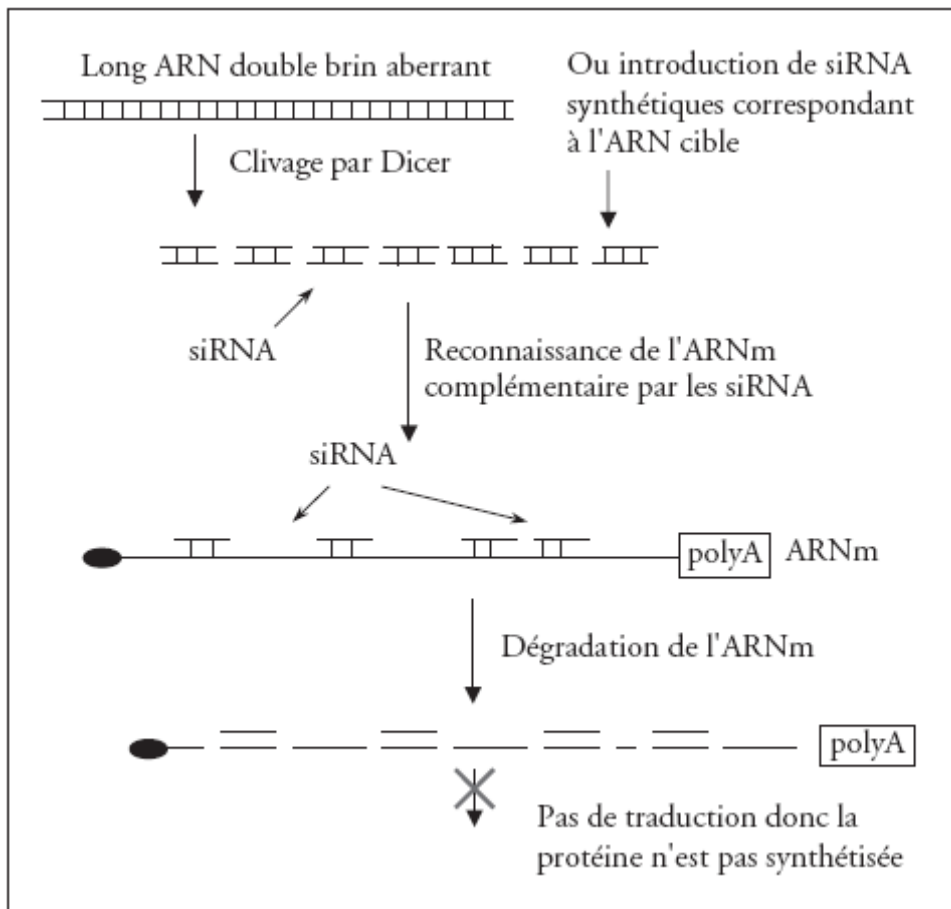


Figure M4 : Principe général de l'ARN interférence.

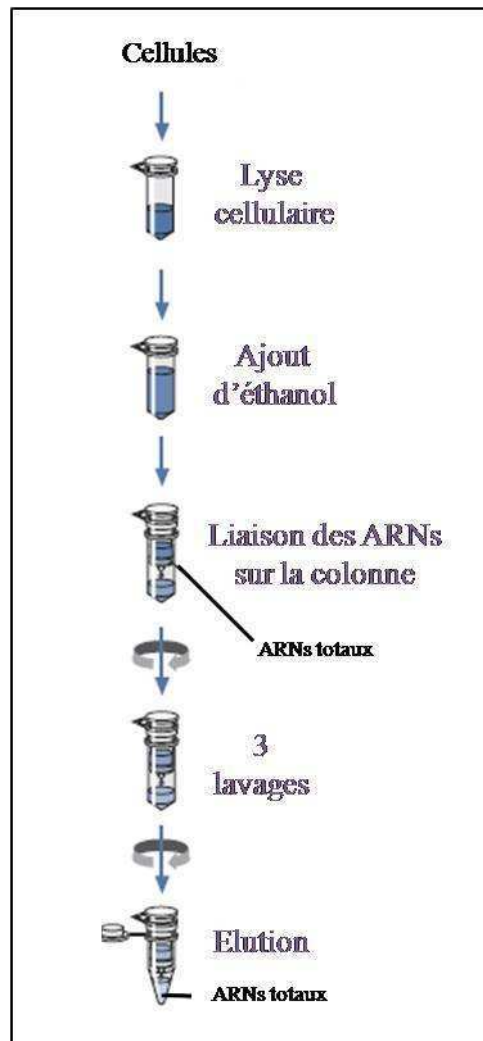
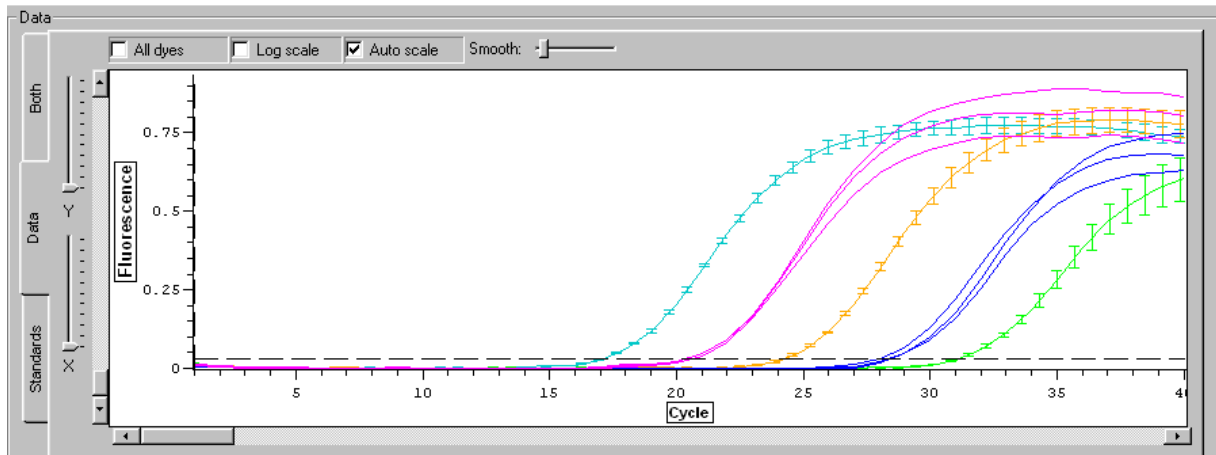


Figure M5 : Protocole d'extraction des ARNs totaux à partir de cellules.

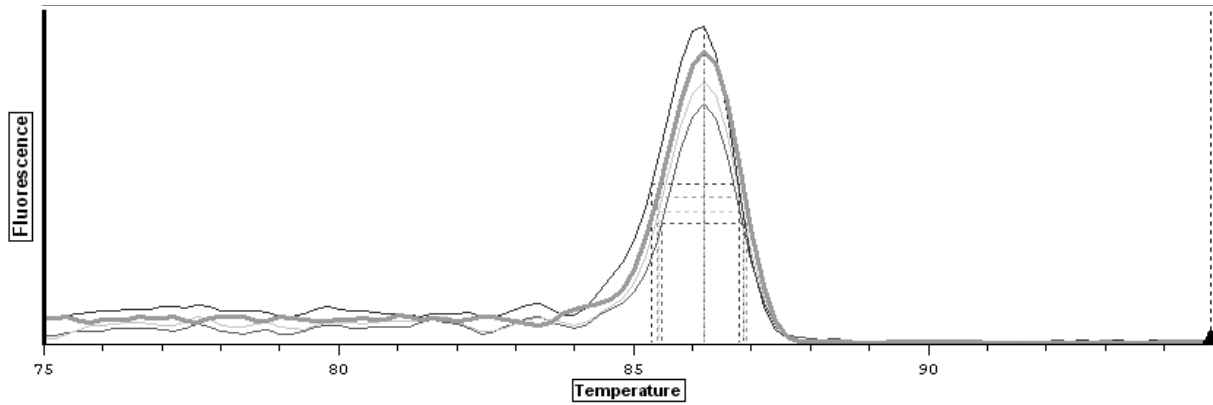
(D'après RNeasy Mini handbook, Qiagen)

ADNmt : ND1-ARNt ^{Leu}	sens	5'-CGCATAAACTTAAACTTTACAG-3'
	antisens	5'-CTTTGCGTAGTTGTATATAGCC-3'
Beta 2 microglobuline	sens	5'-TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3'
	antisens	5'-ATCTTGGGCTGTGACAAAGT-3'
Beta globine	sens	5'-CAACTTCATCCACGTTACC-3'
	antisens	5'-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3'
COII	sens	5'-AACAAACGACCTAAAACCTG-3'
	antisens	5'-GTGAACTACGACTGCTAGAA-3'
COX15	sens	5'-CCTCTCGATGGTAGATTGGC-3'
	antisens	5'-CGGAGGGAGTGCACTGACAG-3'
COX5B	sens	5'-CCAAAGGCAGCTTCAGGCAC-3'
	antisens	5'-CAAGGAAGACCCTAATCTAG-3'
CREB1	sens	5'-GTGTTACGTGGGGAGAGAA-3'
	antisens	5'-GGGCTAATGTGGCAATCTGT-3'
CYT C	sens	5'-CCAGTGCCACACCGTTGAA-3'
	antisens	5'-TCCCCAGATGATGCCTTTGTT-3'
ERR α	sens	5'-AAGACAGCAGCCCCAGTGAA-3'
	antisens	5'-ACACCCAGCACCCAGCACCT-3'
ND5	sens	5'-TAACCCACCCCTACTAAACC-3'
	antisens	5'-GATTATGGGCGTTGATTAGTAG-3'
NRF-1	sens	5'-TCAAAGGCATACAAAAGGTC-3'
	antisens	5'-TACTCTACAGGTCGGGGAAA-3'
PGC-1 α	sens	5'-GTTTCATTACCTACCGTTATAC-3'
	antisens	5'-GCCATCCCTCTGTCATCCTC-3'
PRC	sens	5'-CACTGGTTGACCCTGTTCCCT-3'
	antisens	5'-GTGTTTCAGGGCTTCTCTGC-3'
SOD2	sens	5'-GCTGCACCACAGCAAGCAGTCC-3'
	antisens	5'-CCAGCAACTCCCCTTTGGGT-3'
UCP2	sens	5'-CCAGTGCGCGCTACAGTCA-3'
	antisens	5'-GTGGTGCTGCCTGCTAGGAG-3'

Figure M6 : Amorces utilisées pour les expériences de RT-PCR quantitatives.



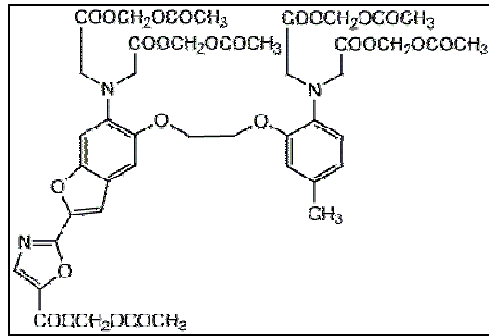
A : Courbe de quantification de la fluorescence du SYBR Green I.



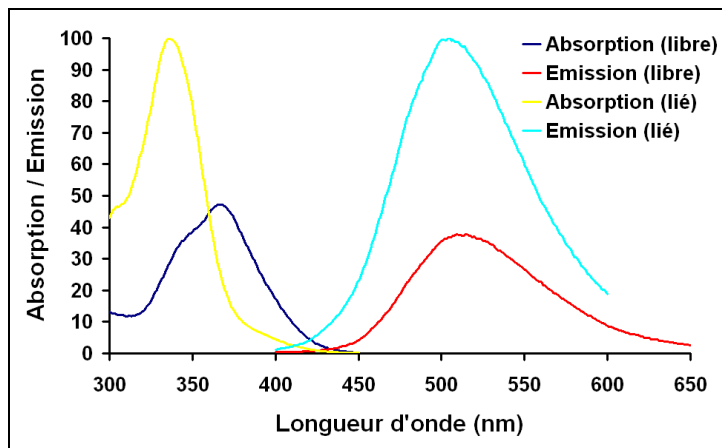
B : Courbe de fusion.

Figure M7 : Exemple de courbes obtenues durant une RT-PCR quantitative à l'aide du Chromo4.

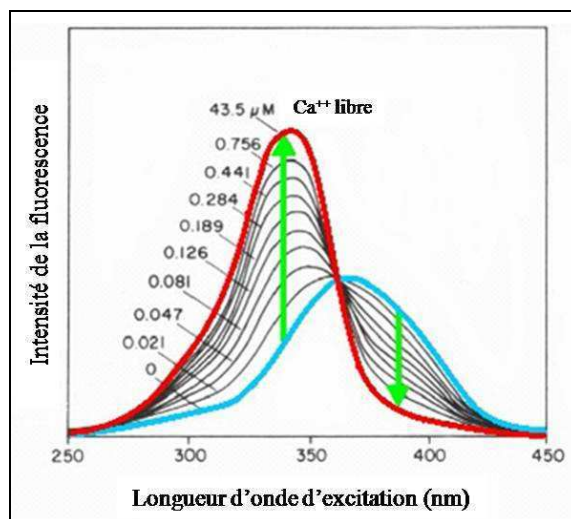
(Données du manuel d'utilisation de l'appareil Chromo4, BioRad)



A : Formule du FURA-2/AM.



B : Spectres d'absorption et d'émission de la sonde FURA-2.



C : Fluorescence de la sonde FURA-2 en fonction de la concentration en calcium.

Figure M8 : Propriétés de la sonde FURA-2/AM.

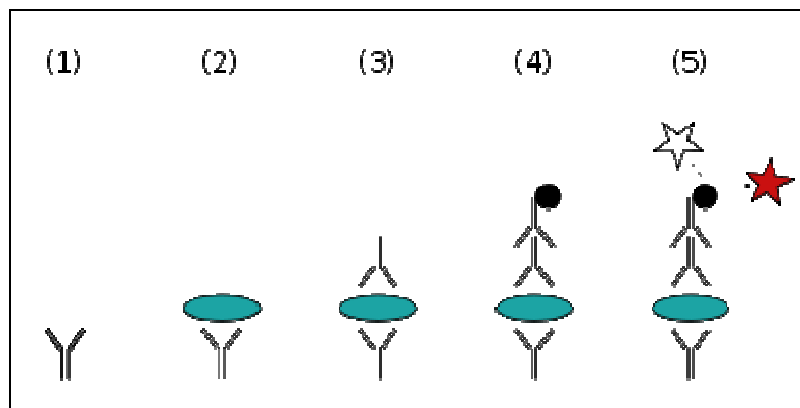


Figure M9 : Description de la méthode ELISA.

(1) La plaque est recouverte avec un anticorps de capture ; (2) L'échantillon est ajouté, et toute protéine d'intérêt présente dans l'échantillon se lie à l'anticorps de capture ; (3) L'anticorps de détection est ajouté et se lie à la protéine d'intérêt ; (4) L'anticorps secondaire lié à une enzyme est ajouté et se lie à l'anticorps de détection ; (5) Le substrat est ajouté et est converti par l'enzyme en une forme colorée détectable par spectrométrie.

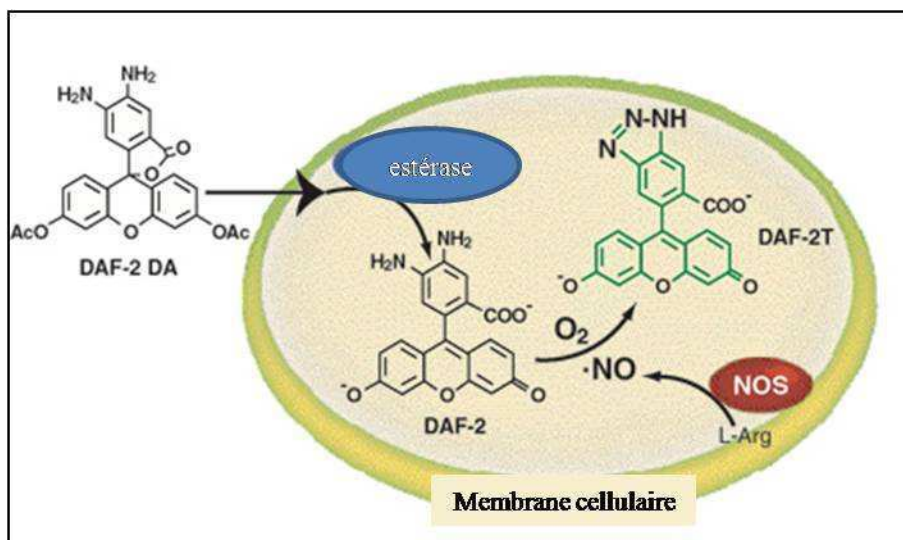


Figure M10 : Principe d'utilisation de la sonde DAF-2/DA.

L-Arg : L-arginine ; NO : monoxyde d'azote ; NOS : NO synthase ; O₂ : dioxygène.

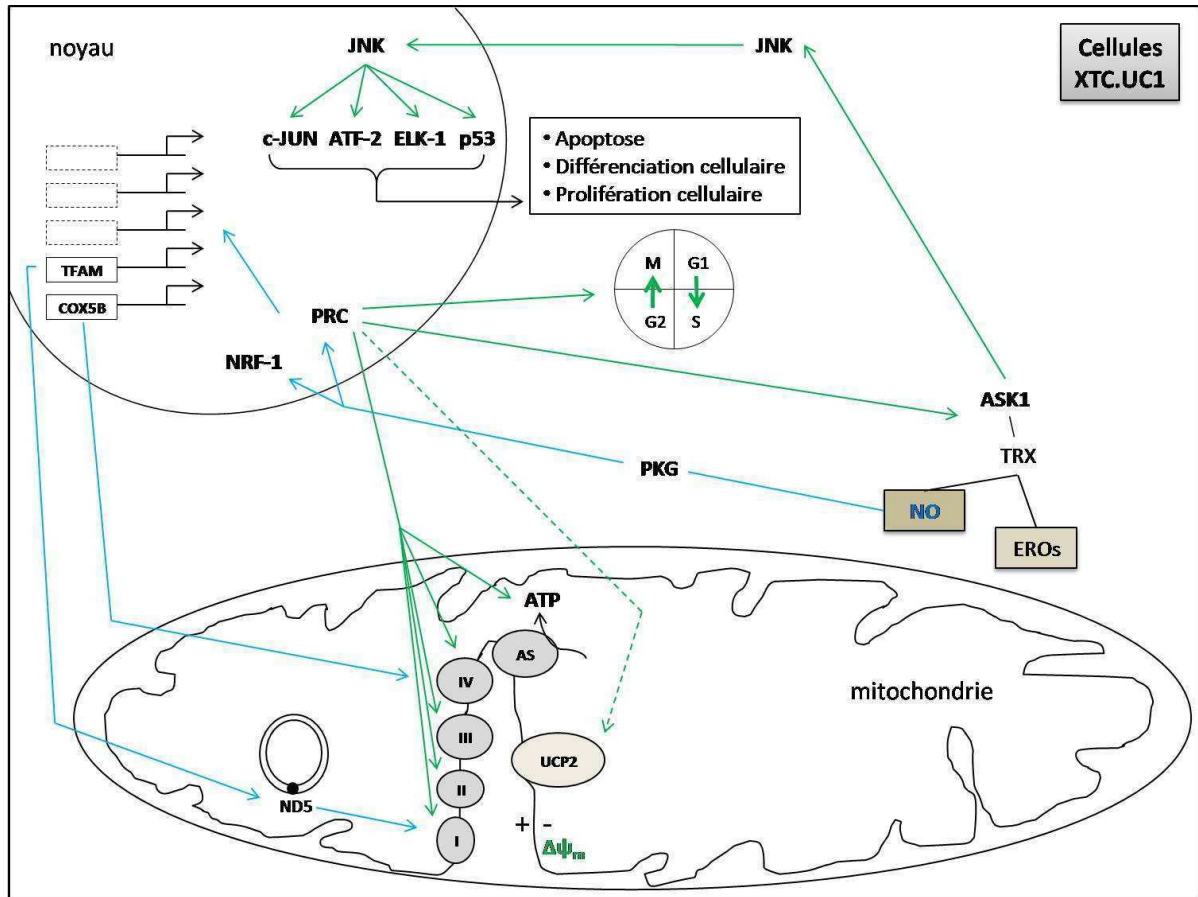


Figure R1 : Schéma synthétisant les résultats de l'article 1.

Les flèches vertes indiquent les résultats obtenus après traitement des cellules XTC.UC1 par le donneur de monoxyde d'azote (NO) SNAP. Les flèches bleues indiquent les résultats obtenus grâce à l'inhibition de PRC par siRNA. Les pointillés indiquent des données spéculatives et les flèches noires des données démontrées dans d'autres modèles.

AS : ATP synthase ; ATP : Adénosine TriPhosphate ; ASK1 : Apoptosis Signal-regulating Kinase 1 ; ATF-2 : Activating Transcription Factor 2 ; COX5B : Cytochrome *c* oxydase subunit 5B ; $\Delta\psi_m$: potentiel de membrane mitochondriale ; EROs : Espèces Réactives de l'Oxygène ; JNK : c-JUN N-terminal Kinase ; ND5 : NADH Dehydrogenase subunit 5 ; NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor-1 ; PKG : Protéine Kinase G ; PRC : PGC-1-Related Coactivator ; TFAM : Transcription Factor A, Mitochondrial ; TRX : thioredoxine ; UCP2 : UnCoupling Protein 2 ; I, II, III, IV : complexes I, II, III, IV.

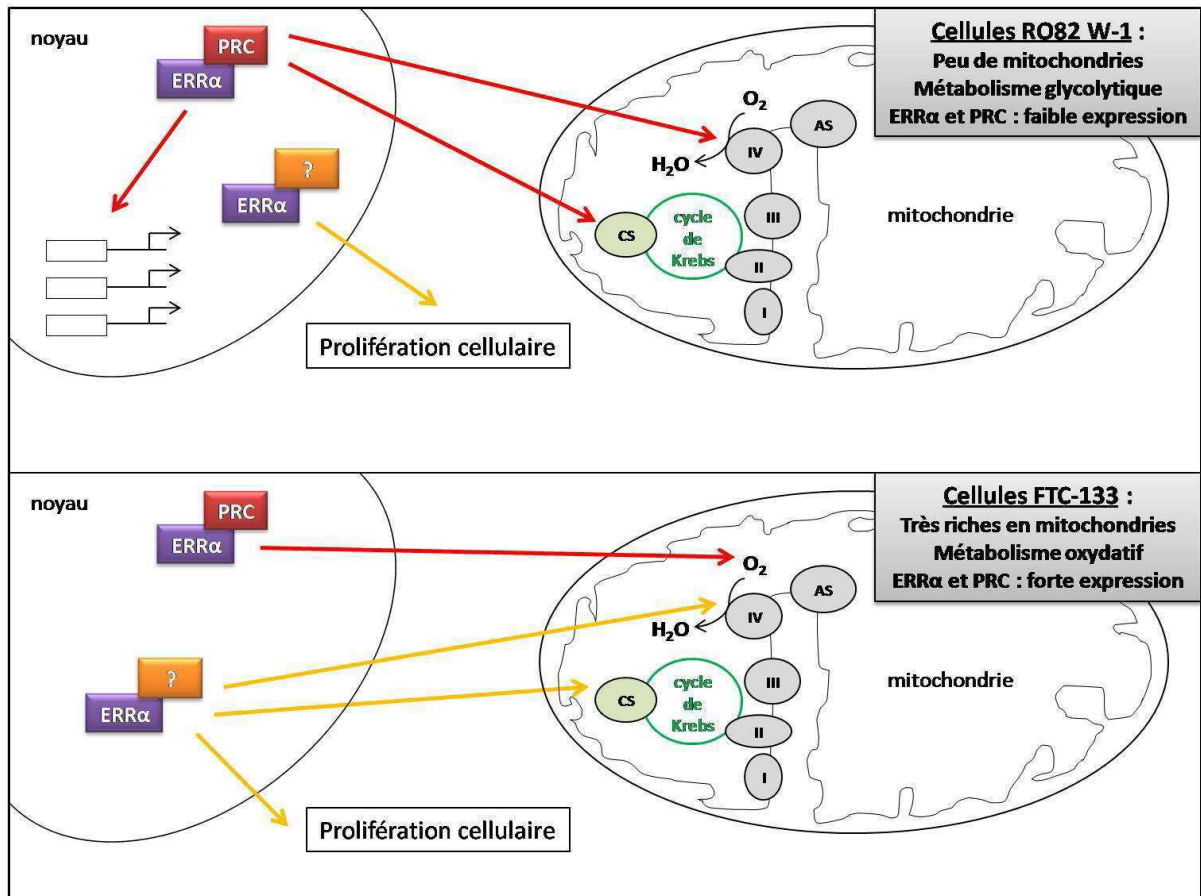


Figure R2 : Schéma synthétisant les résultats de l'article 2.

Les flèches rouges indiquent les actions médiées par ERRα en association avec PRC alors que les flèches orange indiquent les actions médiées par ERRα pour lesquelles PRC ne semble pas intervenir ou bien pour lesquelles l'implication de ce coactivateur n'a pas été vérifiée.

AS : ATP synthase ; CS : Citrate Synthase ; ERRα : Estrogen-Related Receptor α ; H₂O : eau ; O₂ : dioxygène ; PRC : PGC-1-Related Coactivator ; I, II, III, IV : complexes I, II, III, IV.

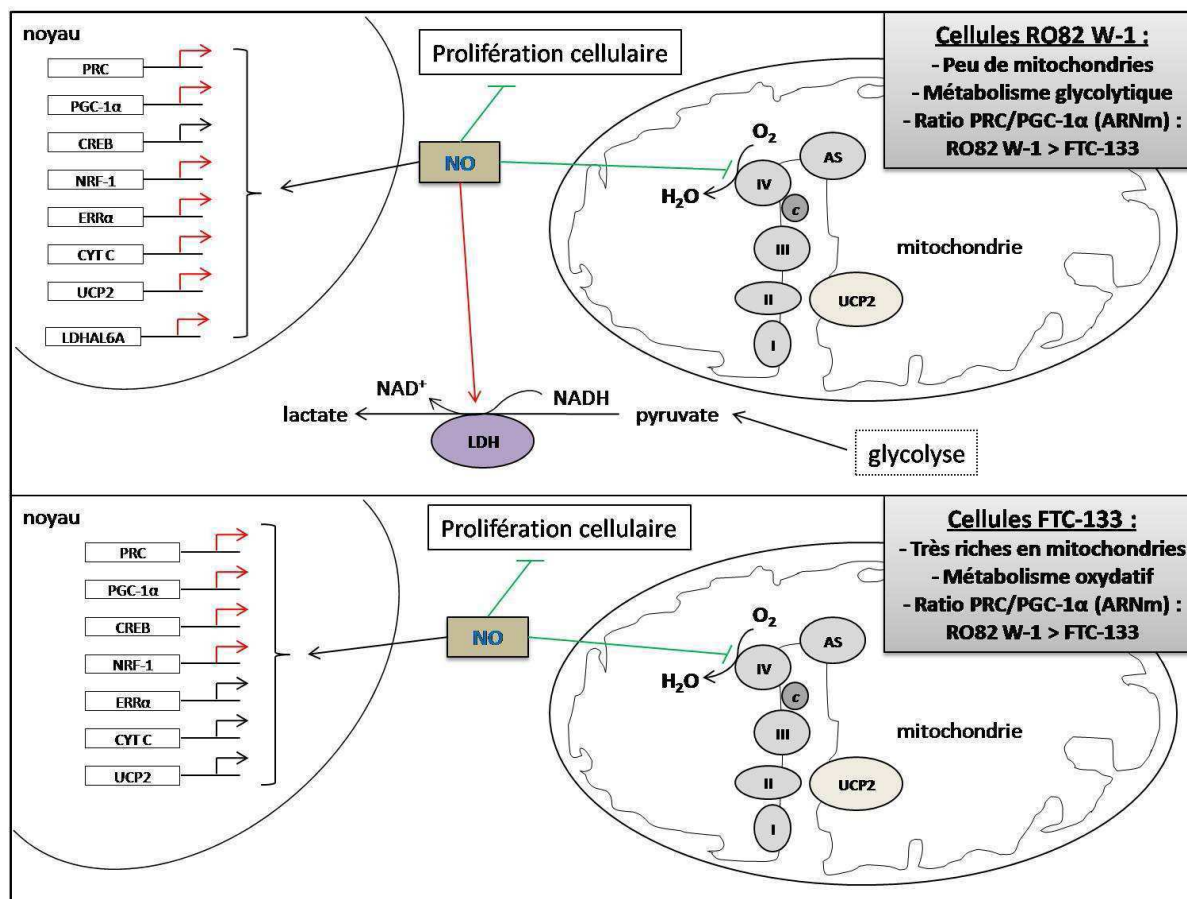


Figure R3 : Schéma synthétisant les effets, décrits dans l'article 3, du donneur de NO SNAP (50 µM) dans les cellules RO82 W-1 et FTC-133.

Les flèches vertes indiquent les actions inhibitrices et les flèches rouges indiquent les actions activatrices du monoxyde d'azote (NO) dans les cellules RO82 W-1 et FTC-133.

AS : ATP synthase ; CREB : cAMP Response-Element Binding ; CYT C ou *c* : cytochrome *c* ; ERRα : Estrogen-Related Receptor α ; H₂O : eau ; LDH : Lactate DésHydrogénase ; LDHAL6A : Lactate DeHydrogenase A-Like 6A ; NAD⁺ : Nicotinamide Adénine Dinucléotide ; NADH : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Hydrogéné ; NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor-1 ; O₂ : dioxygène ; PGC-1α : PPARγ Coactivator-1 α ; PRC : PGC-1-Related Coactivator ; UCP2 : UnCoupling Protein 2 ; I, II, III, IV : complexes I, II, III, IV.

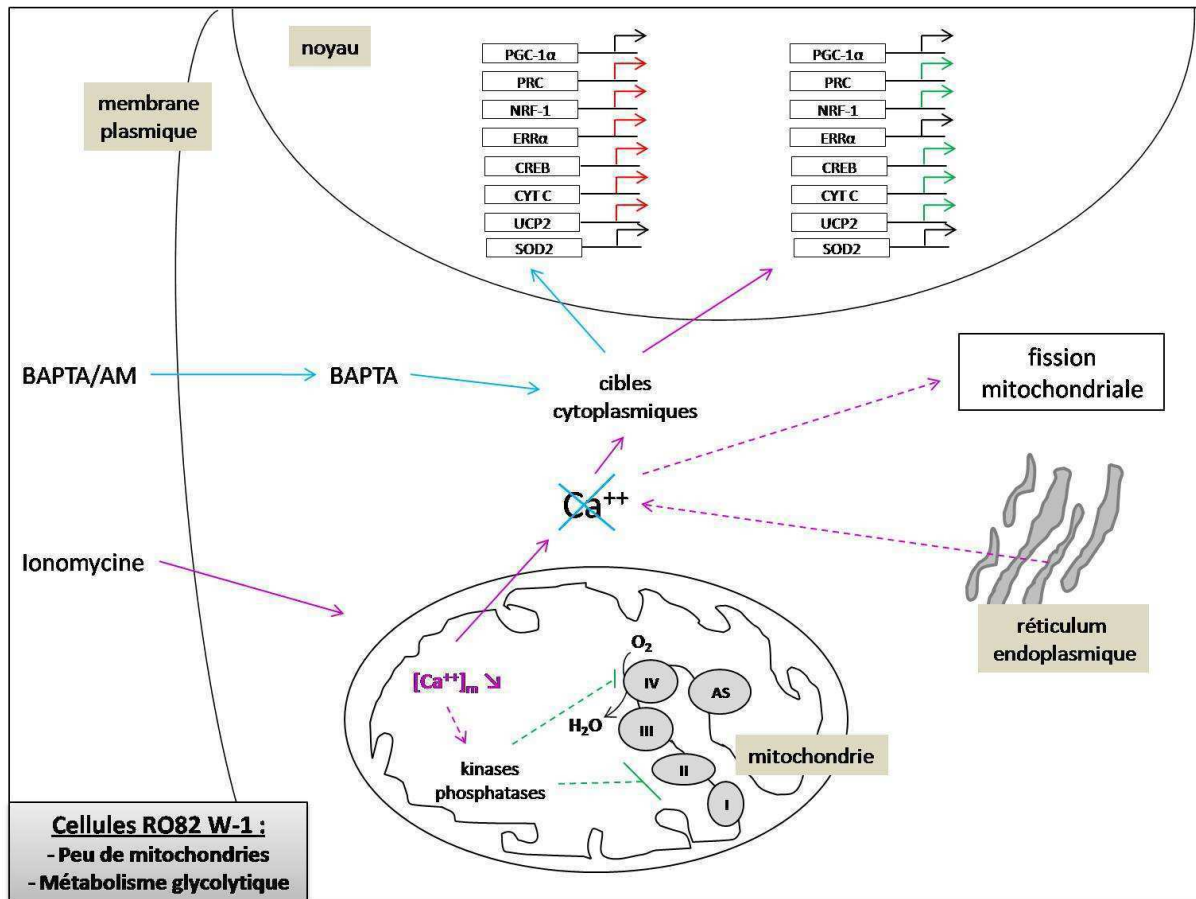


Figure R4 : Schéma synthétisant les effets, décrits dans l'article 3, de la modulation de la concentration calcique intracellulaire dans les cellules RO82 W-1.

Les flèches violettes indiquent les modifications induites par l'ionomycine, ionophore de calcium, et les flèches bleues indiquent les modifications induites par le chélateur de calcium BAPTA/AM. Les flèches vertes correspondent aux actions inhibitrices et les flèches rouges correspondent aux actions activatrices. Les pointillés indiquent des mécanismes d'action supposés ou des résultats préliminaires à préciser.

AS : ATP synthase ; Ca $^{++}$: ions calcium ; CREB : cAMP Response-Element Binding ; CYT C : cytochrome c ; ERR α : Estrogen-Related Receptor α ; H $_2$ O : eau ; NRF-1 : Nuclear Respiratory Factor-1 ; O $_2$: dioxygène ; PGC-1 α : PPAR γ Coactivator-1 α ; PRC : PGC-1-Related Coactivator ; SOD2 : SuperOxyde Dismutase 2 ; UCP2 : UnCoupling Protein 2 ; I, II, III, IV : complexes I, II, III, IV ; [Ca $^{++}$] $_m$: concentration calcique mitochondriale.

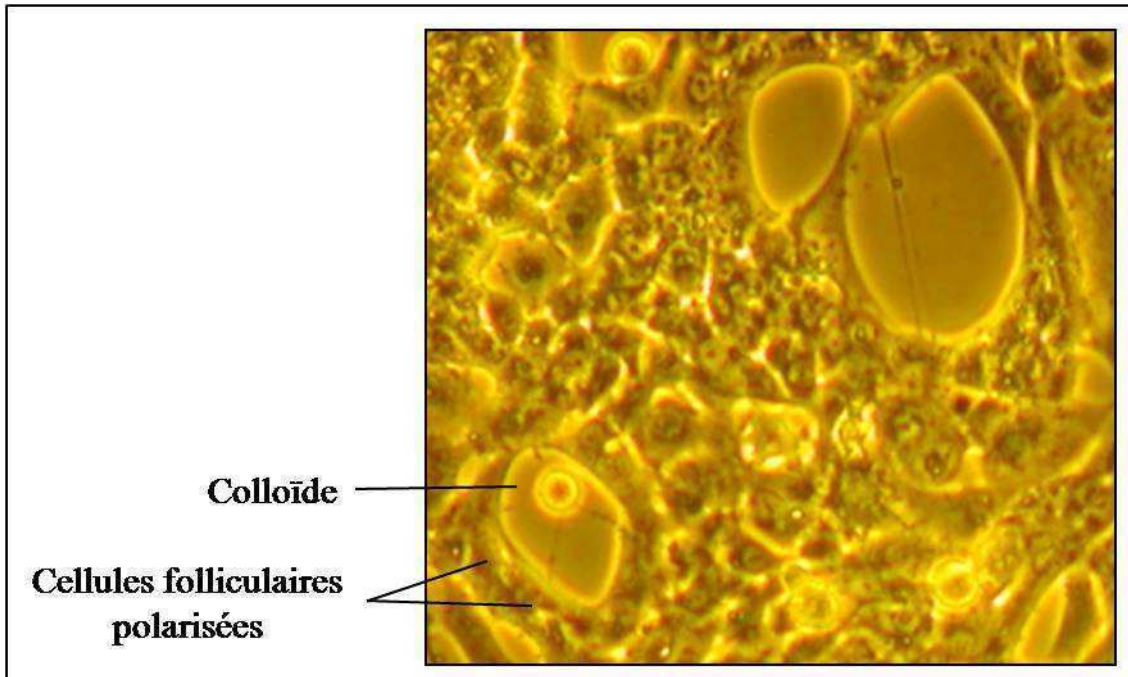


Figure R5 : Cellules XTC.UC1 formant des follicules après traitement par de la TSH.

Le traitement des cellules XTC.UC1 par de la TSH (10 mU/ml) entraîne la formation de structures présentant une architecture en follicule avec présence d'une couronne de cellules folliculaires polarisées entourant la colloïde. (Microscopie inversée, grossissement X20).

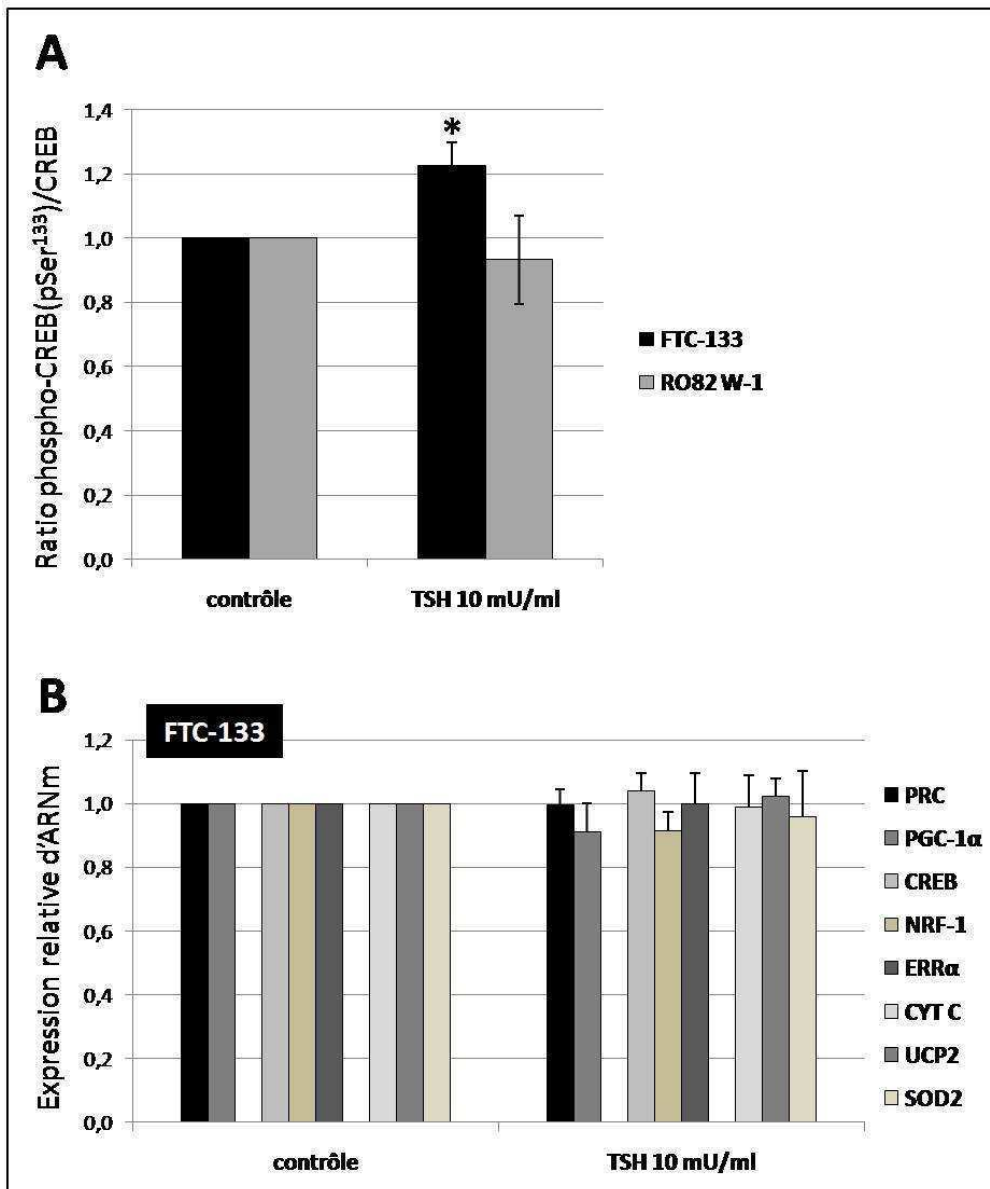


Figure R6 : Effets de la TSH (10 mU/ml) sur les cellules FTC-133 et RO82 W-1.

A : Les cellules de carcinomes folliculaires thyroïdiens, FTC-133 et RO82 W-1, ont été incubées pendant 24 h avec de la TSH (10 mU/ml). A la fin du traitement, les cellules ont été récupérées puis une extraction de protéines a été réalisée. Le niveau de phosphorylation de la protéine CREB a alors été évalué (par quantification de la forme phosphorylée au niveau de la sérine en position 133 et de la forme non phosphorylée de cette protéine, par la méthode ELISA) dans ces deux lignées cellulaires traitées ou non par de la TSH.

B : Après traitement des cellules FTC-133 avec de la TSH (10 mU/ml) pendant 96 h, le niveau d'expression des transcrits des coactivateurs PRC et PGC-1 α , des facteurs de transcription CREB, NRF-1 et ERR α ainsi que du cytochrome *c* (CYT C), de l'UCP2 et de la SOD2 a été quantifié par RT-PCR quantitative.