



HAL
open science

Recherche des partenaires d'ATAD3 et étude de l'effet de l'invalidation sur la différenciation adipocytaire

Shuijie Li

► **To cite this version:**

Shuijie Li. Recherche des partenaires d'ATAD3 et étude de l'effet de l'invalidation sur la différenciation adipocytaire. Biologie cellulaire. Université de Grenoble, 2012. Français. NNT : 2012GRENV025 . tel-00771681

HAL Id: tel-00771681

<https://theses.hal.science/tel-00771681>

Submitted on 9 Jan 2013

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.

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Moléculaire et Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Shuijie LI

Thèse dirigée par **Denis ROUSSEAU**

préparée au sein du **Laboratoire de Bioénergétique
Fondamentale et Appliquée INSERM U1055**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

**Etude de la fonction d'ATAD3
au cours de la différenciation
adipocytaire**

Thèse soutenue publiquement le **06 Juillet 2012**

devant le jury composé de :

Pr Stefan NONCHEV

Professeur, Grenoble, Président

Mme Jennifer RIEUSSET

Chargé de recherche, Lyon, Rapporteur

Mr Michel BEYLOT

Directeur de recherche, Lyon, Rapporteur

Mr Ivan TARASSOV

Directeur de recherche, Strasbourg, Examineur

Pr Uwe SCHLATTNER

Professeur, Directeur du LBFA, Grenoble



REMERCIEMENTS.....	3
ABREVIATIONS	4
INTRODUCTION.....	6
LES MITOCHONDRIES.....	6
LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE.....	11
Fusion et fission mitochondriales.....	11
Mitophagie.....	20
Biogenèse mitochondriale.....	24
Interactions entre les mitochondries et le RE.....	28
Transport mitochondrial.....	33
LES GOUTELLETES LIPIDIQUES.....	37
ATAD3 : UNE PROTEINE DE LA FAMILLE DES ATPASE DE TYPE AAA+.....	44
Introduction d'ATAD3.....	44
Revue I.....	45
Revue II.....	52
RESULTATS.....	61
Résumé de l'article I.....	61
Article I.....	63
Résumé de l'article II.....	112
Article II.....	113
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	119
BIBLIOGRAPHIE.....	122

REMERCIEMENTS

Ma thèse n'ayant pu se faire seul, je souhaite adresser mes remerciements aux personnes suivantes :

- Les membres du Jury d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse.
- Denis Rousseau, directeur de ma thèse, qui m'a appris tellement de connaissances fondamentales, m'a donné avec patience de nombreuses discussions (en moyenne une fois par deux jours, même plus!) et m'a accordé l'encouragement, la liberté et la confiance pendant les trois ans de ma thèse.
- Le Professeur Uwe Schlattner, directeur de LBFA, qui nous a acceptés avec gentillesse au début de ma thèse et nous a prodigué de grands conseils qui sont très importants pour l'amélioration de nos résultats et la récolte de plus d'aboutissements dans nos projets.
- Cécile Cottet, responsable de la microscopie confocal au LBFA, qui m'a beaucoup aidé dans les expériences de microscopie confocale et m'a donné plein de connaissances sur cette technologie. Elle a prodigué son énergie pour l'analyse des images confocale.
- Karine Pernet-Gallay et Julie Delaroche, responsables de la plateforme microscopie électronique au GIN (Grenoble-Institut des Neurosciences), qui ont consacré leurs efforts à réaliser des manip de microscopie électronique et à analyser beaucoup d'images qu'elles ont récoltées et à la fin, nous ont expliqué avec patience et gentillesse les résultats qu'elles ont obtenus.
- Frédéric Lamarche, responsable de la culture cellulaire, qui a consacré tous ses efforts à la direction de la pièce de culture cellulaire et à rendre cette pièce très bien organisée.
- Rita Guzun qui m'a appris à faire les expériences d'oxymétrie et m'a aidé à analyser ces résultats.
- L'équipe des thésards et des post-docs: les jolies filles intelligentes, Sarah Zorman, Evangelia Mourmoura, Marie Le Guen, Marcela Gonzalez et les garçons Martin Pelosse et Fayçal Ounnas qui m'ont accordé des discussions sur la vie quotidienne et sur les problèmes de manips. Les blagues et les sourires dans le bureau des thésards sont toujours la dynamique du LBFA. L'amitié internationale contractée entre nous est toujours dans le coeur de chacun.
- Mes parents et mes beaux-parents qui me soutiennent très fort et m'encouragent toujours depuis le début de ma thèse.
- Mes grands-parents, votre petit-fils n'est plus un enfant qui fait l'enfant, vous êtes forcément contents de me voir finir ma thèse.
- Ma femme, Xiaotian, qui a déjà passé l'examen d'avocat et a choisi d'abandonner son très bon travail en Chine et de rester toujours à mes côtés jusqu'à la fin de ma thèse. Elle m'accorde dans la vie quotidienne des soins qui sont également indispensables pour ma vie de thèse.
- Ma soeur, Shuixiang, qui m'a encouragé toujours pendant toute la période de ma thèse.
- Mon neveu, Hehe Wang, dès sa naissance, il m'a donné tellement de joie en communiquant avec lui.

ABREVIATIONS

AAA : ATPases Associated with diverse cellular Activities
ACAT : Acyl-CoA/Cholesterol AcylTransferase
ACLY : ATP Citrate LYase
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
ADNmt : Acide DésoxyriboNucléique mitochondrial
AGPAT : sn-1-AcylGlycerol-3-Phosphate AcylTransferase
ANT : Adenine Nucleotide Translocase, Transporteur ADP/ATP
ARN : Acide RiboNucléique
ATAD : ATPase family, AAA Domain
ATP : Adénosine TriPhosphate
CREB : CAMP Response Element-Binding
DGAT : DiacylGlycerol AcylTransferase
Dlp : Dynamin-like protein
Drp : Dynamin-related protein
FAS : Fatty Acid Synthase
FAT : Fat-Acid Translocase
FATP : Fat-Acid Transport Protein
GDAP : Ganglioside-induced Differentiation Activated Protein
GPA : Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase
GTP : Guanosine Triphosphate
IP3R : Inositol trisPhosphate Receptor
KLC : Kinesin Light Chain
LD : Lipid Droplets
LDH : Lactate DeHydrogénase
MAM : Membranes Associées aux Mitochondries
MARCH : Human Membrane-Associated RING-CH
Mfn : Mitofusin
MIB : MItofusion-Binding protein
MTGM : Mitochondrial Targeting GxxG Motif protein
OMM : Outer Mitochondrial Membrane
IMM : Inner Mitochondrial Membrane
LXR : Liver X Receptor

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
OPA1 : Optic Atrophy type 1
OXPHOS : Oxidative Phosphorylation, Phosphorylation oxydative
PAS : Pre-Autophagosomal Structure
PMF : Proton Motive Force
PPAR : Peroxisome Proliferator-Activated Receptors
PtdSer : PhosphatidylSérine
PtdEtn : PhosphatidylEthanolamine
PtdCho : PhosphatidylCholine
RE : Réticulum Endoplasmique
ROS : Reactive Oxygen Species
RyR : Ryanodine Receptor
SERCA : Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium Atpase
SiARN : Silencing RNA, Petits ARN interférents
SLP : Stomatine-Like Protein
SUMO : Small Ubiquitin-like MOdifier
VDAC : Voltage Dependant Anion Chanel

INTRODUCTION

Les mitochondries

En 1948, Eugène Kennedy et Albert Lehninger ont découvert que les mitochondries sont le site de la phosphorylation oxydative, dans les cellules eucaryotes. En outre, les mitochondries jouent un rôle important dans la thermogénèse, l'apoptose, la signalisation et la régulation de l'homéostasie ionique (Lehninger et al., 2005).

Les mitochondries sont présentes dans la cellule sous forme de cylindres et elles ont une dimension de 1-2 à 10 μm de long et de 0,5 à 1 μm de large. Elles se composent de 2 membranes mitochondriales, une externe et une interne, qui délimitent trois milieux : le milieu extra-mitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace inter-membranaire et la matrice. Chacun est de l'ordre de 6 nm d'épaisseur et l'espace intermembranaire est de 7 nm. La membrane interne forme des invaginations qui apparaissent sous forme de crêtes, ou replis, au microscope électronique (Fig. 1).

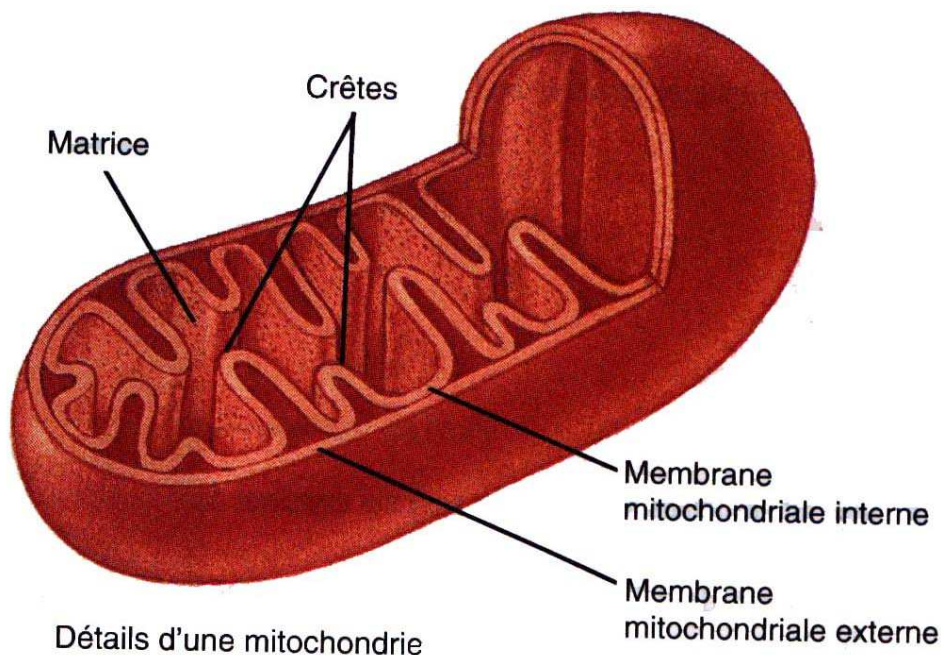


Figure 1. Mitochondrie: la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne. Les crêtes sont des compartiments internes formés par l'IMM (Inner Mitochondrial Membrane). Ces régions élargissent l'IMM, ce qui augmente la capacité d'hébergement en complexe respiratoire et donc la synthèse d'ATP. La matrice mitochondriale est une solution aqueuse contenant des enzymes, des produits intermédiaires du métabolisme énergétique, l'ADNmt et la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle.

En 1981, Anderson et son équipe ont découvert la structure génétique de l'ADN mitochondrial humain. Les mitochondries ont été essentielles pour l'évolution des animaux. Il

est possible que ces organites de conversion d'énergie des eucaryotes aient évolué à partir de procaryotes qui auraient été englouti par des cellules eucaryotes primitives et auraient développé une relation symbiotique avec eux. Cela pourrait expliquer pourquoi les mitochondries possèdent leurs propres ADN (ADNmt), qui codent pour certaines protéines et ARNt. Depuis leur adoption initiale par la cellule hôte, ces organites ont perdu beaucoup de leur propre génome et elles sont devenues fortement dépendantes des gènes nucléaires. Chaque mitochondrie possède au sein de sa matrice plusieurs copies d'ADN mitochondrial circulaire (ADNmt) de 16,6 kDa et ce génome mitochondrial contient 37 gènes essentiels pour la fonction de la respiration mitochondriale. Chaque mitochondrie contient 2 à 10 copies d'ADN qui sont répliquées en fin de phase S et G2 du cycle cellulaire. Selon le nombre de mitochondries présentes dans une cellule, on peut avoir quelques centaines, voire quelques milliers de copies par cellule. Il en résulte qu'un gène de l'ADNmt peut être représenté à des milliers d'exemplaires alors qu'un gène nucléaire n'est représenté qu'en deux exemplaires. Chez les mammifères, l'ADN mitochondrial est double brins: un brin lourd (H, heavy strand) riche en guanine et l'autre brin, riche en cytosine (L, light strand). Le brin lourd contient 12 des 13 gènes codant pour les polypeptides qui composent certaines sous-unités des complexes I, III, IV et V de phosphorylation oxydative (Hom et al., 2009), 14 des 22 gènes codant pour l'ARNt et deux gènes codant pour l'ARNr. Les introns sont absents dans l'ADN mitochondrial, et toutes les séquences codantes sont contiguës et transcrites sous forme polycistronique (Zeviani et al., 1998) (Fig. 2).

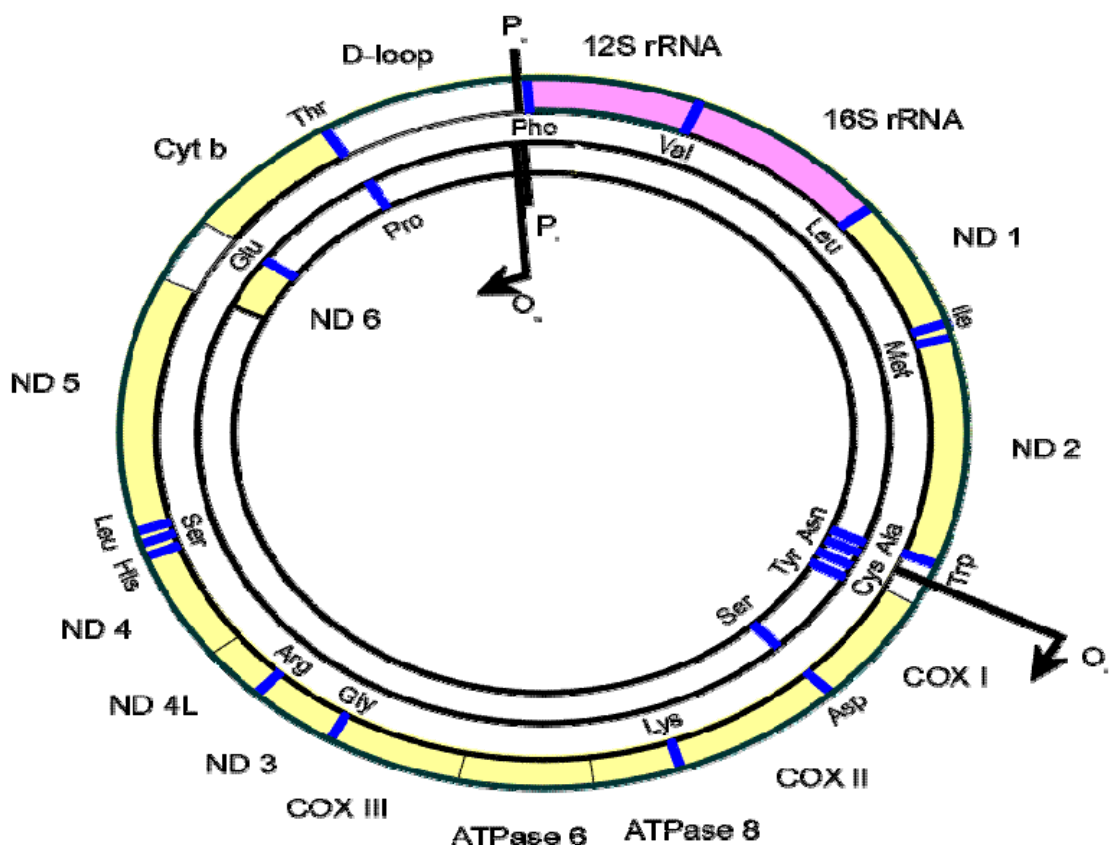


Figure 2. Génome mitochondrial humain. Le génome mitochondrial humain codant pour 13 sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire: sept sous-unités (ND 1-6 et 4L) du complexe I, le cytochrome b (cyt b) du complexe III, les sous-unités de la cytochrome oxydase ou complexe IV, et les sous-unités 6 et 8 d'ATPase de l'ATP synthase F_0F_1 . L'ADNmt code également pour les ARNr 12S et 16S et 22 ARNt. Les noms abrégés des acides aminés indiquent les gènes correspondants aux ARNt. Le brin externe est la chaîne lourde d'ADN et l'interne est la chaîne légère. O_H et O_L sont respectivement les origines de réplication des chaînes lourde et légère, tandis que P_H et P_L indiquent les sites d'initiation de la transcription.

Les mitochondries sont composées de compartiments qui exercent des fonctions spécialisées:

- La membrane externe (OMM, Outer Mitochondrial Membrane) formée de 60 % de protéines et de 40 % de lipides polaires. Elle contient de nombreuses protéines appelées porines (VDAC, Voltage-Dependent Anion Channel) qui forment des canaux aqueux à travers la membrane, ce qui la rend perméable aux molécules inférieures à 5 kDa et aux ions. VDAC a trois isoformes dans des cellules eucaryotes (VDAC1, VDAC2 et VDAC3). La membrane externe présente aussi des complexes TOM constitués de plusieurs sous-unités protéiques dont des récepteurs et des canaux aqueux qui permettent l'entrée des protéines d'origine nucléaire dans la mitochondrie ou l'insertion de ces mêmes protéines dans la membrane externe.

- L'espace intermembranaire (IMS).

- La membrane interne mitochondriale (IMM) composée de 75 % de protéines et de 25 % de lipides. L'IMM forme des compartiments internes appelés crêtes. Elle est beaucoup moins perméable que la membrane externe. Elle est imperméable à la plupart des petites molécules et des ions, y compris des protons (H^+) en raison de la présence de la cardiolipine. Ceci établit une force proton-motrice (PMF, proton motive force) à travers l'IMM. La force proton-motrice est générée par les complexes respiratoires, également connus sous le nom de chaîne de transport des électrons (ETC, electron transport chain). De plus, l'IMM contient les transporteurs spécifiques qui véhiculent le pyruvate, des acides gras et des acides aminés, ou leurs dérivés, dans la matrice pour suivre le cycle de Krebs. L'ADP et le P_i sont spécifiquement transportés dans la matrice lorsque l'ATP nouvellement synthétisé est transporté en dehors. Elle contient des transporteurs d'électrons (les complexes I-IV), l'ADP-ATP (F0F1) synthase ou complexe V, et d'autres transporteurs membranaires.

- La matrice mitochondriale, qui contient le complexe pyruvate déshydrogénase; les enzymes du cycle de l'acide citrique; les enzymes de la β -oxydation des acides gras; les enzymes d'oxydation des acides aminés; l'ADN mitochondrial (ADNmt), des ribosomes; de nombreuses enzymes; ainsi que ATP, ADP, P_i , Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ ; et de nombreux intermédiaires métaboliques solubles. Une molécule d'ADNmt est compactée au sein de petites structures protéiques (100nm) ancrées à la membrane interne et appelées nucléoïde (Albring et al. 1977; Kukat, Wurm et al. 2011). Ces ensembles, semblables aux complexes nucléoïdes-ADN bactériens, réguleraient la réplication et la transcription de l'ADNmt (Albring, Griffith et al. 1977).

Lors de la glycolyse cytoplasmique, le monosaccharide est progressivement transformé en pyruvate. Cet intermédiaire peut alors rentrer dans deux voies métaboliques. En absence d'oxygène, le pyruvate sera rapidement réduit en lactate dans le cytoplasme, ce qui permet de produire un peu d'énergie, sous forme d'ATP, et de recycler les coenzymes oxydées lors de la glycolyse. En présence d'oxygène, le pyruvate peut rentrer dans le cycle de Krebs au sein de la matrice mitochondriale, et permettre ainsi la réduction de coenzymes. L'ensemble de ces coenzymes sera alors oxydé par les complexes I, III, et IV. Ces derniers, avec le complexe II, constituent une chaîne de transport d'électrons jusqu'à l'oxygène, l'accepteur final, qui est alors réduit sous forme d'eau (Fig. 3)

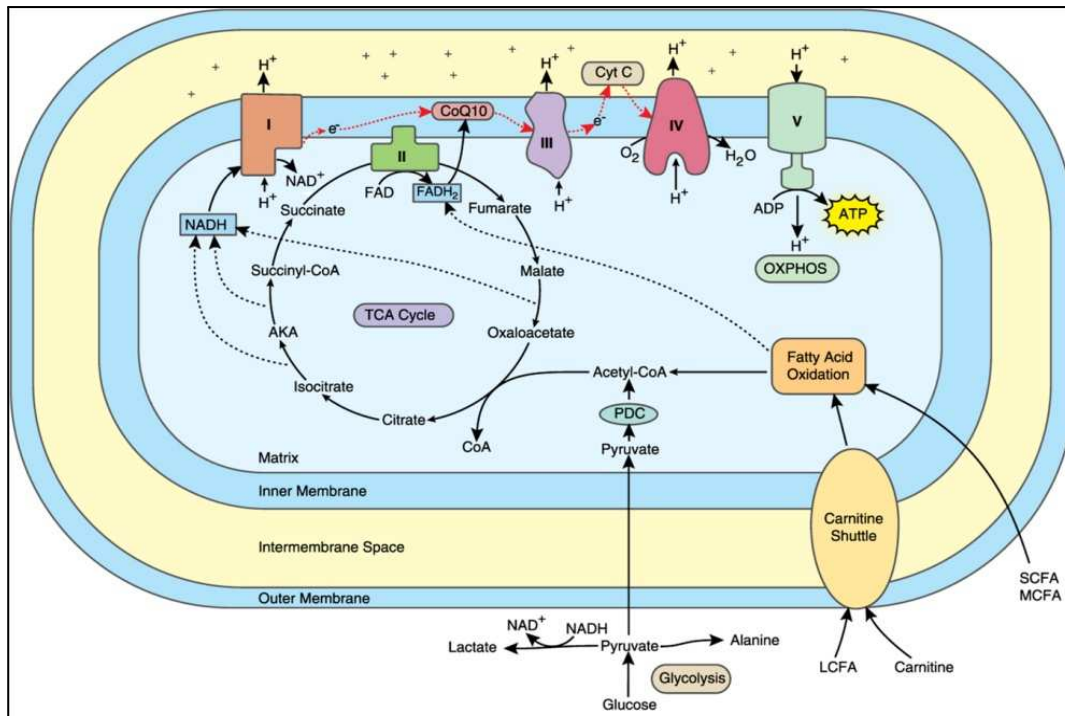


Figure 3. La fonction mitochondriale et la chaîne de transport d'électron. Abréviations: ADP, adenosine diphosphate; AKA, α -ketoglutarate; ATP, adenosine triphosphate; CoQ, co-enzyme Q; Cyt C, cytochrome c; e, electron; FAD, flavin adenine dinucléotide; FADH₂, reduced FAD; H, hydrogen; LCFA, long chain fatty acid; MCFA, medium chain fatty acid; NAD, nicotinamide adenine dinucléotide; NADH, reduced NAD; OXPHOS, oxidative phosphorylation; PDC, pyruvate dehydrogenase complex; SCFA, short chain fatty acid; TCA, tricarboxylic acid; I, complex I; II, complex II; III, complex III; IV, complex IV; V, complex V. Les flèches rouges indiquent le flux d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons.

Dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est un caractère essentiel, impliqué dans les interactions fonctionnelles et métaboliques de la mitochondrie avec d'autres organites au sein de la cellule et dans la maintenance de leur propre intégrité. Nous différencierons trois grands types de dynamique mitochondriale:

- **Le transport des mitochondries**

Leur mouvement dans la cellule est fortement lié à des associations avec d'autres organites et dépend au moins partiellement d'interactions avec le cytosquelette. Ces interactions peuvent être responsables du changement de forme comme la ramification, l'extension, la rétraction et la flexion.

- **La fusion et la fission mitochondriales**

Des événements de fusion et de fission permettent une plasticité de ces organites et favorisent leur cohérence au sein du chondriome (l'ensemble de toutes les mitochondries dans la cellule).

- **La biogenèse mitochondriale et la mitophagie**

La formation et la destruction des mitochondries (mitophagie).

Fission et Fusion mitochondriale

Les mitochondries sont des organites à double membrane qui sont essentiels pour de nombreux processus comme la génération d'ATP aérobie, la biogenèse des lipides et la biogenèse des clusters de l'hème et du fer-souffre (McBride et al., 2006). A ce jour, elles sont reconnues comme des organites hautement dynamiques qui se déplacent à l'intérieur des cellules sur des microtubules ou des microfilaments et elles peuvent se fusionner et se diviser continuellement dans les cellules. Les mitochondries se présentent sous la forme d'un réseau dynamique dont la morphologie résulte d'un équilibre entre des événements de fusion et de fission de cet organite. L'équilibre de la fusion et la fission détermine si les mitochondries forment, dans la cellule, des filaments interconnectés ou apparaissent comme une collection de structures ponctiformes indépendantes (Cécile Sauvanet et al., 2010). Des changements dynamiques morphologiques sont essentiels non seulement pour l'entretien de l'activité respiratoire et de l'ADN mitochondrial (ADNmt), mais aussi pour le contrôle de processus

cellulaires tels que le développement embryonnaire, la plasticité neuronale, l'apoptose ou la signalisation du calcium (Hidenori Otera and Katsuyoshi Mihara. 2011) (Fig. 4). Des dynamiques mitochondriales anormales entraînent souvent la perte de synapse neuronale et la mort des cellules dans plusieurs maladies neurologiques humaines telles que la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et de Huntington (Chen et al., 2009). Les dynamiques mitochondriales ont été trouvées également impliquées dans le vieillissement. De plus, il est suggéré que la dynamique mitochondriale est responsable des conditions pathologiques associées aux stress oxydatifs.

H. Otera and K. Mihara

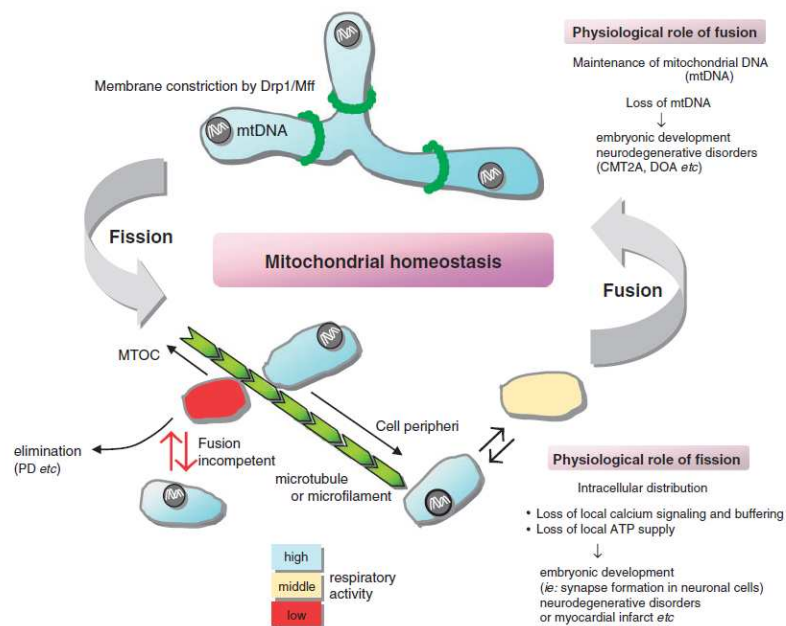


Figure 4. Vue d'ensemble de la dynamique mitochondriale et de l'homéostasie. La morphologie mitochondriale est maintenue par la fusion et la fission. La fission mitochondriale excessive entraîne souvent la génération des mitochondries dépolarisées (respiratoires inactives). Bien que les mitochondries légèrement dépolarisées fusionnent avec les mitochondries actives et récupèrent l'activité respiratoire, les mitochondries fortement dépolarisées ne peuvent pas fusionner avec les mitochondries actives. Par conséquent, la fusion mitochondriale empêche la perte de nucléoïdes d'ADNmt et contribue à maintenir l'activité respiratoire mitochondriale. Les mitochondries dysfonctionnelles sont éliminées par le système d'autophagie, nommé mitophagie. La perturbation de la dynamique mitochondriale ou du système de contrôle de qualité mitochondriale conduit à l'accumulation des mitochondries dysfonctionnelles et entraîne un effondrement de l'environnement cellulaire suivi par la mort cellulaire. CMT2A: Charcot-Marie-Tooth disease type 2A, DOA: Dominant Optic Atrophy, PD: Parkinson's disease.

Selon le type de cellule et la situation physiologique, les mitochondries montrent différents morphotypes : (a) petites et arrondies (fragmentées), (b) allongées, tubulaires, et (c) en réseau interconnecté (Jürgen Bereiter-Hahn and Marina Jendrach. 2010).

La fission mitochondriale contribue non seulement à la répartition des mitochondries en réponse à la demande locale d'ATP, mais aussi à l'élimination des fragments mitochondriaux endommagés, par le biais de la mitophagie (l'autophagie des mitochondries), tandis que la fusion mitochondriale facilite l'échange de l'ADNmt et d'autres composants vitaux entre mitochondries pour le maintien de leur intégrité (Hidenori Otera and Katsuyoshi Mihara. 2011).

La fusion mitochondriale est un processus complexe et régulé impliquant de multiples protéines qui fusionnent à la fois la membrane externe et interne de chaque mitochondrie. Bien que la réaction de fusion des membranes externes mitochondriales et celle subséquente des membranes internes mitochondriales, soient normalement hautement synchronisées, les deux processus peuvent se produire indépendamment (Meeusen S et al., 2004; Malka, F et al., 2005).

Pendant la dernière décennie, divers composants cellulaires ont été identifiés comme des médiateurs essentiels pour la fusion et la fission mitochondriale chez la levure (Hoppins et al., 2007; Merz et al., 2007; Okamoto and Shaw, 2005). Chez les mammifères, la conservation structurelle et fonctionnelle de ces composants indique l'importance ubiquitaire des processus de fusion et de fission dans la biologie mitochondriale (Arnold Y et al., 2010).

La fusion et la fission mitochondriales sont contrôlées par quatre GTPases de grand poids moléculaire et conservées de la levure aux mammifères: La mitofusine, Mfn1 et Mfn2 (Fzo1 dans la levure), ancrées dans la membrane externe mitochondriale et impliquées dans la fusion de la membrane externe mitochondriale (OMM); Opa1 (protéine impliquée dans l'atrophie optique de type I; Mgm1 dans la levure) localisée au niveau de la membrane interne et impliquée dans la fusion de la membrane interne mitochondriale (IMM) et l'organisation des crêtes; et Drp1 (Dnm1 dans la levure), impliqué dans la fission mitochondriale. Il est à noter que les mécanismes fondamentaux contrôlant la dynamique mitochondriale ont été maintenus et probablement améliorés au cours de l'évolution (Hidenori Otera and Katsuyoshi Mihara. 2011). Drp1 et Mfn2 sont co-immunoprécipités par les anticorps spécifiques à MARCH-V ou à ATAD3 (Nobuhiro Nakamura et al., 2006 ; S. Chiang et al., 2011), ce qui suggère que Drp1 et Mfn2 interagissent de manière directe ou indirecte avec ATAD3 and MARCH-V.

Chez la levure, la machinerie de fusion mitochondriale est composée de trois protéines : Fzo1 et Ugo1, ancrées dans la membrane externe, et Mgm1 localisée au niveau de la membrane interne (Cécile Sauvanet et al., 2010), ou dans l'espace intermembranaire mitochondrial (Meeusen S et al., 2006). Il est suggéré que les protéines Fzo1/MFN s'associent

en trans pour induire l'accolement puis la fusion, GTP-dépendante, des membranes externes, et que la fusion des membranes internes est ensuite prise en charge par la dynamine Mgm1/Opa1 (Fig. 5) (Hoppins S et al., 2007). La fusion de la membrane externe nécessite des interactions en trans de Fzo1 et Mgm1 est nécessaire pour attacher et fusionner les membranes internes mitochondriales (Meeusen et al., 2006). Chez la levure, la dimérisation en trans de Mgm1 est nécessaire pour l'accolement et la fusion les deux membranes internes, mais chez les mammifères, la présence d'Opa1 n'est requise que pour une des deux mitochondries (Landes T et al., 2010). Chez la levure, Ugo1, protéine intégrale de la membrane externe mitochondriale, est une partie du complexe contenant les facteurs de fusion, Fzo1 et Mgm1 (Wong et al., 2003), nécessaire à la fusion des membranes externes et internes (Hoppins S et al., 2009). Cette protéine pourrait coupler la dynamique des deux membranes mitochondriales en interagissant avec Fzo1 et Mgm1. Ugo1 affecte la fusion des membranes externes et internes mitochondriales au cours d'une étape postérieure à l'accolement des membranes, probablement en facilitant le mélange des bicouches lipidiques (Hoppins S et al., 2009).

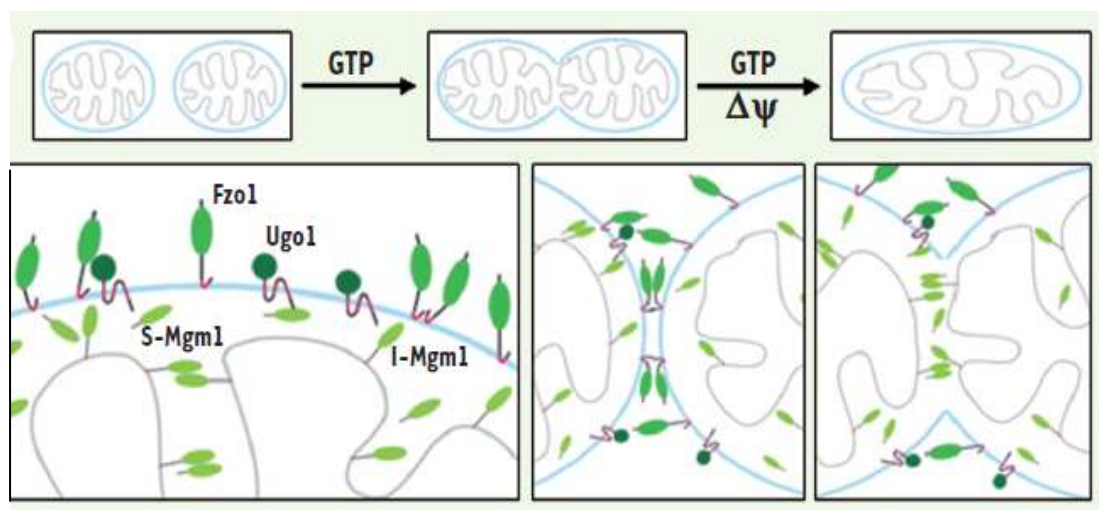


Figure 5. Mécanistique de la fusion : la fusion des membranes externes dépend du GTP ; celle des membranes internes du GTP et du potentiel mitochondrial. Elles impliquent respectivement Fzo1 et Ugo, deux protéines intégrales de la membrane externe, et deux formes de Mgm1, une longue (l-mgm1) ancrée à la membrane interne, et une courte (s-mgm1) en périphérie de la membrane interne ou libre dans l'espace intermembranaire. Fzo1 et Mgm1 contribuent à la fusion séquentielle de la membrane externe puis de la membrane interne par deux processus distincts impliquant d'abord une homodimérisation en trans de chacune des protéines, puis un mélange des bicouches lipidiques. Ugo1, en interagissant avec Fzo1 et Mgm1, couplerait la dynamique des deux membranes.

Dans les cellules de mammifères, la fusion mitochondriale est régulée par deux homologues de Fzo1 appelés mitofusines (Mfn1 et Mfn2 [Rojo M et al., 2002]) et un

homologue de Mgm1 appelé Opa1 (Delettre C et al., 2000; Landes T et al., 2010). Aucun homologue de Ugo1 n'est retrouvé chez les mammifères. L'absence d'un orthologue mammifère de Ugo1 pourrait expliquer pourquoi le couplage de la dynamique des deux membranes semble moins efficace chez les mammifères (Cécile Sauvanet et al., 2010). Chez la levure et les mammifères, la délétion des gènes codant les protéines fusogènes entraîne la fragmentation des mitochondries par inhibition de leur fusion (Hoppins S et al., 2007). Des mutations de Mfn2 ou Opa1 pourraient entraîner des désordres, par exemple neurologiques: la perte de la fonction de Mfn2 provoque la maladie de Charot-Marie-Tooth de type 2A par la dégénérescence des axones dans les extrémités distales (Zuchner et al., 2004) et des mutations d'Opa1 causent une atrophie optique dominante autosomique, où la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine entraîne la perte de fibres du système du nerf optique (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000).

Les deux GTPases Mfn1 et Mfn2 peuvent former des complexes homo- ou hétéromérique (Chen et al., 2003; Ishihara et al., 2004; Koshiba et al., 2004). Ces interactions physiques entre les mitofusines de mitochondries opposées permettent d'attacher et éventuellement de fusionner les membranes externes mitochondriales. L'invalidation de Mfn1 produit des petites mitochondries fragmentées et largement dispersées au sein de la cellule, alors que celle de Mfn2 conduit à de grosses mitochondries fragmentées concentrées autour de noyau (Chen et al., 2003). Conformément à ces phénotypes remarquables, la protéine Mfn1 recombinante purifiée présente plus d'activité de GTPase que Mfn2. De ce fait, ces deux mitofusines sembleraient avoir des rôles distincts dans la fusion de la membrane externe mitochondriale; Mfn1 est considérée comme responsable de l'attachement initial de l'OMM, dépendant du GTP. Il n'est pas encore clair comment Mfn1 et Mfn2 favorisent la fusion de l'OMM au-delà de l'étape d'attachement initiale.

Mfn2 est également enrichie dans les membranes associées aux mitochondries (MAM) du réticulum endoplasmique (RE), où elle interagit avec Mfn1 et Mfn2 sur les mitochondries de façon à former des ponts inter-organites (de Brito et al., 2008; Merkwirth et al., 2008)

En plus de ces deux acteurs, une protéine liée à la mitofusion (MIB, Mitofusion-Binding protein) a été identifiée comme un régulateur de la fusion. Chez les cellules Hela, la surexpression de MIB induit la fragmentation mitochondriale, tandis que l'inhibition de cette protéine par ARN interférence conduit à la formation de mitochondries allongées. Par conséquent, MIB fonctionne comme un régulateur négatif des protéines de fusion. Pour comprendre en détail les mécanismes moléculaires de la fusion de l'OMM, il est nécessaire

d'identifier plus précisément les protéines qui interagissent avec Mfn1/Mfn2 (Hidenori et al., 2011).

Parmi les facteurs supplémentaires de fusion présents dans les cellules de mammifères, la stomatine-like protein 2 (SLP-2) et MARCH-V sont discutées ici. SLP-2 interagit avec Mfn2 (Hajek et al., 2007), et une régulation négative de SLP-2 par shRNA entraîne une perte de l'hyperfusion induite par le stress (Tondera et al., 2009). En outre, MARCH-V (human membrane-associated RING-CH), une protéine transmembranaire de la membrane externe mitochondriale, interagit avec Mfn2, et sa surexpression change l'équilibre vers la fusion mitochondriale, tandis que les mutations de cette protéine mitochondriale induisent la fission (Nakamura et al., 2006). L'inhibition de MARCH5 induit aussi la sénescence des cellules, médiée par l'augmentation de l'expression de Mfn1 et /ou l'inhibition de facteur de fission Drp1 (Park et al., 2010).

Opa1 est une autre molécule essentielle pour la fusion de l'IMM et le remodelage des crêtes. Il existe huit variants d'épissage d'Opa1, qui sont tous synthétisés comme des protéines précurseurs avec la séquence de localisation mitochondriale en N-terminal et les tronçons suivants hydrophobes, responsables du tri de la protéine dans l'IMM (Ishihara et al., 2006; Delettre, C et al., 2001). Elles sont ancrées dans l'IMM avec le domaine GTPase exposé dans l'espace intermembranaire mitochondrial. La surexpression d'Opa1 conduit à l'élongation et la formation du réseau mitochondrial (Cipolat et al., 2004). Opa1 est également impliquée dans le maintien de la structure des crêtes. L'invalidation d'Opa1 induit la destructuration des crêtes, la libération du cytochrome c et l'induction de l'apoptose (Cipolat et al., 2006; Olichon et al., 2003; Frezza et al., 2006). L'inhibition des variants d'Opa1 possédant l'exon 4b donne lieu à une déplétion de l'ADN mitochondrial, l'inhibition de sa réplication et l'altération de sa distribution au sein du nucléoïde (Elachouri et al., 2010).

La machinerie de fission, chez la levure, est constituée par quatre protéines principales: Dnm1, GTPase de la famille des dynamines, Fis1, Mdv1 et Caf4. La délétion ou la mutation de Dnm1, ou de ses homologues Drp1 ou Dlp1 chez les métazoaires, augmente la longueur et la connectivité des mitochondries et empêche leur fragmentation. Dnm1, majoritairement cytosolique, est recrutée à la membrane mitochondriale externe au niveau des futurs sites de fission. Chez la levure, ce recrutement implique la protéine intégrale de la membrane externe Fis1 et les protéines adaptatrices Mdv1 et Caf4 (Fig. 6). Le recrutement de Drp1 demeure assez obscur, d'une part car il n'existe pas d'orthologues mammifères de Caf4 et Mdv1 et d'autre part car la perte de l'homologue humain de Fis1 ne perturbe pas la localisation mitochondriale de la dynamine (Liesas M et al., 2009). Une fois recrutée à la

membrane externe, Dnm1/Drp1 oligomérisent et forment une spirale dont le changement de structure, induit par l'hydrolyse du GTP, provoque la fission des mitochondries (Fig. 6). La possibilité de découpler la fission des deux membranes mitochondriales chez *C. elegans* suggère l'existence d'une machinerie indépendante pour la fission de la membrane interne. Cependant, l'existence d'une telle machinerie n'a pas encore été réellement démontrée.

Chez les mammifères, Drp1 ou Dlp1 (dynamamin-like protein) et la protéine de fission Fis1 sont les facteurs principaux de la fission mitochondriale. Drp1 contient un domaine de GTPase N-terminal, un domaine ressemblant à la dynamine au centre et un domaine effecteur localisé dans la région C-terminale. Drp1 est localisée dans le cytoplasme et est recrutée au niveau des mitochondries pour lancer leur divisions (Frank et al, 2001; Han et al, 2008).

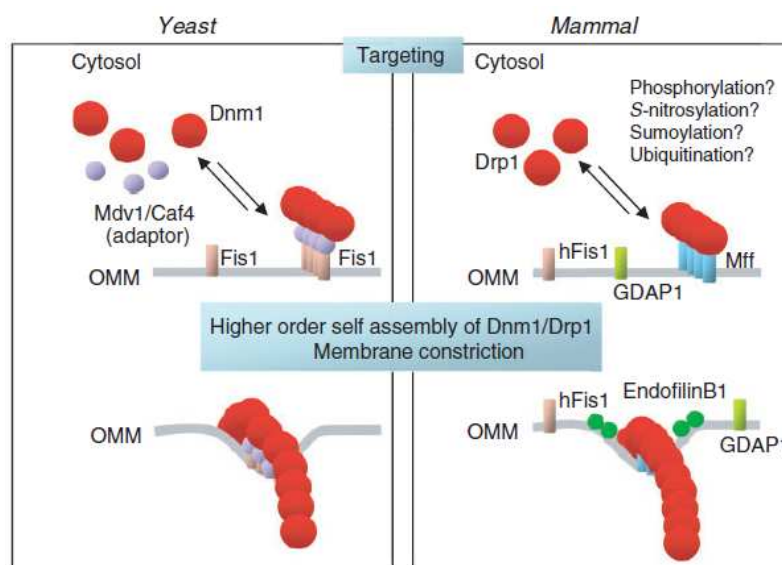


Figure 6. L'assemblage de Drp1/Dnm1 sur l'OMM dans la levure et les mammifères. Chez la levure (Panneau de gauche), la fission mitochondriale implique l'interaction de Dnm1 avec Fis1 via les protéines adaptatrices Mdv1/Caf4. Chez les mammifères (Panneau de droite), la fission mitochondriale nécessite la protéine Mff de la partie C-ter ancrée. DRP1 cytosolique est recrutée à l'OMM par les Mff. Bien que des homologues de Mdv1/Caf4 chez la levure n'ont pas été identifiés dans les eucaryotes supérieurs, Mff semble fonctionner simultanément comme un adaptateur et un récepteur pour le recrutement de DRP1 au niveau des mitochondries.

Fis est une protéine dont la partie C-terminale est ancrée dans l'OMM et qui présente de multiples motifs TPR (tetratricopeptide repeat) N-terminaux exposés au cytoplasme (Stojanovski et al., 2004; Yoon et al., 2003) (Fig. 6). Il est supposé que comme chez la levure et les mammifères, Fis serait impliquée dans le recrutement de Drp1 sur les mitochondries par interaction directe ou indirecte (Yoon et al., 2003) (Fig. 6). La surexpression de Fis1 raccourcit les mitochondries, tandis que la régulation négative de Fis1 les allonge, mais une interaction directe entre Fis1 et Drp1 est encore en discussion car en l'absence de Fis1, Drp1

se déplace quand même vers les mitochondries (Lee et al., 2004). D'autre part, des expériences de «pull-down» ont révélé que l'association de Drp1 à Fis1 dépend de sa phosphorylation sur la Sérine-600 (Han et al., 2008). Des souris dépourvues de Drp1 présentent une léthalité embryonnaire, et les mitochondries, ainsi que les peroxysomes, sont allongés chez ces souris (Wakabayashi et al., 2009). En outre, les souris invalidées spécifiquement pour Drp1 dans les cellules neuronales meurent peu de temps après la naissance, par la perte des neurones et une inhibition de la formation des synapses (Ishihara et al., 2009).

Les autres acteurs de la fission mitochondriale identifiés dans les cellules de mammifères sont Mff (Mitochondrial fission factor) (Figure 6), «ganglioside-induced differentiation activated protein 1» (GDAP1), une protéine mitochondriale de 18 kDa et la «mitochondrial targeting GxxxG motif protein» (MTGM). Les trois premières sont des protéines de l'OMM, alors que MTGM réside dans l'IMM. La surexpression de chacun de ces facteurs entraîne la fragmentation des mitochondries, alors que l'inactivation augmente la fusion mitochondriale (Jürgen Bereiter-Hahn and Marina Jendrach. 2010).

A part les modulations de son niveau d'expression, l'activité de Drp1 peut être également stimulée par des modifications post-traductionnelles: la phosphorylation, la S-nitrosylation, la sumoylation et l'ubiquitination. La phosphorylation de Drp1 pendant la mitose par le complexe Cdk1/CyclineB (Sérine 585 pour le rat et Sérine 616 pour l'homme) favorise la fission mitochondriale et facilite la bonne répartition et la ségrégation des mitochondries dans des cellules filles (Taguchi et al., 2007). Cependant, chez les cellules Hela et PC12, la phosphorylation d'un résidu sérine de Drp1 (Ser 637 pour le rat et Ser 656 pour l'homme), par la protéine kinase A, inhibe la fission mitochondriale par inhibition de l'interaction intra-moléculaire entre le domaine GTPase et celui de GED, ainsi que de l'activité de GTPase et éventuellement du recrutement mitochondrial de Drp1 (Chang et al., 2007). Par conséquent, la phosphorylation de Drp1 peut avoir des effets opposés sur l'activité de fission mitochondriale dans différents cellules ou tissus (Hidenori et al., 2011).

La protéine beta-amyloïde, un médiateur de la maladie d'Alzheimer, stimule la production de monoxyde d'azote qui engendre la S-nitrosylation de Drp1 humain sur la Cys 644, dans le domaine GED, ce qui augmente l'activité GTPase et la formation d'oligomères de Drp1 en association avec la fission mitochondriale. Celui-ci peut être excessif dans les neurones, entraînant une perte synaptique et des lésions neuronales dans le cerveau des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Cho et al., 2009).

La petite protéine SUMO (Small Ubiquitin-like MOdifier protein) affecte également l'activité de Drp1. La surexpression de SUMO1 stabilise Drp1 sur la membrane mitochondriale d'une manière dépendante de Bax / Bak et induit la fission mitochondriale, ce qui suggère que la sumoylation est une étape dans la régulation de Drp1 au cours de la progression de l'apoptose précoce (Wasiak et al., 2007). A l'inverse, la surexpression de la protéase de Sumo, SENP5, diminue la sumoylation de Drp1 et restaure la division mitochondriale induite par SUMO1 (Zunino et al., 2007).

En plus de la sumoylation, l'ubiquitination régule l'activité de Drp1. March5 (mitochondria-associated RING-finger E3 ubiquitin ligase), également connue comme MITOL, ubiquitine Drp1 sur l'OMM. Cependant l'effet de l'ubiquitination de Drp1 par March5/MITOL sur la dynamique mitochondriale reste controversé. Le \square Silencing \square de March5/MITOL, ou la surexpression d'un mutant de March5/MITOL dépourvu de l'activité ubiquitine ligase, induit la fragmentation mitochondriale (Nakamura et al., 2006; Yonashiro et al., 2006). Cependant, la surexpression de ce mutant induit également l'accumulation anormale de Drp1 sur la mitochondrie, en association avec une élancement mitochondriale et des interactions anormales (Yonashiro et al., 2009). La manière dont contribue March5/MITOL aux dynamiques mitochondriales est une question importante aujourd'hui.

Les différents effets, induits par la même modification, dépendent des circonstances, telles que où et quand les effets ont lieu dans les cellules.

Certaines conditions pathologiques pourraient également donner lieu à la fission mitochondriale. Il a été montré que la pression hydrostatique élevée entraîne la fission mitochondriale dans des cellules de la rétine (Ju et al., 2007). L'augmentation excessive de la concentration de Ca^{2+} entraîne la fragmentation mitochondriale (Hom et al., 2007). La fragmentation mitochondriale est observée aussi au cours de l'augmentation du niveau de ROS (Jendrach et al., 2008) et après le découplage de la respiration et de la production d'ATP par le DNP (2,4-p-dinitrophenol; Lyamzaev et al., 2004). Conformément à ces résultats, l'exercice prolongé provoque l'augmentation du niveau de ROS, la diminution de l'expression de Mfn1 et Mfn2 et l'augmentation de l'expression de Fis1 dans les muscles squelettiques du rat (Ding et al., 2010).

Bien que des mitochondries se divisent et fusionnent continuellement, la morphologie globale des mitochondries reste assez stable. Un équilibre de la fission et de la fusion est à l'origine d'une morphologie constante. Sous des conditions physiologiques, la fission et la fusion sont précautionneusement équilibrées (Jendrach et al., 2005; Twing et al., 2008).

Chez la levure, de nombreux mutants de fusion ou de tubulation présentent un défaut de maintien du génome mitochondrial (Okamoto et al., 2005), et c'est grâce à ce phénotype mutant que Mgm1 a été initialement découverte. Plus récemment, des altérations de la dynamique mitochondriale chez les mammifères ont été associées à des défauts dans l'organisation, le maintien et la transmission de l'ADNmt (Chen et al., 2009). Les avantages conférés spécifiquement par la fusion incluent les échanges moléculaires et la complémentation fonctionnelle entre mitochondries, par la formation de filaments capables de transmettre de l'énergie sous forme du potentiel de membrane mitochondriale à l'intérieur de la cellule (Chan et al., 2006). Pour une cellule singulière, à peu près la moitié des mitochondries pourraient être dépourvues d'ADNmt (Bereiter-Hahn and voth, 1996) et la fusion fréquente pourrait être un mécanisme permettant d'assurer l'alimentation continue en ADNmt, également pour des mitochondries dépourvues d'ADNmt. La fusion mitochondriale est aussi essentielle pour la préservation de l'ADN mitochondrial. La fusion mitochondriale permet aux mitochondries de transférer les composants solubles et membranaires. Par conséquent, la fusion mitochondriale est suggérée comme étant un mécanisme de complémentation par lequel les mitochondries endommagées, ou celles qui fonctionnent mal, pourraient maintenir leurs fonctions par une forme de recyclage. À l'inverse, la fission des mitochondries favorise leur transport, notamment dans les neurones, leur répartition équitable au cours de la mitose et leur élimination par autophagie (Chen et al., 2009). Les dynamiques mitochondriales permettent la complémentation des mutations de l'ADNmt in vivo et in vitro (Sato et al., 2009). Enfin, la nature essentielle de la dynamique mitochondriale a définitivement été confirmée par l'implication de plusieurs acteurs de cette dynamique dans des maladies neurodégénératives et par son absolue nécessité au cours du développement embryonnaire (Chen et al, 2009 ; Chan et al., 2006).

Mitophagie

Le cycle de vie des mitochondries implique des séquences répétitives, des périodes de fusion, chacune suivies par la fission (Fig. 7). Après un événement de fission, les mitochondries entrent dans un état solitaire qui peut être 20 fois plus long que la période où elles sont fusionnées. Elles sont aussi disponibles pour des événements de fusion subséquents (Twig et al., 2008). Si une mitochondrie maintient le potentiel de membrane polarisé, elle peut entrer dans un événement de fusion avec une autre mitochondrie. Toutefois, la fusion des

mitochondries dépend du potentiel de la membrane mitochondriale et la fusion mitochondriale ne peut pas se produire pour des mitochondries dépolarisées. Une fois qu'elle se dépolarise, elle reste en état solitaire et éventuellement est adressée vers l'autophagosome pour entrer dans la voie de l'autophagie (Priault et al., 2005), à moins qu'elle ne se repolarise et se recouvre. L'autophagie est régulée et exécutée par les protéines de la famille ATG. A ce jour, plus de 30 protéines de cette famille sont connues ainsi que leurs implications dans l'autophagie (Ke Wang and Daniel J. Klionsky, 2011).

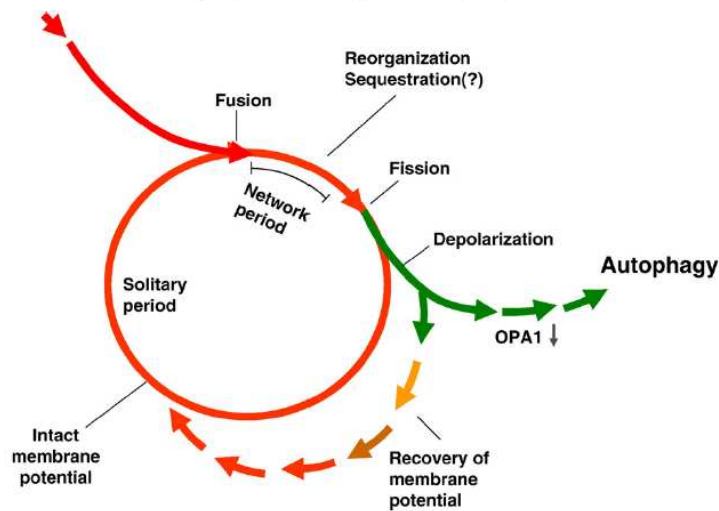


Figure 7. Un modèle schématique du cycle de vie de la mitochondrie et les rôles de la dynamique mitochondriale et de l'autophagie dans la ségrégation des mitochondries dysfonctionnelles. La mitochondrie se déplace de manière cyclique entre un état “post-fusion” (réseau) et un état “post-fission” (solitaire). La fusion est brève et déclenche la fission. Suite à un événement de fission, la mitochondrie “filie” peut soit maintenir le potentiel de membrane intacte (ligne rouge), ou se dépolariser (ligne verte). Une fois qu'elle se dépolarise, elle sera éventuellement ciblée vers l'autophagosome pour entrer dans la voie de l'autophagie. Dans le cas où la dépolarisation mitochondriale est transitoire et le potentiel mitochondrial se recouvre, la capacité de fusion est restaurée (flèches vertes aux rouge flèches courtes). (Twig et al., 2008)

Le lien entre la fission mitochondriale et l'autophagie peut tout simplement être attribué à la réduction évidente de la taille mitochondriale résultant de la fission, ce qui les rend physiquement digestibles par l'autophagosome. Remarquablement, cependant, une observation importante a montré que la fission génère fonctionnellement des unités [filles] dissemblables (Twig et al., 2008; Barsoum et al., 2006). Cette observation suggère que, pendant les événements de fission, des composants fonctionnels peuvent être redistribués inégalement entre les deux produits de fission, entraînant deux mitochondries [filles] dissemblables. Le mécanisme de cette asymétrie métabolique n'est pas clair, mais il pourrait

permettre à la cellule de se séparer et d'éliminer des matériels mitochondriaux endommagés, à un rythme beaucoup plus rapide.

Le mécanisme principal que les cellules utilisent pour éliminer les mitochondries est la macro-autophagie. Les mitochondries ont d'abord été détectées à l'intérieur d'un autophagosome en 1957 (Clark SL Jr., 1957). L'autophagie a été ensuite considérée comme jouant un rôle dans l'élimination des mitochondries. Ceci est soutenue par des études récentes chez la levure et chez les mammifères (Narendra et al., 2010). L'élimination sélective des mitochondries par l'autophagie, ou mitophagie, est étroitement liée aux processus du contrôle de la qualité mitochondriale qui prévient certaines physiopathologies humaines, notamment les maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson et le syndrome 2 de Wolfram (Geisler et al., 2010).

Tous les organites, y compris les mitochondries ainsi que certaines protéines, sont dégradés par macro-autophagie (appelée autophagie/ mitophagie). Le processus d'autophagie est démarré par l'encerclement d'une mitochondrie dans une membrane d'isolation/structure pré-autophagosomale (PAS)/phagophore, ce qui forme l'autophagosome (Fig. 8). Des données récentes indiquent qu'au moins une partie de la membrane d'isolation vient de l'OMM (Hailey et al., 2010). L'autophagosome fusionne avec les endosomes et les lysosomes tardifs de manière à former un autophagolysosome dans lequel, les hydrolases lysosomales, à un pH acide, digèrent le contenu, fournissant ainsi des acides aminés à la cellule (Cuervo, 2004; Mizushima et al, 2002).

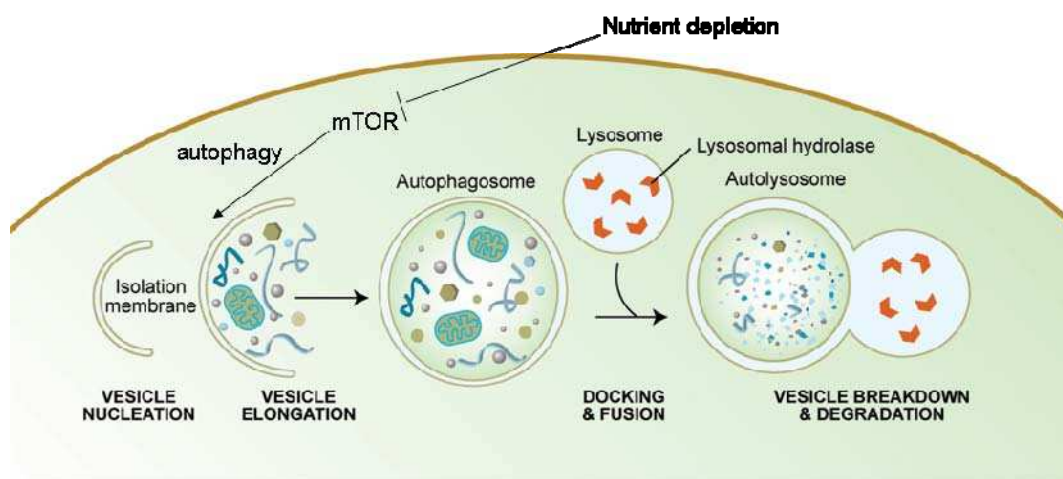


Figure 8. Schéma des étapes de l'autophagie : L'autophagie s'engage par la formation du phagophore ou de la membrane d'isolation (étape de nucléation des vésicules). Des protéines de la machinerie d'autophagie, sur le site de l'assemblage du phagophore (PAS), conduisent de concert à l'expansion du phagophore en autophagosome (l'allongement des vésicules). La membrane externe de l'autophagosome fusionne avec un endosome (formant un amphisome, avant de fusionner avec le lysosome) ou directement avec un lysosome (l'ancrage et les étapes

de fusion) et ceci forme un autophagolysosome. Enfin, les matériels séquestrés se dégradent à l'intérieur de l'autophagolysosome (rupture et dégradation de la vésicule) et sont recyclés dans la cellule.

Les différentes phases du processus d'autophagie sont :

1) L'induction: A la suite des stimulations externes / internes (par exemple l'épuisement des nutriments ou l'ischémie), mTOR est inhibée et conduit à l'induction de l'autophagie. Les gènes essentiels dans la levure sont Atg1 et Atg13, pour lesquels les homologues mammifères ne sont pas encore identifiés.

2) La formation de l'autophagosome: Les mitochondries sont séquestrées par une vésicule à double membrane, dont l'origine est incertaine. Mais elle peut provenir du réticulum endoplasmique. La formation de cette vésicule est coordonnée par des complexes des protéines Atg, en particulier Atg5 et Atg12, qui sont conjuguées et permettent le recrutement de LC3 (Atg8). La Beclin-1 forme également un complexe avec Atg14.

3) L'adressage et la fusion avec le lysosome.

4) La rupture de la vésicule autophagique. A l'égard de la fusion avec le lysosome, ainsi que vis à vis de la rupture et de la dégradation de la vésicule autophagique, les mécanismes moléculaires sont mal connus, bien que lamp-2 semble jouer un rôle essentiel (Meléndez, A. and Levine, B, 2009).

Deux situations différentes peuvent provoquer la dégradation des mitochondries par autophagie, la famine et l'altération de la fonction mitochondriale. L'autophagie est inhibée par de grandes quantités d'acides aminés et par la signalisation de l'insuline, par l'intermédiaire de mTOR (mammalian Target Of Rapamycin). Par conséquent, un moyen d'activer la dégradation des mitochondries est le manque en acides aminés (la famine). Conformément à ce fait, le temps de renouvellement des mitochondries est raccourci dans le foie de la souris sous conditions de restriction alimentaire (Miwa et al., 2008).

La deuxième raison pour l'induction de l'autophagie est la dégradation des mitochondries endommagées (Mouli et al, 2009). Les signaux de marquage identifiant les mitochondries défectueuses et destinées à l'autophagie ont commencé à émerger. Twig et al. (2008) ont montré que les produits de fission mitochondriale avec un faible potentiel membranaire ne sont plus recyclés par fusion dans les cellules INS1. Ils ont constaté que la réduction du potentiel de la membrane précède la dégradation autophagique de plusieurs heures. Toutefois, dès que l'autophagie s'engage, l'élimination des mitochondries semble être un processus très rapide car le taux de renouvellement des vésicules autophagiques est élevé. Le délai entre le début de l'autophagie et la réduction du potentiel de la membrane peut être

lié à la réduction d'OPA1, qui est typique des mitochondries sujettes à la mitophagie (Mouli et al., 2009). La perte du potentiel de membrane induit la translocation de l'ubiquitine ligase Parkin vers la mitochondrie (Narendra et al., 2008). La fragmentation des mitochondries, possiblement régulée par Fis1, semble faciliter l'autophagie (Twig et al., 2008), mais elle n'est pas essentielle pour la translocation de Parkin (Narendra et al., 2008). La translocation de Parkin induite par le stress nécessite la kinase mitochondriale PINK1 qui est stabilisé sur les mitochondries défectueuses (Geisler et al., 2010; Matsuda et al., 2010). Comme les défauts des gènes Parkin (PARK2) et PINK1 (PARK6) conduisent à la maladie de Parkinson, on peut supposer qu'un défaut dans la dégradation des mitochondries endommagées contribue au développement de cette maladie.

Biogenèse mitochondriale

La biogenèse mitochondriale est le processus par lequel de nouvelles mitochondries sont formées dans la cellule. La biogenèse mitochondriale est activée par de nombreux signaux différents, pendant les périodes du stress cellulaire ou en réponse à des *stimuli* environnementaux. La mitochondrie est un acteur et régulateur essentiel pour l'activité métabolique de la cellule, et elle est également un organite important dans la production et la dégradation des radicaux libres. L'augmentation du nombre de copies mitochondriales (ou celle de la «masse mitochondriale») bien que «coûteuse» devrait être protectrice pour la cellule. En réponse à la demande en besoins énergétiques accrues, les cellules et les tissus augmentent la production de nouvelles mitochondries. La biogenèse mitochondriale est nécessaire à la régulation de la «biomasse mitochondriale» (Berman et al., 2009). La biogenèse mitochondriale se produit pendant la progression du cycle cellulaire afin d'assurer l'hérédité des mitochondries pour les cellules «filles». L'exercice est un inducteur fort pour la biogenèse mitochondriale dans les fibres musculaires squelettiques. En général, la régulation de la biogenèse mitochondriale devrait être influencée par la modification des conditions énergétiques et physiologiques. Il n'est donc pas surprenant que des facteurs tels que la disponibilité des éléments nutritifs, la présence ou l'absence de certaines hormones, la température, l'exercice, l'hypoxie, le stress et le vieillissement ont tous été rapportés pour avoir un impact sur le processus de mitochondriogenèse (annexe, et al, 1991; Freyssenet, Berthon & Denis, 1996; Lee & Wei, 2005; Lee, et al, 2002; Nagino, et al, 1989; Wu, et al, 2007).

La régulation de la biogenèse mitochondriale est complexe. Ce processus implique des changements d'expression de plus de 1000 gènes et la coopération des deux génomes, nucléaire et mitochondrial, pour modifier le niveau des protéines cellulaires d'environ 20%. Dans le noyau de la cellule, la régulation de l'expression d'un tel nombre de gènes nécessite un ensemble de facteurs de transcription communs capables d'orchestrer l'expression des gènes présentant des promoteurs différents. En plus des gènes nucléaires qui codent plus de 95% des protéines mitochondriales, la mitochondriogenèse nécessite la participation du génome mitochondrial, responsable de la production d'une partie des protéines hydrophobes de la chaîne respiratoire, ainsi que des ARNt et ARNr. Bien que la plupart des régulations importantes de la mitochondriogenèse semblent avoir lieu au niveau de la régulation transcriptionnelle des gènes nucléaires (Lenka, et al, 1998; Scarpulla, 2002), il a été montré que la transcription affectant à la fois les génomes nucléaires et mitochondriaux doit être coordonnée en vue de produire de nouvelles mitochondries (Roy et al., 2007).

Les hormones thyroïdiennes et stéroïdiennes comme les glucocorticoïdes, régulent l'expression de la plupart des gènes nucléaires codant les protéines mitochondriales. Il a été montré que les hormones sexuelles ont des effets différentiels sur l'expression de diverses molécules mitochondriogéniques. Par exemple, dans le tissu adipeux brun, la progestérone favorise la mitochondriogenèse alors que la testostérone l'inhibe, en régulant différenciellement l'expression de plusieurs facteurs de transcription impliqués dans ce processus (Rodriguez-Cuenca, et al., 2007). D'autres hormones, comme les stéroïdes surrénales, jouent un rôle important dans la maturation mitochondriale périnatale et la biogenèse tissu-spécifique (Prieur, Bismuth & Delaval, 1998). Chez les mammifères, les facteurs les plus importants impliqués dans la biogenèse mitochondriale sont les hormones thyroïdiennes (Mutvei, et al., 1989). Le traitement des rats avec l'hormone thyroïdienne T4 provoque l'hyperplasie et augmente le nombre et la masse des mitochondries dans le foie (Wooten & Musculaire Cascarano, 1980) et la coeur (Goldenthal, Weiss & Marin-Garcia, 2004). L'efficacité des hormones thyroïdiennes sur les tissus spécifiques dépend de la quantité de récepteurs présents sur la cellule, et les niveaux de récepteurs peuvent varier sous différentes conditions physiologiques. Par exemple, la T3 est en mesure d'augmenter la biogenèse mitochondriale dans le muscle oxydatif de rat, mais pas dans le muscle glycolytique, et cette réponse différentielle est en corrélation avec des quantités inférieures de récepteurs aux hormones thyroïdiennes dans le tissu glycolytique (Bahi, et al., 2005).

Au niveau moléculaire, plusieurs facteurs et co-facteurs de transcription sont impliqués essentiellement dans l'activation et la régulation de la biogenèse mitochondriale. Ces facteurs

peuvent être divisés en trois groupes principaux: les facteurs de transcription ubiquitaires (SP1, YY1, CREB, MEF-2/E-box), les facteurs nucléaires respiratoires (NRF-1, -2, Rebox / OXBOX, MT-1 à -4) et les co-activateurs (PGC-1 α , 1 β -, PRC) (Goffart and Wiesner, 2003). La contribution exacte de chacune de ces protéines à la génération de nouvelles mitochondries est assez difficile à disséquer. Ces facteurs participent à un réseau de signalisation complexe. En outre, un autre ensemble de facteurs de transcription est impliqué dans l'adaptation métabolique au jeûn tel que la famille des PPAR (peroxisome proliferator activated receptor) et de LXR (Liver X Receptor) qui, ensemble, avec PGC-1 α augmentent la biogenèse mitochondriale et le catabolisme des acides gras (Quillermo et al., 2008).

Il a été montré que PGC-1 α agit comme un médiateur commun intracellulaire pendant la biogenèse mitochondriale induite par les facteurs hormonaux (Alaynick, 2008). PGC-1 α semble également être un facteur essentiel à la fois dans l'activation du programme complet de mitochondriogenèse ainsi que dans la respiration. PGC-1 α semble aussi agir comme un régulateur essentiel à l'égard du métabolisme énergétique et de la biogenèse mitochondriale par l'intégration et la coordination de l'activité de multiples facteurs de transcription, tels que la NRF-1, -2, PPAR α et mtTFA (Puigserver, et al., 1998). Les niveaux d'expression de PGC-1 α sont directement liés à l'activité de la biogenèse mitochondriale. De nombreux agents et événements peuvent réguler le niveau d'ARNm de PGC-1 α par activation de différents médiateurs intracellulaires (Fig. 9).

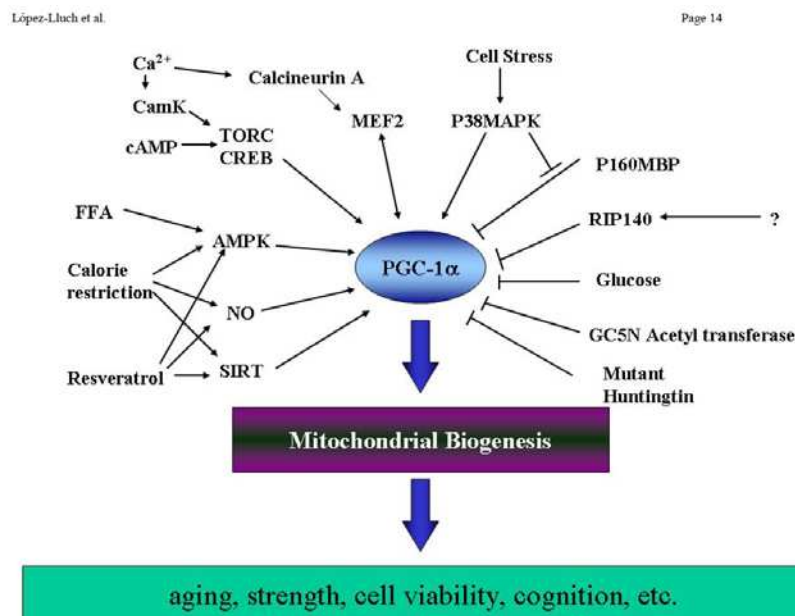


Figure 9. Le réseau de la régulation de PGC-1 α . PGC-1 α est situé au centre d'un réseau complexe de signaux affectés par les facteurs métaboliques, nutritionnels et environnementaux qui modulent (par exemple par le biais de modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles) l'activité de PGC-1 α et la biogenèse mitochondriale. À ce jour, très

peu de régulateurs négatifs de PGC-1 α ont été trouvés. Cependant, l'intérêt croissant porté à cette protéine suggère que le réseau régulateur actuel se complexifiera encore plus dans le futur.

La régulation transcriptionnelle de PGC-1 α est fortement modulée par l'activité de CREB (CAMP Response Element-Binding). En outre, une augmentation du niveau de calcium cytosolique musculaire induite par l'exercice stimule la kinase à calmoduline (CaMK (IV)), qui augmente ensuite l'expression de PGC-1 α par CREB (Wu et al., 2002). La Calcineurine A améliore également l'expression de PGC-1 α dans le muscle cardiaque par activation des MEF-2 (myocytes Enhancer Factor-2) (Czubryt, et al., 2003). Un autre facteur important impliqué dans la régulation de la transcription de PGC-1 α est l'activation par l'AMPK (AMP kinase). Dans les cellules primaires du muscle, l'AMPK régule des changements métaboliques affectant l'absorption du glucose, l'oxydation des acides gras et la biogenèse mitochondriale par la phosphorylation directe de PGC-1 α (Jager, et al, 2007; Winder, Taylor & Thomson, 2006). Au cours d'une privation en nourriture, une augmentation du ratio AMP / ATP intracellulaire conduit à l'activation de l'AMPK, ce qui initie un processus de signalisation qui recrute des médiateurs du métabolisme oxydatif dépendant des acides gras et de la biogenèse mitochondriale, y compris PGC-1 α , PPAR δ et les autres (de Lange, et al., 2006).

Il a aussi été montré que l'oxyde nitrique (NO) peut réguler la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire de l'activation de la transcription de PGC-1 α (Leary et Shoubridge, 2003). La biogenèse mitochondriale, régulée par PGC-1 α , est indépendante de la stimulation NO / cGMP (Wadley & McConnell, 2007). Cependant, le NO et ses dérivés sont produits et consommés par les mitochondries et ils peuvent également stimuler la biogenèse mitochondriale par la régulation positive des facteurs de transcription médiée par cGMP (Brown, 2007). L'augmentation du niveau de cGMP peut également conduire à l'expression de la déacétylase SIRT1 (Nisoli, et al., 2005). SIRT1 est une déacétylase dépendante de NAD⁺ qui peut désacétyler PGC-1 α et par conséquent augmenter son activité (Nisoli & Carruba, 2006). L'activation de SIRT1 par le resvératrol (3,5,4,9-trihydroxystilbène) est impliquée dans la biogenèse mitochondriale, dans les cellules de foie et de muscle en culture (Baur, et al, 2006; Lagouge, et al, 2006). Il semble que le NO et SIRT1 fonctionnent comme médiateurs de la signalisation impliquée dans la biogenèse mitochondriale par l'intermédiaire de l'activation de PGC-1 α .

A ce jour, on connaît peu de facteurs cellulaires qui fonctionnent comme des régulateurs négatifs de PGC-1 α . L'un des régulateurs négatifs est RIP140, co-répresseur

transcriptionnel de PGC-1 α . RIP140 a été proposé comme suppresseur de la biogenèse mitochondriale et du métabolisme oxydatif dans les cellules de mammifères (Powelka, et al, 2006).

Lerin et al. (2006) ont démontré que, au moins dans le foie, il existe un facteur impliqué dans la répression de PGC-1 α , par son acétylation: le complexe d'acétyltransférase GCN5. L'acétylation de PGC-1 α par GCN5 entraîne une inhibition de son activité transcriptionnelle et le re-localise aux foyers nucléaires depuis le promoteur des gènes qu'elle régule.

Interactions des mitochondries avec le réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (RE) est un réseau complexe issu de la membrane externe nucléaire, composé en tubules, vésicules, et citernes élargis dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Il se divise en RE rugueux et RE lisse, et il met en œuvre plusieurs fonctions cellulaires, notamment la synthèse des lipides et des stéroïdes, le métabolisme des glucides, la synthèse et le repliement des protéines, la régulation de la concentration en calcium, la détoxification de drogues et l'attachement des récepteurs à des protéines membranaires cellulaires (English Ar et al., 2009). Parmi les organites qui interagissent avec les mitochondries et contribuent à leurs dynamiques, le réticulum endoplasmique est probablement le plus important du fait des interactions généralisées dans tout l'espace cytoplasmique, en particulier celles liées à la signalisation calcique (Willems et al., 2009). Un certain nombre d'études a montré la communication structurelle entre les mitochondries et le RE. Des images tridimensionnelles à haute résolution ont été obtenues montrant des interactions très nombreuses entre les mitochondries et le RE (R. Rizzuto et al., 1998). Plus récemment, une étude utilisant la tomographie électronique a également démontré que la membrane externe mitochondriale (OMM) et le RE se rejoignent par des attachements, ce qui permet à des protéines du RE de s'associer directement avec les protéines et les lipides de l'OMM (G. Csordas et al., 2006). L'existence de zones spéciales, attachées à des mitochondries, a été suggérée par la co-sédimentation des membranes de ces deux organites dans des lysats cellulaires (Ardail et al., 1993). Ces membranes sont nommées MAM (Mitochondrial Associated Membranes). La microscopie électronique révèle une distance entre 10 et 60 nm entre le RE et l'OMM (Achleitner et al., 1999). Le même groupe a mesuré à 80-110 contacts entre le ER et les mitochondries, chez la levure. Ils représentent les plus nombreux contacts entre différents organites. Jusqu'à 20% de la surface mitochondriale

pourrait être ainsi en contact direct avec le RE (Rizzuto et al., 1998). Ceci a été confirmé par tomographie électronique (Renken et al., 2009). Bien que les deux systèmes organellaires soient très dynamiques, des interactions MAM-mitochondrie semblent pouvoir être stables pendant au moins quelques minutes (Lebiedzinska et al., 2009).

Les MAM jouent un rôle essentiel dans plusieurs fonctions cellulaires, en particulier dans le transport des lipides, la signalisation calcique, et l'apoptose (Hayashi et al., 2009). Un certain nombre des protéines mitochondriales, ou liées au RE, est important pour maintenir la communication structurelle entre ces deux organites, au niveau des MAM (Simmen et al, 2010). En particulier, la communication entre les organites est régulée par des protéines de type chaperone. La protéine VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) est physiquement liée à l'IP3R (Inositol 1,4,5-triPhosphate Receptor) via la chaperone moléculaire Grp75 (Szabadkai et al, 2006). La surexpression de la forme cytosolique de Grp75 augmente sélectivement l'absorption de Ca^{2+} induite par l'IP3 dans la matrice mitochondriale, tandis que la surexpression de la forme mitochondriale de cette protéine n'a pas cet effet. Une autre protéine qui régule l'interaction entre les mitochondries et le RE est PACS-2 (Phosphofurin Acidic Cluster Sorting protein 2), une protéine principalement localisée au niveau du RE. Elle est connue pour intégrer la communication RE-mitochondriale et la signalisation apoptotique. La déplétion de PACS-2 induit la fragmentation mitochondriale, dissocie le RE des mitochondries et bloque la signalisation apoptotique (Simmen et al, 2005). Plus récemment, il a été montré que des récepteurs Sigma-1 étaient situés dans les MAM, où ils forment des complexes avec Bip (Hayashi et al., 2007). Des récepteurs Sigma-1 se dissocient à partir de Bip et se lient aux IP3Rs de type 3 sous des conditions d'épuisement du Ca^{2+} dans le RE. Par conséquent, les IP3Rs de type 3 ne sont pas ici dégradés par les protéasomes. Il semble que l'épuisement du Ca^{2+} induise un événement prolongé de la signalisation calcique du RE vers la mitochondrie, par l'intermédiaire des IP3Rs. Ensemble, les données suggèrent que les récepteurs Sigma-1 sont impliqués dans le maintien d'une signalisation calcique normale à partir du RE vers les mitochondries.

La communication structurelle entre les mitochondries et le RE est également régulée en liaison avec la fission et la fusion des mitochondries. En effet, les protéines impliquées dans la fission et la fusion mitochondriales semblent jouer un rôle dans cette communication. PACS-2 régule la juxtaposition des deux organites par la fission dépendante de Bap31 ainsi que le regroupement périnucléaire des mitochondries (Simmen et al, 2005). Drp1, la protéine de fission mitochondriale, a été identifiée comme une molécule également impliquée dans la régulation du contact entre les mitochondries et le RE (Pitts et al, 1999) (Fig. 10), son action

pourrait être restrictive dans le cas où l'équilibre fusion/fission serait déplacé vers la fission. La surexpression du mutant Drp1 K38A, dépourvu d'activité GTPase, induit la formation de grands agrégats contenant cette protéine attachée au RE, le rendant tubulaire (Yoon et al., 2001). La Mitofusine-2, la GTPase transmembranaire mitochondriale qui régule la fusion mitochondriale, est enrichie dans les MAM (de Brito et al, 2008). La Mitofusine-2 attache quand à elle le RE à la mitochondrie par la formation de complexes homotypiques (Mfn2/Mfn2) et hétérotypiques (Mfn1/Mfn2) (Fig. 10). L'effet d'attachement de la Mitofusine-2 semble jouer un rôle dans le contrôle des flux de Ca^{2+} entre les mitochondries et le RE (de Brito et al, 2008). En outre, ERMES, un complexe multimérique formé par les protéines mitochondriales Mdm34, Mdm10 et les protéines du RE Mmm1 et Mdm12, semble réguler l'attachement RE-mitochondrie chez la levure (Olga Martins de Brito and Luca Scorrano., 2010).

Un régulateur plus évident pour la juxtaposition du RE et des mitochondries est le réseau du cytosquelette (Soltys et Gupta, 1992). En fait, le RE et les mitochondries s'associent à la fois aux microtubules, aux filaments d'actine et probablement aux filaments intermédiaires (Ebneith et al, 1998), ce qui suggère que le cytosquelette pourrait fournir un échaffaudage qui stabilise les points de contact entre ces compartiments. En fait, une protéine récemment identifiée, la Trichoplein / Mitostatin, se lie aux kératines et à d'autres filaments intermédiaires et est fortement enrichie dans les MAM. Elle régule aussi négativement la juxtaposition entre les mitochondries et le RE, d'une manière Mfn2-dépendante (Olga Martins de Brito and Luca Scorrano., 2010). Ces résultats ouvrent la possibilité d'imaginer que les filaments intermédiaires participent à la définition de ces zones d'attachement.

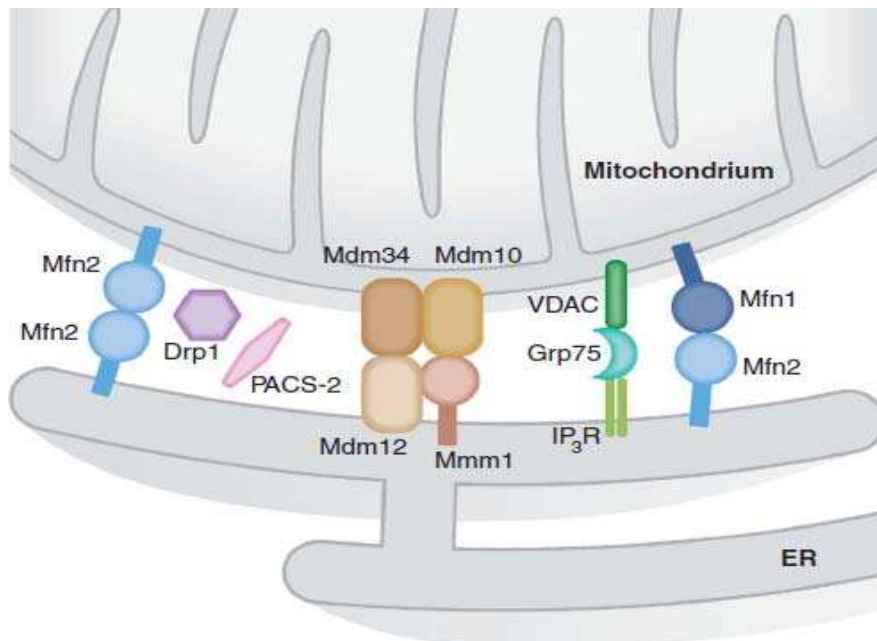


Figure 10. La connexion entre le RE et les mitochondries. Les ponts moléculaires qui régulent les contacts étroits entre les RE et les mitochondries sont montrés. PACS-2 et Drp1 contrôlent indirectement la distance entre les deux organites. Il est suggéré que la formation du complexe composé par l'IP₃R sur le RE, la protéine chaperone cytosolique Grp75 et la protéine VDAC mitochondriale pourrait jouer une fonction plus directe pour lier le RE aux mitochondries. Mfn2 sur le RE forme des homo-hétérodimères avec Mfn1 ou Mfn2 sur les mitochondries pour maintenir les contacts étroits entre les deux organites (Olga Martins de Brito and Luca Scorrano., 2010).

Le réticulum sarco/endoplasmique (SR/ER) et les mitochondries peuvent accumuler le calcium. L'accumulation de calcium dans le RE est réalisée par le système SERCA (sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase), RyR (Ryanodine Receptor) et l'IP₃R qui sont impliqués dans la libération du calcium par le RE. Le lumen du RE contient la plus forte concentration en calcium dans la cellule. Ceci est dû à l'activité d'ATPases à calcium (Pompes calciques), et un environnement oxydant nécessaire à la formation de ponts disulfures et aux repliements appropriés des protéines (Xu C et al., 2005). Par conséquent, le RE est particulièrement sensible aux perturbations des régulations d'oxydo-réduction et à l'homéostasie calcique, qui peuvent, le cas échéant, activer des événements de transduction de signal visant à accélérer la dégradation des protéines défectueuses (Ron D et al., 2007).

Les mitochondries ont également un rôle important comme réservoir à calcium. Les mitochondries pourraient prendre une quantité significative de calcium, par le \square calcium-uniporteur \square d'affinité faible lorsqu'elles sont exposées à de grandes concentrations calciques (millimolaire). Mais la concentration en calcium cytosolique dans les cellules est inférieure à ce niveau, même après la stimulation physiologique. La concentration maximum (1-3 μ M)

atteinte semble être insuffisante pour la prise de calcium mitochondriale en fonction de l'affinité de l'uniporteur mitochondrial au calcium. Le calcium cytoplasmique a besoin de traverser les deux membranes mitochondriales pour entrer dans la matrice. La voie prédominante de la diffusion du calcium du cytoplasme aux mitochondries est réalisée par VDAC. La grande densité et la haute conductance de VDAC permettent la diffusion rapide du calcium (Tan W and Colombini M, 2007). La concentration en calcium mitochondrial augmente immédiatement et transitoirement après stimulation de sa libération depuis le RE, dans les différentes lignées cellulaires, par un agoniste de l'IP₃. Les mitochondries répondent plus efficacement à l'augmentation du calcium aux niveaux de sites spécifiques, proches des canaux calciques du RE, qu'à l'augmentation du calcium général cytoplasmique. Ainsi seule une fraction des mitochondries est exposée à ces sites micro-anatomiques. L'interaction entre les mitochondries et le RE facilite donc le contrôle de la signalisation calcique et les processus dépendants du Ca²⁺ comme l'apoptose. L'interaction des mitochondries et du RE est en accord avec l'existence de micro-domaines calciques locaux qui permettraient la signalisation et la transmission du calcium entre les mitochondries et le RE. Les mitochondries pourraient donc fonctionner comme des senseurs à calcium dans un nombre discret de microdomaines fonctionnels (en juxtaposition étroite avec le RE) en permettant la diffusion et l'amplification du signal de calcium d'une manière précise et coordonnée.

La fonction physiologique de l'apposition étroite entre le RE et les mitochondries devient évidente lorsque l'on s'intéresse à sa fonction dans la synthèse des phospholipides. Les lipides sont faiblement solubles dans l'eau et la plupart des lipides ne peuvent pas se déplacer efficacement dans le cytosol hydrophile, par diffusion (Daum et Vance, 1997). De ce fait, un mécanisme d'échanges des phospholipides entre les membranes de différents organites doit exister. Une hypothèse récente indique que les mécanismes de transfert de lipides entre les organites impliquent des contacts directs entre le donneur et l'accepteur, ce qui éliminerait le transfert énergétiquement défavorable des lipides à travers le cytosol hydrophile (Voelker, 2003). En accord avec ce point de vue, la phosphatidylsérine (PtdSer) synthase-1 et -2, les enzymes impliquées dans la synthèse de PtdSer sont enrichies dans les MAM par rapport au RE. D'autre part, la décarboxylase PtdSer, l'enzyme qui catalyse la conversion de PtdSer en phosphatidyléthanolamine (PtdEtn), est associée à la membrane interne mitochondriale. La PtdEtn synthétisée dans les mitochondries peut retourner aux MAM où elle est convertie en phosphatidylcholine (PtdCho) par la PtdEtn méthyltransférase (Cui et al, 1993). Au final, cela suggère que l'échange des phospholipides se fait grâce à l'existence d'une interaction étroite, physique, entre le RE et les mitochondries (Stone et

Vance, 2000). En plus de leur fonction dans l'homéostasie des phospholipides, les MAM sont également impliquées dans le métabolisme du cholestérol et de ses métabolites. En premier lieu, le RE est le site principal de la synthèse et du stockage du cholestérol et plusieurs enzymes impliquées dans le métabolisme des dérivés du cholestérol, telles que l'acyl-transférase du diacylglycérol et de l'acyl-coenzymeA (cholestérol acyltransférase), qui sont fortement enrichies dans les MAM (Rusinol et al, 1994). Toutefois, le cytochrome P450_{scc}, l'enzyme nécessaire à la conversion du cholestérol en prégnénolone, est localisé exclusivement dans les mitochondries (Thomson, 2003). Bien qu'il n'ait pas encore été clarifié comment le cholestérol est importé dans les mitochondries, une possibilité est que cela se produise au niveau des sites de contact avec le RE.

Enfin, les MAM pourraient également être impliquées dans le métabolisme et le trafic des sphingolipides (Hayashi et al, 2009). L'exposition à un analogue de céramide marqué a permis de montrer que les sphingolipides sont transférées du RE vers les mitochondries (Lipsky et Pagano, 1983). En outre, les MAM et les mitochondries participent ensemble au métabolisme des céramides, un métabolite des sphingolipides ayant des fonctions assignées dans le cycle cellulaire, la différenciation et l'apoptose (Bionda et al, 2004).

Au total, des preuves évidentes soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'interface entre le RE et les mitochondries joue un rôle majeur dans le contrôle du métabolisme de différentes classes de lipides. En accord avec ce point de vue, des études chez la levure, indiquent que la perturbation des sites de contacts étroits entre les deux organites affecte l'échange des phospholipides (Kornmann et al, 2009).

Transport des mitochondries

La distribution appropriée du réseau mitochondrial contribue à la fonction de cet organe et est essentielle à la survie des cellules. Les cellules hautement polarisées, y compris les neurones et les bourgeonnements de levure, sont particulièrement sensibles aux défauts dans le mouvement des mitochondries (Rebecca L. Frederick and Janet M. Shaw¹, 2007).

Le transport des mitochondries dans les axones, le mouvement le plus rapide et le plus long, se déroule par translocation de l'organe conduite par des moteurs le long des microtubules. Les mitochondries sont déplacées de manière antérograde vers l'extrémité **plus** des microtubules, à partir du corps de la cellule vers les parties distales des axones et le mouvement rétrograde peut se faire en direction opposée (Boldogh and Pon, 2007). Ces

événements sont précisément régulés en réponse aux changements de l'état d'énergie local et de la demande métabolique.

Les mitochondries avec un potentiel membranaire normal sont transportées de manière antérograde, tandis que des mitochondries avec le potentiel membranaire et des activités synthétiques de l'ATP altérées montrent une mobilité rétrograde élevée (Miller and Michael, 2004). Le mouvement antérograde transporte les mitochondries vers leurs sites d'action alors que le mouvement rétrograde les transporte vers le corps de la cellule, pour la dégradation et le recyclage (Boldogh and Pon, 2007).

Chez les eucaryotes multicellulaires, les mitochondries utilisent les microtubules comme support de transport. La kinésine, l'un des moteurs des microtubules, dirige le transport antérograde et la dynéine le transport rétrograde (Fig. 11). Le transport bidirectionnel des organites est donc contrôlé par la régulation coordonnée des deux moteurs opposés. Dans les cellules de neurone, bien que des microtubules, des filaments d'actine et des filaments intermédiaires soient les composants majeurs du cytosquelette de l'axone, il n'y a que les microtubules et les filaments d'actine qui semblent jouer des rôles essentiels dans le transport mitochondrial (Qian Cai and Zu-Hang Sheng, 2009).

Le transport rapide des mitochondries sur de longues distances, le long de l'axone, dépend donc de protéines motrices, des enzymes spécifiques qui utilisent l'énergie d'hydrolyse de l'ATP de manière à réguler le mouvement le long des microtubules (Hollenbeck, 1996). La kinésine-1 contient deux chaînes lourdes et deux chaînes légères. Les deux chaînes lourdes de la kinésine, connues comme étant KIF5, peuvent fonctionner comme moteur et former des homo- ou hétéro-dimères par leurs régions «coiled-coil». Chaque chaîne lourde contient un domaine moteur N-terminal qui se lie directement aux microtubules tandis que le domaine C-terminal régule son association avec les chaînes légères de kinésine (KLC, kinesin light chain) ainsi que l'interaction avec les organites à transporter (Qian Cai and Zu-Hang Sheng, 2009).

La dynéine cytoplasmique est un moteur essentiel dans la régulation du transport rétrograde le long des microtubules dans les axones. La dynactine, un complexe de onze sous-unités, peut s'associer à la dynéine cytoplasmique et aux microtubules. Ce complexe n'est pas essentiel mais il peut renforcer la processivité du moteur de dynéine et également réguler certaines interactions avec son cargo (King and Storer., 2000), ou coordonner le transport bidirectionnel le long de l'axone (Haghnia and al., 2007).

Dans la levure en bourgeonnement, Myo2p, l'orthologue de la myosine V, est impliquée dans le transport des mitochondries basées sur l'actine. Dans les neurones, les

filaments d'actine sont assemblés en réseau et leurs orientations peuvent directement affecter l'activité des moteurs myosines basés sur l'actine. Il est supposé que les moteurs basés sur les microtubules assurent le transport sur de longues distances le long de l'axone tandis que les mouvements de courtes distances des vésicules et des organites au terminal présynaptique dépendent principalement des myosines basées sur l'actine (Langford, 2002). Les protéines motrices basées sur les microtubules, comme la kinésine et la dynéine, transportent des organites le long de l'axone à grande distance et la myosine dirige le mouvement sur de courtes distances, le long des filaments d'actine, au terminal pré-synaptique.

Il existe aussi des liaisons entre les mitochondries et les filaments intermédiaires (FIs). Certaines mitochondries colocalisent avec les FIs neuronaux et des mitochondries avec un haut potentiel sont associées à des neurofilaments (Wagner et al., 2003). De plus, la délétion de la desmine altère la distribution, la morphologie et la fonction respiratoire mitochondriales dans les cellules de muscle cardiaque, en inhibant le recrutement de la kinésine par les mitochondries (Milner et al., 2000).

Le couplage des moteurs avec les mitochondries est indirect et nécessite l'implication de leurs adaptateurs. Milton est une protéine liée à la chaîne lourde de la kinésine. Miro, une GTPase mitochondriale (Rho-like GTPase), est localisée sur la membrane externe mitochondriale. Miro est nécessaire pour l'association de Milton avec la chaîne lourde de la kinésine. Miro et Milton fonctionnent aussi comme adaptateurs qui lient la chaîne lourde des kinésines aux mitochondries pour le transport antérograde, indépendamment de la chaîne légère, le long de l'axone (Boldogh, IR and Pon. LA 2007) (Fig. 11).

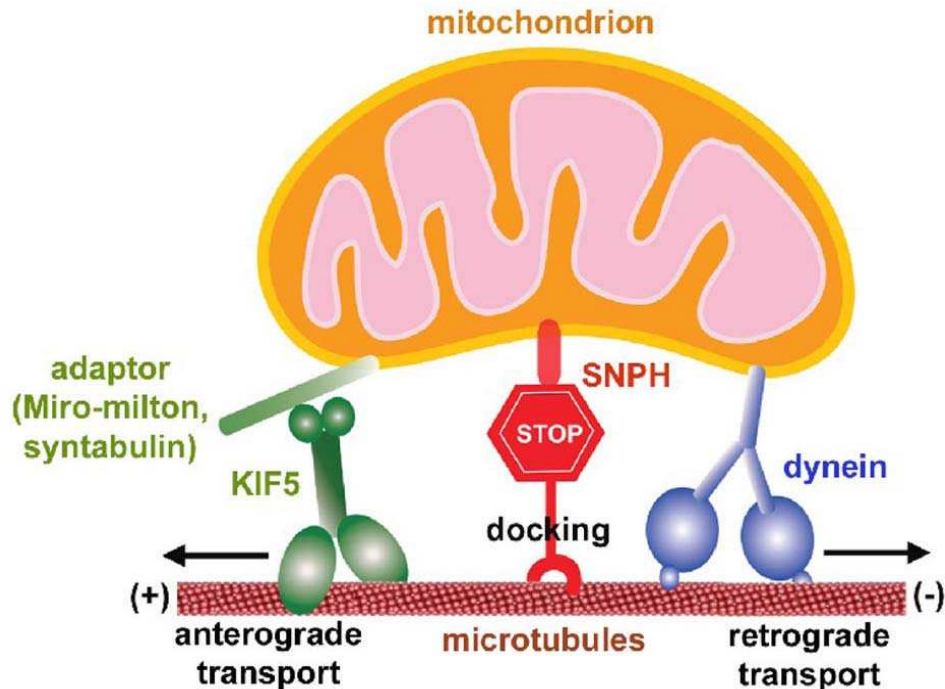


Figure 11. Schéma de la régulation du transport mitochondrial. Les mitochondries utilisent les microtubules comme support de transport. La kinésine, l'un des moteurs des microtubules, dirige le transport antérograde par l'intermédiaire des adaptateurs et la dynéine le transport rétrograde. SNPH fonctionne comme un récepteur d'adressage des mitochondries aux microtubules et est nécessaire pour maintenir un grand nombre des mitochondries dans un état stationnaire à travers l'interaction avec les microtubules.

Environ un tiers des mitochondries axonales sont mobiles dans les neurones matures, une proportion importante reste stationnaire. Leur mouvement net est affecté de façon significative par leur recrutement sous des états stationnaires ou mobiles (Hollenbeck, 1996). La Syntaphiline (SNPH), une protéine spécifique des neurones et adressée au niveau des axones, peut ancrer les mitochondries et réguler leur densité dans les axones. SNPH est nécessaire pour maintenir un grand nombre de mitochondries axonales dans un état stationnaire (Kang et al., 2008). SNPH contient un domaine associé aux microtubules, qui est nécessaire et suffisant pour l'immobilisation des mitochondries axonales médiée par SNPH. SNPH fonctionne comme un récepteur spécifique d'adressage pour les mitochondries axonales, à travers l'interaction unique avec le cytosquelette, à la base des microtubules (Qian Cai and Zu-Hang Sheng, 2009) (Fig. 11).

Les gouttelettes lipidiques

Les gouttelettes lipidiques (LDs pour lipid droplets) sont des organites cellulaires majeurs pour le stockage des lipides neutres. Ce procédé de stockage d'énergie affectent de nombreux tissus, en particulier bien sûr le tissu adipeux. Un stockage excessif de lipides, sous forme de gouttelettes lipidiques est un élément essentiel dans la pathogenèse des maladies métaboliques, telles que l'obésité, le diabète et l'athérosclérose (Yi Guo et al., 2009).

Les gouttelettes lipidiques sont constituées d'un noyau organique comprenant des lipides neutres (triglycérides et esters de stérols) qui sont enveloppés par une mono-couche de phospholipides (Bartz et al., 2007a) (Fig. 12). Cette structure permet la séparation des phases aqueuses et organiques de la cellule.

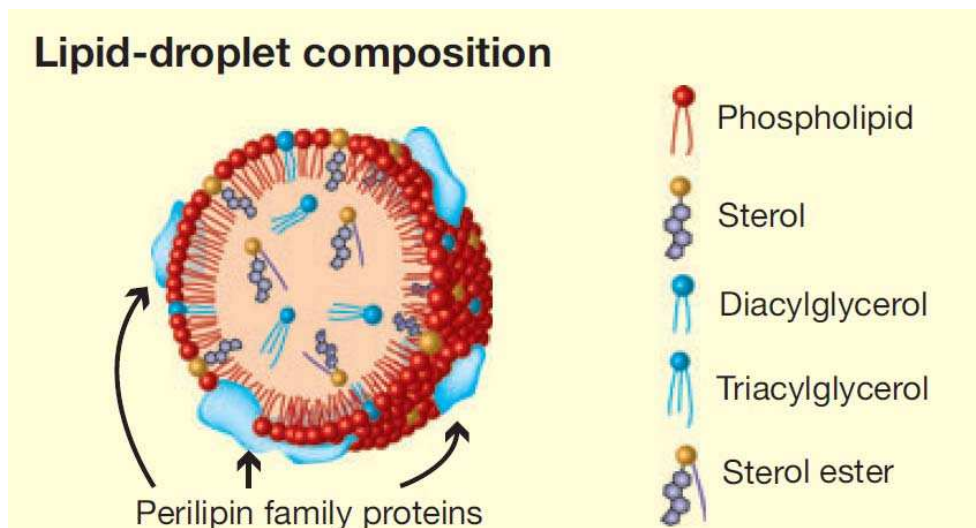


Figure 12. Composition de la gouttelette lipidique : Diacylglycérols, Triacylglycérols, Esters de stérols, Stérols, Phospholipides et protéines PAT (périlipine, adipophiline/adipose differentiation-related protein, TIP47 et d'autres protéines).

L'intérieur hydrophobe des gouttelettes lipidiques comprend principalement les esters de stérols et des triacylglycérols, bien que dans certains types cellulaires, il existe des esters de rétinyl ou des diacylglycérols. Les gouttelettes lipidiques de la levure contiennent environ 50% de TGs (triacylglycérols) et 50% d'esters de stérols, tandis que les adipocytes contiennent principalement des TGs et les macrophages contiennent principalement les esters de stérols. Sur la monocouche de phospholipides, plusieurs types de protéines décorent les gouttelettes lipidiques (Bartz et al, 2007b), y compris des protéines PAT (périlipine, adipophiline/adipose differentiation-related protein, TIP47 et d'autres protéines) qui disposent des fonctions structurales et régulatrices, les enzymes de la synthèse des lipides [acétyl-

coenzyme A (CoA) carboxylase, l'acyl-CoA synthétase et les acyl-CoA: 2 diacylglycérol-acyltransférase (DGAT2)], les lipases [adipose tissue triacylglycérol lipase (ATGL)] et des protéines de trafic de membrane (par exemple Rab5, Rab18 et ARF1). De plus, les différentes gouttelettes lipidiques d'une cellule pourraient contenir des protéines différentes (Ducharme et Taux de Bickel, 2008) et avoir des ratios différents dans l'acquisition du triacylglycérol (Kuerschner et al., 2008). Ceci suggère que les cellules contiennent des gouttelettes lipidiques de types distincts avec des fonctions spécialisées.

Chez les procaryotes, il semble que les gouttelettes lipidiques soient formées depuis la membrane plasmique (Wältermann et al., 2005). Chez les eucaryotes, des preuves suggèrent que les gouttelettes lipidiques proviennent du réticulum endoplasmique. Les micrographies électroniques à partir d'une variété de types cellulaires montrent que des gouttelettes lipidiques sont toujours très étroitement associées, et parfois même liées, au RE. En général, des «feuillets membranaires» du RE entourent des gouttelettes lipidiques (Robenek et al., 2006). En outre, les enzymes qui catalysent la synthèse des lipides neutres dans le noyau des gouttelettes sont principalement localisées sur le RE (Buhman et al., 2001). En fait, DGAT2 (acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase), l'enzyme principale catalysant la synthèse des TGs (Lardizabal et al., 2001; Cases et al., 2001), est localisée dans les zones où les gouttelettes sont étroitement associées avec le RE, sous des conditions qui favorisent la formation des gouttelettes (Kuerschner et al., 2008). Ceci suggère que l'association RE-gouttelettes lipidiques favorise le transfert des TGs et d'autres lipides nouvellement synthétisés vers le noyau des gouttelettes. Conformément à l'idée que ces zones de contact sont les sites de synthèse active des lipides, les mitochondries sont souvent localisées au voisinage des gouttelettes lipidiques (Sturmeijer et al., 2006), comme les compartiments spécialisés du RE appelés MAM, qui sont considérés comme les centres de synthèse des lipides (Vance et al., 2003). Les MAM et les mitochondries peuvent fournir de l'énergie et le NADPH, qui facilitent la synthèse des TGs et la biogenèse des gouttelettes de lipides. Par conséquent, de nombreuses preuves suggèrent que le RE donne naissance aux gouttelettes, les autres organites contribuant également à leur maturation (Walther et Farese Jr 2009).

Le cycle de vie des gouttelettes lipidiques commence lorsque les acides gras extracellulaires portés par l'albumine et les lipoprotéines entrent dans les cellules. Les acides gras sont libérés, depuis les triglycérides dans les lipoprotéines, par la lipoprotéine lipase, et entrent aussi dans les cellules par diffusion passive, facilitée par les protéines FATP (fatty-acid transport protein) ou les protéines FAT (fatty-acid translocase) (Ehehalt et al, 2006) (Fig. 13).

Les acides gras peuvent également être synthétisés *de novo* dans de nombreux types cellulaires à partir des hydrates de carbone (Fig. 13). Il existe 25 enzymes impliquées dans le métabolisme du glucose vers les acides gras. Après l'absorption cellulaire par les transporteurs du glucose, le glucose est phosphorylé en glucose-6-phosphate par les hexokinases. La plupart du glucose-6-phosphate entre dans la voie glycolytique de manière à produire le pyruvate et de l'ATP. Le pyruvate est converti en acétyl-coenzyme A (CoA), qui entre dans le cycle de l'acide citrique au sein de la mitochondrie (cycle de krebs). En fonction de la disponibilité en oxygène, le citrate peut être totalement oxydé, pour produire de l'ATP par la phosphorylation oxydative, ou il peut être transporté dans le cytoplasme où il est reconverti en acétyl-CoA (le bloc de construction nécessaire pour la synthèse FA) par l'ACLY (ATP Citrate LYase). En condition anaérobie, le pyruvate peut également être utilisé comme accepteur d'électrons, ce qui entraîne la production de lactate, catalysée par la lactate déshydrogénase (LDH) et ensuite le lactate est sécrété par la cellule. Une partie des acétyl-CoAs est carboxylée en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase (ACC). La synthase des acides gras (FAS, Fatty Acid Synthase), l'enzyme principale biosynthétique, effectue la condensation de l'acétyl-CoA et celle du malonyl-CoA pour produire le palmitate, l'acide gras à 16-carbone saturé et d'autres acides gras saturés à longue chaîne. En outre, les acides gras saturés à longue chaîne peuvent être modifiés par des élongases ou des désaturases, ce qui forme des acides gras plus complexes qui sont utilisés pour la synthèse de différents lipides cellulaires tels que les phospholipides, les triglycérides et les esters de cholestérol. Il a été montré que l'insuline stimule la redistribution et la translocation du transporteur du glucose (GLUT4) qui permettent l'augmentation de l'absorption de l'insuline par la cellule (Khan AH and Pessin JE, 2002)

Ensuite, les acides gras entrent dans un pool bioactif et, par la conjugaison avec le CoA, l'acyl-CoA gras se forme par une réaction nécessitant de l'énergie. L'acyl-CoA est utilisé par les enzymes de synthèse des glycérolipides (GPA, glycérol-3-phosphate acyltransférase; AGPAT, sn-1-acylglycérol-3-phosphate acyltransférase; PAP, phosphatidic and phosphohydrolase) sur la membrane du RE, ce qui produit en définitive les diacylglycérols. Les diacylglycérols sont convertis en lipides neutres (triglycérides) par les enzymes DGAT (acyl-CoA: DiacylGlycerol AcylTransferase) ou entrent dans les voies de synthèse des phospholipides (Yi Guo et al., 2009) (Fig. 13).

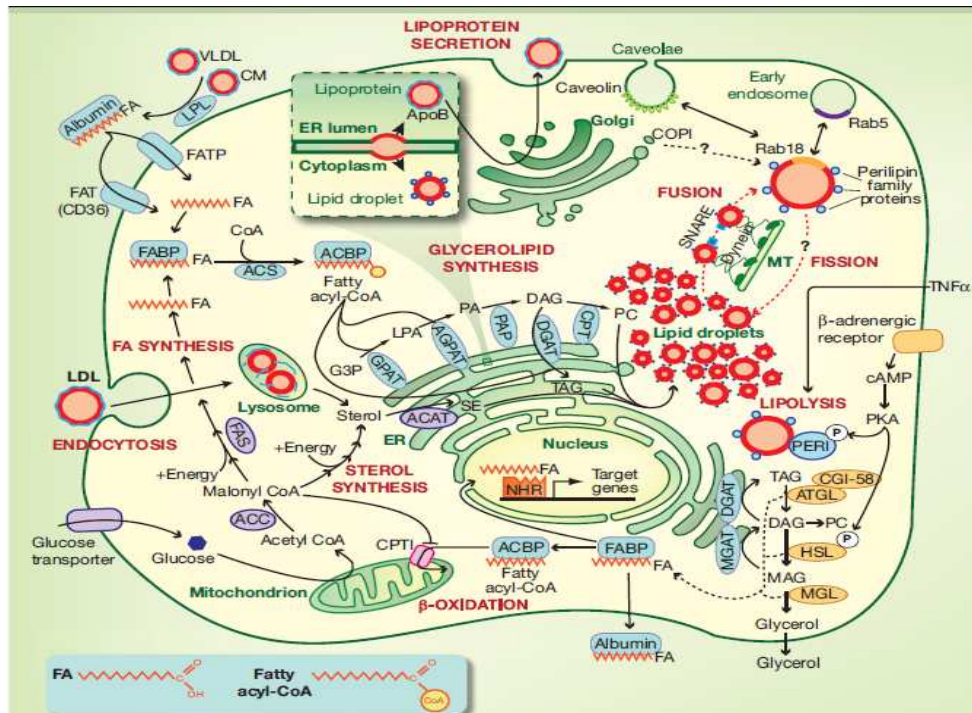


Figure 13. Le cycle de vie des gouttelettes lipidiques. Abréviations: ACAT, acyl-CoA:cholesterol acyltransférase; ACBP, acyl-CoA binding protein; ACC, acetyl-CoA carboxylase; ACS, acyl-CoA synthetase; AGPAT, sn-1-acylglycerol-3-phosphate acyltransférase; ApoB, apolipoprotein B; ATGL, adipose tissue triacylglycerol lipase; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; CGI-58, comparative gene identification-58; CM, chylomicron; CoA, coenzyme A; COPI, coatomer protein complex I; CPT, cholinephosphotransférase; CPTI, carnitine/acylcarnitine translocase I; DAG, diacylglycerol; DGAT, acyl-CoA: diacylglycerol acyltransférase; ER, endoplasmic reticulum; FA, fatty acid; FABP, fatty acid binding protein; FAS, fatty acid synthase; FAT (CD36), fatty acid translocase; FATP, fatty acid transport protein; G3P, glycerol-3-phosphate; GPAT, glycerol-3-phosphate acyltransférase; HCV, hepatitis C virus; HSL, hormone -sensitive lipase; LDL, low density lipoprotein; LPA, lysophosphatidate; LPL, lipoprotein lipase; MAG, monoacylglycerol; MGAT, acyl-CoA: monoacylglycerol acyltransférase; MGL, monoacylglycerol lipase; MT, microtubule; NHR, nuclear hormone receptor; NLSE, neutral lipid synthesis enzyme; PA, phosphatidate; PAP, phosphatidic acid phosphohydrolase; PC, phosphatidylcholine; PERI, perilipin; PKA, protein kinase A; Rab, Ras-related protein; SE, sterol ester; SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor adaptor protein receptor; TAG, triacylglycerol; TNF α , tumor necrosis factor α ; VLDL, very low density lipoprotein.

Contrairement aux acides gras, les stérols sont principalement absorbés par les cellules par le biais de l'endocytose et ils proviennent de la dégradation lysosomale des lipoprotéines. La plupart des cellules peuvent également synthétiser des stérols. Les stérols excessifs sont convertis en esters de stérols par la conjugaison avec les acyl-CoA gras, une réaction catalysée par des stérols-O-acyltransférases (par exemple : ACAT, acyl- CoA: cholesterol acyltransférase) dans le RE.

De ce fait, les lipides neutres dans le noyau des gouttelettes lipidiques sont synthétisés dans le RE. Comment les lipides s'accumulent-ils et forment-ils les gouttelettes lipidiques?

Ceci n'est pas encore connu. Mais il existe plusieurs modèles de formation des gouttelettes lipidiques :

Modèle I: Les gouttelettes lipidiques se forment dans la membrane du RE à la suite d'une accumulation de lipides neutres dans la bicouche, ce qui entraîne le "bourgeonnement" d'une gouttelette naissante à partir de renflements (leaflet) membranaires (Fig. 14, modèle 1). Ces facteurs peuvent être des protéines PAT qui pourraient servir de médiateurs du bourgeonnement dans des domaines spécialisés du RE (Londos et al., 2005).

Modèle II: Les gouttelettes lipidiques sont excisées depuis les deux couches membranaires du RE comme une micelle (Fig. 14, modèle 2) (Ploegh et al., 2007). Une caractéristique intéressante de ce modèle est que le processus d'excision pourrait réguler l'extrusion de protéines destinées à la dégradation des protéines associée au RE par le protéasome (Ploegh et al., 2007). Ceci impliquerait une liaison fonctionnelle entre la formation des gouttelettes et la dégradation des protéines.

Modèle III: Les gouttelettes lipidiques sont tout d'abord formées à l'intérieur des petites vésicules de la bicouche, en utilisant la machinerie de formation des vésicules par la voie de sécrétion (Fig. 14, modèle 3). Cela pourrait avoir lieu dans un domaine spécialisé du RE qui est distinct du transport vésiculaire et dédié à la synthèse des lipides. Dans ce modèle, une vésicule naissante se forme et reste attachée au voisinage de la membrane du RE. Les lipides neutres pourraient remplir la vésicule lorsqu'elle est encore continue avec la membrane du RE ou après le bourgeonnement des vésicules, via un mécanisme de navette des vésicules qui sont attachées au côté cytoplasmique du RE. Puisque la DGAT2 est localisée dans les zones proches des gouttelettes, les triglycérides synthétisés par DGAT2 pourraient directement s'incorporer dans les gouttelettes (Kuerschner., 2008).

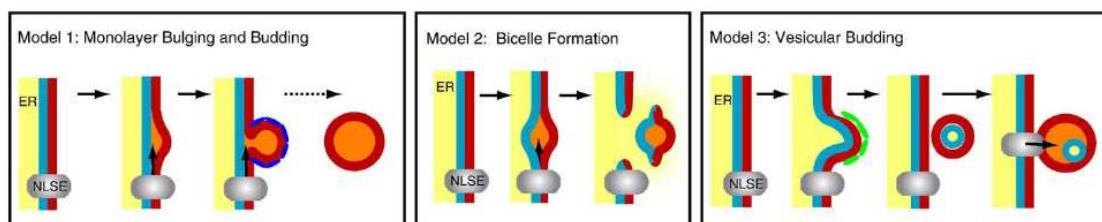


Figure 14. Modèles de formation des gouttelettes lipidiques. Modèle I: La biogenèse des gouttelettes lipidiques par le bourgeonnement de RE. Les lipides neutres sont synthétisés par NLSE (Neutral Lipid-Synthesizing Enzymes) et bourgeonnent depuis la couche externe de la membrane de RE (rouge). Les gouttelettes lipidiques naissantes sont enveloppées par les protéines (bleu) qui favorisent ce processus de bourgeonnement. Modèle II: L'excision de deux couches membranaires du RE. Les gouttelettes lipidiques sont accumulées et excisées depuis les deux couches membranaires du RE comme une micelle. Modèle III: Le bourgeonnement vésiculaire. Une vésicule contenant les deux couches membranaires de RE

(rouge et bleu) sont formées par la machinerie de bourgeonnement vésiculaire (vert) depuis la membrane de RE.

La taille des gouttelettes des lipides varie largement, avec des diamètres de 20-40 nm (Stobart et al., 1986) à 100 microm (dans les adipocytes blancs). Et clairement, les gouttelettes lipidiques peuvent grandir pour atteindre des grandes tailles. Une fois que les gouttelettes lipidiques sont formées, elles pourraient accumuler des lipides neutres dans leurs noyaux et des phospholipides sur leurs surfaces. Si les gouttelettes lipidiques sont attachées au RE, les protéines et les lipides neutres nouvellement synthétisés peuvent diffuser latéralement vers les gouttelettes lipidiques. Si les gouttelettes lipidiques sont détachées du RE, ces protéines et ces lipides pourraient être transportés vers les gouttelettes lipidiques, probablement par transport vésiculaire (Yi Guo et al., 2009). De plus, les lipides neutres dans le noyau peuvent être produits localement par des enzymes telles que les DGATs qui sont ciblées aux gouttelettes lipidiques. La DGAT2 est localisée principalement dans le RE, mais elle est aussi localisée dans les gouttelettes lipidiques, lorsque les cellules sont stimulées par l'acide oléique.

Les gouttelettes lipidiques peuvent fusionner et fissionner. La fusion des petites gouttelettes lipidiques, qui forme des grosses gouttelettes lipidiques, contribue probablement à leur croissance (Guo et al., 2008). Il est suggéré que la fusion des gouttelettes lipidiques dépend des microtubules, de la protéine motrice dynéine et des protéines SNARE (Olofsson et al., 2008). Sous certaines conditions spécifiques, à un moment donné, jusqu'à 15% de gouttelettes peuvent être impliquées dans la fusion (Boström et al., 2005). Dans les adipocytes 3T3-L1, l'induction de la lipolyse entraîne la fission des gouttelettes lipidiques (Marcinkiewicz et al., 2006). Cette fragmentation augmente la surface des gouttelettes disponible pour la lipolyse et nécessite l'augmentation de la disponibilité en phospholipides pour envelopper les surfaces des gouttelettes.

Les gouttelettes lipidiques interagissent également avec d'autres organites cellulaires. En particulier, les gouttelettes lipidiques se trouvent souvent à proximité du RE, des mitochondries, des endosomes, des peroxysomes et de la membrane plasmique (Goodman, 2008; Murphy et al, 2008). Les fonctions de ces interactions sont encore largement inconnues. Ces associations d'organites pourraient favoriser l'échange de lipides, soit pour la croissance anabolique des gouttelettes lipidiques soit pour leur métabolisme catabolique. Alternativement, les gouttelettes lipidiques pourraient fournir un moyen de transport des lipides entre différents organites au sein de la cellule. Certaines interactions entre les

gouttelettes lipidiques et d'autres organites pourraient être régulées par les GTPases Rab, qui ont été trouvées sur les gouttelettes (Liu et al., 2008).

En plus d'un stockage de lipides important, il est suggéré que les gouttelettes lipidiques puissent avoir d'autres fonctions dans la physiologie et la pathologie cellulaires. Par exemple, les gouttelettes lipidiques pourraient agir comme le réservoir protecteur pour les protéines dépliées ou d'autres composants de manière à empêcher des interactions nuisibles avec d'autres composants cellulaires (Ohsaki et al, 2006; Welte, 2007).

Les gouttelettes lipidiques des adipocytes blancs, chez les mammifères, sont peut-être le type le plus largement caractérisé. Elles ont un rôle défini pour le stockage et l'approvisionnement à partir de cette «énergie» stockée dans le corps. Les gouttelettes lipidiques jouent des rôles biologiques importants dans de nombreux types cellulaires, en plus des adipocytes blancs (Murphy 2001). Dans les hépatocytes, les esters de cholestérol et les triacylglycérols sont stockés dans les gouttelettes lipidiques. Des pools des gouttelettes lipidiques hépatiques fournissent jusqu'à 70% du substrat de triacylglycérol pour l'assemblage de VLDL (Very-low-density lipoprotein) (Lehner et al., 1999). Les gouttelettes lipidiques dans les cellules HSC (hepatic stellate cells) contiennent la majorité des vitamines A du corps et ses métabolites (Blaner et al., 2009). Les gouttelettes lipidiques dans les cellules épithéliales sécrétoires de la glande mammaire contribuent à la composition nutritionnelle du lait maternel (Heid et al., 2005). Les gouttelettes lipidiques semblent avoir des fonctions importantes dans plusieurs types de cellules du système immunitaire. Les gouttelettes lipidiques dans les macrophages et d'autres leucocytes participent à l'inflammation et à la réponse immunitaire (Melo et al., 2011). Lors de la phagocytose des macrophages, les gouttelettes lipidiques ont tendance à se déplacer vers une position entourant les phagolysosomes, ce qui suggère son rôle actif dans la fonction basique des macrophages (Dvorak et al., 1983).

Au final, les gouttelettes lipidiques ont des rôles fonctionnels très importants dans l'homéostasie des lipides cellulaires et du métabolisme énergétique.

ATAD3 : UNE PROTEINE DE LA FAMILLE DES ATPASE DE TYPE AAA+

INTRODUCTION D'ATAD3

ATAD3 (ATPase family AAA domain-containing protein 3) est une ATPase découverte en 2003, identifiée d'abord comme gène cible de c-MYC [1] puis comme une protéine transmembranaire de la membrane interne mitochondriale [2]. Elle appartient à la très grande famille des AAA-ATPases (ATPases associated with diverse cellular activities). Cette famille regroupe des protéines à activité ATPasique impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription, la réplication, la traduction, la protéolyse et le transport vésiculaire [3]. ATAD3 est composée de deux domaines coiled-coil du côté N-terminal, d'un domaine d'adressage à la mitochondrie proche du domaine transmembranaire ainsi que d'un domaine ATPase du côté C-terminal. Le gène codant pour ATAD3 existe chez les organismes pluricellulaires à tissus spécialisés et a été conservé sous la forme d'un gène unique jusqu'aux vertébrés. Chez les primates et les humains, deux autres gènes sont apparus (appelés ATAD3B et ATAD3C par rapport à ATAD3A, le gène ancestral). Cependant, la fonction d'ATAD3 n'est pas encore connue bien que l'ensemble des études lui reconnaisse un rôle important. En effet, son expression est ubiquitaire, et elle est essentielle à l'embryogenèse, à la structuration du réseau mitochondrial et aux interactions fonctionnelles entre mitochondries et réticulum endoplasmique [4-7]. ATAD3 participe donc à une fonction mitochondriale vitale qui reste à découvrir.

Cependant, l'analyse des fonctions d'ATAD3A et d'ATAD3B dans différentes lignées cancéreuses humaines montre, au contraire, que ces protéines peuvent avoir des propriétés anti-prolifératives et augmenter la chimio-résistance. ATAD3 semble donc impliquée dans une fonction mitochondriale encore inconnue, essentielle à la croissance des organismes pluricellulaires et impliquée dans la tumorigenèse.

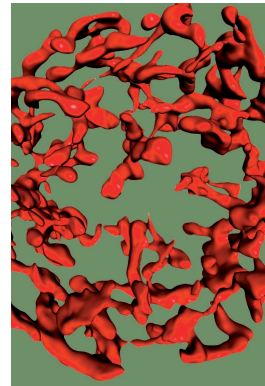
► *ATAD3* (ATPase family AAA domain-containing protein 3) est une ATPase mitochondriale membranaire dont la fonction n'est pas connue à ce jour mais qui est indispensable au développement embryonnaire. Le gène codant pour *ATAD3* existe chez les organismes pluricellulaires à tissus spécialisés et a été conservé sous la forme d'un gène unique jusqu'aux vertébrés. Chez les primates et les humains, deux autres gènes sont apparus (appelés *ATAD3B* et *ATAD3C* par rapport à *ATAD3A*, le gène ancestral). L'inactivation d'*ATAD3* dans différentes lignées cellulaires non transformées est associée à une modification drastique de la structure du réseau mitochondrial, à une inhibition de la prolifération et à une réduction des interactions fonctionnelles entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique. Cependant, l'analyse des fonctions d'*ATAD3A* et d'*ATAD3B* dans différentes lignées cancéreuses humaines montre au contraire que ces protéines peuvent avoir des propriétés antiprolifératives et augmenter la chimiorésistance. *ATAD3* semble donc impliquée dans une fonction mitochondriale encore inconnue, essentielle à la croissance des organismes pluricellulaires et impliquée dans la tumorigenèse. ◀

ATAD3 (ATPase family AAA domain-containing protein 3) est une ATPase découverte en 2003, identifiée d'abord parce que son gène est une cible de c-MYC [1] puis comme protéine de la membrane mitochondriale interne [2]. Elle appartient à la très grande famille des AAA-ATPases (ATPases associated with diverse cellular activities). Cette famille regroupe des protéines à activité ATPasique impliquées dans de nombreux processus cellulaires comme la transcription, la réplication, la traduction, la protéolyse et le transport vésiculaire [3]. Cependant, la fonction d'*ATAD3* n'est pas encore connue bien que l'ensemble

ATAD3

Une ATPase membranaire mitochondriale vitale impliquée dans la progression tumorale

Shuijie Li, Denis Rousseau



Laboratoire de bioénergétique fondamentale et appliquée, Inserm U1055, Université Joseph Fourier, 2280, rue de la Piscine, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9, France.
Denis.Rousseau@ujf-grenoble.fr

des études lui reconnaissent un rôle important. En effet, son expression est ubiquitaire, et elle est essentielle à l'embryogenèse, à la structuration du réseau mitochondrial et aux interactions fonctionnelles entre mitochondries et réticulum endoplasmique [4-7]. *ATAD3* participe donc à une fonction mitochondriale vitale qui reste à découvrir.

Phylogénie

Aucun orthologue d'*ATAD3* n'existe chez les organismes procaryotes ni chez la levure. Un orthologue très éloigné est présent chez les protistes et les levures, mais il s'agit d'une protéase dont le domaine caractéristique n'est pas présent dans *ATAD3*.

Le gène *ATAD3* apparaît réellement chez les organismes eucaryotes supérieurs : chez les plantes (*Arabidopsis thaliana*), les nématodes (*Caenorhabditis elegans*), les insectes (*Drosophila melanogaster*), les mammifères, le singe macaque et l'homme (Figure 1). Une seule copie de ce gène est présente dans les génomes haploïdes de ces organismes eucaryotes supérieurs, sauf chez les primates et l'homme où trois gènes différents existent. Chez les plantes, le gène *ATAD3* est présent en trois exemplaires identiques par la simple conséquence de la polyploidie. Chez les primates et l'homme, *ATAD3* a été dupliqué deux fois (duplications contiguës sur le chromosome 1 et mutations). Ces duplications, tardives dans l'évolution des espèces, sont propres aux primates et aux hommes.

En tant que forme ancestrale, l'un des gènes est nommé *ATAD3A*. Le deuxième gène est un paralogue très proche, nommé *ATAD3B* et le troisième gène, *ATAD3C*, présente une délétion de la séquence codante d'*ATAD3A*, produisant ainsi une partie amino-terminale raccourcie.

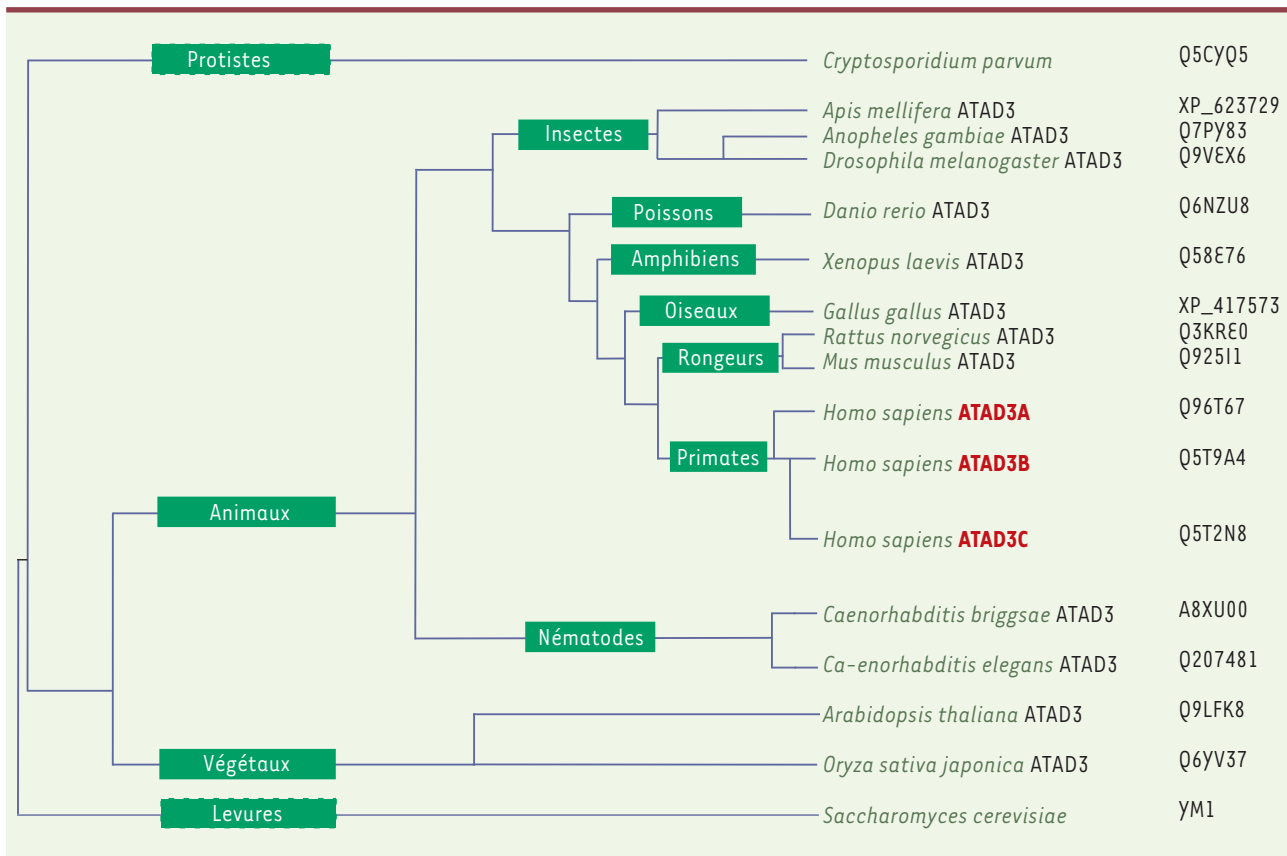


Figure 1. Arbre phylogénétique simplifié d'ATAD3. Un homologue très éloigné est repéré chez les protozoaires et la levure mais il s'agit d'une ATPase ayant fonction de protéase. Ce domaine protéasique n'est pas présent dans les protéines ATAD3. (<http://www.treefam.org/cgi-bin/> ou <http://phylofacts.berkeley.edu/phyloscope/>).

Ces trois gènes se situent côte à côte à l'extrémité du bras court du chromosome 1 au locus 1p36.33.

Le gène *ATAD3B* est très similaire à *ATAD3A* : le nombre d'exons est identique (16) et la longueur des introns ne varie que très peu. La partie codante engendre une séquence protéique dont l'identité stricte est de 93 %. *ATAD3A* et *ATAD3B* diffèrent essentiellement dans la structure de leur promoteur (voir plus loin) et au niveau du dernier exon : dans *ATAD3B*, le codon stop présent originellement dans *ATAD3A* a subi une mutation permettant le prolongement de la traduction. Il en résulte une extension carboxy-terminale de 62 acides aminés de la protéine, avec quelques sites potentiels de phosphorylation (<http://www.phosphosite.org>) et une séquence transmembranaire putative.

Le troisième gène, *ATAD3C*, ne possède que 12 exons au lieu de 16 pour *ATAD3A* et *ATAD3B*. Les exons codant pour les 70 premiers acides aminés d'*ATAD3A/B* ne sont pas traduits, car le site d'initiation de la traduction est modifié et non utilisé, l'initiation ayant lieu en aval (+210). Pour le reste de sa structure, *ATAD3C* possède une identité de 87 % par rapport à *ATAD3A*.

Enfin, les gènes codant *ATAD3* semblent présenter des processus d'excision-épissage différentiels : les variants d'épissage des gènes *ATAD3A* et *ATAD3B* (*ATAD3AI* et *ATAD3Bs*) présentent deux exons supplémentaires

codant pour une séquence à potentiel transmembranaire de type hélice alpha hydrophobe en amino-terminal (aa101-120 pour *ATAD3AI*) (Figure 2).

La séquence de la protéine *ATAD3A* est donc très conservée au cours de l'évolution : 39 % d'identité entre la protéine *ATAD3A* humaine et ses orthologues. *ATAD3A* a été détectée dans tous les modèles cellulaires et tous les tissus étudiés à ce jour. L'inactivation d'*ATAD3* chez le nématode *C. elegans* est létale précocement, à un stade où la biosynthèse massive de mitochondries est nécessaire [4, 5]. De même, l'inactivation d'*ATAD3* chez la drosophile inhibe le développement embryonnaire au stade pré-pupal [6].

Propriétés in silico

La séquence primaire d'*ATAD3* permet de distinguer deux domaines fonctionnels majeurs correspondant aux deux moitiés, amino- et carboxy-terminales de la protéine. La présence ou l'absence de deux exons épissés pour *ATAD3A* et *ATAD3B* a amené à définir une

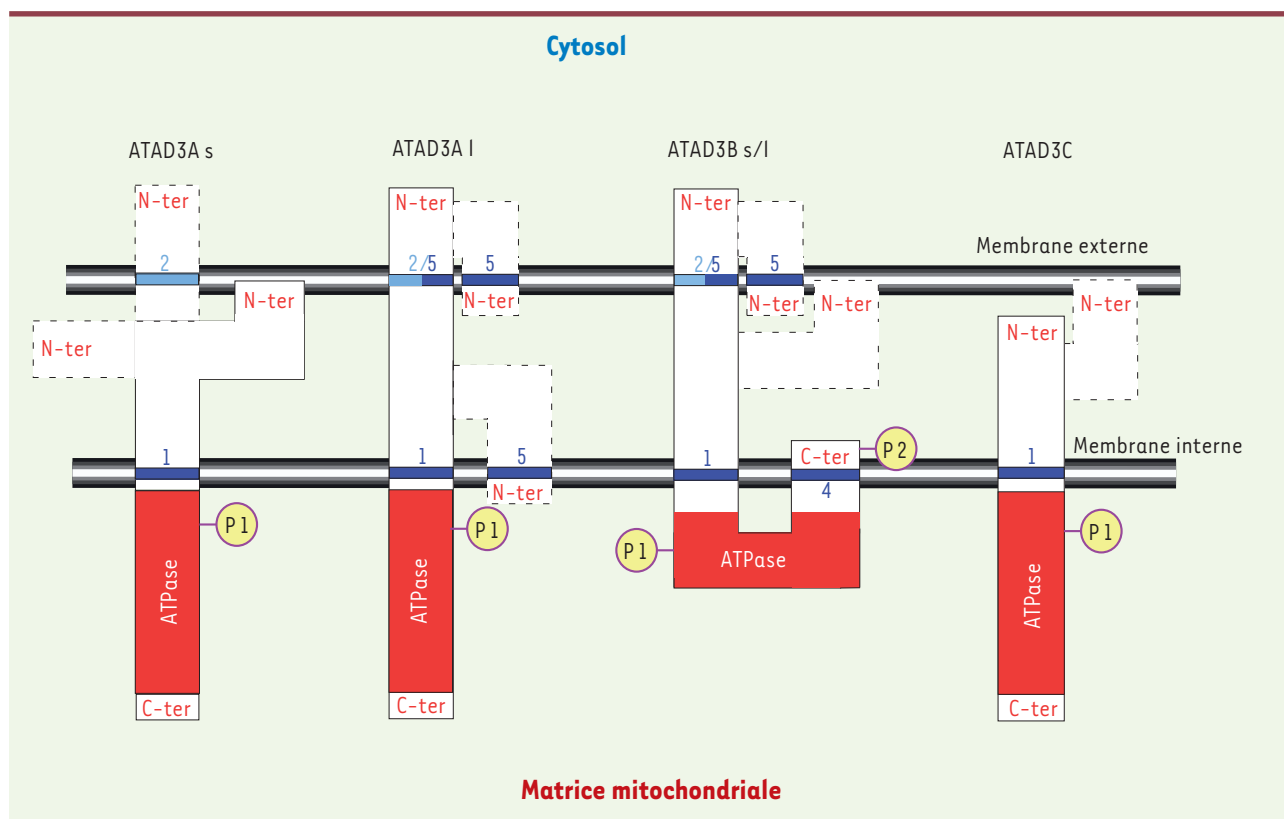


Figure 2. Modèles d'insertion membranaire d'ATAD3 et de ses variants. Selon les données actuelles, la partie ATPasique d'ATAD3 se situe dans la matrice mitochondriale quelles que soient les isoformes concernées. Pour ATAD3As, qui pourrait posséder une, deux, voire trois hélices, la partie amino-terminale est soit dans le cytosol, soit dans l'espace intermembranaire, soit ancrée dans la membrane externe. Pour ATAD3Al, qui possède clairement une deuxième hélice transmembranaire (excision-épissage différentiel), la partie amino-terminale est soit dans le cytosol, soit dans l'espace intermembranaire, soit renvoyée dans la matrice. Pour ATAD3B, le cas est similaire à ATAD3As/l mais la partie carboxy-terminale devrait revenir dans l'espace intermembranaire. Enfin, pour ATAD3C, il est très probable que la partie amino-terminale soit dans l'espace intermembranaire ou ancrée dans la membrane externe. Les séquences transmembranaires sont numérotées. Les séquences transmembranaires en bleu foncé correspondent à des séquences identifiées par tous les moteurs de recherche (DAS, TOPpred, TMPred et HMMTOP, n° 1, 4 et 5). Les séquences transmembranaires en bleu clair correspondent à des séquences identifiées par un ou quelques moteurs de recherche (TMPred et HMMTOP, n° 2 et 3). Ces dernières zones d'hydrophobicité pourraient correspondre à des formes transitoires d'insertion membranaire. Les sites putatifs de phosphorylation par la PKC sont indiqués par P1 [23] et le site de phosphorylation spécifique aux isoformes d'ATAD3Bs/l est représenté par P2.

nomenclature basée sur la taille respective des protéines à savoir *s* et *l* pour *small* et *long*¹.

La partie carboxy-terminale de la protéine constitue le domaine ATPasique : on y retrouve les motifs clés impliqués dans la fixation et l'hydrolyse de l'ATP : *sensor 1*, *sensor 2*, doigt arginine (Arg), Walker A (WA) et Walker B (WB) [3]. La région amino-terminale constitue le domaine spécifique d'ATAD3. Il contient un, ou des, domaine(s) transmembranaire(s) (certains logiciels en trouvent jusqu'à trois, Figure 2 [8]), une région flexible riche en proline (a.a 18-27 de ATAD3As), et une région de type *coiled coil* (a.a. 80-220 de ATAD3As) possiblement impliquée dans l'oligomérisation

des monomères d'ATAD3 et/ou l'interaction avec des partenaires [6]. On sait par ailleurs que les membres de la famille des AAA-ATPases dont la structure a été précisée forment des hexamères arrangés en anneaux [3].

D'après l'analyse *in silico* de la séquence primaire, aucune des isoformes d'ATAD3A/B/C ne possède de signal d'adressage mitochondrial connu de type extrémité amino-terminale clivable. L'adressage d'ATAD3 à la mitochondrie dépend d'une large séquence centrale comprenant la séquence transmembranaire majeure [6, 7].

Concernant les modifications post-traductionnelles prédictibles, il est possible de détecter plusieurs sites de phosphorylation putatifs pour des kinases.

¹ Description sur les sites http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000197785 pour ATAD3A et http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000160072 pour ATAD3B.

Localisation cellulaire et topologie membranaire

La localisation mitochondriale d'ATAD3 a d'abord été mise en évidence par une approche d'exploration protéomique de la membrane interne de la mitochondrie [2]. Ce résultat a été confirmé par immunofluorescence dans des cellules Hela [9]. Différentes approches de biochimie ont permis ensuite de montrer qu'ATAD3 est fortement ancrée dans la membrane interne de la mitochondrie [6, 7, 10]. Par ailleurs, ATAD3 a été trouvée dans de larges complexes multimoléculaires associés à l'ADN mitochondrial [11, 10]. L'extrémité amino-terminale d'ATAD3 n'est toutefois pas située dans la matrice mitochondriale (Figure 2) [11-13]. Nous avons effectivement montré que la partie amino-terminale d'ATAD3A est exposée à l'extérieur de la membrane interne, sa localisation précise dans le cytosol, l'espace intermembranaire ou la membrane externe étant encore incertaine. La partie carboxy-terminale est, quant à elle, bien située dans la matrice (Figure 2) [13]. ATAD3AI, ATAD3BI et ATAD3C, qui contiennent une partie de ces 50 acides aminés amino-terminaux, pourraient aussi partager cette insertion membranaire, mais pas ATAD3s qui ne contient pas cette séquence.

Le problème se complique légèrement si l'on considère les variants d'épissage d'ATAD3A et d'ATAD3B [8]. ATAD3AI et ATAD3Bs possèdent ainsi un domaine structural supplémentaire susceptible de former une hélice alpha transmembranaire. Ce segment pourrait permettre à la protéine d'accéder au cytosol, ou de retraverser la membrane interne. Il présente de plus des sites de phosphorylation (Figure 2). Enfin, les formes *s* et *l* de ATAD3B, contrairement à celles de ATAD3A, possèdent une séquence transmembranaire potentielle à l'extrémité carboxy-terminale qui pourrait contribuer à faire revenir la protéine dans l'espace intermembranaire (Figure 2).

Cependant, on ne peut exclure que ces régions hydrophobes à potentiel transmembranaire jouent un rôle dans l'homopolymérisation d'ATAD3, dans l'interaction avec des partenaires ou dans les mécanismes d'insertion membranaire d'ATAD3, sans pour autant constituer *in fine* un domaine transmembranaire.

Une meilleure connaissance de la topologie membranaire d'ATAD3 et de ses isoformes est aujourd'hui nécessaire à la poursuite d'autres investigations, en particulier la recherche de partenaires. La microscopie électronique semble être aujourd'hui une étape incontournable pour atteindre ce but.

Expression d'ATAD3 chez l'homme

Chez les primates et l'homme, la forme ancestrale du gène codant pour ATAD3, nommée ATAD3A, a été dupliquée deux fois et mutée pour engendrer deux paralogues nommés ATAD3B et ATAD3C. Ces trois gènes sont contigus à l'extrémité du chromosome 1 (locus 1p36.33).

Comme nous l'avons vu, le gène ATAD3B est très similaire à ATAD3A (93 % d'homologie par rapport à ATAD3As), mais avec une extension de son extrémité carboxy-terminale (voir ci-dessus). La protéine ATAD3C (87 % d'homologie avec ATAD3As), ne possède pas les premiers 70 a.a., ce qui lui fait perdre la structure *coiled coil* ; elle diffère aussi

dans la partie carboxy-terminale en lui conférant de nouveaux sites potentiels de phosphorylation. Ces trois protéines pourraient donc partager une même fonction tout en gardant des spécificités de fonctionnement (localisation, régulation, partenaires...).

Une observation notable concerne les promoteurs de ces gènes (<http://www.bimas.cit.nih.gov>). Le promoteur putatif du gène ancestral, ATAD3A, contient des sites de fixation pour de nombreux éléments de régulation de la croissance cellulaire comme par exemple C/EBP (CCAAT/*enhancer binding protein*, 2 sites de fixation), CBF/IRP/CREB (*core binding factor* et *iron regulatoty protein* et *cAMP response element binding protein*, 2 sites), GATA-1 (3 sites), Oct-1 (*octamer-binding protein*, 1 site) et TFIID (1 site). Le promoteur d'ATAD3B contient ces mêmes sites (CREB, GATA-1, Oct-1 et TFIID), mais contient, en plus, 5 domaines de liaison à Pit1 (*growth hormone factor 1*), 2 domaines de liaison à Myc et un domaine de liaison à la myogénine. Le facteur transcriptionnel Pit1 est exprimé au cours de l'embryogenèse et dans l'hypophyse chez l'adulte [14], et la myogénine est également exprimée au cours de l'embryogenèse [15-17]. En conséquence, ces deux facteurs pourraient contribuer à l'expression spécifique d'ATAD3BI/s dans des tissus embryonnaires et en particulier dans les tissus musculaires.

Nous avons montré que l'expression relative de ces deux gènes ATAD3A et ATAD3B varie significativement chez l'homme [8] : le premier est exprimé de manière ubiquitaire, et en particulier dans le cerveau ; le second n'est pas exprimé dans le cerveau adulte normal mais dans des tissus à fort potentiel prolifératif (embryon et zones germinatives adultes comme l'hypophyse adulte) [8-10]. Concernant l'expression d'ATAD3C, aucune donnée expérimentale n'existe actuellement.

ATAD3 et cancers

Plusieurs articles ont mis en évidence un lien entre la surexpression d'ATAD3As ou d'ATAD3BI, la progression tumorale et une résistance accrue à l'apoptose (chimiorésistance) [8, 9, 18, 19].

La localisation chromosomique des gènes humains ATAD3A, ATAD3B et ATAD3C (1p36-33) a attiré notre attention, car dans cette région sont également localisés des gènes suppresseurs de tumeur et de chimiorésistance. Or les remaniements de cette région chromosomique permettent de discriminer deux types de tumeurs gliales : les astrocytomes et les oligodendrogliomes [20]. Ces derniers présentent



une délétion récurrente du bras court du chromosome 1 (1p), absente des astrocytomes. Les oligodendrogliomes étant des tumeurs de bon pronostic, c'est-à-dire peu agressives et chimiosensibles, contrairement aux astrocytomes, il devenait intéressant de voir si ATAD3A et ATAD3B pouvaient se comporter, dans des cellules de type oligodendroglial, comme des anti-oncogènes ou des gènes de chimiorésistance.

Dans nos études [8], ATAD3BI était indétectable dans des lignées dérivées d'oligodendrogliomes, alors qu'ATAD3As était légèrement sous exprimée par rapport à des lignées dérivées d'astrocytomes. Nous avons ensuite montré, en étudiant une lignée d'oligodendrogliome (HS683), qu'en plus de la large délétion 1p, le deuxième gène *ATAD3B* avait disparu par délétion, ne laissant, sur les quatre gènes *ATAD3A/B*, qu'un seul exemplaire d'*ATAD3A*. Ces délétions pourraient indiquer un processus de perte d'hétérozygotie d'un gène suppresseur de tumeur. Puisqu'ATAD3BI est détectable dans des lignées cellulaires dérivées d'astrocytomes mais indétectable dans celles dérivées d'oligodendrogliomes, il est possible qu'elle puisse être un marqueur positif des astrocytomes par rapport aux oligodendrogliomes et du tissu sain bordant les résections chirurgicales, ou, inversement, un marqueur négatif des oligodendrogliomes. L'analyse de l'expression d'ATAD3BI dans des biopsies de tumeurs gliales humaines pourrait valider cette hypothèse.

In vitro, l'expression ectopique d'ATAD3As et d'ATAD3BI dans des cellules dérivées de gliomes induit une inhibition notable de la croissance cellulaire en allongeant la phase G1 du cycle cellulaire (Tableau 1) [8]. ATAD3 pourrait donc avoir des propriétés d'anti-oncogène dans ces lignées cellulaires. À l'inverse, le traitement par des siARN dirigés contre ATAD3 des cellules de la lignée U373 dérivée d'un astrocytome, stimule leur prolifération. Cette observation ne peut cependant pas être généralisée à tous les types cellulaires : en effet, ces siARN induisent une apoptose associée à un dysfonctionnement de la cytokinèse et une endoréplication dans les cellules GHD-1 (carcinome de l'hypopharynx) [9], et la surexpression d'ATAD3As dans les cellules HeLa a un effet proapoptotique [2]. Il est possible que selon le contexte cellulaire, dans des lignées tumorales différentes, l'expression d'ATAD3 puisse être soit facultative soit indispensable. Dans les cellules HeLa et GHD-1, la surexpression d'ATAD3Bs/1 n'induit pas de ralentissement notable du cycle cellulaire mais ici la surexpression relative d'ATAD3 n'a pas été mesurée [9].

Nous avons également montré que l'expression ectopique d'ATAD3As et d'ATAD3BI dans une lignée issue d'oligodendrogliome chimiosensible induit une résistance à court et à long terme envers différents agents génotoxiques [8] - peut-être liée à l'efficacité de l'arrêt du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. À l'inverse, la diminution d'expression d'ATAD3As et 3BI rend chimiosensible une lignée issue d'astrocytome chimiorésistante. Le mécanisme de cette résistance à court terme fait intervenir l'élimination rapide (perméabilité, modification chimique, dégradation) de l'agent génotoxique. En conséquence, en plus d'être un marqueur discriminant l'oligodendrogliome de l'astrocytome, ATAD3 pourrait être une cible thérapeutique pour optimiser le traitement chimiothé-

rapeutique de l'astrocytome. Il a été par ailleurs montré récemment qu'ATAD3A constituait un marqueur antiapoptotique dans les tumeurs du poumon [18] et un marqueur de radiorésistance dans les lymphomes non hodgkiniens [21].

Quelle fonction pour ATAD3 ?

Aujourd'hui, les données concernant ATAD3 sont encore peu nombreuses et si sa localisation et sa topologie membranaire sont maintenant mieux établies, certains aspects restent contradictoires.

ATAD3 a été initialement impliquée dans des réponses auto-immunes chez des patients cancéreux [22, 23]. Ces résultats impliquent qu'ATAD3 puisse être accessible au système immunitaire et aux anticorps. Or, elle n'a été visualisée que dans les mitochondries même si sa topologie membranaire mitochondriale n'est pas définitivement élucidée (voir ci-dessus). On ne peut exclure sa relocalisation dans le compartiment extracellulaire à la suite d'un clivage ou d'un processus d'excision/épissage différentiel. Elle peut aussi être exposée par des cellules mortes ou endommagées par les traitements antitumoraux ce d'autant qu'elle est abondante et relativement stable.

ATAD3A a été montrée comme pouvant s'associer à la frataxine [24], qui intervient dans l'assemblage des noyaux fer-soufre essentiels au fonctionnement des complexes de la chaîne respiratoire, et dont les mutations sont impliquées dans l'ataxie de Friedreich, une maladie neurodégénérative.

Pour terminer, nous insistons sur le rôle que pourrait avoir ATAD3 dans les interactions entre le réticulum et la mitochondrie et, dans cette dernière, entre membrane interne et membrane externe. En effet, ATAD3 semble être localisée aux points de contact où se juxtaposent la membrane externe et la membrane interne des mitochondries, et ces points de contact sont en rapport avec les zones de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries [6, 7, 18]. Ces zones de contact sont reconnues aujourd'hui pour être des lieux de transit de nombreuses molécules comme des protéines néosynthétisées, le calcium et des phospholipides tels que la phosphatidylsérine et le cholestérol. Ainsi, l'invalidation d'ATAD3, qui induit une fragmentation du réseau mitochondrial et une perte d'interaction entre les mitochondries et le réticulum, induit une réduction majeure des flux lipidiques de cholestérol et de phosphatidylsérine entre ces compartiments [5, 6, 7, 25].

En participant à la constitution de ces structures d'échange, ATAD3 pourrait donc, de manière plus

Modèles cellulaires	Techniques Isoformes	Effets	Références
COS Cellule de rein-SV40/ singe	Surexpression transitoire ATAD3As/BI	↘ Prolifération	[8]
HS683 Oligodendrogliome/ homme	Surexpression transitoire/stable ATAD3As/BI	↘ Prolifération ↘ Apoptose	[8]
U373 Astrocytome/homme	Surexpression transitoire/stable ATAD3As/BI	↘ Prolifération	[8]
U373 Astrocytome/homme	SiARN ATAD3As/BI	↗ Prolifération ↗ Apoptose	[8]
GHD-1 Carcinome hypopharynx/homme	SiARN ATAD3Bs/BI	↗ Apoptose	[9]
GHD-1 Carcinome hypopharynx/homme	Surexpression transitoire ATAD3Bs/BI	Pas d'effet	[9]
HeLa Cancer cervical/ homme	Surexpression transitoire ATAD3As	↗ Apoptose	[2]
A549 Cancer poumon/ homme	SiARN ATAD3As	↘ Chimiorésistance	[18]
H838 Cancer poumon/ homme	SiARN ATAD3As	↘ Chimiorésistance	[18]
U373 Astrocytome/homme	Surexpression ATAD3As/BI	↗ Chimiorésistance	[8]
HS683 Oligodendrogliome/ homme	Surexpression ATAD3As/BI	↗ Chimiorésistance	[8]
RAJI Lymphome/homme	Protéomique diffé- rentielle ATAD3Bs/BI	↗ Radiorésistance	[19]

Tableau 1. Tableau récapitulatif des effets de la sur- ou sous-expression d'ATAD3 sur la prolifération et la chimiorésistance pour différents modèles de lignées cancéreuses.

générale, contribuer à l'homéostasie mitochondriale en participant à un mécanisme de recyclage/néosynthèse des constituants mitochondriaux et ceci en lien avec le réticulum endoplasmique [19, 26, 27]. Pour autant, nous ne sommes pas certains qu'il existe une causalité directe entre l'inactivation d'ATAD3 et la déstructuration du réseau mitochondrial. Ce processus pourrait être indirect et associé à un autre dysfonctionnement de la mitochondrie.

La fonction précise de cette ATPase mitochondriale reste encore inconnue bien qu'elle se révèle essentielle au bon fonctionnement du réseau mitochondrial. Son abondance et son expression ubiquitaire reflètent certainement un rôle important dans la cellule. La recherche de ses partenaires est une étape essentielle – qui peut être rendue difficile par l'abondance cellulaire d'ATAD3, sa localisation membranaire, ainsi que son pHi très basique (pHi=10) –, de même que l'étude de modèles de différenciation, permettant l'analyse des effets cellulaires de son inactivation ou de sa surexpression. ♦

SUMMARY

ATAD3, a vital membrane-bound mitochondrial ATPase

involved in tumor progression

ATAD3 (ATPase family AAA domain-containing protein 3) is a mitochondrial membrane bound ATPase whose function has not yet been discovered but its role is essential for the embryonic development. The *ATAD3* gene exists since the pluri-cellular organisms with specialized tissues and remains unique until vertebrates. In primates and humans, two other genes have appeared (called *ATAD3B* and *ATAD3C* versus *ATAD3A* the ancestral gene). *ATAD3* knock-down in different non-transformed cell lines is associated with drastic changes in the mitochondrial network, inhibition of proliferation and modification of the functional interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum. However, the analysis of the functions of *ATAD3A* and *ATAD3B* in different human cancer cell lines shows at the contrary that they can have anti-proliferative effects and induce chemoresistant properties. *ATAD3* may therefore be implicated in an unknown but essential and growth-linked mitochondrial function existing since pluri-cellular organization and involved in tumorigenesis. ♦

CONFLITS D'INTÉRÊTS

L'auteur déclare n'avoir aucun conflit d'intérêts concernant les données publiées dans cet article.

REMERCIEMENTS

Nous sommes très reconnaissants au Dr Cécile Batandier pour son aide à la rédaction de ce manuscrit.

RÉFÉRENCES

1. Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, et al. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol* 2003 ; 4 : R69.
2. Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, et al. Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 2003 ; 278 : 41566-71.
3. Frickey T, Lupas AN. Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* 2004 ; 146 : 2-10.
4. Kamath RS, Ahringer J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 2003 ; 30 : 313-21.
5. Hoffmann M, Bellance N, Rossignol R, et al. *C. elegans* ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development. *PLoS One* 2009 ; 4 : e7644.
6. Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, et al. The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membrane. *Mol Cell Biol* 2010 ; 30 : 1984-96.
7. Hubstenberger A. *MSBP, une protéine identifiée comme une cible de la S100B, impliquée dans la distribution subcellulaire des mitochondries*. Grenoble, Thèse de médecine, Université Joseph Fourier, 2006. http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/17/52/59/PDF/Arnaud_Hubstenberger.pdf.
8. Hubstenberger A, Labourdette G, Baudier J, Rousseau D. ATAD3A and ATAD3B are distal 1p-located genes differentially expressed in human glioma cell lines and present *in vitro* anti-oncogenic and chemoresistant properties. *Exp Cell Res* 2008 ; 314 : 2870-83.
9. Schaffrik M, Mack B, Matthias C, et al. Molecular characterization of the tumor-associated antigen AAA-TOB3. *Cell Mol Life Sci* 2006 ; 63 : 2162-74.
10. He J, Mao CC, Reyes A, et al. The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol* 2007 ; 176 : 141-6.
11. Wang Y, Bogenhagen DF. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 25791-802.
12. Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 3665-7.
13. Hubstenberger A, Merle N, Charton R, et al. Topological analysis of ATAD3A insertion in purified human mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 2010 ; 42 : 143-50.
14. Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, et al. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* 1990 ; 4 : 695-711.
15. Sassoon D, Lyons G, Wright WE, et al. Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 1989 ; 341 : 303-7.
16. Hinterberger TJ, Sassoon DA, Rhodes SJ, Konieczny SF. Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev Biol* 1991 ; 147 : 144-56.
17. Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2002 ; 18 : 747-83.
18. Fang HY, Chang CL, Hsu SH, et al. ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *J Cell Sci* 2010 ; 123 : 1171-80.
19. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 2009 ; 19 : 81-8.
20. Smith JB, Alderete B, Minn Y, et al. Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human glioma and their association with histological subtype. *Oncogene* 1999 ; 18 : 4144-52.
21. Jiang Y, Liu X, Fang X, Wang X. Proteomic analysis of mitochondria in Raji cells following exposure to radiation: implications for radiotherapy response. *Protein Pept Lett* 2009 ; 16 : 1350-9.
22. Gires O, Münz M, Schaffrik M, et al. Profile identification of disease-associated humoral antigens using Amida, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci* 2004 ; 61 : 1198-207.
23. Geuijen CA, Bijl N, Smit RC, et al. A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. *Eur J Cancer* 2005 ; 41 : 178-87.
24. Correia AR, Pastore C, Adinolfi S, et al. Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS J* 2008 ; 275 : 3680-90.
25. Gilquin B, Cannon BR, Hubstenberger A, et al. The calcium-dependent interaction between S100B and the mitochondrial AAA-ATPase ATAD3A and the role of this complex in the cytoplasmic processing of ATAD3A. *Mol Cell Biol* 2010 ; 30 : 2724-36.
26. Kornmann B. Le complexe Erms : une connexion haut-débit entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 145-6.
27. Kornmann B, Walter P. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci* 2010 ; 123 : 1389-93.

TIRÉS À PART
D. Rousseau



ATAD3, a vital membrane bound mitochondrial ATPase involved in tumor progression

Shuijie Li · Denis Rousseau

Published online: 9 February 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract ATAD3 (ATPase family AAA Domain-containing protein 3) is a mitochondrial membrane bound ATPase whose function has not yet been discovered but its role is essential for embryonic development. The ATAD3 gene has existed since the pluri-cellular organisms with specialized tissues and has remained unique until vertebrates. In primates and human, two other genes have appeared (called ATAD3B and ATAD3C versus ATAD3A the ancestral gene). ATAD3 knock-down in different non-transformed cell lines is associated with drastic changes in the mitochondrial network, inhibition of proliferation and modification of the functional interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum. However, the analysis of the cellular properties of ATAD3A and ATAD3B in different human cancer cell lines shows on the contrary that they can present anti-proliferative and chemoresistant properties. ATAD3 may therefore be implicated in an unknown but essential and growth-linked mitochondrial function existing since pluri-cellular organization and involved in tumorigenesis.

Keywords ATAD3 · Mitochondria · Inner membrane · ATPase

Introduction

ATAD3 (ATPase family AAA Domain-containing protein 3) is a mitochondrial membrane ATPase which was first discovered in 2003 as a target gene of c-MYC (Zeller et al. 2003) and

then as a protein of the mitochondrial inner membrane (Da Cruz et al. 2003).

ATAD3 belongs to the very large family of the AAA-ATPases (ATPases Associated with diverse cellular Activities). This family includes proteins with ATPase activity involved in many cellular processes such as transcription, replication, translation, proteolysis, vesicular transport and many others (Frickey and Lupas 2004). However, to date, the function of ATAD3 has not yet been discovered although all studies conducted so far reveal a very significant role. Indeed, its expression is ubiquitous, essential for embryogenesis, for the structure of the mitochondrial network and for the functional interactions between mitochondria and endoplasmic reticulum (Kamath and Ahringer 2003; Hoffmann et al. 2009; Gilquin et al. 2010a; Hubstenberger 2006). Therefore, ATAD3 participates in a vital mitochondrial function which remains to be determined.

Phylogeny

Exploring the emergence of ATAD3 in the genomes, it appears that no ortholog exists neither in yeast nor in prokaryotic organisms. A far ortholog is found in protists and yeast but it is about a protease whose characteristic domain is not present in ATAD3. The ATAD3 gene appears in higher eukaryotic organisms: in plants (*Arabidopsis thaliana*), nematodes (*Caenorhabditis elegans*), insects (*Drosophila melanogaster*), monkey (macaque) and human (see Fig. 1). A single copy of this gene is present in the haploid genomes of these higher eukaryotic organisms except for primates. In plants, the ATAD3 gene is present in three identical copies by the simple consequence of polyploidy. In primates and humans, ATAD3 was duplicated twice (contiguous duplications on chromosome 1 and mutations). As the ancestral form,

S. Li · D. Rousseau (✉)
Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée U1055
INSERM, Université Joseph Fourier,
BP 53 38041 Grenoble cedex 9, France
e-mail: Denis.Rousseau@ujf-grenoble.fr

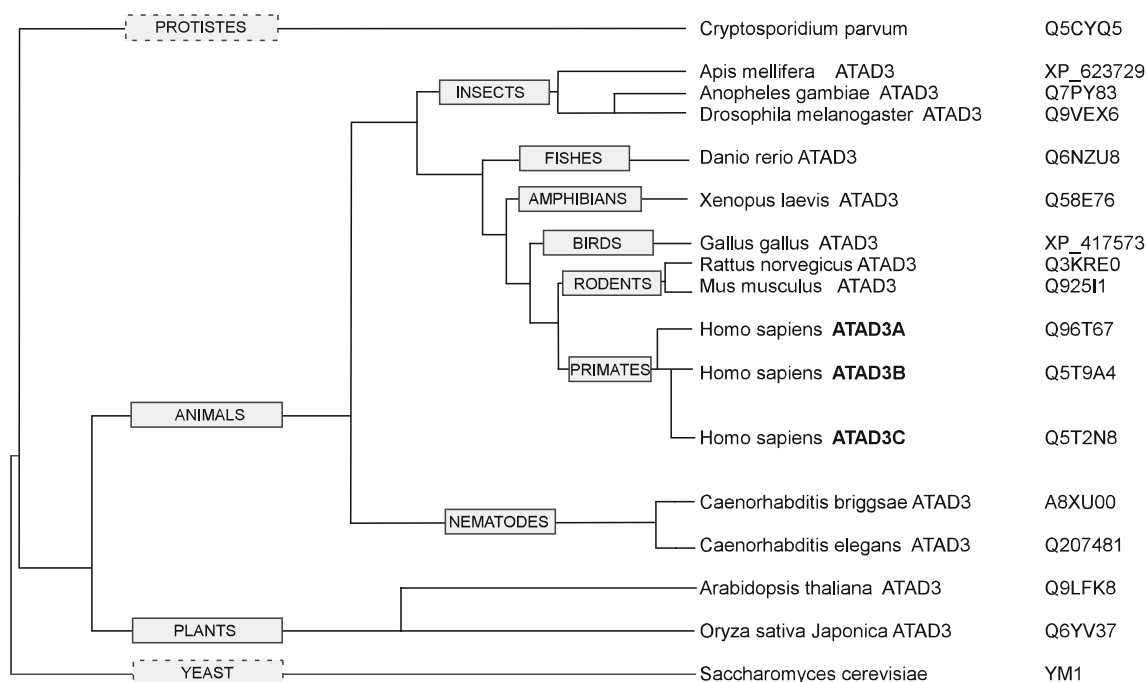


Fig. 1 ATAD3 phylogenetic tree: A far homologue is found in protists (Cryptosporidium) but the protease associated function is not present in ATAD3. From <http://phylofacts.berkeley.edu/phyloscope> or <http://www.treefam.org/cgi-bin>

one of the genes is called ATAD3A. The second gene is a very close paralogue, named ATAD3B, and the third gene, ATAD3C, presents an important deletion of the original coding sequence of ATAD3A producing a large N-terminal truncation (see Fig. 2).

These three genes are located side by side at the end of the short arm of chromosome 1 at the 1p36.33 locus. Since a single copy of the gene is present in chicken *Gallus gallus*, beef *Bos taurus*, mouse *Mus musculus*, rat *Rattus norvegicus*, dog *Canis familiaris*, cat *Felis catus*, pig *Sus scrofa* and dolphin *Tursiops truncatus*, it appears that these duplications occurred late in the species evolution, close to primates and humans.

The ATAD3B gene is indeed very similar to ATAD3A: the number of exons is identical (16) and the length of introns varies very little. Regarding the coding sequence, the strict identity of their protein sequences is 93% (see Fig. 2). The highest difference between ATAD3A and ATAD3B is found on the last exon, where a replacement mutation of the original ATAD3A Stop codon enables a 3'UTR sequence (not-translated in ATAD3A) to be translated in ATAD3B. For that reason, ATAD3B has a C-terminal extension of 62 amino acids compared to ATAD3A. This extension presents several potential phosphorylation sites (<http://www.phosphosite.org>) and a putative transmembrane sequence (see Fig. 2—<http://www.enzim.hu/hmmtop>). In addition, these two genes differ in their promoter structure (see below).

As regards to the third gene, ATAD3C, it possesses only the 12 last exons instead of the 16 of ATAD3A and ATAD3B.

The exons encoding the first 70 amino acids of ATAD3A are not translated in ATAD3C because the translational initiation site is mutated, leaving the initiation to occur downstream (+210). For the rest of its structure, ATAD3C processes a 87% identity compared to ATAD3A (see Fig. 2).

Finally, the genes coding ATAD3 seem to present processes of differential excision-splicing about which we will discuss later.

The ATAD3 protein sequence is then highly conserved during evolution as reflected by the 39% identity existing between the human ATAD3 protein and its orthologue in plants. This strong conservation suggests that in higher eukaryotes, the ATAD3 protein has been involved in processes undergoing high selection pressure. Confirming this presumption, it has been shown that the invalidation of the ATAD3 ortholog in nematode *C. Elegans* is lethal during early embryonic development, at a stage where the massive mitochondrial biosynthesis is necessary (Kamath and Ahringer 2003; Hoffmann et al. 2009). Similarly, in drosophila, the invalidation of ATAD3 inhibits embryonic development at the pre-pupal stage (Gilquin et al. 2010a). We note here that ATAD3 was detected in all cell models, or all tissues studied to date (brain, heart, lung, liver, spleen, intestine, muscle; personal data).

The presence and absence of two alternatively spliced exons in ATAD3A and ATAD3B led others and us to define a nomenclature based on the respective protein sizes namely *s* for *small* and *l* for *long* (description on <http://www.ensembl>.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000197785 for ATAD3A and http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?g=ENSG00000160072 for ATAD3B).

Proprieties *in silico*

The ATAD3 primary sequence allows us to distinguish two major functional areas corresponding to the two halves, the N- and the C-terminals of the protein (see Fig. 2). The C-terminal part of the protein constitutes the ATPase domain in which we can find the key motives involved in the binding and hydrolysis of ATP: sensor 1, sensor 2, arginine finger (Arg), Walker A (WA) and Walker B (WB) sites (Fig. 2 and (Frickey and Lupas 2004)). We note here that ATAD3 possesses the specific DEAD motif of the Walker B site (a.a. 411–414 for ATAD3As), specific for the RNA helicases subfamily. However, comparison of the ATAD3 with RNA helicases shows that this similarity is limited to the DEAD motif.

The N-terminal specific region of ATAD3 constitutes the specific domain of ATAD3. It contains one or some transmembrane domain(s) (some software finds up to three, Fig. 2 and (Hubstenberger et al. 2010)), a flexible region rich in proline (a.a. 18–27 on ATAD3As), and a Coiled-coil region (a.a. 80–220 for ATAD3As) offering an interaction zone which could be important for the oligomerization of ATAD3 monomers and / or for interaction with partners (Gilquin et al. 2010a). We also know that the members of AAA-ATPases family, whose structure has already been clarified, form hexamers arranged in rings (Frickey and Lupas 2004).

We note also the presence of a glutamine-rich domain (Q domain a.a. 89–166 for ATAD3As), conserved since *Drosophila*, but whose function remains unknown.

According to the *in silico* analysis of the primary sequence, none of the ATAD3A/B/C isoforms have mitochondrial addressing signal known by «cleavable N-terminal extremity» type. The targeting of ATAD3 to the mitochondria depends on a large central sequence including the major transmembrane sequence (Gilquin et al. 2010a; Hubstenberger 2006).

As regards to the predictable post-translational modifications, it is possible to detect several putative phosphorylation sites for PKC, PKA, GSK3, cdc2 CKI, CKII, DNAPK, RSK, Cdk5, PKG and p38MAPK INSR (NetPhosK 1.0 server). It was also detected two N6-acetyl-lysine in position 490 and 512 in the mouse ATAD3 protein (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q925I1>).

We finally emphasize on the fact that splicing variants of ATAD3 exist for ATAD3A and ATAD3B genes (ATAD3A1/s and ATAD3B1/s). These variants present two additional exons encoding a potential transmembrane sequence of hydrophobic alpha helix type present at the N-terminus (a.a. 101–120 for ATAD3A1, Figs. 2 and 3).

Cellular localization and membrane topology

The mitochondrial localization of ATAD3 was first shown by a proteomic approach of the mouse liver mitochondrial inner membrane (Da Cruz et al. 2003). This result was then confirmed by immunofluorescence in HeLa cells (Schaffrik et al. 2006). Different biochemistry approaches were then used and showed that ATAD3 is strongly anchored to the mitochondrial inner membrane (Gilquin et al. 2010a; Hubstenberger 2006; He et al. 2007). Furthermore, it was shown that ATAD3 was found in a large multi-molecular complex associated with mitochondrial DNA (Wang and Bogenhagen 2006). He and his colleagues also showed that ATAD3 could interact with the mitochondrial DNA by its N-terminal (He et al. 2007). However, further analysis by chemical cross-linking showed that this interaction could be at long distance and could not involve the N-terminal (Bogenhagen et al. 2008). We observed as others that like outer membrane or inter-membrane space proteins, the N-terminal of ATAD3 is sensitive to trypsin attack in the context of the isolated mitochondria. The C-terminus which remains resistant to trypsin is thus probably in the matrix (Gilquin et al. 2010a; Bogenhagen et al. 2008). This shows that the N-terminal of ATAD3 is very probably not located in the mitochondria matrix (Fig. 3).

In order to clarify this problem, we carried out a back-titration ELISA and an immunofluorescence analysis on isolated human mitochondria (Hubstenberger et al. 2010). These experiments showed that the N-terminal part of ATAD3 is accessible to antibodies while the C-terminus is not. These experiments confirmed that the N-terminus is exposed to the outside of the mitochondrial inner membrane, either in the inter-membrane space, in the outer membrane or in the cytosol. The C-terminus is located in the matrix (Fig. 3) (Hubstenberger et al. 2010). The following work is now to determine the precise location of the N-terminal part of ATAD3. In fact, trypsin permeabilizing effects and low doses of detergent used do not enable one to unambiguously distinguish the three possible locations (cytosol, inter-membrane space or outer membrane). Recent experiments suggest that the N-terminus (a.a. 1–50 for ATAD3As) is embedded in the outer membrane and confirm that the C-terminus is located in the matrix (Gilquin et al. 2010a). The membrane insertion of the N-terminus of ATAD3As may also exist for ATAD3A1 and ATAD3B1, which contain this N-terminal part of 50 amino acids but not for ATAD3Bs which does not contain this sequence.

The problem is more complex if we consider the splicing variants of ATAD3A and ATAD3B (Hubstenberger et al. 2008). ATAD3A1 and ATAD3Bs possess also an additional structural domain likely to form a transmembrane alpha helix (Fig. 2). This segment could allow the protein to join the cytosol or to cross again the inner membrane, and presents moreover phosphorylation sites (Fig. 3).

We finally note that ATAD3Bs/l, unlike ATAD3As/l, possess a potential transmembrane sequence at its C-terminus which could contribute to bring back the protein in the intermembrane space (Fig. 3).

However, we cannot exclude that these hydrophobic regions with transmembrane potential play a role in ATAD3 homo-polymerization, in interaction with partners or in the mechanisms of membrane insertion of ATAD3, without constituting *in fine* a transmembrane domain. Electron microscopy seems to be now an inescapable step to achieve this goal.

A more precise knowledge of the membrane topology of ATAD3 and of its variants seems now necessary to the pursuit of other investigations, particularly as regards to the search of partners.

ATAD3 expression in human

In primates and humans, the ancestral form of ATAD3 gene, named ATAD3A, has been duplicated and mutated twice to generate two paralogues named ATAD3B and ATAD3C. These three genes are located side by side at the end of chromosome 1 (locus 1p36.33).

As discussed above, the ATAD3B gene is very similar to ATAD3A (93% homology compared to ATAD3As). However, ATAD3B has a C-terminal extended to 62 amino acids where are mainly found potential phosphorylation sites and a presumed transmembrane domain (<http://www.enzim.hu/hmmtop/>, Figs. 2 and 3). The protein ATAD3C (87% homology with ATAD3As) lacks the first 70 a.a causing the loss of the coiled-coil structure. ATAD3C differs also in the last exon, giving it new potential phosphorylation sites. These three proteins could thus contribute to a common function presenting specificity in functioning (cellular localization, tissue expression, regulation, partners...).

The most notable observation concerns the promoters of these genes (<http://www.bimas.cit.nih.gov>). The putative promoter of the ancestral gene, ATAD3A, contains numerous regulatory elements linked to cell growth, such as C/EBP (CCAAT / enhancer binding protein, two binding sites), CBF/IRP/CREB (Core Binding Factor and Iron Regulatory Protein and cAMP Response Element Binding protein, 2 sites), GATA-1 (3 sites), Oct-1 (OCTAM-binding Protein, 1 site), and TFIID (1 site). The promoter of ATAD3B gene contains these same sites (CREB, GATA-1, Oct-1, and TFIID) and in addition, contains 5 Pit1 binding domains, two Myc-binding domains and a myogenin binding domain. The transcription factor Pit1 (growth hormone factor 1) is expressed during embryogenesis and in the adult (Simmons et al. 1990) and myogenin is also expressed during embryogenesis (Sassoon et al. 1989; Hinterberger et al. 1991; Pownall et al. 2002). Hence, these two factors could contribute to the

Fig. 2 Alignment of human ATAD3A/3B/3C isoforms and structural areas (identity * and homology :). The ATPase region is represented by the light grey box (Walker sites dotted squared). The coiled-coil region is represented by the dark grey box. The three putative transmembrane domains are squared in black and numbered. The proline-rich region and the glutamine-rich region are squared in grey. From <http://www.ebi.ac.uk/Tools/es/cgi-bin/clustalw2>

specific expression of ATAD3Bl/s in embryonic tissues, particularly in muscle tissue.

We have shown that the relative expression of these genes varies significantly in humans (Hubstenberger et al. 2008). The ATAD3A gene is expressed ubiquitously, particularly in the brain. On the contrary, ATAD3B gene is not expressed in the adult brain, but expressed in human astrocytoma cell lines, in embryonic tissues and in the pituitary gland, an adult brain germinal zone (Hubstenberger et al. 2008; Schaffrik et al. 2006; He et al. 2007). It seems therefore that the ATAD3B gene is expressed in the tissues with high proliferative potential (embryo and adult germinal zones).

As regard to ATAD3C expression, no experimental data exists currently.

ATAD3 and cancers

Several articles have highlighted the link which exists between the ATAD3 expression and tumor progression [8, 9, 24, 27, 29 and Fig. 4]. In all studied cases, the tumor progression is associated with the ATAD3As or ATAD3Bl overexpression and with an increased resistance to apoptosis (chemoresistance).

The chromosomal localization of the three human genes ATAD3A, ATAD3B and ATAD3C (1p36-33) drew our attention because this region is known for many years to contain chemoresistance and tumor suppressor genes. Indeed, this chromosomal region could enable the discrimination of the two major glioma sub-types which are astrocytoma and oligodendroglioma (Smith et al. 1999). Oligodendroglioma presents a recurrent deletion of the short arm of chromosome 1 (1p), whereas astrocytoma do not have this genetic signature. Oligodendroglioma tumors are relatively benign, that is to say not too aggressive and chemosensitive, while astrocytomas are instead highly evolutive and chemoresistant glioma. It was then interesting to see if ATAD3A and ATAD3B genes could behave as anti-oncogenes or genes inducing chemoresistance in oligodendroglioma cells. To do this, we studied the expression of ATAD3As and ATAD3Bl and their over- and under-expression in oligodendroglial cell lines in order to measure the anti-proliferative and chemoresistance properties of ATAD3 (Hubstenberger et al. 2008).

We first noticed that ATAD3Bl was undetectable in cell lines derived from oligodendroglioma, whereas ATAD3As was slightly under-expressed, compared to cell lines derived

ATAD3A5_Human	MSWLFGIMNSPESGASFPFLPFAQPGAECSGDRGLGDRFAFDHNSMFDPTGLERAAK	60
ATAD3A1_Human	MSWLFGIMNSPESGASFPFLPFAQPGAECSGDRGLGDRFAFDHNSMFDPTGLERAAK	60
ATAD3R5_Human		
ATAD3R1_Human	MSWLFGVNHSFESGASFPFLPFAQPGAECSGDRGLGDRFAFDHNSMFDPTGLERAAK	60
ATAD3C_Human		
ATAD3A5_Human	AARELEPSK--YANDALNLAQMDEQTLQLEQQSILK-----5-----	94
ATAD3A1_Human	AARELEPSK--YANDALNLAQMDEQTLQLEQQSILKMRLEALSLIHTLVWAWSLCRAGAV	118
ATAD3R5_Human	-----MQLLEALNLIHTLVWAWSLCRAGAV-----	24
ATAD3R1_Human	AARELEPSK--RYANPALNLAQMDEQTLQLEQQSILK-----	94
ATAD3C_Human	-----MSKDALNLAQMDEQTLQLEQQSILK-----	25
	::: * : ** : : * :	
ATAD3A5_Human	-----EYEAAVEQLLESQITRAQAERERTLSSETRQBQARA-----	130
ATAD3A1_Human	QTQERLSSASPEQVEAGECALQEYEAAVEQLLESQITRAQAERERTLSSETRQBQARA	178
ATAD3R5_Human	QTQERLSSASPEQVEAGECALQEYEAAVEQLLESQITRAQAERERTLSSETRQBQARA	84
ATAD3R1_Human	-----EYEAAVEQLLESQITRAQAERERTLSSETRQBQARA-----	130
ATAD3C_Human		
ATAD3A5_Human	QYQDELLARQRYEDQLHQQQLLNEENLRHQEESVQIQEAMRRAATVEREMELRHINEMLEKVE	190
ATAD3A1_Human	QYQDELLARQRYEDQLHQQQLLNEENLRHQEESVQIQEAMRRAATVEREMELRHINEMLEKVE	238
ATAD3R5_Human	QYQDELLARQRYEDQLHQQQLLNEENLRHQEESVQIQEAMRRAATVEREMELRHINEMLEKVE	144
ATAD3R1_Human	QYQDELLARQRYEDQLHQQQLLNEENLRHQEESVQIQEAMRRAATVEREMELRHINEMLEKVE	190
ATAD3C_Human	-----QLVN--EDLRHQEESVQI-----	41
	** * - *****	
ATAD3A5_Human	AEARARAAAEKRNADITIREQIRLKAASEHQITVLESIRYASTLPGESEKAFVITDRDHWYAT	250
ATAD3A1_Human	AEARARAAAEKRNADITIREQIRLKAASEHQITVLESIRYASTLPGESEKAFVITDRDHWYAT	298
ATAD3R5_Human	TEARARAAAEKRNADITIREQIRLKAASEHQITVLESIRYASTLPGESEKAFVITDRDHWYAT	204
ATAD3R1_Human	TEARARAAAEKRNADITIREQIRLKAASEHQITVLESIRYASTLPGESEKAFVITDRDHWYAT	250
ATAD3C_Human	-----HSEKTELESIRYASTLPGESEKAFVITDRDHWYAT-----	74
	* - * *****	
ATAD3A5_Human	VAGLTLAVGVYSANMATAVTRGRIEARLGNPILVRETSRITVLEALRHPITQ--VSRRLS	309
ATAD3A1_Human	VAGLTLAVGVYSANMATAVTRGRIEARLGNPILVRETSRITVLEALRHPITQ--VSRRLS	357
ATAD3R5_Human	VAGLTLAVGVYSANMATAVTRGRIEARLGNPILVRETSRITVLEALRHPITQ--VSRRLS	263
ATAD3R1_Human	VAGLTLAVGVYSANMATAVTRGRIEARLGNPILVRETSRITVLEALRHPITQ--VSRRLS	309
ATAD3C_Human	VAGLTLAVGVYSANMATAVTRGRIEARLGNPILVRETSRITVLEALRHPITQVSRRLS	134
	***** * - * *****	
ATAD3A5_Human	RPQDALEGVVLSPLKARVRDIAATENTENRSLYRHILLYGEPFSTGETLFAHIALHS	369
ATAD3A1_Human	RPQDALEGVVLSPLKARVRDIAATENTENRSLYRHILLYGEPFSTGETLFAHIALHS	417
ATAD3R5_Human	RPQIVLEGVVLSPLKARVRDIAATENTENRSLYRHILLYGEPFSTGETLFAHIALHS	323
ATAD3R1_Human	RPQIVLEGVVLSPLKARVRDIAATENTENRSLYRHILLYGEPFSTGETLFAHIALHS	369
ATAD3C_Human	RPQIVLEGVVLSPLKARVRDIAATENTENRSLYRHILLYGEPFSTGETLFAHIALHS	194
	***** * - * *****	
ATAD3A5_Human	GMDYAIMTGSIVAPMCREGVTAMHLLFDWANTSRRLLLFVDEADAPLREKATEKISDIL	429
ATAD3A1_Human	GMDYAIMTGSIVAPMCREGVTAMHLLFDWANTSRRLLLFVDEADAPLREKATEKISDIL	477
ATAD3R5_Human	GMDYAIMTGSIVAPMCREGVTAMHLLFDWANTSRRLLLFVDEADAPLREKATEKISDIL	383
ATAD3R1_Human	GMDYAIMTGSIVAPMCREGVTAMHLLFDWANTSRRLLLFVDEADAPLREKATEKISDIL	429
ATAD3C_Human	GMDYAIMTGSIVAPMCREGVTAMHLLFDWANTSRRLLLFVDEADAPLREKATEKISDIL	254
	***** * - * *****	
	Sensor 1 Arg finger	
ATAD3A5_Human	EATLNAPLYRSGQHSNHEPMLVLSNLEPQFDCAINSRITVWVHFDLPQGERERLVRMYP	489
ATAD3A1_Human	EATLNAPLYRSGQHSNHEPMLVLSNLEPQFDCAINSRITVWVHFDLPQGERERLVRMYP	537
ATAD3R5_Human	EATLNAPLYRSGQHSNHEPMLVLSNLEPQFDCAINSRITVWVHFDLPQGERERLVRMYP	443
ATAD3R1_Human	EATLNAPLYRSGQHSNHEPMLVLSNLEPQFDCAINSRITVWVHFDLPQGERERLVRMYP	489
ATAD3C_Human	EATLNAPLYRSGQHSNHEPMLVLSNLEPQFDCAINSRITVWVHFDLPQGERERLVRMYP	314
	***** * - * *****	
	Sensor 2	
ATAD3A5_Human	DEYVLEKATEGERRLILAQFDYSEKICSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASIDGVL	549
ATAD3A1_Human	DEYVLEKATEGERRLILAQFDYSEKICSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASIDGVL	597
ATAD3R5_Human	DKCVLEKATEGERRLILAQFDYSEKICSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASIDGVL	503
ATAD3R1_Human	DEYVLEKATEGERRLILAQFDYSEKICSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASIDGVL	549
ATAD3C_Human	DEYVLEKATEGERRLILAQFDYSEKICSEVARLTEGMSGREIAQLAVSWQATAYASIDGVL	374
	***** * - * *****	
ATAD3A5_Human	TEAMMDTRVQDAVQQBQQIMCMLKAESEGRGDEKESPS-----	586
ATAD3A1_Human	TEAMMDTRVQDAVQQBQQIMCMLKAESEGRGDEKESPS-----	634
ATAD3R5_Human	TEAMMDACVQDAVQQYRQIMCMLKAESEGRGVEHPLSGVQGETLTSWISLATDPSYPCLAG	563
ATAD3R1_Human	TEAMMDACVQDAVQQYRQIMCMLKAESEGRGVEHPLSGVQGETLTSWISLATDPSYPCLAG	609
ATAD3C_Human	TEAMMDACVQDFVQQBQQIMCMLKAESEGRGDEKESPS-----	411
	***** * - * *****	
ATAD3A5_Human		
ATAD3A1_Human		
ATAD3R5_Human	PCFTRICSSMGIIGLCGPLSPMSGGGRFCCPCHPLL 602	
ATAD3R1_Human	PCFTRICSSMGIIGLCGPLSPMSGGGRFCCPCHPLL 648	
ATAD3C_Human		

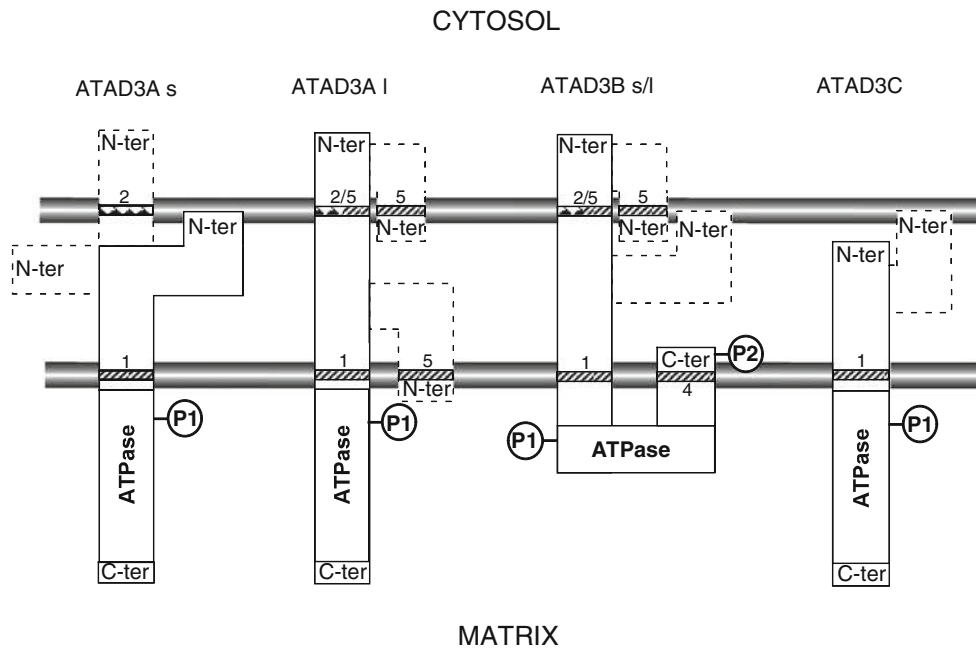


Fig. 3 Models for membrane insertion of ATAD3 variants. According to current data, the ATPase part of ATAD3 is located in the mitochondrial matrix. For ATAD3As (s for small), which could have two helices or more, the N-terminal part is either in the cytosol or in the intermembrane space. For ATAD3Al (l for long) which clearly contains a second transmembrane helix (from a differential splicing), the N-terminal is either in the cytosol or returns in the matrix. For ATAD3B, the case is similar to ATAD3A except that the C-terminus could return to the intermembrane space. Finally, ATAD3C has probably the N-terminal

part in the intermembrane space. The transmembrane sequences (numbered as in Fig. 3) in hatched correspond to sequences identified by all predictive softwares (DAS, TOPpred, TMPred and HMMTOP). The transmembrane sequences with dots (numbered as in Fig. 3) correspond to sequences identified by one or two predictive softwares (TMPred and HMMTOP). These last zones of hydrophobicity could correspond to transitory forms of membrane insertion. Major phosphorylation sites are indicated by P1 and P2

from astrocytoma. We showed that in an oligodendroglioma cell line (HS683), in addition to the 1p deletion (1pLOH), the second ATAD3B gene had disappeared by deletion, leaving only one ATAD3A copy from the 4 initial ATAD3A/B genes. This triple gene loss could be the genetic signature of the selective deletion of a tumor suppressor gene (heterozygosity loss).

Since ATAD3Bl is detectable in cell lines derived from astrocytoma but not in those derived from oligodendroglioma, it is now interesting to explore the expression of ATAD3Bl in biopsies of human glial tumors in order to see if ATAD3Bl could be a positive marker of astrocytoma compared to oligodendroglioma and healthy tissue adjacent to surgical resection or conversely a negative marker for oligodendroglioma against astrocytoma.

In vitro ectopic expression of ATAD3As and ATAD3Bl in cells derived from oligodendrogliomas induced also a notable inhibition of cell growth by increasing the duration of G1 phase of cell cycle (Fig. 4, (Hubstenberger et al. 2008)). This observation suggests also that ATAD3 has the properties of an anti-oncogene in this model. Confirming this finding, a proliferative effect is observed by under-expression of ATAD3 with SiRNA in U373 cells, a cell line derived from astrocytoma. However, this observation may

not be generalized because in the GHD-1 cells, cell line derived from carcinoma of the hypopharynx, the transfection of SiRNA induces an apoptotic effect associated with dysfunction of cytokinesis and endo-replication (Schaffrik et al. 2006). This is not contradictory, since apoptosis is intimately linked to processes of cell cycle progression. Moreover, in HeLa cells, over-expression of ATAD3As showed a pro-apoptotic effect (Da Cruz et al. 2003). It is possible that in different cell lines derived from tumors, ATAD3 can be either dispensable or indispensable depending on the degree of differentiation or transformation. In HeLa and GHD-1 cells, over-expression of ATAD3s/l does not induce a significant slowdown of the cell cycle but here the relative over-expression of ATAD3 was not measured (Schaffrik et al. 2006).

In parallel, we have also shown that ectopic expression of ATAD3As and ATAD3Bl in an oligodendroglioma derived cell line (chemosensitive) induces in short- and long-term chemoresistance against different genotoxic agents (Hubstenberger et al. 2008). This observation was confirmed by the under-expression of ATAD3As and 3Bl in an astrocytoma derived cell line (chemoresistant) which makes them chemosensitive. The effect of ATAD3As and ATAD3Bl on short-term resistance suggests that ATAD3A and ATAD3B may protect cells

Fig. 4 Effects of under- and overexpression of ATAD3 in different cancer cells. Effects on proliferation, apoptosis and chemo- or radio-resistance of ATAD3 expression are recapitulated, describing the cellular model used, the studied isoform and the technique involved. Corresponding references are indicated

Cellular models	Techniques Studied/isoformes	Effects	References
COS Kidneycells-SV40/monkey	Surexpression transitoire ATAD3As/BI	↘ proliferation	[8]
HS683 Oligodendrogloma/human	Surexpression transitoire/stable ATAD3As/BI	↘ proliferation ↘ apoptosis	[8]
U373 Astrocytoma/human	Surexpression transitoire/stable ATAD3As/BI	↘ proliferation	[8]
U373 Astrocytoma/human	SiRNA ATAD3As/BI	↗ proliferation ↗ apoptosis	[8]
GHD-1 Hypopharynx carcinoma/human	SiRNA ATAD3Bs/BI	↗ apoptosis	[9]
GHD-1 Hypopharynx carcinoma/human	Surexpression transitoire ATAD3Bs/BI	noeffect	[9]
HeLa Cervixcancer/human	Surexpression transitoire ATAD3As	↗ apoptosis	[2]
A549 Lungcancer/human	SiRNA ATAD3As	↘ chemoresistance	[24]
H838 Lungcancer/human	SiRNA ATAD3As	↘ chemoresistance	[24]
U373 Astrocytoma/human	Surexpression ATAD3As/BI	↗ chemoresistance	[8]
HS683 Oligodendrogloma/human	Surexpression ATAD3As/BI	↗ chemoresistance	[8]
RAJI Lymphoma/human	Protéomiquedifférentielle ATAD3Bs/BI	↗ radioresistance	[27]

against genotoxic agents by improving their rapid elimination (permeability, chemical modification and degradation). The long-term resistance suggests that ATAD3As and ATAD3BI could increase the efficiency of the cell cycle arrest and DNA repair. Therefore, ATAD3 could be a target for optimizing the chemotherapeutic treatment of astrocytoma. Oligodendrogloma is a chemosensitive glioma which is characterized by loss of heterozygosity (LOH 1p), whereas chemoresistant astrocytoma is an aggressive tumor unaffected by the 1pLOH, we can imagine that within the population of glial precursor cells, the loss of ATAD3 genes could participate in their transformation into oligodendrogloma and contribute to their chemosensitive phenotype. Thus, ATAD3B is a putative marker which could enable the discrimination of oligodendrogloma from astrocytoma and surrounding healthy tissue (Hubstenberger et al. 2008). More recently and confirming

these results, it has been shown that ATAD3A constitutes an anti-apoptotic marker in lung tumors (Fang et al. 2010) and a radioresistance marker in non-Hodgkin lymphoma and uterine cervical cancer (Jiang et al. 2009; Chen et al. 2011).

ATAD3, to a function

Today, data on ATAD3 are still quite few and some results are contradictory. However ATAD3 localization and its membrane topology are now better confirmed.

ATAD3 has been originally described twice as producing auto-immune responses in cancer patients (Gires et al. 2004; Geuijen et al. 2005). These results imply that ATAD3 could be present outside the cell, accessible to the immune system and to the antibodies. To date, achieved approaches have not

yet confirmed this location and ATAD3 has been visualized only in mitochondria. We can only exclude those different processes, such as a cleavage or a process of differential excision/splicing that could relocate ATAD3 in the extracellular compartment. However, the acquired autoimmune response against ATAD3 could result from dead or damaged cells produced by the anti-tumor treatment suffered by these patients, noting that ATAD3 is an abundant and relatively stable protein.

However, ATAD3 is now clearly considered as an inner-membrane mitochondrial protein. ATAD3 membrane topology is now nearly elucidated but doubts remain concerning the exact localization of the N-terminus (Gilquin et al. 2010a; Gilquin et al. 2010b; Fang et al. 2010). The C-terminus is located in the mitochondrial matrix and could be associated with the nucleoid (mitochondrial DNA and associated proteins) but this interaction may be indirect (Bogenhagen et al. 2008).

ATAD3A has been also shown to bind Frataxin (Correia et al. 2008), a mitochondrial protein from which mutations in exon 1 can cause Friedreich's ataxia (FRDA), a neurodegenerative disease. Frataxin interacts with mortalin/GRP75, an homologue of the yeast chaperone protein ssq1 which integrates the Iron-sulfur group into proteins imported into mitochondria (Shan et al. 2007). Another frataxin interactant is ISD11, a component of the Nfs/ICSU complex. These two proteins are also components of the Fe/S assembly complex (CSI) where Nfs, a cysteine disulfurase, removes sulfur from cysteine and converts it into alanine. These two proteins are essential for the biogenesis of the iron-sulfur group. These results suggest that Frataxin binds the complex Nfs/ICSU through ISD11 and that ATAD3 could be associated to this function.

In conclusion, we would insist on the role that ATAD3 could have in mitochondria-reticulum interactions as well as in inner-outer mitochondrial membranes interactions. Indeed, ATAD3 seems to be located at contact points where the outer membrane and the inner membrane of mitochondria are juxtaposed, and these contact points are in relation to contact areas between the endoplasmic reticulum and mitochondria (Gilquin et al. 2010a; Hubstenberger 2006; Fang et al. 2010). These contact areas are now considered to be the transit zones for many molecules such as neo-synthesized proteins, calcium and lipids such as phosphatidylserine and cholesterol. Also, the invalidation of ATAD3 which induces a fragmentation of the mitochondrial network and a loss of interaction between mitochondria and reticulum, induces a notable reduction of cholesterol flow between these compartments (Hoffmann et al. 2009; Gilquin et al. 2010a; Hubstenberger 2006; Gilquin et al. 2010b).

ATAD3 could therefore contribute to define structures capable of promoting mitochondrial inner-outer membranes as well as mitochondrial outer membrane-reticulum interactions, contributing to the transit of some molecules. ATAD3 could also, more generally, contribute to mitochondrial homeostasis by participating in a recycling/neosynthesis mechanism of

mitochondrial constituents and this related to endoplasmic reticulum (Kommann 2010; Kommann and Walter 2010; Hayashi et al. 2009). However, we are not certain that there is a direct causality between invalidation of ATAD3 and modification of the mitochondrial network structure. This process could be indirect and associated with another mitochondrial dysfunction.

The function of this ATPase still remains an enigma although it is revealed essential for proper functioning of the mitochondrial network. Its abundance and its ubiquitous expression certainly reflect an important role in the cell and the search for its partners is now an essential question to discover its function. However, these approaches must be established pertinently because the high abundance of ATAD3, its membrane localization and its very basic pHi (pI=10) are major sources of artifacts. The study of a differentiation model is now necessary to know the action level of ATAD3 by precisely studying the cellular effects of its invalidation or over-expression.

Acknowledgements We are very grateful to Pr. Valdur SAKS who gave us a critical reading of the manuscript and also to Dr. Arnaud HUBSTENBERGER with whom a big piece of work was done on ATAD3. Shuijie LI is supported by Hubert Curien Program PhD fellowship. I'm sincerely and profoundly grateful to Yulia DIMITROVA for constant supports and fruitful discussions.

Conflict of interest The authors declare no conflict of interest.

References

- Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV (2003) An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol* 4(10):R69
- Da Cruz S, Xenarios I, Langridge J, Vilbois F, Parone PA, Martinou JC (2003) Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 278(42):41566–71
- Frickey T, Lupas AN (2004) Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* 146:2–10
- Kamath RS, Ahringer J (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 30:313–21
- Hoffmann M, Bellance N, Rossignol R, Koopman WJ, Willems PH, Mayatepek E, Bossinger O, Distelmaier FC (2009) *elegans* ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development. *PLoS One* 4(10):e7644
- Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, Hubstenberger A, Gay O, Merle N, Assard N, Fauvarque MO, Tomohiro S, Kuge O, Baudier J (2010a) The AAA+ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membrane. *Mol Cell Biol* 30(8):1984–96
- Hubstenberger A (2006) MSBP, une protéine identifiée comme une cible de la S100B, impliquée dans la distribution subcellulaire des mitochondries. Thèse de l'Université J. Fourier 2006. http://tel.archives-ouvertes.fr/docs/00/17/52/59/PDF/Arnaud_Hubstenberger.pdf
- Hubstenberger A, Labourdette G, Baudier J, Rousseau D (2008) ATAD3A and ATAD3B are distal 1p-located genes differentially expressed in human glioma cell lines and present in vitro anti-oncogenic and chemoresistant properties. *Exp Cell Res* 314:2870–2883

- Schaffrik M, Mack B, Matthias C, Rauch J, Gires O (2006) Molecular characterization of the tumor-associated antigen AAA-TOB3. *Cell Mol Life Sci* 63(18):2162–2174
- He J, Mao CC, Reyes A, Sembongi H, Di Re M, Granycome C, Clippingdale AB, Fearnley IM, Harbour M, Robinson AJ, Reichelt S, Spelbrink JN, Walker JE, Holt IJ (2007) The AAA+protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *J Cell Biol* 176(2):141–146
- Wang Y, Bogenhagen DF (2006) Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 281(35):25791–802
- Bogenhagen DF, Rousseau D, Burke S (2008) The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* 283(6):3665–3667
- Hubstenberger A, Merle N, Charton R, Brandolin G, Rousseau D (2010) Topological analysis of ATAD3A insertion in purified human mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 42(2):143–50
- Simmons DM, Voss JW, Ingraham HA, Holloway JM, Broide RS, Rosenfeld MG, Swanson LW (1990) Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. *Genes Dev* 4(5):695–711
- Sassoon D, Lyons G, Wright WE, Lin V, Lassar A, Weintraub H, Buckingham M (1989) Expression of two myogenic regulatory factors myogenin and MyoD1 during mouse embryogenesis. *Nature* 341(6240):303–307
- Hinterberger TJ, Sassoon DA, Rhodes SJ, Konieczny SF (1991) Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Dev Biol* 147(1):144–156
- Pownall ME, Gustafsson MK, Emerson CP Jr (2002) Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:747–783
- Smith JS, Alderete B, Minn Y, Borell TJ, Perry A, Mohapatra G, Mohapatra G, Hosek SM, Kimmel D, O'Fallon J, Yates A, Feuerstein BG, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB (1999) Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human glioma and their association with histological subtype. *Oncogene* 18:4144–4152
- Correia AR, Pastore C, Adinolfi S, Pastore A, Gomes CM (2008) Dynamics, stability and iron-binding activity of frataxin clinical mutants. *FEBS J* 275(14):3680–90
- Shan Y, Napoli E, Cortopassi G (2007) Mitochondrial frataxin interacts with ISD11 of the NFS1/ISCU complex and multiple mitochondrial chaperones. *Hum Mol Genet* 16(8):929–41
- Gires O, Münz M, Schaffrik M, Kieu C, Rauch J, Ahlemann M, Eberle D, Mack B, Wollenberg B, Lang S, Hofmann T, Hammerschmidt W, Zeidler R (2004) Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci* 61(10):1198–207
- Geuijen CA, Bijl N, Smit RC, Cox F, Throsby M, Visser TJ, Jongeneelen MA, Bakker AB, Kruisbeek AM, Goudsmit J, de Kruif JA (2005) Proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. *Eur J Cancer* 41(1):178–87
- Gilquin B, Cannon BR, Hubstenberger A, Moulouel B, Falk E, Merle N, Assard N, Kieffer S, Rousseau D, Wilder PT, Weber DJ, Baudier J (2010b) The calcium-dependent interaction between S100B and the mitochondrial AAA-ATPase ATAD3A and the role of this complex in the cytoplasmic processing of ATAD3A. *Mol Cell Biol* 30(11):2724–36
- Fang HY, Chang CL, Hsu SH, Huang CY, Chiang SF, Chiou SH, Huang CH, Hsiao YT, Lin TY, Chiang IP, Hsu WH, Sugano S, Chen CY, Lin CY, Ko WJ, Chow KC (2010) ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *J Cell Sci* 123(7):1171–80
- Kormann B (2010) Le complexe ERMES : une connexion haut débit entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries. *Médecine/Science* (2)
- Kormann B, Walter P (2010) ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci* 123:1389–93
- Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP (2009) MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 19(2):81–8
- Jiang Y, Liu X, Fang X, Wang X (2009) Proteomic analysis of mitochondria in Raji cells following exposure to radiation: implications for radiotherapy response. *Protein Pept Lett* 16(11):1350–9
- Chen TC, Hung YC, Lin TY, Chang HW, Chiang IP, Chen YY, Chow KC (2011) Human papillomavirus infection and expression of ATPase family AAA domain containing 3A, a novel anti-autophagy factor, in uterine cervical cancer. *Int J Mol Med* 28(5):689–96. doi:10.3892/ijmm.2011.743

RESULTATS

ARTICLE I

Résumé de l'article I

ATAD3 est un facteur limitant le remodelage mitochondrial et la lipogenèse des adipocytes blancs 3T3-L1

ATAD3 est une ATPase ubiquitaire et vitale localisée dans la membrane interne des mitochondries, mais la fonction associée à son activité ATPase est encore inconnue. Cependant, l'inactivation d'ATAD3 bloque le développement de *C. elegans* et de *D. melanogaster*, à des stades nécessitant une augmentation importante de la masse mitochondriale, en perturbant le réseau mitochondrial et ses interactions avec le réticulum endoplasmique. Les premiers organes affectés par l'inactivation d'ATAD3 dans le développement du *C. elegans* (stade L1) sont le tissu adipeux intestinal, ressemblant aux adipocytes blancs des mammifères, et les gonades. Pour aller plus loin dans la compréhension de la fonction mitochondriale d'ATAD3, nous avons donc utilisé la lignée cellulaire de souris 3T3-L1 comme modèle cellulaire de tissu adipeux blanc de mammifères. Ces cellules ont déjà été bien caractérisées car il est connu que l'adipogenèse/lipogenèse induite par l'insuline est associée à une augmentation significative de la masse mitochondriale, couplée à un remodelage mitochondrial, celui-ci précédant l'étape de stockages de triglycérides. Par des modifications stables et transitoires du niveau d'ATAD3 dans ces cellules, nous avons montré que (i) ATAD3 est surexprimée précocement au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1 induite par l'insuline, au début de l'augmentation de la masse mitochondriale et des processus de remodelage mitochondriaux (ii) ATAD3 est essentielle et limitante pour la différenciation adipocytaire et la lipogenèse (iii) L'inactivation d'ATAD3 inhibe le remodelage mitochondrial et l'augmentation de la masse mitochondriale, sans affecter la voie de transduction de l'insuline ni l'augmentation, en aval, de la quantité de certaines protéines mitochondriales codées par l'ADN nucléaire comme VDAC et ANT. Cependant l'inactivation inhibe l'accumulation d'autres protéines mitochondriales (codées par l'ADN nucléaire ou mitochondrial) et de la forme active de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et (iiii) ces effets peuvent être restaurés par la ré-expression d'ATAD3 ou complétés par la surexpression de Drp1, mais pas par celle de Mfn2, deux acteurs principaux des processus fission / fusion.

Ces résultats montrent que, dans les adipocytes blancs tels que les cellules 3T3-L1, ATAD3 contribue principalement à la biogenèse mitochondriale liée au remodelage du réseau

mitochondrial et à l'activation, en aval, des processus métaboliques mitochondriaux impliqués dans la formation de gouttelettes lipidiques. Nous précisons ici et ainsi son niveau d'action.

ATAD3 is a limiting factor in mitochondrial remodeling and lipogenesis in white adipocyte 3T3-L1 cells

Shuijie LI^{1,2}, Yiao YIAO³, Rui XU³, Cécile COTTET^{1,2}, Uwe SCHLATTNER^{1,2},
Kan LIAO^{3,4} and Denis ROUSSEAU^{1,2,4,5}

¹ Laboratory for Fundamental and Applied Bioenergetic, Université Joseph Fourier, Grenoble, France.

² Laboratory for Fundamental and Applied Bioenergetic INSERM U1055, Grenoble, France.

³ Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai, China.

⁴ Both authors contributed equally to the work.

⁵ Corresponding author: Denis ROUSSEAU INSERM U1055 Joseph Fourier University
BP53 38041 Grenoble Cedex France, Tel 04 76 63 56 00 Fax 04 76 51 42 18
E-mail: Denis.Rousseau@ujf-grenoble.fr

Key words: Mitochondria, ER, adipocyte, 3T3-L1, ATAD3, Drp1, Mfn2, fission.

ABSTRACT

ATAD3 is a ubiquitous and vital ATPase located in the inner membrane of mitochondria but whose functions are still unknown. However, invalidation of ATAD3 blocks the development of *C. elegans* and *D. melanogaster* at stages requiring a significant increase in mitochondrial mass, by disturbing the mitochondrial network and its interactions with the endoplasmic reticulum. ATAD3 depletion in *C. elegans* development first affects larvae white adipocyte-like intestinal fat tissue and gonads. Here we use the mouse 3T3-L1 cell line as a homologous mammalian white adipose cellular model to analyze ATAD3 mitochondrial function. Following insulin-induced adipogenesis/lipogenesis, 3T3-L1 cells also show a significant increase in mitochondrial mass coupled with mitochondrial remodeling that precedes triglycerides storage. By stable and transient modifications of ATAD3 level in these cells, we show that (i) ATAD3 is overexpressed early during insulin-induced 3T3-L1 differentiation at the onset of mitochondrial mass increase and remodeling processes (ii) ATAD3 is essential and limiting for *in vitro* adipocyte differentiation and lipogenesis (iii) ATAD3 down-regulation inhibits mitochondrial remodeling and mitochondrial mass increase without affecting insulin signalling or the increase of some nuclear-encoded mitochondrial proteins like VDAC or ANT, but by inhibiting accumulation of other mitochondrial proteins (nuclear- and mitochondrial-encoded) and of the active form of Acetyl-CoA Carboxylase (ACC), and (iiii) these effects can be rescued by ATAD3 re-expression or complemented by overexpression of Drp1, but not by Mfn2, two main actors in mitochondrial fission/fusion processes. These results show that, in white adipocyte-like 3T3-L1 cells, ATAD3 contributes mainly to mitochondrial biogenesis-linked remodeling and down-stream activation of mitochondrial metabolic processes involved in lipid droplet formation, thus specifying ATAD3 action level.

INTRODUCTION

Mitochondria are central actors of cell metabolism, first as the main cellular ATP supplier but secondary and importantly as a crucial actor in lipid metabolism. In deed, mitochondria are the cross-talk center for carbohydrate and lipid metabolisms and storages. If mitochondria are well known to be involved in lipolysis, by β -oxidation, they are also involved in lipogenesis, for lipid storage, in adipocytes and other tissues (1 Novikoff 1980, 2 Frayn 2006, 3 Goodman 2008, 4 Walther 2009, 5 Kazantzis 2011), but also for other lipid synthesis and exports such as the conversion of phosphatidylserine into phosphatidylethanolamine for further exports or synthesis of phosphatidylcholine (6 Voelker 2003, 7 Vance JE 2008), and also for conversion of cholesterol, for mitochondrial steroids synthesis in endocrine cells (8 Miller 2011). Furthermore, mitochondria are dynamic as they need to be made, divided, moved away, docked, recycled or destroyed (9 Westermann 2010, 10 Kageyama 2011) and it may exist by the way a number of regulation processes to control their metabolic activities and destiny (11 Osman 2011).

Because of all these associated functions, inappropriate mitochondrial mechanisms may give rise to many different pathologies such can be myopathies, neuropathies, cardiopathies, obesity, diabete and probably some other pathologies like cancers (12 Choo 2003, 13 Campello 2010).

Among the thousand mitochondrial proteins in human (14 Meisinger 2008, 15 Pagliarini 2008), ATAD3 was discovered in 2003 as gene target of c-Myc (16 Zeller et al. 2003, 17 Li and Rousseau 2012). ATAD3 protein was later identified in patients with carcinoma as an antigen arising from the autoimmune response (18 Gires 2004, 19 Schaffrik 2006). ATAD3 was also found overexpressed in these carcinomas and its localization was then assessed to be mitochondrial (19 Schaffrik 2006). Proteomic approaches from murine tissues identified ATAD3 as a protein associated with the inner membrane (20 Da Cruz 2003, 21 Da Cruz and Martinou 2008). ATAD3 has been also shown to be essential for early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans* (22 Piano 2002; 23 Kamath and Ahringer 2003; 24 Simmer 2003; 25 Sonnichsen 2005; 26 Hoffmann 2009) and *Drosophila melanogaster* (27 Guertin 2006, 28 Gilquin 2010a). The protein is therefore involved in an essential mitochondrial function which has emerged in all pluri-cellular organisms and was developed in primates, as ATAD3 has three encoding genes in hominidae (17 Li and Rousseau 2012). Improved researches for

ATAD3 localisation and topology had contributed to discover how ATAD3 is inserted into the inner mitochondrial membranes (29 Bogenhagen 2008, 30 Hubstenberger 2010, 31 Gilquin 2010b, 17 Li 2012). ATAD3 presents a C-terminal region (a.a. 337–586) constituting an ATPase core domain, with the well known Walker sequences, which locates inside the mitochondrial matrix, and a specific N-terminal region (a.a. 1–336) located in the intermembrane space or in interaction with cytoplasmic partners. To date, and even if ATAD3 has a clear ATPase molecular signature and is today efficiently purified as full length (32 Li 2012), no one has been able to identify its intrinsic in vitro ATPase activity.

It can be noted at this time that ATAD3 expression is highly related to cancer initiation and progression (18 Gires 2004, 33 Hubstenberger 2008, 34 Fang 2010, 35 Chen 2011) as well as chemoresistance and apoptosis processes (33 Hubstenberger 2008, 36 Huang 2011), showing again the major mitochondrial function that may be sustained by ATAD3 activity.

Finally, it is well admitted now that mitochondrial biology is dependent of the one of the endoplasmic reticulum (ER). Mitochondria appear in deed more or less tethered by ER (37 de Brito 2008). These interactions insure different metabolic fluxes such as lipid transfers, in both ways (6 Voelker 2003, 7 Vance 2008), Calcium communication (38 Wang 2000, 39 Csordás 2006, 40 Szabadkai 2006, 41 Goetz 2007) and nuclear-encoded mitochondria protein synthesis and translocation (42 de Brito 2010). By the way, Chow and coll. already shown a possible interaction of ATAD3 with proteins of contact sites (43 Chiang 2012) and another interaction with Mitochondrial Scaffolding protein 1 (MICS-1) has been recently published (44 Hoffman 2012).

ATAD3 is expressed in all tissues and cells studied so far. Moreover ATAD3 has a major cellular function because ATAD3 invalidation in *C. elegans* and *D. melanogaster* lead to developmental arrest at larvae stages (23 Kamath 2003, 26 Hoffmann 2009, 28 Gilquin 2010a), at a time where animals need to feed to continue development. The first organs being affected by ATAD3 depletion, in *C. elegans* development (stage L1), are the adipocyte-like intestinal fat tissue and the gonads (26 Hoffman 2009). Because intestinal worm cells (like endodermal derivative) play the role of white adipocytes (45 McKay 2003), we decided to use a mammalian white adipocyte-like cellular model to go inside molecular events that can link ATAD3 function to adipogenesis and lipogenesis.

For this purpose we used the 3T3-L1 murine cellular model as these cells have been extensively studied for the understanding of molecular processes associated with lipids storage, or as usually said, adipocyte differentiation. These cells undergo complete

differentiation, observed by accumulation of lipid droplets following induction by Insuline, Dexamethasone and Isobutylmethyl Xanthine. During this process of adipogenesis and lipogenesis, a significant mitochondrial mass increase was previously and reproducibly identified, just preceding lipid storage (46 Wilson-Fritch 2003, 47 Kita 2009, 48 Gao 2011). Furthermore, evolution of mitochondrial proteomic of 3T3-L1 along differentiation has been well described more recently and shows that overexpressed proteins are mostly linked to TCA cycle, fatty acid oxidation and ATP synthesis (49 Guo 2008, 50 Cho 2009, 51 Newton 2011). This idea of mitochondrial-linked lipogenesis is also confirmed, *in vitro* and *in vivo*, in humans by the strong correlation existing between mtDNA copy number and lipogenesis (52 Kaaman 2007, 53 Bogacka 2005). The major actual hypotheses concerning the contribution of mitochondria to lipid storage are one, the ATP supply to metabolic processes involved in lipid storage and second, the mitochondrial export of Citrate, modified in Acetyl-CoA by ATP Citrate Lyase, transformed in Malonyl-CoA by Acetyl-CoA Carboxylase (ACC) through cytoplasmic processes, producing finally triglycerides (through cytoplasmic Fatty Acid Synthase), which are then, with the Fatty Acid Binding Protein (FABP), modified in Fatty acyl-CoA by Acyl-CoA Synthetase (ACS) and then modified in the endoplasmic reticulum to be ultimately transferred into lipid droplets as Triacylglycerol (54 Muoio 1999, 55 Shi and Burn 2004, 56 Guo 2009). Finally, the Triacylglycerol droplets become coated with a monolayer of phospholipid and a cadre of proteins (Perilipin) that stabilizes it within the cytoplasm (57 Blanchette-Mackie 1995). Previous studies by electron microscopy detailed the spatial organisation of cellular organelles during adipogenesis/lipogenesis and shown that the endoplasmic reticulum is the closest compartment next to lipid droplets, before the mitochondria which are juxtaposed (57 Blanchette-Mackie 1995), and that mitochondria increased in density during differentiation (46 Wilson-Fritch et al. 2003). Finally it can be point out that AMPK, a central kinase involved in metabolic control, is one of the principal putative kinase for phosphorylation, and inactivation, of ACC (58 Munday 1988, 59 Vingdeux 2010, 60 Vingdeux 2011).

Considering all this, we investigated the role of ATAD3 during adipocyte differentiation by transient and stable modifications of ATAD3 level. We found that ATAD3 is overexpressed early upon induction of 3T3-L1 differentiation, at the beginning of the mitochondrial mass increase. Stable and transient knock-down of ATAD3 in 3T3-L1 inhibited adipocyte differentiation and lipogenesis in a correlative manner, without affecting insulin pathway neither synthesis of some nuclear-encoded mitochondrial proteins. Inhibition of lipogenesis by ATAD3 knock-down appeared to arise first from inhibition of mitochondrial remodeling

and mass increase, as well as from inhibition of OXPHOS and ACC proteins increase. This inhibition of adipocyte differentiation and lipogenesis can be rescued by ATAD3 re-expression or complemented by Drp1 overexpression, but not by Mfn2, two major actors of mitochondrial fusion/fission and ER tethering processes. These results precise then the action level of ATAD3 in adipocyte differentiation and lipogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Cells, treatments and biopsies:

Cells used in this studied are mice cells (3T3-L1) purchased from ATCC. 3T3-L1 preadipocytes were cultured in a Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco™) containing 10% FBS (Biowest) at 37°C and 5% CO₂ until confluence and maintained for 48h (day 0). Cells were induced to differentiate using MDI induction medium (DMEM containing 10% FBS and 0.5 mM 3-isobutyl-1-methylxanthine, 1 μM dexamethasone, and 1 μM insulin) for 2 days, followed by insulin medium (DMEM containing 10% FBS and 1 μM insulin) for 2 days. The medium was subsequently replaced with fresh culture medium (DMEM with 10% FBS) containing insulin (1μM) every 2 days until the terminal differentiation.

Adipose tissues were taken from C57Bl6 male according to ethnic rules.

ShRNA stable cell lines establishment:

For the stable ATAD3 knockdown cells, a retrovirus-based siRNA expression system was used. The sequences of ATAD3 were 223, 5'-GGACAAATGGAGCAACTTC; 354, 5'-GAACAGCAGTCCAAGCTCA; 530, 5'-ACAACAGCAACTTCTGAAT; 1084, 5'-GCCATCGCAACAAGAAATA; and 1791, 5'-GCAGAAGATGCAGTGGCTT, and cloned into a pSIREN-Retro-Q Vector and shuttled into Knockout RNAi Systems (Clontech Laboratories Inc., Otsu, Shiga, Japan). A control sequence, 50-AACTAGAGCCACAACCTACC-3', was used as control. The retrovirus was produced in HEK293 cell following the manufacturer's protocol and infected the proliferating 3T3-L1 cells. The stable cell lines were selected in medium supplemented with 5 μg/ml of puromycin.

Stable siRNA sequences, from 5' to 3':

ATADshRNA-1084

Top Strand (65bp)

gatccGCCATCGCAACAAGAAATATTCAAGAGATATTTCTTGTTGCGATGGCTTTTTT
ACGCGTg

Bottom Strand (65bp)

aattcACGCGTAAAAAAGCCATCGCAACAAGAAATATCTCTTGAATATTTCTTGTTG
CGATGGCg

ATADshRNA-1791

Top Strand (66bp)

gatccGCAGAAGATGCAGTGGCTTATTCAAGAGATAAGCCACTGCATCTTCTGTTTT
TTACGCGTg

Bottom Strand (66bp)

aattcACGCGTAAAAACAGAAGATGCAGTGGCTTATCTCTTGAATAAGCCACTGCA
TCTTCTGCg

ATADshRNA-223

Top Strand (65bp)

gatccGGACAAATGGAGCAACTTCTTCAAGAGAGAAGTTGCTCCATTTGTCCTTTTT
TACGCGTg

Bottom Strand (65bp)

aattcACGCGTAAAAAAGGACAAATGGAGCAACTTCTCTCTTGAAGAAGTTGCTCCA
TTTGTCCg

ATADshRNA-354

Top Strand (65bp)

gatccGAACAGCAGTCCAAGCTCATTCAAGAGATGAGCTTGGACTGCTGTTCTTTTT
TACGCGTg

Bottom Strand (65bp)

aattcACGCGTAAAAAAGAACAGCAGTCCAAGCTCATCTCTTGAATGAGCTTGGACT
GCTGTTCg

ATADshRNA-530

Top Strand (65bp)

gatccACAACAGCAACTTCTGAATTTCAAGAGAATTCAGAAGTTGCTGTTGTTTTTTTT
ACGCGTg

Bottom Strand (65bp)

aattcACGCGTAAAAAACAACAGCAACTTCTGAATTCTCTTGAATTCAGAAGTTG
CTGTTGTg

control shRNA

Top Strand (65bp)

gatccAACTAGAGCCACAACCTACCTTCAAGAGAGGTAGTTGTGGCTCTAGTTTTTTT
TACGCGTg

Bottom Strand (65bp)

aattcACGCGTAAAAAACTAGAGCCACAACCTACCTTCTCTTGAAGGTAGTTGTGGC
TCTAGTTg

Confocal microscopic analysis:

The cells were stained and incubated with 200nM MitoTracker Green FM at 37°C in a 5% CO₂ incubator for 30 min and 1µg/ml Hoechst 33342 in the dark at 37°C for 10 min. After staining, cells were washed twice with pre-warmed phosphate-buffered saline (PBS), and fresh DMEM medium was added. The cells were then observed under confocal microscope (1000x magnification) (Nikon Eclipse TE200, Leica TCS SP2). Mitochondria 3D-sizing was performed from 3D image acquisitions using ImageJ software.

Electron microscopic analysis:

The cells, adherent to the coverslip, were fixed with 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer pH 7.4 during 2 hours at room temperature. Cells were then washed with buffer and post-fixed with 2% Osmium tetroxyde in the same buffer during 1 hour at 4°C. After extensive washing with distilled water cells were stained with 1% Uranyl acetate pH 4 during 1 hour at 4°C. Cells were then dehydrated through graded alcohol (30%-60%-90%-100%-100%-100%) and infiltrated with a mix of 1/1 epon/alcohol 100% during 1 hour before several baths of fresh epon (Fluka) during 3 hours. Finally, a capsule full of epon was deposited on the surface of the cells and the resin was let to polymerise during 72h at 60°C. The polymerised bloc was then detached from the culture coverslip with hydrofluoric acid 48% during 1 h at room temperature and ultrathin sections of the cell monolayer were cut with an ultramicrotome (Leica). Sections were post-stained with 4% Uranile acetate and 0.4% lead citrate before being observed in an electron microscope at 80 kV (JEOL 1200EX). Images were acquired with a digital camera (Veleta, SIS, Olympus) and morphometric analysis was performed with iTEM software (Olympus).

Oil-Red-O staining:

Cells were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature. After fixation, cells were washed two times with distilled water and one time with 60% isopropanol. The plates were dried for 30 minutes at room temperature and

then cells were stained with filtered Oil-Red-O working solution (stock solution: 3 mg/ml in isopropanol; working solution: 60% Oil-Red-O stock solution and 40% distilled water) for 10 minutes at room temperature, washed 4 times with distilled water, and plates were dried and scanned for images. Oil-Red-O dye was extracted using 100% isopropyl alcohol and measured by spectrophotometry at 500 nm.

Western Blot Analysis

The 3T3-L1 Wild-Type and the three siRNA cell lines were propagated in duplicate in 6-well plates. Proteins were extracted, at various time points, in Laemmli buffer containing 10 mM DTT and 5% 2-mercaptoethanol. Samples (containing same cell amount) were separated by 10% SDS-PAGE and electro-blotted onto nitrocellulose membrane. The nitrocellulose membranes were incubated with blocking buffer containing TBST [Tris-buffered saline (25 mM Tris), plus 0.1% Tween 20] plus 3% non-fat dry milk powder for 1 h at room temperature, further incubated at 4°C overnight with first antibodies in blocking buffer, washed three times for 10 min each with TBST at room temperature, and finally incubated at room temperature for 1 h with secondary antibodies in blocking buffer. After washing three times for 10 min each in TBST, detection was performed by enhanced chemiluminescence (ECL Plus, GE Healthcare). The different antibodies used are the following rabbit antibodies (all from Cell Signalling Technology unless otherwise stated): anti phospho-ACC (Ser79) and anti ACC ; anti-phospho-Akt (Thr308) and anti-Akt (Santa Cruz); anti-phospho-mTOR (Ser2448) and anti-mTOR; anti-phospho-4EBP1 (Ser65); anti-phospho-S6K (Thr389) and anti-p70 S6K; anti-phospho-AMPK (Tyr172, BD Biosciences) and anti-AMPK and mouse antibodies to ANT (Santa Cruz) ; VDAC (Santa Cruz) ; cytochrome C (BD Biosciences) and MitoProfile OXPHOS (Abcam) recognizing ATP5A (ATP synthase F1 complex, subunit 1), UQCRC2 (CytochromeB/c complex, subunit 2), MTCO1 (Cytochrome oxidase, subunit 1), SDHB (Succinate dehydrogenase) and NDUFB8 (NADH dehydrogenase, subunit 8). Tubulin and Actin were rabbit polyclonal antibodies (Santacruz). ATAD3 was detected using rabbit polyclonal antibodies raised against specific parts of ATAD3 and produced by Eurogentec (Anti-Nter (R⁴⁰PAPKDKWSNFDPTG⁵³ in ATAD3As) and used as purified immunoglobulins. Drp1 was detected with rabbit polyclonal antibodies (Abcam) and myc-tagged Mfn2 was detected with anti-Myc mouse monoclonal antibodies (Abcam). Secondary antibodies were anti-mouse, anti-goat or anti-rabbit IgG-HRP conjugate (GE Healthcare). The membranes were occasionally incubated with TBST blocking buffer again with sodium azide

for irreversible inactivation of HRP and re-probed with anti-beta-actin and anti- beta-tubulin antibodies as a loading control. Exposed films were analysed using ImageJ (NIH).

Citrate synthase activity measurements

The reduction of 5',5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DNTB) by citrate synthase (CS) at 412 nm (extinction coefficient $13.6 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) was followed in a coupled reaction with coenzyme A and oxaloacetate. A reaction mixture of 150 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM acetyl-coenzyme A, 3 mM DTNB and 20 μl of cells lysates were incubated at 37°C for 5 min. The reaction was initiated by the addition of 0.5 mM oxaloacetate and the absorbance changes were monitored for 5 min. All assays were normalized to cell amount through western blot quantification of Tubuline and compared to day 0 level.

Measurement of mitochondrial cytochromes content

Cell samples were solubilised with 1% of sodium deoxycholate in phosphate buffer (KH_2PO_4 100mM, pH8). The differential spectrum (reduced by dithionite versus oxidized cytochromes) was obtained by scanning from 400 to 650 nm using a Cary50 Bio spectrophotometer (Varian, Palo Alto, USA). Cytochromes of the respiratory chain were reduced by addition of sodium dithionite crystals to 1 ml of suspension (final concentration of 0.25 mg/ml). The value of peak at 605 nm was used for quantification of respiratory chain cytochrome aa3 contents (cytochrome c oxydase) using the extinction coefficient value equal to $24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (61 Monge 2008).

Transient transfection of siRNA and plasmids

RNA interference was used for transient down-regulation of ATAD3. The sequences of double stranded RNAs for ATAD3 were:

Sequence 1: sens 5'-ACAACAGCAACUUCUGAAUdTdT-3',
antisens 3'-dTdTUGUUGUCGUUGAAGACUUA-5'

sequence 2 : sens 5'-ACAGCAGUCCAAGCUCAAGdTdT-3'
antisens 3'-dTdTUGUCGUCAGGUUCGAGUUC-5'

Plasmid encoding mouse ATAD3 is pCDNA3.1+ based; Drp1- and Mfn2-Myc-encoding plasmids are respectively P26048 and P23213 pCDNA3-based from Addgene.

For transient transfection, Wildtype 3T3-L1 preadipocytes cultured in 6-well plates were transfected with 50nM dsRNAs or 10µg of plasmid DNA using Lipofectamine 2000 (Invitrogen USA) according to the manufacturer's protocol. After 6 hours, the transfection medium was replaced with Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) containing 10% FBS. The samples for Western Blot were collected after 72 hours. The cells prepared for the Oil-Red-O coloration were maintained and replaced with the insulin medium (DMEM containing 10% FBS and 1 µM insulin) until the terminal differentiation (days 8 to 12).

For the stable transfection, Wild-Type and siRNA knock-down 3T3-L1 preadipocytes cultured in dishes were transfected with 5µg/ml of plasmids encoding ATAD3, Drp1 and Myc-tagged Mfn2 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen USA). 72 hours post-transfection, cells were selected with antibiotic G418 (750 µg/ml) during 2 to 3 weeks with medium replaced every 2 days. Selected cells were grown as pools.

Oxymetry

Wild-Type and siRNA 3T3-L1 preadipocytes were isolated by free Ca²⁺ Mitomed solution (EGTA 0.5mM, MgCl₂ 95.21mM, K-Lactobionate 60mM, Taurine 20mM, KH₂PO₄ 3mM, HEPES 20mM, Sucrose 110mM, DTT 0.5mM). Cells were permeabilized with saponin (25µg/mL). The rates of oxygen were determined with high-resolution respirometer oxygraph-2K (OROBOROS Instruments, Austria) in Mitomed solution enriched with 5mM glutamate, 2mM Malate, 2mM ADP and 10mM Succinate as respiratory substrates and for the inhibitor of complex I, 3µM rotenone was added. The measurements were carried out at 25° C and the solubility of oxygen was taken as 240 nmol.

RESULTS

Early ATAD3 increase with mitochondrial remodeling during insulin-induced 3T3-L1 adipogenesis and lipogenesis

Mouse 3T3-L1 cell line pre-adipocytes were induced by insulin to differentiate into adipocytes. Structural and functional mitochondrial parameters, expression of ATAD3 and other mitochondrial proteins, and insulin-related cell signalling were followed along the differentiation process.

We first performed confocal (figure 1A) and electron microscopy (figure 1B) of 3T3-L1 cells upon induction of differentiation. Most strikingly, the mitochondrial network of 3T3-L1 cells underwent a full change in its structure as observed also by others (57 Blanchette-Mackie 1995, 46 Wilson-Fritch 2003, 47 Kita 2009). From a tubular-like network in pre-adipocytes, mitochondria underwent remodeling and proliferated as indicated by increased Mitotracker staining, starting from day 4 (end of adipogenesis), at the beginning of lipid droplet accumulation (lipogenesis), until termination of differentiation around day 12 day. Analysis of confocal images for calculation of 3D-branch length mean of the mitochondrial network revealed a mitochondrial fragmentation process (figure S1-A). Electron microscopy (figure 1B) confirmed that mitochondria became more numerous and smaller in length along with adipocyte differentiation (quantitative 2D analysis, figure S1-B), displaying a morphology with more marked cristae (figures 1B and S2), and are located close to lipid droplets, surrounded by endoplasmic reticulum, as already described previously (57 Blanchette-Mackie et al. 1995). Mitochondria in uninduced cells usually colocalized with intermediate filaments and enlarged granular endoplasmic reticulum (figure S2). Upon differentiation, more granular endoplasmic reticulum (with ribosomes) appeared, mostly in tubular form (figure S2), and the adipocyte-typical coating of certain lipid droplets with Perilipin was observed (figure S2, 1 Novikoff 1980). Triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells as quantified by Oil-Red-O staining indicated that lipogenesis occurs mostly between days 2-4 and day 10 of differentiation (Figure 1C). Thus, lipid and mitochondrial mass seem to increase in parallel.

To have a more quantitative measure for mitochondrial mass increase during 3T3-L1 differentiation, we determined Citrate Synthase activity (figure 2A-1) rather than relying on Mitotracker fluorescence quantification which may be perturbed by lipid-induced quenching. It is also to note that all biochemical data in this study were normalized to constant cell number per assay, determined by manual counting under microscope. Under this normalization, Citrate Synthase activity increased 12-fold between day 0 and day 8 (with a

peak at day 8), suggesting a similar increase in mitochondrial mass. This was confirmed by spectrophotometrical measurements of Cytochrome A3 levels which presented a 11 fold increase between differentiation days 0 and 8 (figure S1C). This also correlated well with increased mitochondrial protein levels determined by immunoblotting of ATAD3 (8 fold) and of prominent mitochondrial proteins like Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC, 6 fold), Adenine Nucleotide Translocase (ANT, 6 fold) and OXPHOS proteins (from 3 to 10 fold), while protein expression of Cytochrome C was increased later and more than hundred fold (figure 2A-2). Similar increases in mitochondrial mass during 3T3-L1 differentiation were also suggested by a 6-fold increase in mtDNA copy number (62 Gao 2011) and previous data from Wilson-Fritch (46 2003). As a functional mitochondrial property we measured mitochondrial respiration by oxymetry with permeabilized 3T3-L1 cells at days 0 and day 8 of differentiation (figure 2B-1). We observed that the respiration rate, per cell, was only moderately modified during differentiation (2 fold increase). ADP respiration (V_{max}) was unchanged between days 0 and 8 but Glutamate/Malate and Succinate respirations were nearly doubled. Considering a mean of 10 fold increase in mitochondrial mass (Citrate synthase activity, mitochondrial proteins levels and Cytochrome A3 content), we may conclude that all mitochondrial metabolic activity may not be devoted to respiration and rather to lipogenesis-linked mitochondrial functions.

ATAD3 protein levels of 3T3-L1 cells are comparable with those of C57Bl6 mouse peritoneal adipose tissue (figure 2A-3). After induction of 3T3-L1 differentiation, expression of ATAD3 increased already at day 3, prior to other mitochondrial proteins tested (protein levels of ANT, VDAC, OXPHOS proteins, Cytochrome C and enzymatic activity of Citrate Synthase). This led us to hypothesize that ATAD3 may be involved in triggering subsequent events like initiation of mitochondrial remodeling and lipogenesis.

As expected, insulin-induction of adipogenesis and lipogenesis involved phosphorylation and activation of mediators in the insulin signalling pathway such as Akt, S6K and 4E-BP (figure 2A-2), contributing to the about 3-fold increase in cellular protein content (figure 2B-2).

ATAD3 knock-down inhibits adipocyte lipogenesis without affecting insulin signaling

To understand whether induction of ATAD3 expression in 3T3-L1 cells is important for either mitochondrial mass increase/remodeling or other related down-stream functions like lipid storage, we performed ATAD3 invalidation by stable lentiviral ATAD3-targeted siRNA expression in 3T3-L1 cells. Five cell lines showing graded reduction in ATAD3 expression

were examined in detail. They all showed strongly inhibited differentiation as revealed by reduced triglyceride accumulation, mostly correlating with the degree of ATAD3 reduction (figure 3A, upper panel). This correlation was quantitatively demonstrated by using two of the cell lines with intermediate (1084) and very low (530) ATAD3 expression (figure 3A, lower panel). To test first whether this inhibition could be due to a decrease in insulin sensitivity or signal transduction, we explored the phosphorylation levels of key transducers of insulin signalling such as Akt (Thr308), mTOR (Ser2448), S6 Kinase (Thr389), and 4E-BP1 (Ser65) (figure 3B). As can be seen and quantified (figure 3C), phosphorylation ratio of Akt is unchanged in the different cell lines, even if total phosphorylation level increased during differentiation. In the same way, mTOR, S6K and 4E-BP1 protein, from up-stream to down-stream targets of insulin signalisation and principal actor in protein synthesis regulation, were increased under their phosphorylated form during differentiation in control and ATAD3 KD cell lines. Concerning AMPK, a major kinase involved in the activation of mitochondrial metabolism under energy stress, we observed that in all cells, control and ATAD3 KD, AMPK is also overexpressed along differentiation, while the p-AMPK/AMPK ratio remained rather constant first and decreased at day 8 (figure 3C). AMPK pathway is therefore largely unaffected by stable knock-down of ATAD3. Finally, actin, here analyzed at similar cell number, appeared slightly increased along differentiation (2-3 times, like overall protein amount). Inhibition of differentiation by stable ATAD3 KD was neither due to a delayed response to insulin since a higher dose of insulin (4 times) and/or of oleic acid (an inducer of adipogenesis and lipogenesis, [63 Xie 2006](#), [64 Singh 2009](#)) at prolonged expose (24 days) were not able to counteract the inhibition of differentiation (figure 3D).

Since invalidation of ATAD3 efficiently blocked differentiation and lipogenesis, ATAD3 appears as a potent limiting factor in these processes. To test whether inhibition of lipogenesis is an early consequence of ATAD3 invalidation, we repeated some experiments with transient ATAD3 siRNA KD in 3T3-L1 cells, following induction of differentiation. Like in stable knock-downs, transient transfection with siRNA inhibited adipocyte differentiation as seen with neutral lipid accumulation measured by Oil-Red-O staining (figure 3E, top left panel). Investigation of elements in insulin signal transduction by Western blotting confirmed that transient ATAD3 KD did not inhibit the insulin signaling pathway (figure 3E, right panel). Phosphorylation levels of Akt, mTOR, S6K and 4E-BP1 were not particularly affected. Specially, no significant changes in p-Akt/Akt ratio was observed, neither for p-AMPK/AMPK ratio (figure 3E, bottom left panel).

ATAD3 invalidation inhibits mitochondrial remodeling and OXPHOS mitochondrial protein and ACC expressions

Next we examined at which steps down-stream of potential ATAD3 functions the adipogenesis and lipogenesis are inhibited. We therefore investigated the impact of ATAD3 KD on mitochondrial dynamic associated with 3T3-L1 differentiation and lipogenesis. We first determined the evolution of Citrate Synthase activity after insulin induction of stable ATAD3 KD and control cells as a quantitative measure for mitochondrial mass (figure 4A). ATAD3 KD cell lines showed a reduced although continuous increase in Citrate Synthase activity (3-5 fold) throughout day 10 as compared to a 12-fold increase in control cells, which however peaks at day 8 and then declines again. This indicates a defect of KD cells to increase Citrate Synthase activity and thus mitochondrial mass upon insulin induction, in particular at days 4-6, when mitochondrial remodeling is observed. Oxygraphy measurements of respiration in control and ATAD3 KD cell lines showed that stable ATAD3 KD, in particular when leading to largely reduced ATAD3 levels (cell line 530), reduces glutamate/malate, ADP and succinate dependent respirations in undifferentiated but mostly in differentiating cells (figure 4B). These results indicate that ATAD KD impacts overall cellular respiration. However, when normalized to Citrate Synthase levels (mitochondrial mass), which are reduced 2-3 times during differentiation, this 2-3 fold respiration inhibition (day 8) is nearly proportional indicating that mitochondrial respiration level *per se* was not modified by ATAD3 KD (figure S3A).

To analyze whether ATAD3 knock-down impacts mitochondrial protein accumulation, Western-blot analysis of different mitochondrial proteins was performed (figure 4C): ANT and VDAC (both nuclear-encoded mitochondrial proteins), and OXPHOS proteins (mitochondria-encoded for COX1, nuclear-encoded for ATP5A, UQCRC2, SDHB and NDUFB8). ATAD3 KD did not affect the insulin-induced increase in expression of ANT and VDAC, despite the reduced mitochondrial mass increase. Thus, synthesis of at least these nuclear-encoded mitochondrial proteins occurs normally in ATAD3 KD cells, as also seen with unaffected cytosolic insulin signaling. However, COX1, ATP5A, UQCRC2, SDHB and NDUFB8 OXPHOS proteins were not normally induced in ATAD3 KD cell lines. Thus, irrespective of being mitochondria-(MTCO1) or nuclear-encoded (ANT, VDAC, ATP5A, UQCRC2, SDHB and NDUFB8), accumulation of these OXPHOS proteins did not properly occur upon ATAD3 invalidation. The observed changes of individual proteins have to be considered in the context of total cellular protein. Although there is a significant inhibition of the total protein increase in the ATAD3 KD cell lines, as compared to controls, this inhibition

is rather minor and of about 25% (figure S3B). This can be reflected however either clone heterogeneity or an impact of ATAD3 siRNA on total protein synthesis.

We then analyzed ACC (Acetyl-CoA Carboxylase 1 or 2), a cytoplasmic enzyme transforming of Acetyl-CoA into Malonyl-CoA, the main precursor for Fatty Acid Synthase which provides finally triglycerides to lipid droplets. ACC levels were drastically reduced in ATAD3 KD cell lines, while the pool of inactivated phosphorylated ACC remained stable (thus decreased ACC/p-ACC ratios), both reducing ACC activity (Figure 4C and S4A). Normally, ACC expression is highly increased during differentiation to trigger triglyceride synthesis, thus our results explain why lipid droplets are reduced in ATAD3 KD cell lines. Although in our experiment both ACC1 and ACC2 are detectable by the used antibody, adipose tissues are generally rich in ACC1 (65 Bianchi 1990, 66 Ha 1996) so we think that the one observed here is ACC1. Finally, we analyzed expression a molecular actor of mitochondria remodeling, the Dynamin-related protein 1 (Drp1), involved in mitochondrial fission and ER-mitochondria tethering processes (42 de Brito 2010) and especially in 3T3-L1 cells (47 Kita 2009). We observed that expression of Drp1 is increased during adipogenesis and lipogenesis and that ATAD3 KD has no effect on the Drp1 expression profile (figure 4C).

To confirm the observation that ATAD3 siRNA stable knock-down does not exhibit an indirect and long term effect on mitochondrial protein synthesis, we checked for expression of mitochondrial proteins expression upon transient siRNA knock-down of ATAD3 in 3T3-L1 cells during induction of differentiation (figure 4D). Transient ATAD3 KD did again not impact the levels of ANT and VDAC, but reduced the different OXPHOS proteins levels. This confirms data obtained from stable siRNA knock-down and the conclusion that synthesis of some mitochondrial proteins (VDAC, ANT) is not dependant of ATAD3 level, while others are (OXPHOS proteins, either nuclear- or mitochondrial-encoded). Transient invalidation of ATAD3 also decreased ACC/p-ACC levels (see figure S4B for quantification), confirming inhibition of ACC activity as a putative mechanism for reduced lipogenesis.

To conclude about the effect of ATAD3 on the regulation of the mitochondrial mass, we performed the measurement of Cytochrome A3 in stable ATAD3 KD and control cell lines at days 0 and 8 of differentiation. (figure S4D). As can be seen, a strong inhibition occurred in ATAD3 KD cell lines (3 to 5 fold), similarly to Citrate synthase activity and to particular mitochondrial proteins levels (OXPHOS).

Finally, we performed confocal and electron microscopy analysis of ATAD3 KD 3T3-L1 cells compared to control cells (figure 5A and 5B). We observed that at days 3 and 6 the

percent of cells with tubular-like network (undifferentiated cells) is highly increased in ATAD3 KD cell lines, like if mitochondrial remodeling was inhibited. Electron microscopy provided more details (figure 5B), showing that mitochondria of ATAD3 KD cells at day 8 appear still tubular-like, typical of undifferentiated cells. In cells undergoing low adipogenesis and lipogenesis, we observed also recurrent accumulations of transition vesicles, probably from endoplasmic reticulum (figure S5) with still the appearance of some tubular endoplasmic reticulum close to small lipid droplets, like in differentiated cells. However mitochondria appeared less numerous compared to control differentiated cells and mitochondria were very round, clear and with very few crests (figures 5B and S5). These results showed that the cellular compartment of mitochondria, ER and lipid droplets are drastically impaired by ATAD3 KD.

To rule out the possibility that increased mitophagy is responsible of ATAD3 KD effects, we treated control and ATAD3 KD cell lines with Chloroquine and Bafilomycine, two inhibitors of autophagy, during the time course of insulin induction (figure S6B). As shown, inhibition of autophagy inhibited lipogenesis, to the same extend for ATAD3 KD and control cell lines. Thus, differences in autophagy could not explain the ATAD3 KD-induced inhibition of lipogenesis.

Since Drp1 expression increased along differentiation of both control and siRNA cell lines (figure 4B), it may not be responsible either of the observed lipogenesis inhibition.

Re-expression of ATAD3 or overexpression of Drp1 rescues or complements differentiation of ATAD3-invalidated 3T3-L1 cells by reinitiating mitochondrial dynamic

To conclude first about a direct effect of ATAD3 knock-down on mitochondrial remodeling processes we tested the rescue experiment in stable ATAD3 KD cell lines, by stable transfection of wild-type ATAD3 (figure 6A). We used untagged ATAD3 expression plasmid for re-expression because we observed much lower rescue efficiency with C-terminal tagged expression plasmid. By the way we also stably transfected mitochondrial fission Drp1 or fusion Mfn2 proteins because they have been considered as potent interactors of ATAD3 (43 Chiang 2012, 28 Gilquin 2010a) and so potentially involved in mitochondrial biogenesis and down-stream lipogenesis.

Stable re-expression of ATAD3 in both ATAD3 KD cell lines induced a rescue of the lipogenesis potential as seen by Oil-Red-O staining levels at day 6 of induction (figure 6A). This was observed for both cell lines but was higher in cell line 530 which has smaller initial

ATAD3 level. We also observed by confocal microscopy that mitochondria remodeling was restored by ATAD3 re-expression in ATAD3 KD cell lines (figure 6B and S7A).

Hypothesizing a possible link of ATAD3 with fission/fusion machinery or tethering between mitochondria and MAM (Mitochondria Associated Membranes), therefore explaining the inability of siRNA cell lines to remodel their mitochondria, we parallelly analyzed lipogenesis potential and mitochondrial dynamic of Drp1 and Mfn2 overexpressing cell lines (figure 6A and 6B). As can be seen, and compared to ATAD3 stable re-expression, stable Drp1 overexpression was also able to restore lipogenesis in both 530 and 1084 siRNA cell lines. This restoration of lipogenesis was detailed upon confocal microscopy analysis (figure 6B) and we could observe that the restoration of remodeling process, like with ATAD3, occurred in Drp1 overexpressing cells. At the contrary, Mfn2, mostly showed previously as an inducer of fusion processes, had no visible effect on lipogenesis and mitochondrial dynamic. However, Drp1 efficiently complements the ATAD3-depleted phenotype.

To test ultimately the limiting effect of ATAD3 on lipogenesis, we performed stable transfection of ATAD3 in the original 3T3-L1, as of the so called Dead mutant of ATAD3 which is both a killed ATPase (produced by point mutation of the Walker A motif (GPPGTGKT) where Lysine 358 has been replaced by Glutamate), and also a dominant negative mutant by its ability to hetero-polymerize and inhibit endogenous ATAD3 (28 Gilquin 2010a). The results showed that stable overexpression of ATAD3 induced a significant increase of the lipogenesis level, as observed by Oil-Red-O staining and an increase in mitochondrial remodeling dynamic as shown by confocal microscopy (figure S7B). Expression of the Dead mutant induced a slight but significant decrease in lipogenesis. Also western-blot detection of ATAD3 showed in this case an upper band that may correspond to a hyper-phosphorylated form of ATAD3 (34 Fang 2010). As expected and as a control, transient expression of ATAD3 during insulin-induction of original 3T3-L1 also increased lipogenesis (figure S6A). This transient rescue induced overexpression of ANT, VDAC and mixed-OXPHOS proteins indicating that mitochondrial biogenesis occurred. Furthermore, ACC appeared slightly under-phosphorylated by ATAD3 overexpression (figure S6A), confirming again that ATAD3 determines lipogenesis level through ACC regulation. In this case also, AMPK couldn't be specially implicated as no major change occurred at its phosphorylation level.

Probably involved in mitochondrial biogenesis/remodeling processes, ATAD3 may therefore support some mitochondrial fission processes or ER-mitochondria tethering/releasing processes, that may allow mitochondria to be remodelled and driven to lipogenesis areas where functional interactions with ACC enzymes and further ER functions will finally contribute to triglycerides accumulation.

DISCUSSION

ATAD3 is an abundant and ubiquitous ATPase of the inner mitochondrial membrane but its function, since vital for development, is still unknown. Knock-down and overexpression experiments have already suspected this protein to be involved in the maintenance of the mitochondrial network and their interaction with endoplasmic reticulum through contact-points (28 Gilquin 2010, 26 Hoffman 2009, 34 Fang 2010). However no approaches have yet shown a direct implication of ATAD3 in any precise mitochondrial processes.

Starting from the point that ATAD3 KD, in *C. elegans*, induces larva development arrest at stage 1, at the first time larva need to feed, and affects primarily adipocyte-like intestinal cells (and gonads) by inhibiting lipid storage, we decided to appreciate the effects of ATAD3 modulation on white adipocyte-like 3T3-L1 cultured cells, the first differentiation model used to date to explore ATAD3 function. These cells are well described by their ability to respond to insulin, differentiate into adipocytes and undergo lipogenesis (57 Blanchette-Mackie 1995). During this differentiation, 3T3-L1 cells undergo first a reprogramming process characterized by insulin transduction cascade and further induction of differentiation-linked transcription factors like PPAR and CREB, initializing then the adipogenesis differentiation program and later on lipogenesis (46 Wilson-Fritch 2003). This last process of lipid accumulation was already shown to be linked to an increase of the mitochondrial mass (46 Wilson-Fritch 2003) as to a kind of mitochondrial network fragmentation (46 Wilson-Fritch 2003, 47 Kita 2009). Mitochondrial mass increase was described in the 3T3-L1 model and quantified to be around 5 to 10 times, depending of the different methods and references used (46 Wilson-Fritch 2003, 47 Kita 2009). These data are in accordance to our observation for Citrate Synthase activity (12 fold), mitochondrial protein markers (ANT, VDAC, ATAD3, cytochrome c (more than 6 fold) as well as for Cytochrome A3 dosage (11 fold). Considering respiration, we observed, like others (46 Wilson-Fritch 2003, 67 Lu 2010, 68 Ducluzeau 2011), a two fold increase in the overall cellular respiration during differentiation, thus meaning that not all mitochondrial metabolic mass is devoted to respiration and may be rather involved in Acetyl-CoA production (from citrate) and down-stream use for Malonyl-CoA synthesis (through ACC), itself modified into Acyl-CoA (through Fatty Acid Synthase) for final triglyceride synthesis. These considerations are in perfect agreement with ultra-structural data obtained from electronic microscopy showing a complete refolding of mitochondrial and reticulum networks during the time of lipogenesis (46 Wilson-Fritch 2003, 47 Kita 2009 and this article). In these articles, like here, the organelles remodeling is clearly observed, with a thin

reticulum envelop surrounding lipid droplets and mitochondria juxtaposed to the periphery. In the 3T3-L1 model, or in human adipose tissue, the mtDNA mass was also studied and was shown to be increase from 2 to 6 fold (69 Kaaman 2007, 62 Gao 2011). It should be noted at this point that in most studies, all these mitochondrial parameters were often measured and normalized versus protein amounts. However we point out here that protein content of 3T3-L1 cells during differentiation is increased by 3 times, justifying, in this article, why all data were normalized to cell number, in order to get easy comparable quantitative interpretations. On the basis of all the different mitochondrial parameters studied here and before, we studied ATAD3 KD effects upon insulin-induced differentiation of 3T3-L1. Using siRNA-encoding lentivirus targeted against ATAD3 gene expression, we succeeded in obtaining several cell lines with significant constitutive ATAD3 underexpression. All these knock-down cell lines exhibited a strong decrease of lipogenesis potential, in a manner correlated with ATAD3 expression level. This inhibition is shown to be due to a reduced ability of these cells to remodel their mitochondria, leading then to an inhibition of mitochondrial metabolic mass increase appreciated by Citrate Synthase, mitochondrial protein contents and Cytochrome A3 dosages, with no impact in upstream insulin signalisation, at neither short nor long term. This conclusion fit well with data obtained from animal (*C. elegans*) where lowered Citrate Synthase activity was observed in intestinal ATAD3 KD cells (26 Hoffman 2010) as well as with a recent paper showing that ATAD3 invalidation specifically impact mitochondrial protein synthesis (70 He 2012). Considering then possible ATAD3 effects on mitochondrial respiration, and after normalizing data to mitochondrial mass (Citrate synthase activity or Cytochrome A3 content), we found no specific effect of ATAD3 level on respiration level (Data not shown). Also we observed that ATAD3 KD did not inhibit synthesis of some nuclear-encoded mitochondrial proteins, like ANT and VDAC but did inhibit COX1 (mitochondria-encoded) and other nuclear-encoded OXPHOS protein overexpressions. This last result fit again with recently published data on transient ATAD3 siRNA KD (70 He 2012) showing a reduction of mitochondrial protein synthesis. Drp1 and AMPK, two actors of mitochondrial remodeling and signalling, are for their part overexpressed during adipogenesis and lipogenesis but were unaffected by ATAD3 KD. Therefore, ATAD3 may not be imply in early down-stream effects of insulin, leading normally to induction of protein synthesis, even if a low down-regulation of 4E-BP phosphorylation can be observed at long term induction of knock-down cells, but rather to specific mitochondria protein synthesis and import. It should be point here that VDAC and ANT, to the opposite of COX1, ATP5A, UQCRC2, SDHB and NDUFB8, don't posses a cleavable addressing signal.

A major observation made here is that ACC accumulation is also specifically inhibited by ATAD3 KD. The amount of ACC in ATAD3 KD cell lines is four and ten fold lower compared to control cells at day 8 of differentiation (adipose tissue has been shown to express essentially ACC1 which is linked to lipogenesis processes. [65](#) Bianchi 1990, [66](#) Ha 1996). This observation was made upon stable underexpression. Transient underexpression of ATAD3 induced an increase of phospho-ACC level and a decreased ACC/p-ACC ratio indicating a reduced activity. Transient overexpression of ATAD3 revealed in another way that, at short term, ATAD3 can decrease ACC phosphorylation, meaning an increase of activity, linked to lipogenesis (synthesis of Malonyl-CoA from Acetyl-CoA). Knock-down and overexpression experiments shown, even differently, that co-regulations exist between ACC activity and ATAD3 expression level. Furthermore, we shown that AMPK is overexpressed during 3T3-L1 differentiation and ACC is one of the potential substrate of AMPK ([58](#) Munday 1988, [59-60](#) Vingdeux 2010 and 2011). However, regulation of AMPK level or its phosphorylation state can not explain ATAD3 dependent regulation of ACC activity. ATAD3 effects on differentiation and lipogenesis may be independent of, but probably parallel to, AMPK signalisation.

Finally and concerning the role of mitochondria in lipid droplet formation, it should be pointed that triglyceride accumulation may not require so much respiration as Antimycine (inhibitor of respiration complexe III and of β -oxydation) can induce lipogenesis ([71](#) Vankoningsloo 2005 and figure S8). As we said, a doubling of respiration was observed in our experiments thus meaning that the mitochondrial mass increase (twelve fold for citrate synthase) is probably more devoted to lipid synthesis than to respiration, as seen also by proteomic ([49](#) Guo 2008, [50](#) Cho 2009, [51](#) Newton 2011). These observations lead to the idea that ATP production is not the main role of mitochondria for lipogenesis. Contribution of Citrate and Acetyl-CoA may be therefore principally suspected for mitochondrial lipogenesis contribution.

The major impact of ATAD3 KD is then found at the level of mitochondrial remodeling and mass increase, as observed previously in *C. elegans* model and cultured cells with abnormal mitochondrial distribution and morphology induced by ATAD3 KD ([28](#) Gilquin 2010, [26](#) Hoffman 2010). Demonstrative results were obtained here by rescue and complementation experiments. The first demonstrates the direct effect of ATAD3 level on mitochondrial remodeling and lipogenesis and the second shows that Drp1 is an efficient co-factor for ATAD3 function by promoting fission-based mitochondrial remodeling processes ([72](#) Westermann 2010). More precisely, we observed that ATAD3 re-expression had a higher

effect as the initial ATAD3 level is low, showing that ATAD3 is a real limiting factor. Furthermore, Drp1 overexpression complemented better if ATAD3 is higher meaning then that ATAD3 activity may be favorized by Drp1 level. This result confirms previously suspected interaction of ATAD3, directly or not, with Mfn2 and Drp1 (43 Chiang 2012) and help in focusing its possible molecular and cellular functions.

ATAD3 may therefore contribute to initial fission-linked processes that allow the remodeling of mitochondria network and their consecutive addressing to metabolic regions involved in fatty acid synthesis (namely the reticulum associated with lipid droplets). ATAD3 can also be especially involved in ER-mitochondria tethering which also determines mitochondrial network and implicates Mfn2 and Drp1 (42 de Brito 2010). This hypothesis is again sustained by the studies of Chow and colleagues showing that ATAD3 may be directly implicated in Apoptosis-Inducing Factor (AIF) distribution (43 Chiang 2012). AIF is an essential FAD-dependent NADH oxidase for the oxidative phosphorylation which is located in the intermembranous space. In this article the authors shown that Drp1 knock-down reduced AIF levels in the mitochondria, but increased AIF concentrations in the MAM. Knockdown of Mitofusin-2 (Mfn2) or of ATAD3A expressions, the same, reduced AIF levels in the mitochondria and increased the number of transport vesicles that contained AIF in the cytosol, suggesting that ATAD3A and Mfn-2 were respectively essential for the import and fusion of transport vesicles into the mitochondria (43 Chiang 2012). This observation should be related to the observation we made by electronic microscopy as we observed strange budding from the endoplasmic reticulum as well as very particular structure of mitochondria (very low staining density and very few crests). Also, like Drp1 and mTOR KD, limited ATAD3 KD in *C. elegans* increases life span (73 Yang 2011, 74 McCormick 2011, 44 Hoffmann 2012).

In addition, ATAD3 has been shown to be a molecular target of S100B, a calcpotein involved in calcium transduction signalling (29 Gilquin 2010b). Because calcium signalling is a main characteristic of ER-Mitochondria contact sites, these results argument for a role of ATAD3 in ER-Mitochondria contacts.

Inhibition of ATAD3 expression exerts differential effects on mitochondrial protein accumulation leading therefore to an incorrect mitochondrial network and inhibition of mitochondria mass increase which unable proper involvement of mitochondria in lipogenesis, thus explaining the ATAD3 KD phenotype obtained in *C. elegans* (26 Hoffman 2010). We observed by the way that ATAD3 KD effects may not be related to autophagy. We observed that inhibition of autophagy decreased lipogenesis in 3T3-L1, at the opposite to what

observed in hepatocyte (64 Singh 2009). However, this question is not surprising as liver does not work the same way, even in concert, with adipocyte tissues (75 Rosen 2006, 76 Greenberg 2011).

To conclude here about possible functions for ATAD3, we can hypothesize from this work that ATAD3 is involved, directly or not, either in mitochondrial fission and/or in ER-Mitochondria tethering and, may be indirectly, to synthesis/transport/stability of mitochondrial proteins of either mitochondria- or nuclear-encoded. Inhibition of nuclear-encoded OXPHOS proteins accumulation could come also from inappropriate composition of the OXPHOS system.

ER-Mitochondria contact sites concept is today a crucial idea in the understanding of mitochondria homeostasy, functions, biogenesis and remodeling. Among the functions of these particular reticulum sites, MAM, newly synthesised mitochondrial protein transit may be concerned by ATAD3. ATAD3 can be also involved in other MAM functions such as phospholipid transfers (7 Vance 2008), calcium fluxes and RNA mitochondrial import such for tRNA or 5S rRNA. Among these functions, a role in RNA mitochondrial import is highly suspected, because ATAD3 has the molecular signature of an RNA helicase (77 Linder 2011, 17 Li 2012). Lowering mitochondrial rRNA content could explain the inhibition of the mitochondrial protein synthesis, remodeling and maturation observed here. ATAD3 however, and as a ubiquitous protein, may be and by a way, a major regulator of mitochondrial mass increase and remodeling that could be involved generally in triglycerides storage or any others down-stream mitochondrial functions.

Acknowledgments:

This work was supported by Cai Yuanpei and Xu Guangqi Hubert Curien programs from the French Ministry of Foreign affairs. We greatly thank Morane Renoux, Maëva Ruel and Célia Bouzar for excellent technical assistance in cell culture and western-blot experiments and Frédéric Lamarche for perfect supervision of cell culture facilities. We thank very much Karin Pernet-Gallay and Julie Delaroche for their excellent expertises in electronic microscopy analysis. We are also grateful to Pr. Valdur Saks, Pr. Uwe Schlattner and Dr. Rita Guzun for their essential advices in the expending field of mitochondria research. D.R. thanks personally Yuliya Lyubenova Dimitrova for indispensable and permanent sustain in daily work.

FIGURES LEGENDS

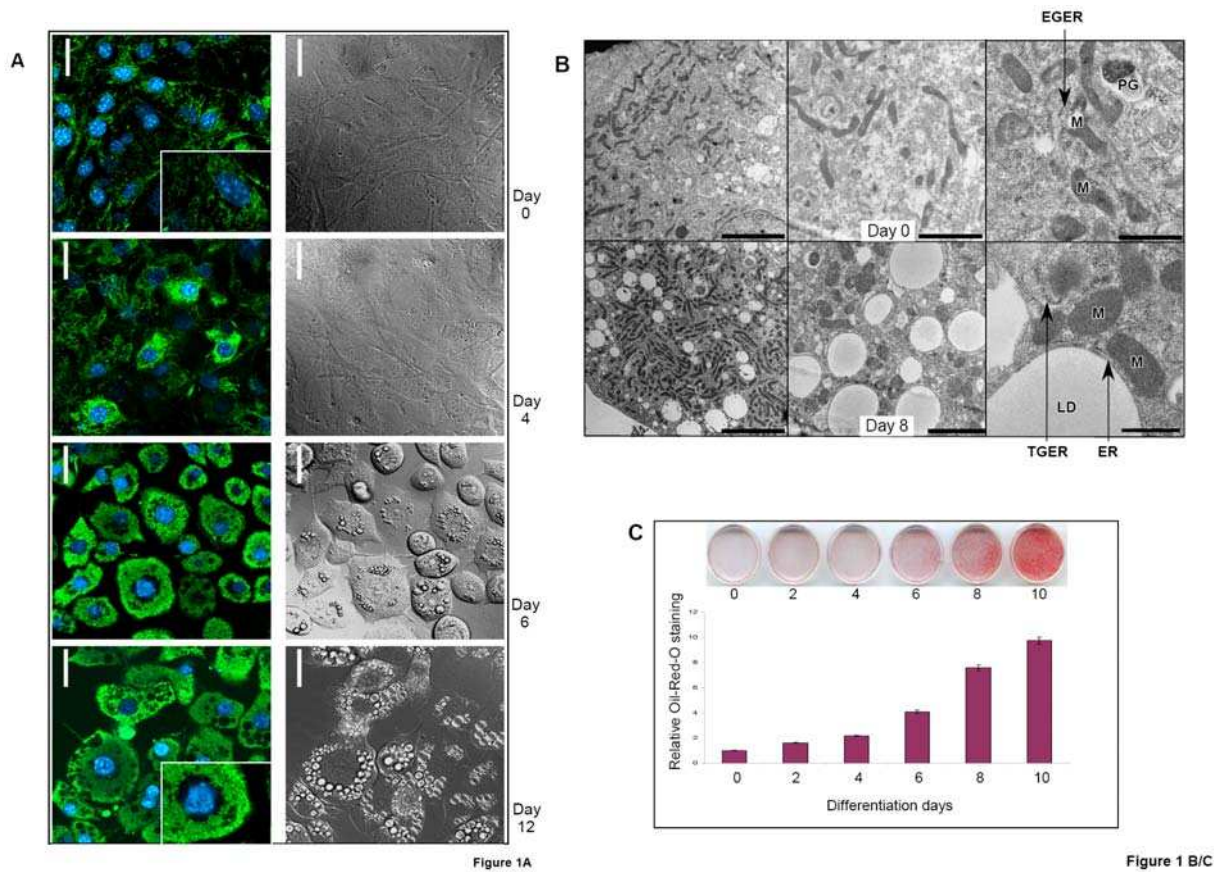


Figure 1 - Evolution of mitochondrial network and of lipogenesis during insulin-induced differentiation of 3T3-L1 cells

A- 3T3-L1 were induced for differentiation and imaged by confocal microscopy during the course of experiment. Double Mitotracker (Green FMTM) and Hoescht stainings as phase contrast imaging are respectively presented on left and right at indicated days. Scales represent 20 μ m and inserts are two times fold enlargement of typical Mitotracker staining. Mitochondria 3D-size quantifications are presented in figure S1A. B- 3T3-L1 cells were imaged by electron microscopy at days 0 (top row) and 8 (bottom row) at increasing magnifications from left to right (scale bars equal 2, 1 and 0.5 μ m). M, Mitochondria, ER, endoplasmic reticulum, EGER, enlarged granular endoplasmic reticulum, TGER, tubular granular endoplasmic reticulum, LD, lipid droplets, PG, phagosome. C- 3T3-L1 cells were Oil-Red-O stained during differentiation time course and stainings were quantified by spectrophotometric analysis from three independent experiments. For quantification of Oil-Red-O staining, the staining of pre-adipocytes and plastic dishes were considered as a value of one.

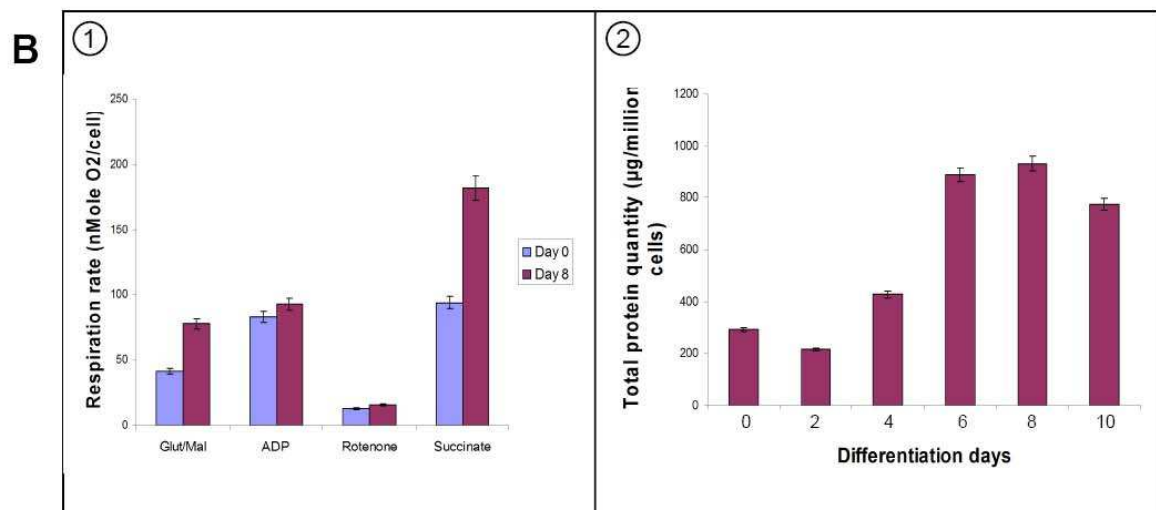
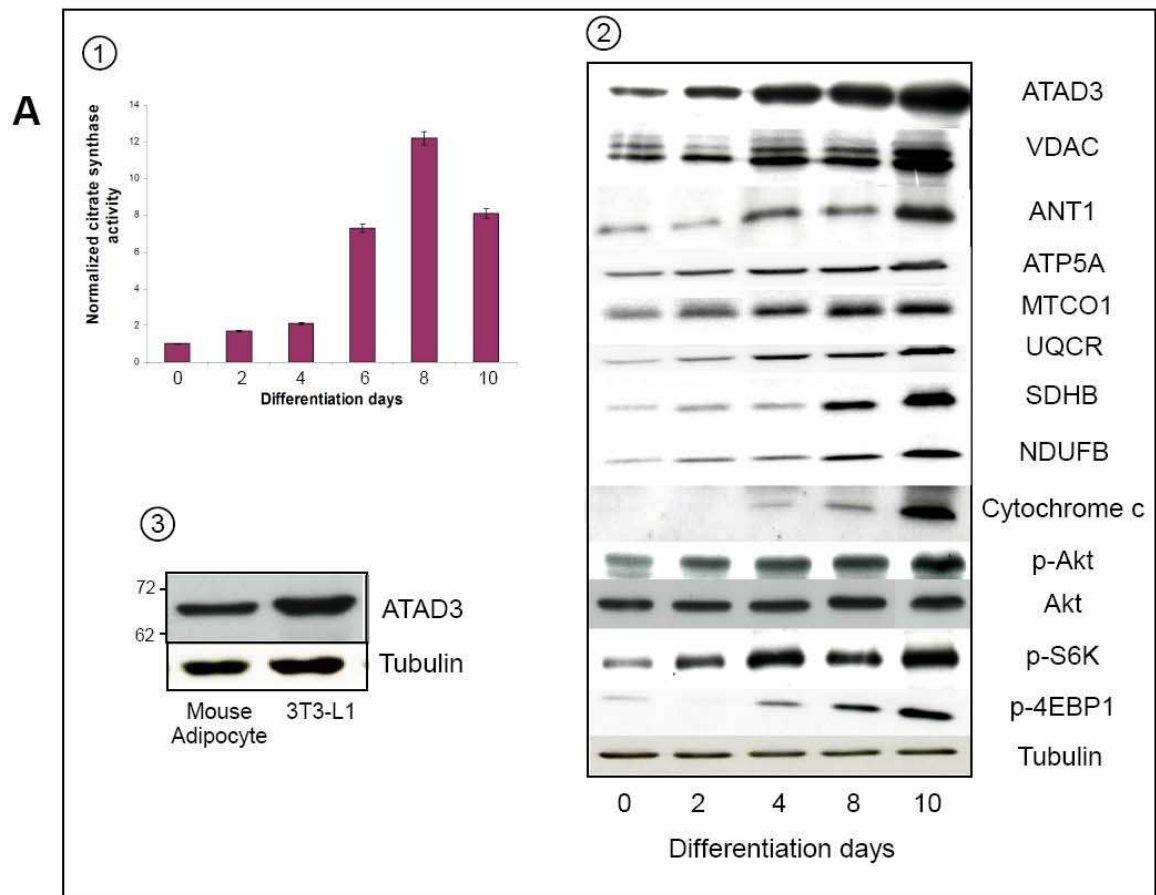


Figure 2

Figure 2 - Evolution of mitochondrial mass markers during insulin-induced differentiation of 3T3-L1

A- Citrate synthase activity (1) and Western-blot analysis (2) during the time course of differentiation. Western-blot analysis of ATAD3 was in addition performed on biopsies of mice adipose tissue to demonstrate its normal expression levels (3). For all assays, samples were normalized to same cell number. B- Respiration rates were measured by oxymetry (1) and cellular protein amounts were quantified by Bradford assays during the time course of differentiation (2) as reported in materials and methods. For all assays, samples were normalized to same cell number and quantifications were obtained from triplicates of two independent experiments with indicated standard deviation.

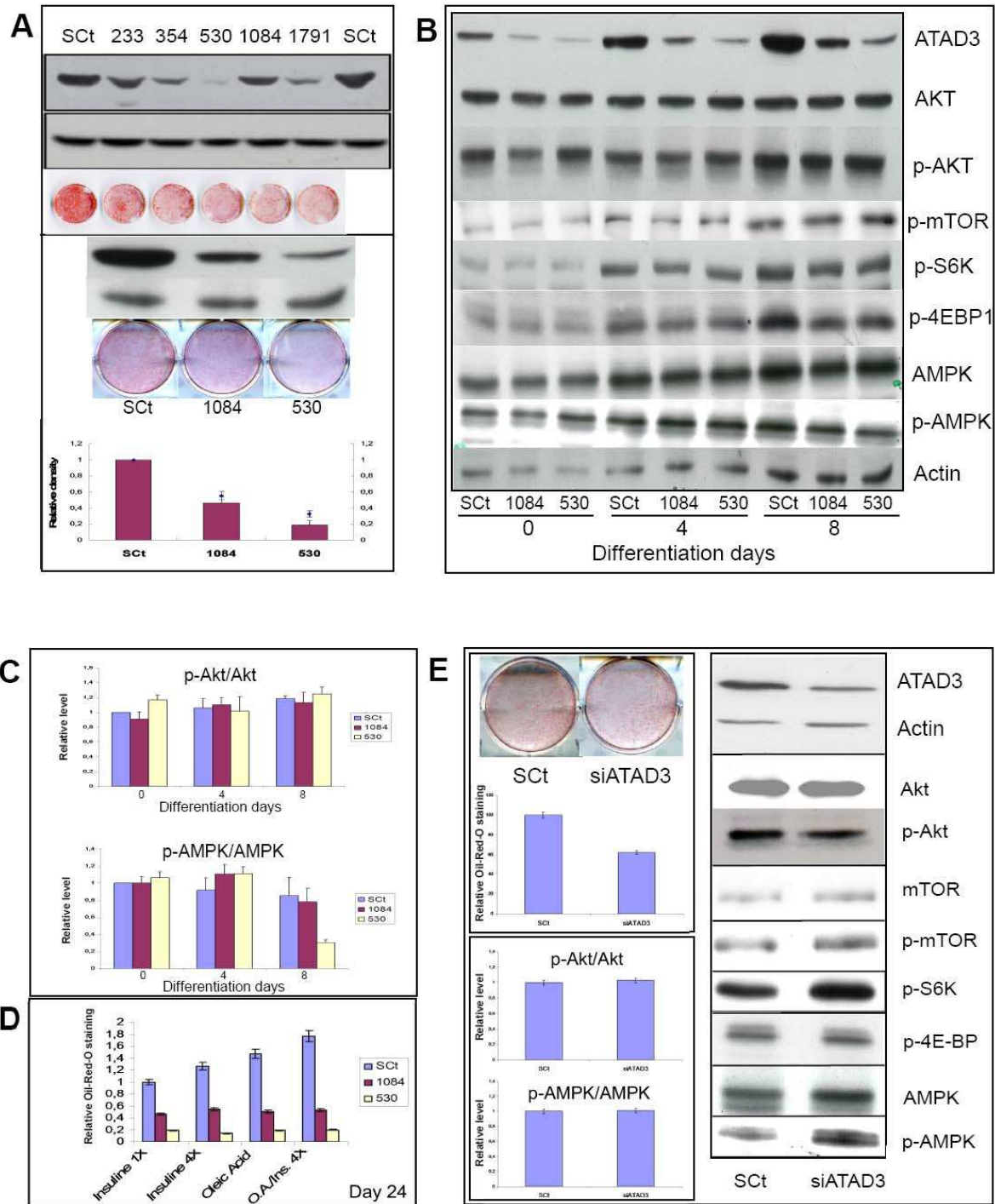


Figure 3

Figure 3 - Effects of stable and transient ATAD3 siRNA invalidation on insulin-induced differentiation of 3T3-L1

A- Stable lentiviral ATAD3 KD was performed in 3T3-L1 and five cell lines were selected for analysis of ATAD3 levels by Western blot and lipogenic potential by Oil-Red-O staining (upper panel). Quantifications of ATAD3 levels and Oil-Red-O staining levels were

performed on control (SCt), 1084 and 530 siATAD3 cell lines (lower panel) by three independent assays performed in triplicates, standard deviations are indicated. B- Western-blot analysis was performed on control, 1084 and 530 cell lines during the course of differentiation (days 0, 4 and 8) using a set of antibodies investigating the insulin signal transduction pathway (Akt, mTOR, S6K and 4EBP1). C- Quantifications of p-Akt/Akt and p-AMPK/AMPK ratios in stable ATAD3 KD cell lines were performed from triplicates of two independent experiments and standard deviations are indicated. D- Control (SCt), 1084 and 530 siATAD3 cell lines were tested for forced differentiation by the use of four time insulin dose (4 μ M) and/or Oleic acid (0.5mM), compared to control induction (1 μ M insulin). Quantification of Oil-Red-O staining (day 24) was obtained from two independent experiments and standard deviations are indicated. E- Original 3T3-L1 cells were transiently siRNA invalidated for ATAD3 and tested for lipogenic potential at day 8 (left upper panel). Transducers of the insulin signal were detected by Western blot (right panel) and quantifications of p-Akt/Akt and p-AMPK/AMPK ratios were performed from triplicates of two independent experiments and with indicated standard deviations (left upper panel).

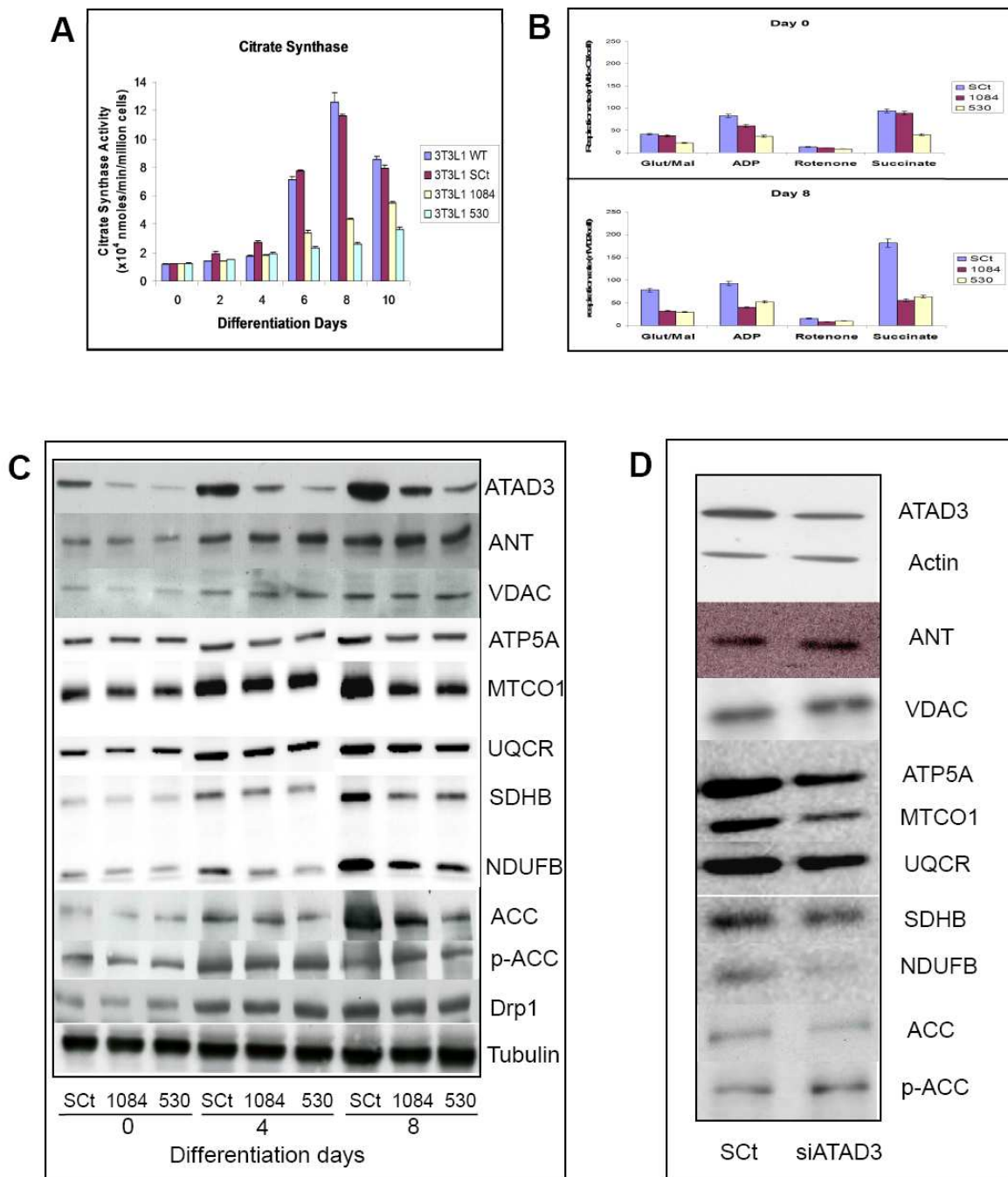


Figure 4 - Effects of stable and transient ATAD3 siRNA invalidation on mitochondrial mass increase and ACC activation

A- Citrate synthase activities of original 3T3-L1 (WT), Control scrambled siRNA (SCt), 1084 and 530 siRNA ATAD3 KD cell lines were measured along differentiation. B- Respiration rates of Control (SCt), 1084 and 530 siRNA cell lines were measured at days 0 and 8 of differentiation, with different substrates or inhibitor (see materials and methods and discussion). C- Western blot analysis of mitochondrial proteins of Control (SCt), 1084 and 530 siRNA cell lines was performed at days 0, 4 and 8 of differentiation. D- Western blot

analysis of mitochondrial proteins was performed on transient ATAD3 siRNA knock-down of 3T3-L1 cells induced to differentiate (day 6, 5 days post-transfection). For all assays presented in the figure, samples were normalized to the same cell number and quantifications were obtained by triplicates from at least two independent experiments, with indicated standard deviation.

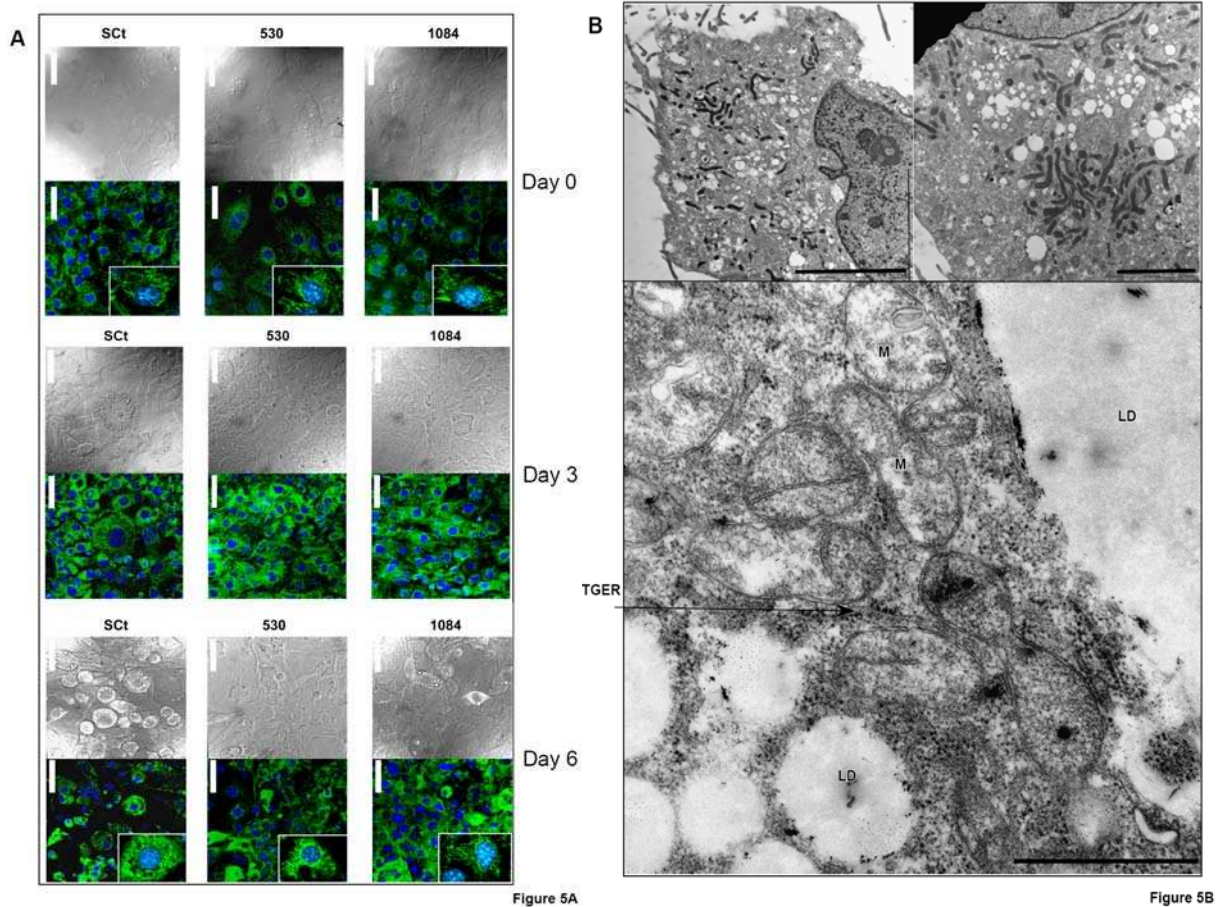


Figure 5 - Effects of stable ATAD3 siRNA invalidation on mitochondrial remodeling

A- Confocal microscopy analysis was performed on ATAD3 siRNA stable (1084 and 530) and control cell lines (SCt). Mitotracker mitochondria staining (GreenFMTM), Hoescht DNA stainings and phase contrast images are presented for the indicated cells and times of differentiation. Scale bars represent 20 μ m and inserts are three fold enlargements of typical staining. B- Electron microscopy was performed on 530 ATAD3 siRNA stable cell line at day 8. Images are focused on poorly differentiated cell with low abundant (top left) and unfragmented mitochondria (top right) with scale bars indicating respectively 5 and 2 μ m. In some cells slightly differentiated, mitochondria appeared with large, clear and with very few

crests (bottom image, scale bar equal 1 μ m). M, Mitochondria, TGER, tubular granular endoplasmic reticulum, LD, lipid droplets.

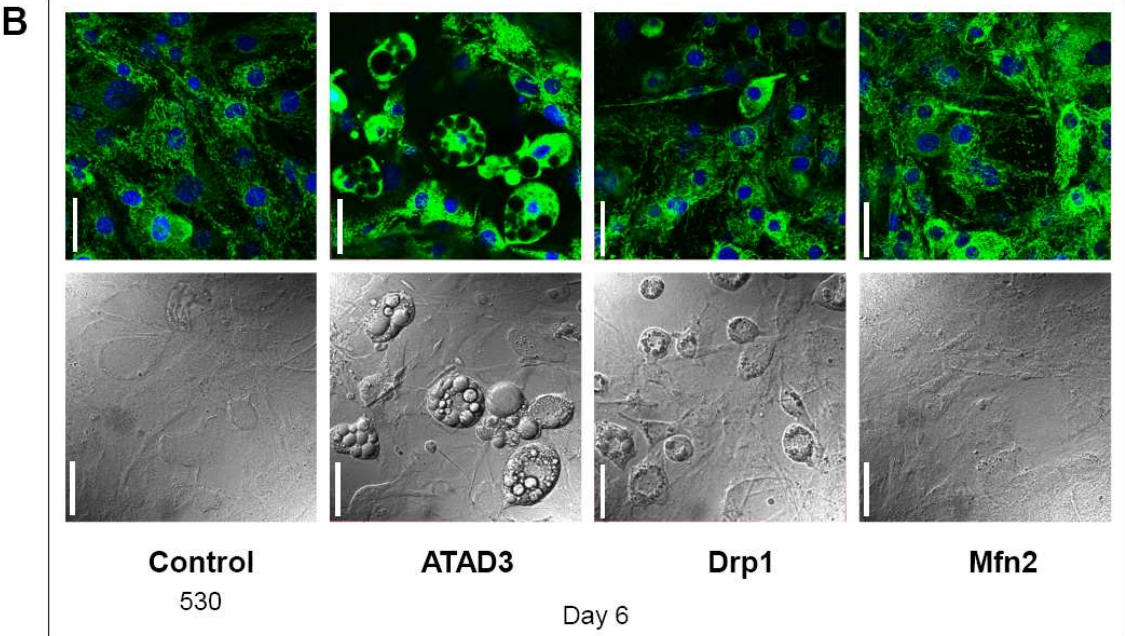
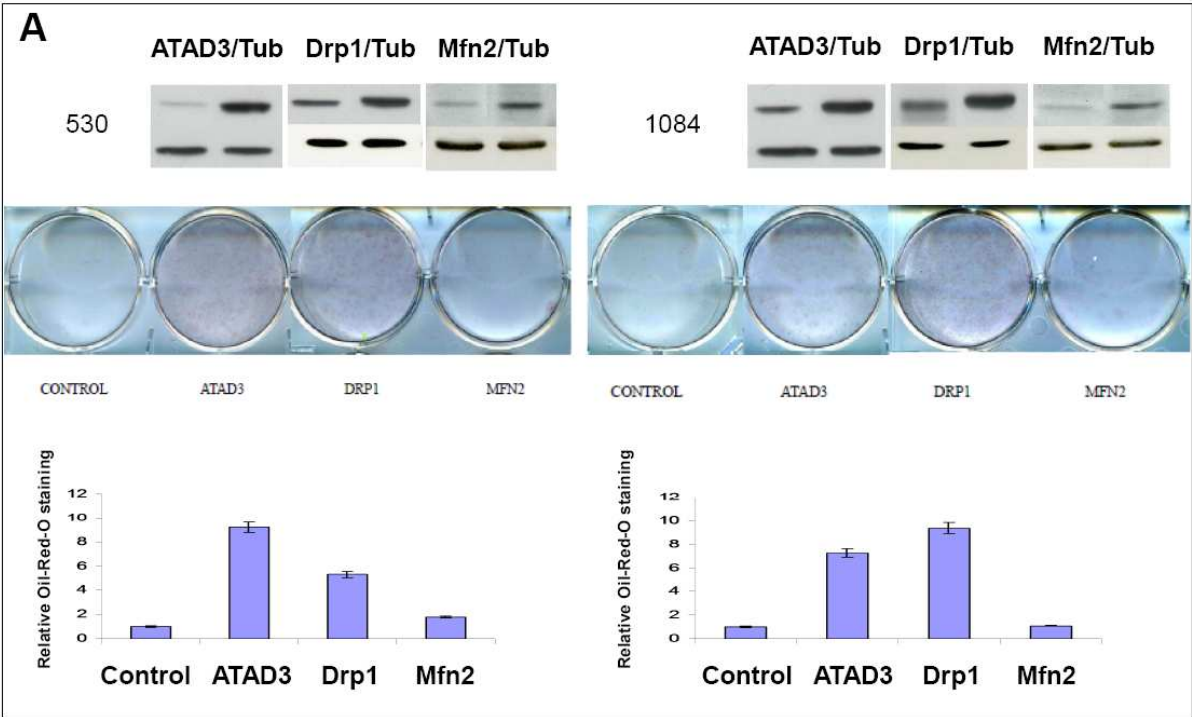


Figure 6

Figure 6 - Effects of ATAD3 re-expression and Drp1/Mfn2 overexpression on lipogenesis and mitochondrial remodeling of siRNA stable cell lines

A- Stable ATAD3 KD cell lines 530 (left) and 1084 (right), were stably transfected with ATAD3, Drp1 and Mfn2-Myc expression plasmids (and empty control vector) and tested for proteins expressions and for lipogenic potential under insulin induction (12 days). Western blots are presented at the top and detect from left to right, ATAD3, Drp1 and Myc-tagged Mfn2. Oil-red-O staining are presented and quantification were obtained from triplicates of two independent experiments, with indicated standard deviation. B- Stable ATAD3 KD cell line 530, stably transfected with ATAD3, Drp1 and Mfn2 expression plasmids, was analyzed at day 6 for mitochondrial remodeling. Mitotracker and phase contrast images are presented for each cell lines. Data on 1084 cell line are presented in figure S7. Scale bar represents 20 μ m.

SUPPLEMENTAL DATA

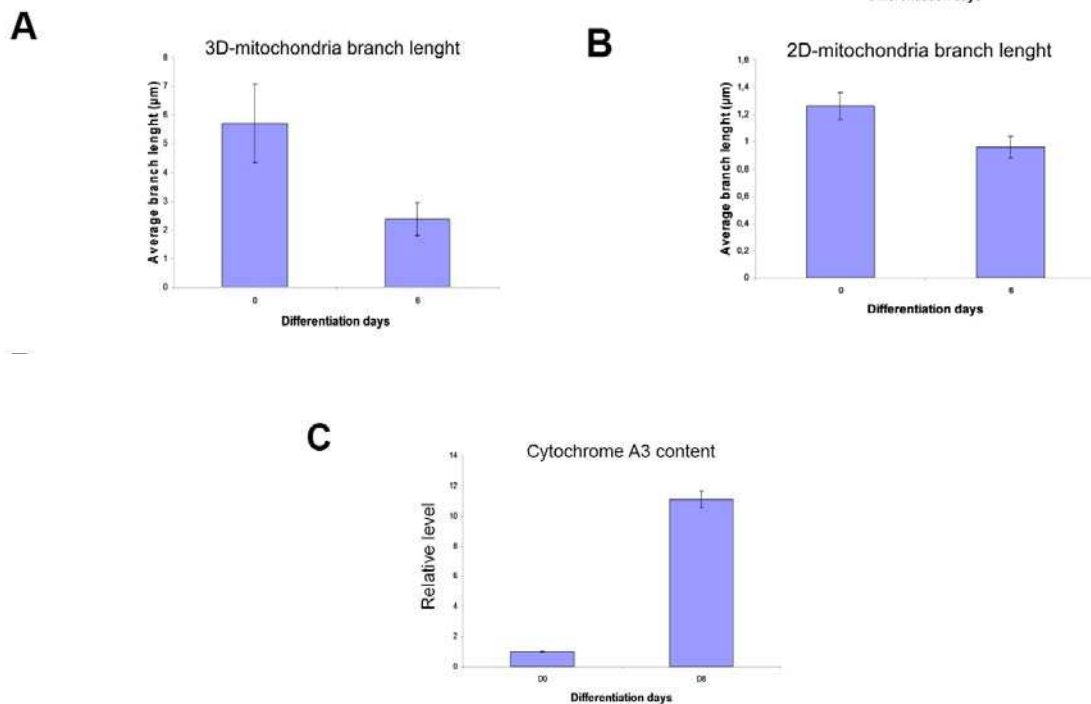


Figure S1 - Quantification of confocal and electronic microscopy analysis and Cytochrome A3 dosages

A- 3D mitochondria sizes (branch lengths) were quantified at days 0 and 6 of differentiation by ImageJ analysis from mitotracker 3D imaging. Standard deviations were calculated from 10 confocal 3D images.

B- 2D mitochondria sizes (branch lengths) were also quantified from electronic microscopy data at days 0 and 6, from 200 measurements.

C- Data from Cytochrome A3 dosage of 3T3-L1 cells at days 0 and 8 of differentiation were obtained from differential spectral measurement (400 to 650 nm) of cell lysates normalized to same cell number. The value of peak at 605 nm was used for quantification of respiratory chain cytochrome aa3 contents (cytochrome c oxydase) using the extinction coefficient value equal to $24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Assays were performed in triplicates from two independent experiments with the indicated standard deviations.

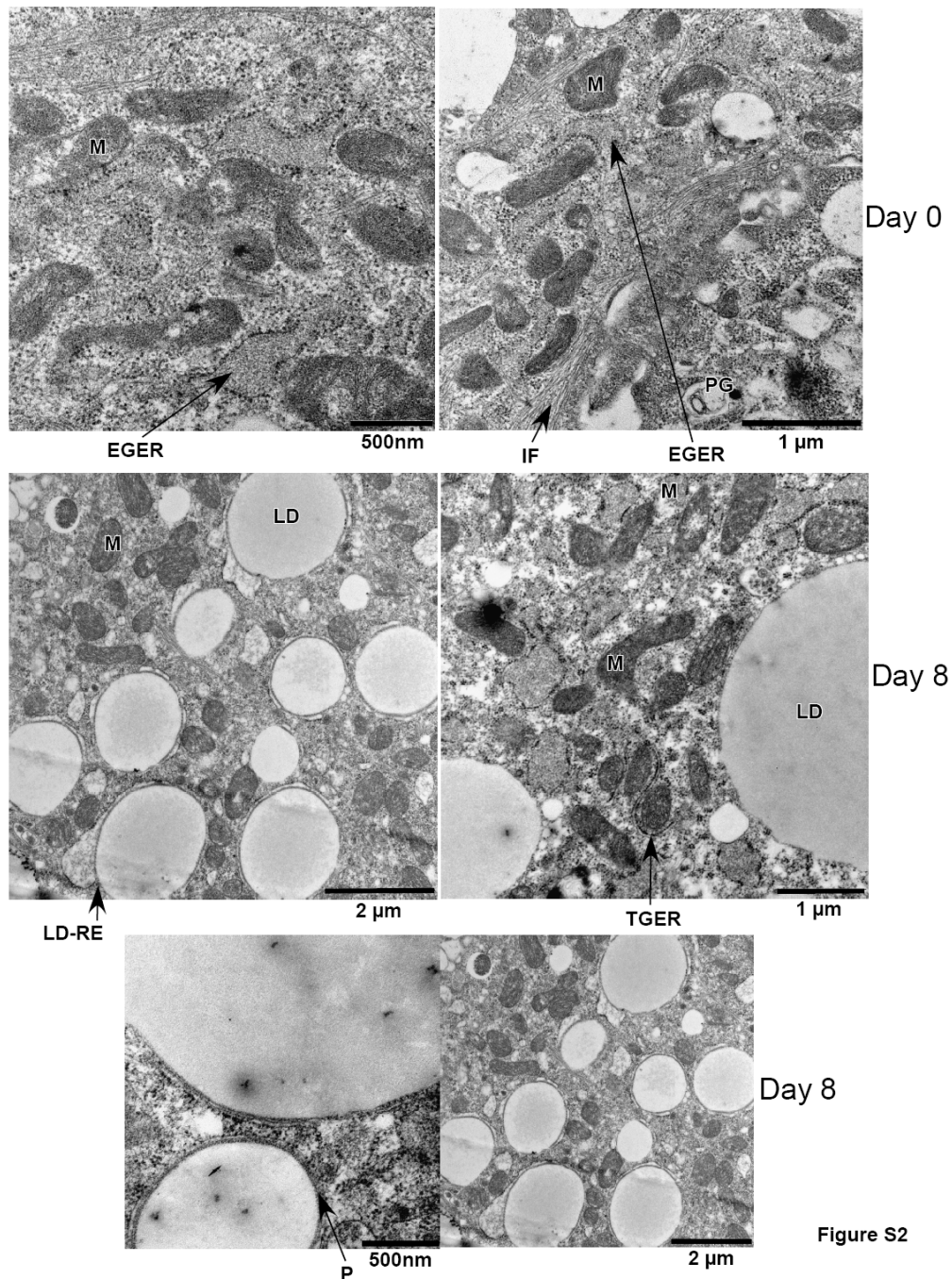


Figure S2

Figure S2 - Electronic microscopy analysis of cell morphology during differentiation of 3T3-L1 cells

Electron microscopy images of particular cellular areas at days 0 (top) and 8 (middle and bottom) are presented showing mitochondria (M) with enlarged granular endoplasmic reticulum (EGER), intermediary filaments (IF) and phagosomes (PG) at day 0 (undifferentiated cells) and growing lipid droplets (LD) with well-defined mitochondria, enlarged granular endoplasmic reticulum (EGER), Perilipin (P) and tubular granular endoplasmic reticulum (TGER) at day 8 (differentiating cells). Scale bars indicated.

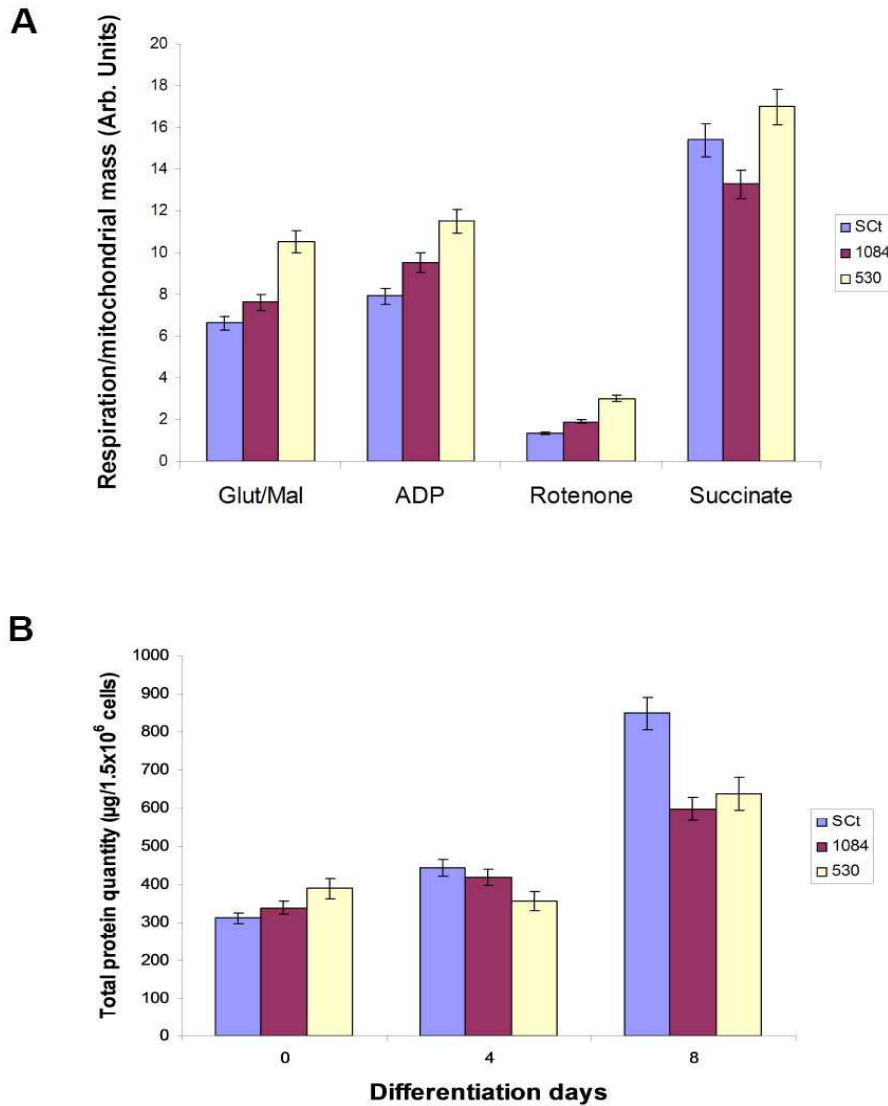


Figure S3 - Quantification of confocal and electronic microscopy analysis of siRNA invalidated 3T3-L1 cells

A- Respiration data were expressed versus mitochondrial mass after normalization by Citrate Synthase activity a day 8 for stable ATAD3 KD 1084, 530 and control (SCt) cell lines. B- Total protein amounts of stable ATAD3 KD and control cell lines were determined by Bradford at days 0, 4 and 8 of differentiation and quantified.

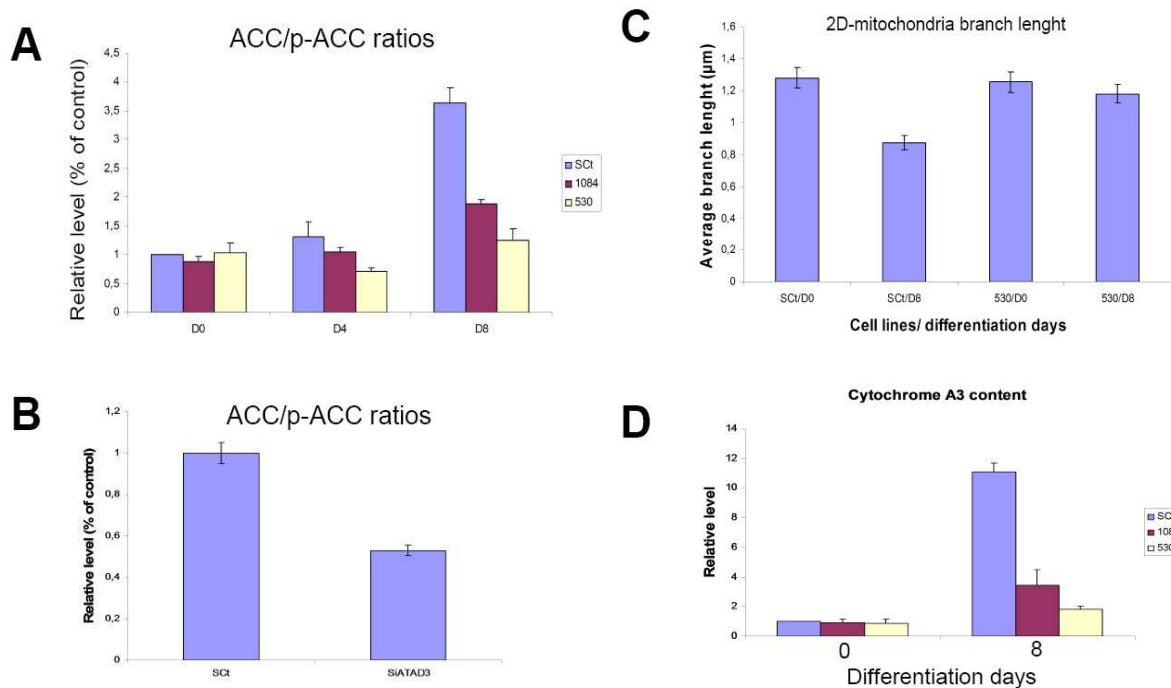


Figure S4 - ACC/p-ACC ratios in 3T3-L1 cells stably or transiently invalidated for ATAD3

A- ACC/p-ACC ratios were calculated from two western-blot from different experiments on stable ATAD3 KD 1084, 530 and control (SCt) cell lines extracts at differentiation days 0, 4 and 8. B- ACC/p-ACC ratios were calculated from two western-blot from different experiments on transient ATAD3 KD and control (SCt) cell extracts. Both quantifications of ACC/p-ACC ratios in stable and transient ATAD3 KD cell lines were performed from two independent experiments with the indicated standard deviations. C- 2D mitochondria sizes (branch lengths) were quantified from electronic microscopy data at days 0 and 8 in ATAD3 KD 530 and control cell lines (SCt), from 200 measurements with indicated standard deviation. D- Data from Cytochrome A3 dosage of 3T3-L1 cells at days 0 and 8 of differentiation were obtained from differential spectral measurement (400 to 650 nm) of cell lysates (ATAD3 KD and control cell lines) normalized to the same cell number. The value of peak at 605 nm was used for quantification of respiratory chain cytochrome aa3 contents (cytochrome c oxydase) using the extinction coefficient value equal to $24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Assays were performed in triplicates from two independent experiments with the indicated standard deviations.

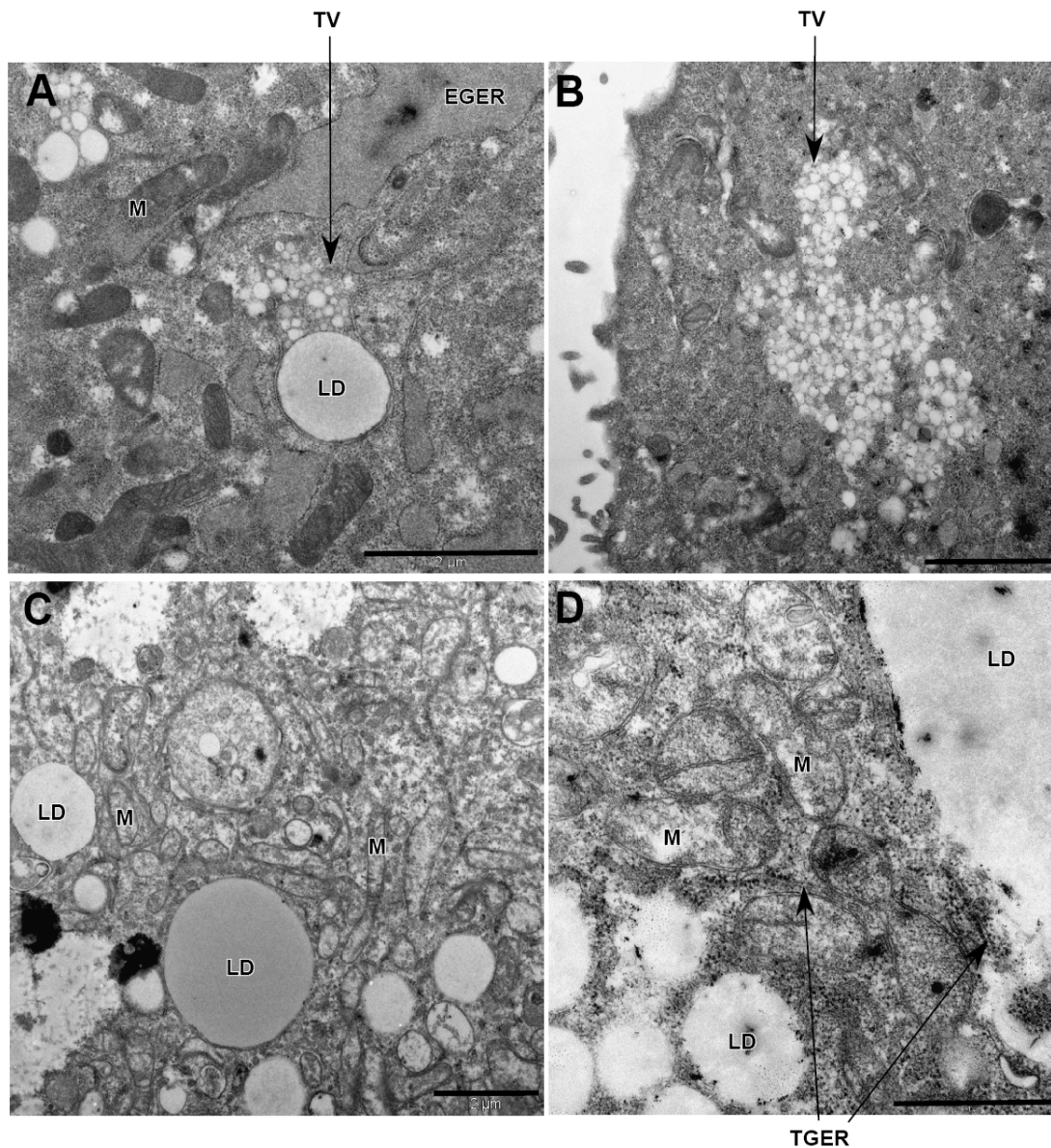


Figure S5

Figure S5 - Electron microscopy analysis of 3T3-L1 cells stably invalidated for ATAD3

Electron microscopy images of particular cellular areas of 530 ATAD3 KD cell line at day 8 (undergoing poor lipogenesis) are presented. A- Abundant enlarged granular endoplasmic reticulum (EGER), small lipid droplets (LD) and transition vesicles (TV). Scale bar indicates 2 μm. B- Transition vesicles accumulation. Scale bar indicates 2 μm. C/D- In cells undergoing slight differentiation, growing lipid droplets (LD) are associated with enlarged mitochondria presenting very few crests and very clear matrix staining but still close to tubular granular endoplasmic reticulum (TGER). Scale bars indicate respectively 1 and 2 μm.

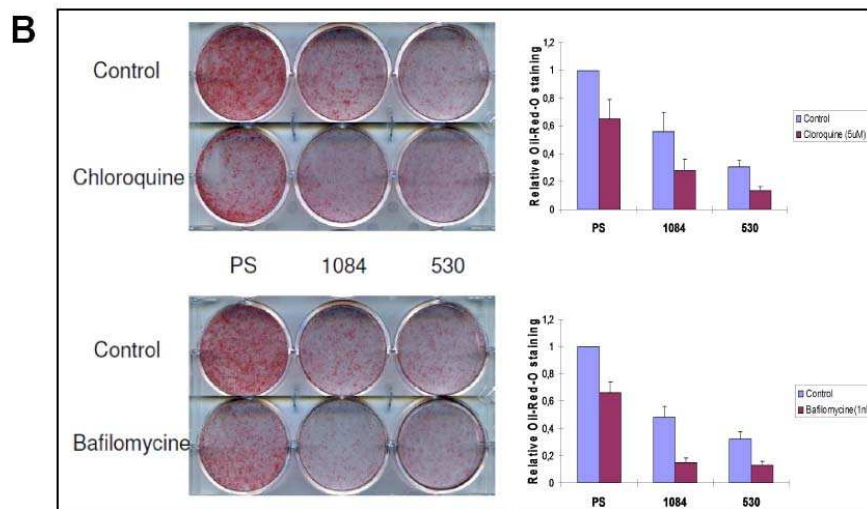
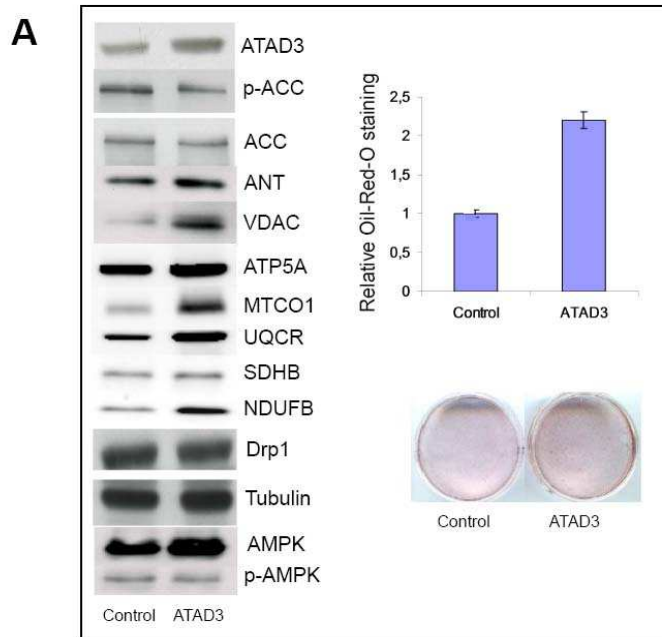


Figure S6 - Effects of ATAD3 transient transfection on mitochondrial protein expression, AMPK and ACC phosphorylations and lipogenesis. Effects of mitophagy inhibitors on siRNA KD 3T3-L1 cell lines lipogenesis

A- ATAD3 was transiently transfected into 3T3-L1 cells and analyzed by Western blot at day 4 and compared to empty plasmid transfection (Control). Oil-Red-O staining was performed at day 6 and quantified by spectrophotometer measurement of triplicates from two independent experiments (indicated standard deviation). B- Chloroquine and Bafilomycine were tested for the effect on lipogenesis in control (SCT) and ATAD3 siRNA 3T3-L1 cell lines, at 5µM and 1nM respectively. Quantification was performed by spectrophotometer measurement of triplicates from two independent experiments (indicated standard deviation).

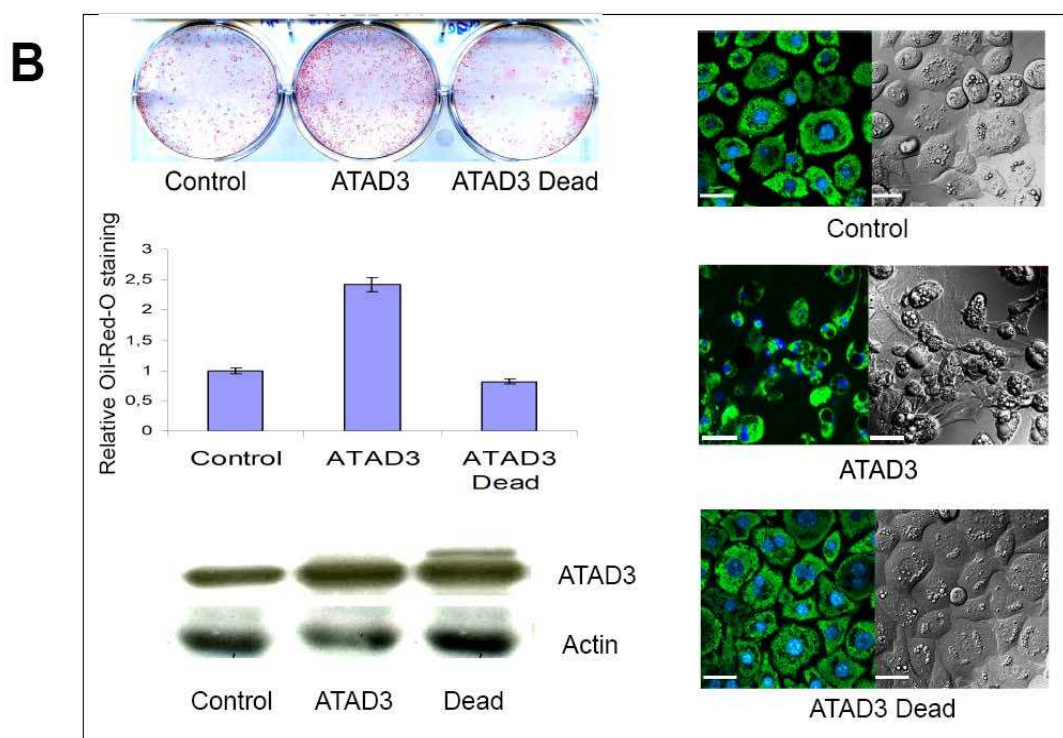
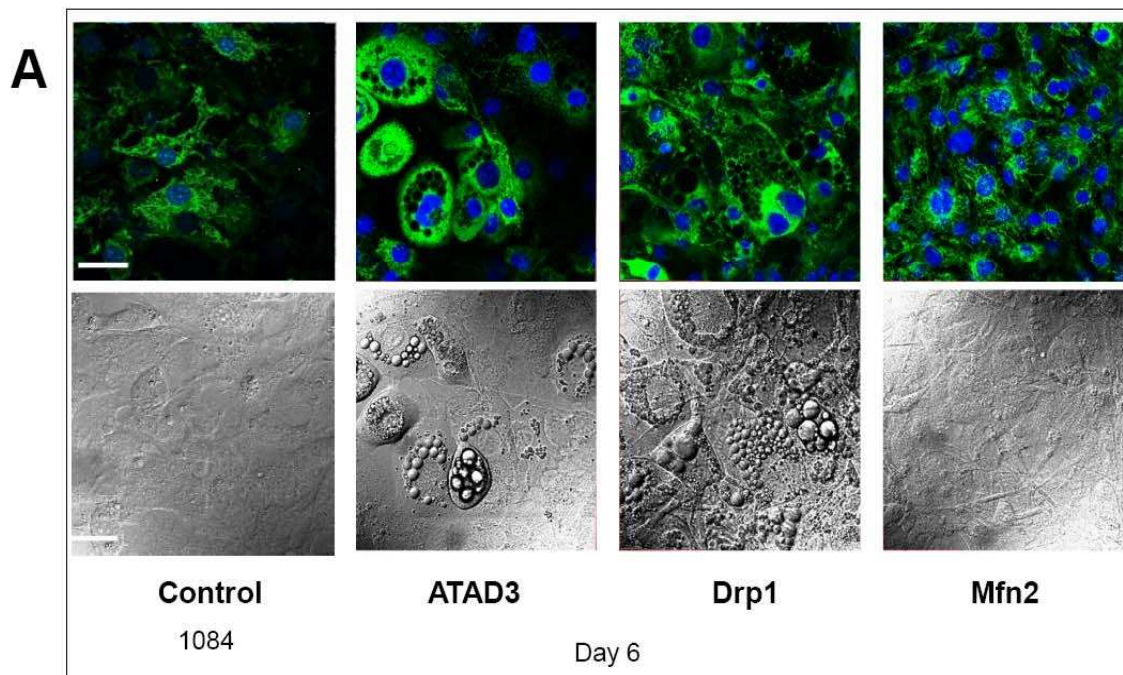


Figure S7

Figure S7 - Effects of ATAD3/Drp1/Mfn2 overexpression on mitochondrial remodeling of 1084 KD cell line and on lipogenesis and on mitochondrial remodeling of original 3T3-L1 cells

A-Stable ATAD3 KD cell line 1084, stably transfected with ATAD3, Drp1, Mfn2 expression plasmids (and empty control vector) was tested for mitochondrial remodeling. Mitotracker and phase contrast images are presented for indicated cell lines with a scale bar representing 20 μ m. A- Original 3T3-L1 cells were stably transfected with ATAD3 and ATAD3 Dead mutant expression plasmids (and empty vector as control) and tested for lipogenic potential and for proteins expressions under insulin induction (12 days). Oil-red-O staining are presented with quantifications obtained from triplicates of two independent experiments with indicated standard deviation (top left). Western blots for ATAD3 are presented (bottom left). and detect from left to right, ATAD3, Drp1 and Myc-tagged Mfn2. Mitochondrial remodeling was investigated using Mitotracker and presented with phase contrast images for indicated cell lines. Scale bars represent 20 μ m.

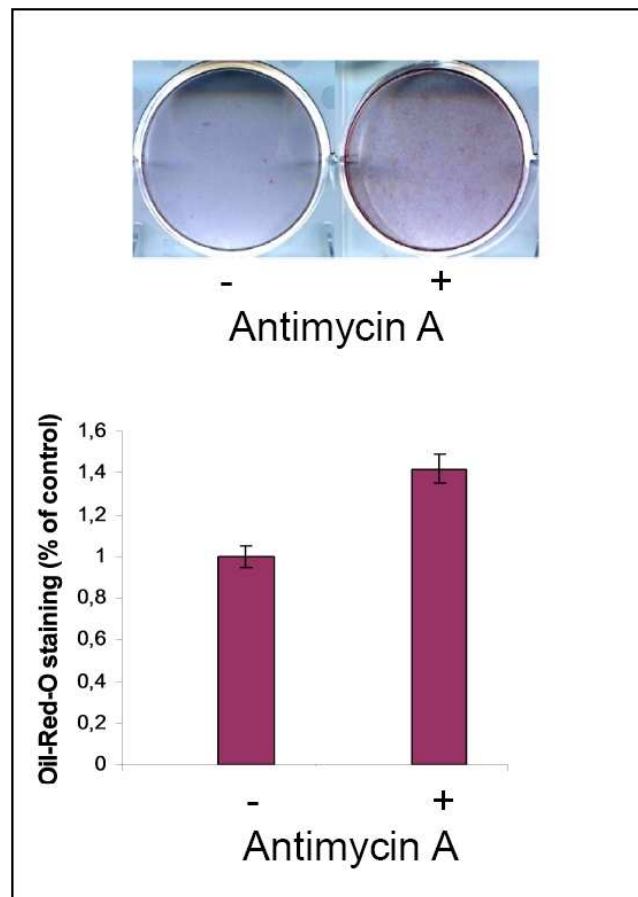


Figure S8 - Effects of Antimycin on 3T3-L1 lipogenesis

Effect of Antimycin A on 3T3-L1 differentiation was tested after 16 days of continuous treatment (100nM) and lipogenesis was quantified by Oil-Red-O staining. Quantification was performed by spectrophotometer measurement of triplicates from two independent experiments (indicated standard deviation).

BIBLIOGRAPHY

- 1- Novikoff AB, Novikoff PM, Rosen OM, Rubin CS. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol.* 1980, 87(1):180-96.
- 2- Frayn KN, Arner P, Yki-Järvinen H. Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease. *Essays Biochem.* 2006, 42:89-103.
- 3- Goodman JM. The gregarious lipid droplet. *J Biol Chem.* 2008, 283(42):28005-9.
- 4- Walther TC, Farese RV Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta.* 2009, 1791(6):459-66.
- 5- Kazantzis M, Stahl A. Fatty acid transport proteins, implications in physiology and disease. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Sep 25.
- 6- Voelker DR. New perspectives on the regulation of intermembrane glycerophospholipid traffic. *J Lipid Res.* 2003, 44(3):441-9.
- 7- Vance JE. Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *J Lipid Res.* 2008, 49(7):1377-87.
- 8- Miller WL. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Endocr Dev.* 2011, 20:1-19.
- 9- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010, 11(12):872-84.
- 10- Kageyama Y, Zhang Z, Sesaki H. Mitochondrial division: molecular machinery and physiological functions. *Curr Opin Cell Biol.* 2011, 4:427-34.
- 11- Osman C, Voelker DR, Langer T. Making heads or tails of phospholipids in mitochondria. *J Cell Biol.* 2011, 192(1):7-16.
- 12- Choo HJ, Kim JH, Kwon OB, Lee CS, Mun JY, Han SS, Yoon YS, Yoon G, Choi KM, Ko YG. Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia.* 2006, 49(4):784-91.
- 13- Campello S, Scorrano L. Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep.* 2010, 11(9):678-84.
- 14- Meisinger C, Sickmann A, Pfanner N: The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell* 2008, 134:22-24.
- 15- Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, Walford GA, Sugiana C, Boneh A, Chen WK, Hill DE, Vidal M, Evans JG, Thorburn DR, Carr SA, Mootha VK. A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell.* 2008, 134(1):112-23.

- 16- Zeller KI, Jegga AG, Aronow BJ, O'Donnell KA, Dang CV. An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets. *Genome Biol.* 2003 ; 4(10):R69.
- 17- Li S and Rousseau D. ATAD3, a vital membrane bound mitochondrial ATPase involved in tumor progression. *Journal of Biomembranes and Bioenergetic* 2012 DOI: 10.1007/s10863-012-9424-5
- 18- Gires O, Münz M, Schaffrik M, Kieu C, Rauch J, Ahlemann M, Eberle D, Mack B, Wollenberg B, Lang S, Hofmann T, Hammerschmidt W, Zeidler R. Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci.* 2004 ; 61(10):1198-207.
- 19- Schaffrik, MB, Mack C, Matthias, Rauch J, and Gires O, Molecular characterization of the tumor-associated antigen AAA-TOB3, *Cell Mol Life Sci.* 2006 ; 63 (18) 2162-2174.
- 20- Da Cruz, S, Xenarios, I, Langridge, J, Vilbois F, Parone PA, Martinou JC, Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 278 (2003) 41566–41571.
- 21- Da Cruz S and Martinou JC. Purification and proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *Methods Mol Biol.* 432 (2008) 101-16.
- 22- Piano F, Schetter AJ, Morton DG, Gunsalus KC, Reinke V, Kim SK and Kempthues KJ, Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*. *Curr Biol* 12 (2002) 1959–1964.
- 23- Kamath, R. S and Ahringer, J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* 2003 ; 30, 313-21.
- 24- F. Simmer F, Moorman C, van der Linden AM, Kuijk E, van den Berghe PV, Kamath RS, Fraser AG, Ahringer J and Plasterk RH, Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* 1 (2003) E12.
- 25- Sonnichsen B, Koski LB, Walsh A, Marschall P, Neumann B, Brehm M, Alleaume AM, Artelt J, Bettencourt P, Cassin E, Fullgenome E. RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 434 (2005) 462–469.
- 26- Hoffmann M, Bellance N, Rossignol R, Koopman WJ, Willems PH, Mayatepek E, Bossinger O, Distelmaier F. *C. elegans* ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development. *PLoS One.* 2009 ; 4(10):e7644.
- 27- Guertin, D. A., K. V. Guntur, G. W. Bell, C. C. Thoreen, and D. M. Sabatini. Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth and division. *Curr Biol* 2006 16:958-70.
- 28- Gilquin B, Taillebourg E, Cherradi N, Hubstenberger A, Gay O, Merle N, Assard N, Fauvarque MO, Tomohiro S, Kuge O and Baudier J. The AAA+ ATPase ATAD3A

controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membrane. *Mol.Cell.Biol.* 2010a ; 30(8):1984-96.

29- Bogenhagen DF, Rousseau D and Burke S, The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J. Biol. Chem.* 2008 ; 283 (6) 3665-3667.

30- Hubstenberger A, Merle N, Charton R, Brandolin G and Rousseau D, Topological analysis of ATAD3A insertion in purified human mitochondria, *J. Bioener. & Biomemb.* 2010 ; 42(2):143-50.

31- Gilquin B, Cannon BR, Hubstenberger A, Moulouel B, Falk E, Merle N, Assard N, Kieffer S, Rousseau D, Wilder PT, Weber DJ, Baudier J. The calcium-dependent interaction between S100B and the mitochondrial AAA ATPase ATAD3A and the role of this complex in the cytoplasmic processing of ATAD3A. *Mol Cell Biol.* 2010b; 30(11):2724-36.

32- Li S, Cl  men  on B, Catty C, Brandolin B, Schlattner U, Rousseau D. Yeast-based production and purification of HIS-tagged human ATAD3A, a specific target of S100B. *Protein Expression and Purification.* 2012, dx.doi.org/10.1016/j.pep.2012.04.005

33- Hubstenberger A, Labourdette G, Baudier J and, Rousseau D. ATAD3A and ATAD3B are distal 1p-located genes differentially expressed in human glioma cell lines and present in vitro anti-oncogenic and chemoresistant properties, *Experimental Cell Research.* 2008 ; 314, 2870-2883.

34-Fang HY, Chang CL, Hsu SH, Huang CY, Chiang SF, Chiou SH, Huang CH, Hsiao YT, Lin TY, Chiang IP, Hsu WH, Sugano S, Chen CY, Lin CY, Ko WJ, Chow KC. ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells. *J Cell Sci.* 2010 ;123:1171-80.

35- Chen TC, Hung YC, Lin TY, Chang HW, Chiang IP, Chen YY, Chow KC. Human papillomavirus infection and expression of ATPase family AAA domain containing 3A, a novel anti-autophagy factor, in uterine cervical cancer. *Int J Mol Med.* 2011 28(5):689-96. doi: 10.3892/ijmm.2011.743.

36- Huang KH, Chow KC, Chang HW, Lin TY, Lee MC. The ATPase family, AAA domain containing 3A is an anti-apoptotic factor and a secretion regulator of PSA in the prostate cancer. *Int J Mol Med* 2011, 28(1):9-15.

37- de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 2008, 456(7222):605-10.

38- Wang HJ, Guay G, Pogan L, Sauvé R, Nabi IR. Calcium regulates the association between mitochondria and a smooth subdomain of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2000, 150(6):1489-98.

39- Csord  s G, Renken C, Várnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajn  czky G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* 2006, 174(7):915-21.

- 40- Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol.* 2006, 175(6):901-11.
- 41- Goetz JG, Genty H, St-Pierre P, Dang T, Joshi B, Sauvé R, Vogl W, Nabi IR. Reversible interactions between smooth domains of the endoplasmic reticulum and mitochondria are regulated by physiological cytosolic Ca²⁺ levels. *J Cell Sci.* 2007, 120:3553-64.
- 42- de Brito OM, Scorrano An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *L. EMBO J.* 2010, 29(16):2715-23.
- 43- Chiang SF, Huang CY, Lin TY, Chiou SH, Chow KC. An alternative import pathway of AIF to the mitochondria. *Int J Mol Med.* 2012, 29(3):365-72.
- 44- Hoffmann M, Honnen S, Mayatepek E, Wätjen W, Koopman WJ, Bossinger O, Distelmaier F. MICS-1 interacts with mitochondrial ATAD-3 and modulates lifespan in *C. elegans*. *Exp Gerontol.* 2012, 47(3):270-5.
- 45- McKay RM, McKay JP, Avery L, Graff JM. *C elegans*: a model for exploring the genetics of fat storage. *Dev Cell.* 2003, 4(1):131-42.
- 46- Wilson-Fritch L, Burkart A, Bell G, Mendelson K, Leszyk J, Nicoloso S, Czech M, Corvera S. Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol.* 2003, 23(3):1085-94.
- 47- Kita T, Nishida H, Shibata H, Niimi S, Higuti T, Arakaki N. Possible role of mitochondrial remodeling on cellular triacylglycerol accumulation. *J Biochem.* 2009, 146(6):787-96.
- 48- Gao CL, Liu GL, Liu S, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, Xia ZK, Guo XR. Overexpression of PGC-1 β improves insulin sensitivity and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem.* 2011, 353(1-2):215-23.
- 49- Guo Y, Walther TC, Rao M, Stuurman N, Goshima G, Terayama K, Wong JS, Vale RD, Walter P, Farese RV. Functional genomic screen reveals genes involved in lipid-droplet formation and utilization. *Nature.* 2008, 453(7195):657-61.
- 50- Cho SY, Park PJ, Shin ES, Lee JH, Chang HK, Lee TR. Proteomic analysis of mitochondrial proteins of basal and lipolytically (isoproterenol and TNF- α)-stimulated adipocytes. *J Cell Biochem.* 2009, 106(2):257-66.
- 51- Newton BW, Cologna SM, Moya C, Russell DH, Russell WK, Jayaraman A. Proteomic analysis of 3T3-L1 adipocyte mitochondria during differentiation and enlargement. *J Proteome Res.* 2011, 10(10):4692-702.

- 52- Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjölin Arner P. Strong association between mtDNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia* 2007 50:2526-2533.
- 53- Bogacka I, Ukropcova B, McNeil M, Gimble JM, Smith SR. Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90(12):6650-6.
- 54- Muoio D, Seefeld K, Witters LA and Coleman RA. AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that *sn*-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target *Biochem. J.* 1999, 338: 783–791.
- 55- Shi Y and Burn P. Lipid metabolic enzymes: emerging drug targets for the treatment of obesity. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2004, 3, 695-710.
- 56- Guo Y, Cordes KR, Farese RV Jr, Walther TC Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci.* 2009, 122:749-52.
- 57- Blanchette-Mackie EJ, Dwyer NK, Barber T, Coxey RA, Takeda T, Rondinone CM, Theodorakis JL, Greenberg AS, Londos C. Perilipin is located on the surface layer of intracellular lipid droplets in adipocytes. *J Lipid Res.* 1995, 36(6):1211-26.
- 58- Munday MR, Campbell DG, Carling D, Hardie DG. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *Eur J Biochem.* 1988; 175(2):331-8.
- 59- Vingtdoux V, Giliberto L, Zhao H, Chandakkar P, Wu Q, Simon JE, Janle EM, Lobo J, Ferruzzi MG, Davies P, Marambaud P. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem.* 2010 ;285(12):9100-13.
- 60- Vingtdoux V, Chandakkar P, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Small-molecule activators of AMP-activated protein kinase (AMPK), RSVA314 and RSVA405, inhibit adipogenesis. *Mol Med.* 2011, 17(9-10):1022-30. doi: 10.2119/molmed.2011.00163.
- 61- Monge C, Beraud N, Kuznetsov AV, Rostovtseva T, Sackett D, Schlattner U, Vendelin M, Saks VA. Regulation of respiration in brain mitochondria and synaptosomes: restrictions of ADP diffusion in situ, roles of tubulin, and mitochondrial creatine kinase. *Mol Cell Biochem.* 2008, 318(1-2):147-65.
- 62- Gao CL, Liu GL, Liu S, Chen XH, Ji CB, Zhang CM, Xia ZK, Guo XR. Overexpression of PGC-1 β improves insulin sensitivity and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Biochem.* 2011, 353(1-2):215-23.
- 63- Xie W, Hamilton JA, Kirkland JL, Corkey BE, Guo W. Oleate-induced formation of fat cells with impaired insulin sensitivity. *Lipids.* 2006 ;41(3):267-71.
- 64- Singh R, Kaushik S, Wang Y, Xiang Y, Novak I, Komatsu M, Tanaka K, Cuervo AM, Czaja MJ. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009, 458(7242):1131-5.

- 65- Bianchi A, Evans JL, Iverson AJ, Nordlund AC, Watts TD, Witters LA. Identification of an isozymic form of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.* 1990, 265(3):1502-9.
- 66- Ha J, Lee JK, Kim KS, Witters LA, Kim KH. Cloning of human acetyl-CoA carboxylase-beta and its unique features. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93(21):11466-70.
- 67- Lu RH, Ji H, Chang ZG, Su SS, Yang GS. Mitochondrial development and the influence of its dysfunction during rat adipocyte differentiation. *Mol Biol Rep.* 2010, 37(5):2173-82.
- 68- Ducluzeau PH, Priou M, Weitheimer M, Flamment M, Duluc L, Iacobazi F, Soletti R, Simard G, Durand A, Rieusset J, Andriantsitohaina R, Malthiery Y. Dynamic regulation of mitochondrial network and oxidative functions during 3T3-L1 fat cell differentiation. *J Physiol Biochem.* 2011, 67(3):285-96.
- 69- Kaaman M, Sparks LM, van Harmelen V, Smith SR, Sjölin E, Dahlman I, Arner P. Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia.* 2007, 50(12):2526-33.
- 70- He J, Cooper HM, Reyes A, Di Re M, Sembongi H, Litwin TR, Gao J, Neuman KC, Fearnley IM, Spinazzola A, Walker JE, Holt IJ. Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res.* 2012 Mar 26.
- 71- Vankoningsloo S, Piens M, Lecocq C, Gilson A, De Pauw A, Renard P, Demazy C, Houbion A, Raes M, Arnould T. Mitochondrial dysfunction induces triglyceride accumulation in 3T3-L1 cells: role of fatty acid beta-oxidation and glucose. *J Lipid Res.* 2005, 46(6):1133-49.
- 72- Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010, 11(12):872-84.
- 73- Yang CC, Chen D, Lee SS, Walter L. The dynamin-related protein DRP-1 and the insulin signaling pathway cooperate to modulate *Caenorhabditis elegans* longevity. *Aging Cell.* 2011, 10(4):724-8.
- 74- McCormick MA, Tsai SY, Kennedy BK. TOR and ageing: a complex pathway for a complex process. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011, 366(1561):17-27.
- 75- Rosen ED, Spiegelman BM. Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature.* 2006, 444(7121):847-53.
- 76- Greenberg AS, Coleman RA, Kraemer FB, McManaman JL, Obin MS, Puri V, Yan QW, Miyoshi H, Mashek DG. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. *J Clin Invest.* 2011, 121(6):2102-10. doi: 10.1172/JCI46069.
- 77- Linder P, Jankowsky E. From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011, 12(8):505-16.

ARTICLE II

Résumé de l'article II

Yeast-based production and purification of HIS-tagged human ATAD3A, a specific target of S100B

ATAD3 est une ATPase intégrale de la membrane interne mitochondriale dont la fonction est inconnue. ATAD3 est absente chez la levure et les protozoaires et présente dans tous les eucaryotes pluricellulaires où son expression est essentielle au développement. À ce jour, l'expression d'ATAD3 entière, dans des bactéries, n'a pas abouti en raison de dégradations endogènes élevées. En utilisant *Saccharomyces cerevisiae* comme système d'expression hétérologue, nous avons conçu un plasmide d'expression exprimant ATAD3A-Myc-HIS humaine à un niveau relativement élevé (50 µg / g d'extrait de levure, rendement de 1/20, 000), sans affecter la croissance des levures de manière significative. La plupart de l'ATAD3A-Myc-HIS humaine exprimée co-purifie avec la fraction mitochondriale de la levure, ce qui suggère que l'adressage d'ATAD3 à cet organite est conservé dans la levure. Comme la protéine endogène dans les cellules humaines, ATAD3A-Myc-His exprimée dans la levure se trouve résistante à l'extraction par le sel et certains détergents, ce qui suggère également une insertion membranaire. Les détergents comme le Sarkosyl, C13-DAO, C12-DAO et ONMG permettent de solubiliser ATAD3A-Myc-HIS depuis les extraits de levure, mais ces espèces solubles ne fixent pas la matrice d'agarose-nickel. En revanche, ATAD3A-Myc-His dénaturée par l'urée peut se lier aux billes d'agarose-nickel et être renaturée et éluée pour obtenir ATAD3A-Myc-HIS hautement pure. Comme la protéine native in vivo, ATAD3 recombinante renaturée est reconnue spécifiquement in vitro par la S100B et S100A dans des essais de Far-Western.

Contents lists available at [SciVerse ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com)

Protein Expression and Purification

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yprep

Yeast-based production and purification of HIS-tagged human ATAD3A, A specific target of S100B

Shuijie Li^{a,b}, Benjamin Cléménçon^{a,b}, Patrice Catty^c, Gérard Brandolin^d, Uwe Schlattner^{a,b}, Denis Rousseau^{a,b,d,*}

^a Université Joseph Fourier, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, BP53 38041 Grenoble Cedex, France

^b INSERM U1055, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, BP53 38041 Grenoble Cedex, France

^c Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux, iRTSV-CEA, Grenoble, France

^d Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, iRTSV-CEA, Grenoble, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 20 February 2012

and in revised form 30 March 2012

Available online 21 April 2012

Keywords:

ATAD3

S100B

S100A1

AAA-ATPase

Tob3

ABSTRACT

ATAD3 is a mitochondrial integral inner membrane ATPase with unknown function. ATAD3 is absent in yeast and protozoan and present in all pluricellular eucaryotes where its expression is essential for development. To date, bacterial-based expression of full-length ATAD3 has been unsuccessful because of very high levels of endogenous degradation. Based on *Saccharomyces cerevisiae* as a heterogeneous expression system, we engineered a high copy strain expressing human ATAD3A-Myc-HIS at a relative high level (2.5 mg/l of yeast culture) without significantly affecting yeast growth. Most of the expressed human ATAD3A-Myc-HIS co-purified with the yeast mitochondrial fraction thus suggesting that targeting to this organelle is preserved in yeast. Like the endogenous protein in human cells, ATAD3A-Myc-HIS expressed in yeast is found resistant to extraction with salt and certain detergents, suggesting membrane insertion. Sarkosyl, C13-DAO, C12-DAO and ONMG efficiently solubilized ATAD3A-Myc-HIS from yeast extracts, but these soluble species did not bind to agarose–nickel matrix. By contrast, urea-denatured ATAD3A-Myc-HIS bound to agarose–nickel beads and could be renatured and eluted to obtain highly pure ATAD3A-Myc-HIS. As the native protein *in vivo*, this recombinant, renatured species specifically bound *in vitro* to S100B and S100A1 in Far-Western assays.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

ATPase family AAA domain-containing protein 3 (ATAD3)¹ is a 66 kDa (586 amino-acids) mitochondrial inner membrane ATPase with unknown but vital function [1]. ATAD3 appears as a single gene in pluricellular eukaryote genomes and has no close homolog in yeast or protistes. The ATAD3 gene has been preserved in plants (*Arabidopsis thaliana*), invertebrates (*Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster*), vertebrates and mammals. In primates and humans, the appearance of two additional genes gives rise to ATAD3A, 3B and 3C, with ATAD3A corresponding to the ancestral gene.

ATAD3 protein was first described as a target of c-Myc [2] and later identified in patients with carcinoma, particularly as a marker of glioma subtypes [3,4]. ATAD3 was soon localized in mitochondria [4] and mitochondrial proteomics approaches described ATAD3 associated with the inner membrane [5,6]. Although ATAD3 does not possess a canonical mitochondrial targeting sequence [3], it was shown to be essential for early embryogenesis in *C. elegans* through a major contribution to mitochondrial biogenesis at larva stage 1 [7–11,1]. Thus, ATAD3 appeared with the evolution of pluricellular organization, acquired an essential mitochondrial function, and further diversified in primates and humans.

An improved understanding of ATAD3 localization and topology is therefore needed to address its cellular function. The analysis of the primary sequence of ATAD3, like with almost all ATPases, reveals two major domains. The C-terminal region (337–586), constituting the ATPase core with the well-known Walker's sequences, and the ATAD3-specific N-terminal region (1–336), which contains few putative transmembrane domains, a flexible proline-rich region, and a coiled-coil region that may confer specific function(s) to ATAD3. Particularly relevant for its function may be one of the putative transmembrane domains that are predicted by different approaches [3]. Previous experiments confirmed that ATAD3 is an integral membrane protein because of its resistance to extraction by certain detergents or salt [12,13]. Furthermore, proteolysis experiments with freshly isolated mitochondria have shown that

ATAD3 is an integral membrane protein because of its resistance to extraction by certain detergents or salt [12,13]. Furthermore, proteolysis experiments with freshly isolated mitochondria have shown that

* Corresponding author at: Université Joseph Fourier, Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, BP53 38041 Grenoble Cedex, France. Fax: +33 04 76 51 42 18.

E-mail address: Denis.Rousseau@ujf-grenoble.fr (D. Rousseau).

¹ Abbreviations used: ATAD3, ATPase family AAA domain-containing protein 3; CSM-URA, complete supplement mixture without uracile; SDS, sodium dodecyl sulfate; ANC2, adenine nucleotide carrier 2; Calm., calmodulin.

the N-terminal domain is rapidly and totally digested [13] and thus exposed to the cytosol or to the accessible inter-membrane/cristae space. On the contrary, the C-terminal domain is resistant to proteolysis and thus very probably located in the matrix [13–15].

However, to date no function is directly related to ATAD3, except the fact that siRNA invalidation in different cellular models showed a strong impact on the organization of the mitochondrial network [1,15]. ATAD3 may therefore participate in mitochondrial structure and dynamics [15]. Like most ATPases, ATAD3A homopolymerizes and may form a functional hexamer that may transport or modify an unknown substrate [16]. Intermediate or storage forms were also identified, like a reduced dimeric form and a preoligomerized trimeric form [16]. Finally, it must be pointed out that to date, the main and unique functional characteristic of ATAD3 is its ability to bind *in vivo* to S100B [15,16], a property that has been one at the origin of ATAD3 discovery [16].

To explore structural and functional properties of ATAD3 *in vitro*, availability of pure ATAD3 has emerged as a bottleneck. It is almost impossible to produce full-length ATAD3 in bacteria, as observed in multiple *Escherichia coli* (DH5alpha, BHL21, Rosetta), and following different induction procedures, in several laboratories, mostly due to high endogenous degradation of the recombinant protein (our unpublished trials and personal communications). Separate bacterial expression of the C- and the N-terminal halves was described by He and colleagues in 2007 [12], but caution is warranted as to the utility of these isolated domains. The authors described an interaction of mtDNA with the N-terminal domain, which other studies have clearly located rather in the inter-membrane space [13–15]. Also the C-terminal ATPase domain may not show its native functionality when separated from the N-terminal domain likely encoding the functional specificity of the protein.

In order to produce full-length human recombinant ATAD3A, we used a novel strategy based on *Saccharomyces cerevisiae* together with a high-copy number plasmid encoding human ATAD3A fused to Myc- and HIS-tags. Stable expression of this construct was obtained and solubilization was achieved by four detergents or urea-denaturation. In contrast to detergent-solubilized species, urea-denatured ATAD3A-Myc-HIS could be affinity-purified to homogeneity after renaturation on the resin. Correct refolding of ATAD3A-Myc-HIS was suggested by its specific *in vitro* interaction with the well-known binding partner S100B protein, the only existing functional assay for ATAD3.

Materials and methods

Strains and media

For maintenance, the yeast strain W303-1A [17] was grown at 30 °C in YD medium (1% KAT yeast extract, 2% glucose). Plasmid selection was performed by growing cells in synthetic minimal DOB medium (2% glucose, 0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate, without aminoacids from Q-biogene) added with a Complete Supplement Mixture without uracile (CSM-URA from Bio101). Cells were transformed following the method of Kuo and Campbell [18], without DNA carrier.

Human ATAD3A cloning

The human ATAD3A cDNA (EMBL-Bank: AK001571.1: Homo sapiens cDNA FLJ10709 fis, clone NT2RP3000869) encoding Q9NV17-2 was modified at its 3' end by the insertion of a HIS-Myc epitope coding sequence. The insert was extracted from the pcDNATM3.1⁺-ATAD3A vector by EcoRI/AflII and subcloned into the same sites of the multicopy yeast expression vector YEP196PALHE. The latter, hereafter denoted HC, is derived from

YEplac195 [19] and contains for the heterologous expression, the strong constitutive promoter of the yeast *PMA1* gene and the terminator of the yeast *ADH1* gene. The expression plasmid is therefore called HC-ATAD3A-HIS-Myc. From the pcDNATM3.1⁺-ATAD3A vector, the modified ATAD3A cDNA was also extracted by EcoRI/HindIII and subcloned into the same sites of the low-copy-number yeast vector CEN-CadA, a vector previously used for the expression of a cadmium transporting P-type ATPases, here called LC [20].

Yeast lysates (French press) and sub-cellular fractionation

For total yeast extracts, exponentially growing yeasts at OD of 4–6 were centrifuged, rinsed in PBS at 4 °C and resuspended at 4 °C in lysis buffer containing NaH₂PO₄ 50 mM pH 7.4, NaCl 250 mM and antiprotease cocktail (Pierce) for French press extraction. Yeast lysates were directly used for solubilization studies.

For sub-cellular fractionation, exponentially growing yeasts at OD of 4–6 were centrifuged, rinsed in PBS at 4 °C and resuspended in Zymolyase buffer and treated according to Dahout-Gonzalez et al. [21]. Cytoplasmic, nuclear and mitochondrial subfractions were analyzed for their purity by western blot.

Detergents and solubilization assays

The detergents used for solubilization are Triton X100, C12-DAO (dodecyl dimethyl amine oxide), C13-DAO (tridecyl dimethyl amine oxide), ONMG (*n*-nonyl-*b*-maltopyranoside and *n*-octyl-*b*-*D*-glucopyranoside), Chaps, Sarkosyl, Tween 20, LDAO (lauryl dimethyl amine oxide), C12E9 (Polyoxyethylene (8) dodecyl ether), DDM (*n*-dodecyl-*b*-*D*-Maltopyranoside) and SDS (sodium dodecyl sulfate) as positive control. All detergents were purchased from SIGMATM Anatrace[®].

French press extracts were treated by aliquots to test ATAD3A-Myc-HIS solubilization with 1% detergent in NaH₂PO₄ 50 mM pH 7.4, NaCl 250 mM and antiprotease cocktail. After 15 min under vigorous shaking at room temperature, extracts were centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C. Supernatants and pellets were analyzed directly on SDS-PAGE.

Western blot assays

Western blot were performed using the following antibodies. Anti-ATAD3 antibodies are rabbit polyclonal anti-peptide antibodies described in reference [14]. Anti-yeast adenine nucleotide carrier 2 (ANC2) are rabbit polyclonal antibodies provided by G. Brandolin, anti-yeast Histone H2A and anti-yeast Tubulin were from Active MotifTM and anti-Myc and anti-HIS were provided from QiagenTM. All these antibodies were used according to manufacturer's or producer's recommendations.

Ni-Sepharose purification

Total yeast extracts from French press were either treated by detergent (1%) or Urea (6 M) in the extraction buffer (150 mM NaCl, 100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl pH 8.0). After a centrifugation of 10,000g for 5 min, supernatants were incubated with NTA resin for 3 h at 4 °C. Thereafter, resins were rinsed four times with each washing buffers containing urea at 6, 4, 2, 1 and 0 mM (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl pH 6.3, 1% Sarkosyl). Imidazole was used for elution at a concentration of 250 mM in elution buffer (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-Cl Tris base pH 5.9). Fractions were separated by SDS-PAGE and stained with Colloidal Coomassie Blue InvitrogenTM.

Far-Western assay

In vitro transcribed/translated/labeled S100 proteins were produced using TNT™ Promega system according to manufacturer instructions. Briefly, S100B, S100A1, S100A6, S100A11 and deltaC-ter-S100B cDNAs subcloned in pcDNA3™ (T7 driven), were transcribed/translated/labeled *in vitro* with S³⁵ methionine–cysteine (NEM) and used directly as probes for Far Western assay like described previously [16]. Purified ATAD3A-Myc-HIS was migrated on SDS–PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and pre-hybridized in blocking buffer for 2 h at 4 °C. S³⁵ labeled S100 proteins were added in the hybridization buffer and membranes were incubated over night at 4 °C. Membranes were rinsed five times at 4 °C with washing buffer and exposed to radiographic film for 2–5 days.

Results

Expression of human ATAD3A-myc-HIS in *S. cerevisiae*

Because bacteria-based expression of full length ATAD3 has never succeeded before, we aimed at expression of ATAD3 in eukaryotic cells with the rationale to provide a mitochondrial compartment. We used the yeast *S. cerevisiae* (URA-) together with His(x6) Myc C-terminally tagged human ATAD3A cDNA subcloned into low (LC) or high copy plasmids (HC) in order to obtain stable yeast transformants expressing ATAD3A. After transformation and selection on URA-medium, few clones were isolated and checked for ATAD3A expression by Western-blot (Fig. 1A). Only high copy

(HC) plasmid transformants yielded detectable levels of ATAD3A. The subcellular compartmentalization of ATAD3A-Myc-HIS was then determined in clone HC2 by Western-blot probing of yeast nuclear, cytoplasmic and mitochondrial subfractions (Fig. 1B). Most of the expressed ATAD3A-Myc-HIS was detected in the mitochondrial fraction, the purity of which was assessed with anti-ANC2 antibodies, thus indicating that ATAD3A-Myc-HIS may have reached yeast mitochondria *in vivo*.

We then verified the presence of the C-terminal Myc- and His-tags by Western-blot (Fig. 1C). The expressed construct did contain both tags and appeared at the correct size of about 70 kDa (66.2 kDa ATAD3A, 586 a.a., plus 3.2 kDa Myc- and HIS-tags, 16 a.a.).

Finally we tested whether ATAD3A-Myc-HIS expression affects yeast cell growth in fermentable substrate (lactate) or glycolytic media (glucose, favoring glycolysis). Compared to control yeast clone HCO, no major difference of division time was found in clone HC2, in either conditions (60 min for both HC2 and HCO in lactate). Only a small difference was seen for the latency period (19 h in HC2 versus 17 h in HCO, in lactate) and in saturation density (2.5×10^6 /ml in HC2 versus 3.3×10^6 /ml in HCO, in lactate). The impact of ATAD3A-Myc-HIS expression on yeast growth, which does not naturally express this protein, is therefore rather minor.

Solubilization and Ni-Sepharose purification

The first problem to solve was to efficiently solubilize ATAD3A-Myc-HIS for HIS-tag based purification. As previously shown, ATAD3A is an integral membrane protein which is resistant to extraction by different detergents [12,16]. We tested therefore a panel of different classes of detergents: Triton X100, C12-DAO, C13-DAO,

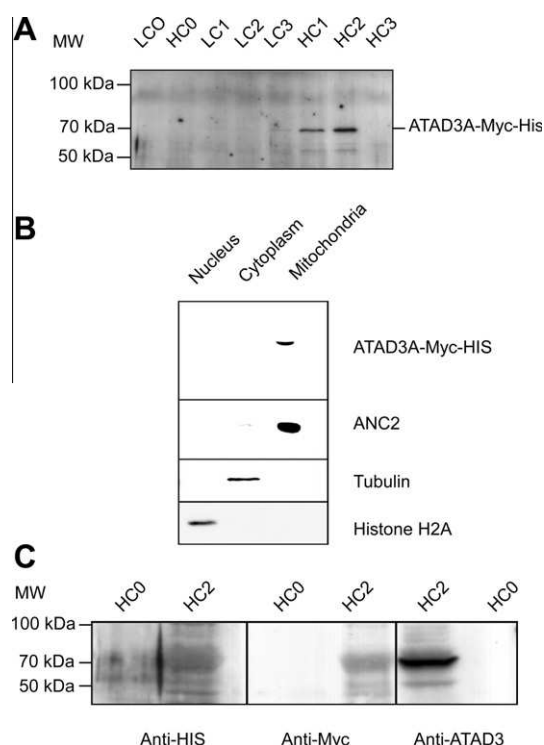


Fig. 1. Screening for expression and sub-cellular distribution of ATAD3A-Myc-HIS. (A) Selected Ura+ yeast transformants were checked for ATAD3A expression in total yeast extracts. Tested samples represent low (LC) or high copy plasmid (HC) numbered clones. LC0 and HC0 are empty plasmid containing clones. ATAD3A-Myc-HIS was detected with anti-Nter-ATAD3 antibodies. (B) Yeast HC2 subcellular fractions (nucleus, cytoplasm and mitochondria) were prepared and analyzed by Western blotting for ATAD3, ANC2 (mitochondrial marker), Tubulin (cytoplasmic marker) and Histone H2A (nuclear marker). (C) The presence of the double Myc-HIS tag was controlled on HC2 by Western blotting with the respective antibodies using HCO as a negative control.

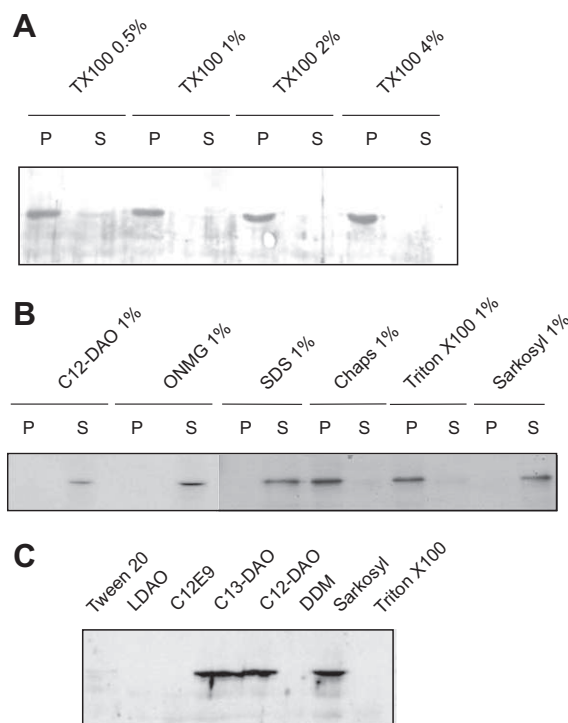


Fig. 2. Solubilization of ATAD3A-HIS-Myc from yeast extracts. ATAD3A-HIS-Myc solubilization was tested in total yeast French press extracts. (A) Different Triton X100 concentrations were tested from 0.5% to 4%. (B) C12-DAO, ONMG, SDS, Chaps, Triton X100 and Sarkosyl (at 1% each) were compared to test solubilization. P, pellets and S, supernatants, were checked with anti-ATAD3 antibodies. (C) Tween 20, LDAO, C12E9, C13- and C12-DAO, DDM, Sarkosyl and Triton X100 (at 1% each) were compared to test solubilization. Supernatants were checked by Western blotting with anti-ATAD3 antibodies.

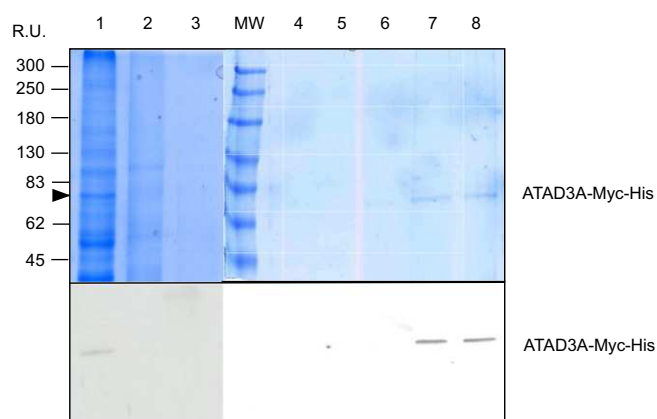


Fig. 3. Purification of denatured/renatured ATAD3-HIS-Myc on NTA-Sepharose. Protein bound to a NTA-Sepharose column was renatured by decreasing urea concentrations and eluted by imidazole. Upper panel: Initial extract, washes and elution fractions were analyzed by colloidal Coomassie Blue-stained SDS-PAGE: 1, total lysate, 2–6, first washes in 6, 4, 2, 1 and 0 M urea, 7–8, first and second imidazole elutions. Lower panel: these fractions were further tested by Western blotting with ATAD3 antibodies. Bands correspond to approximately 50 ng of purified protein.

ONMG, Chaps, Sarkosyl, Tween 20, LDAO, C12E9, and DTM, as well as SDS as a positive control (Fig. 2). ATAD3A-Myc-HIS was resistant to Triton X100 extraction for up to 4% (Fig. 2A), suggesting again an *in vivo*-like insertion into mitochondrial membranes [12,22]. Among the eleven detergents tested only four (Sarkosyl, ONMG, C13-DAO and C12-DAO), plus SDS, efficiently solubilized ATAD3A-Myc-HIS (Figs. 2B, 2C). We first used 1% Sarkosyl-treated extracts for nickel-Sepharose affinity purification, but noticed that these solubilized forms did not bind to the resin, and this was also true for C12-DAO. We therefore solubilized ATAD3A-Myc-HIS by denaturation with 6 M urea. These species bound to nickel-Sepharose and allowed renaturation while bound to the resin by gradually decreasing urea concentration in presence of 1% Sarkosyl. Finally, protein was eluted with 250 mM imidazole also containing 1% Sarkosyl. Colloidal Coomassie Blue-stained SDS-PAGE of washes and elution fractions revealed a single protein band that was identified to be ATAD3 by Western blot (Fig. 3). Thus, ATAD3A-Myc-HIS was efficiently purified from yeast extracts, with a yield of about 50 ng of protein per 20 μ l of yeast extract (as estimated from the Colloidal Coomassie Blue-staining in Fig. 3), thus corresponding to about 2.5 mg/l yeast extract and 0.5 mg/l yeast culture.

Testing of S100B binding to ATAD3A-Myc-HIS by Far-Western

Despite several trials, we failed to measure any ATPase activity of the purified ATAD3A-Myc-HIS. This is understandable as most ATPases need their substrate to hydrolyze ATP and the one of ATAD3 is still unknown. The only known functional property of ATAD3 to confirm its native structure is its specific recognition by S100B, as detectable by Far Western assays, which has been one at the origin of ATAD3 discovery [15,16]. We thus performed Far Western assays on purified renatured ATAD3A-Myc-HIS using as a probe different proteins of the S100 family that were 35 S labeled with 35 S Cysteine/Methionine: S100A1, A6, A11, B and S100B delta Cter (C-terminal truncation of S100B with a.a. 1 to 66, a.a. 67–92 missing). *In vitro* transcribed/translated protein probes analyzed by SDS-PAGE and autoradiography (Fig. 4A) had correct sizes and about similar 35 S incorporation, considering the different number of methionine and cysteine residues in S100A6 (3), S100B (7), S100A11 (7), S100B delta C-ter (3) and S100A1 (4). These probes were used for Far Western assays on purified, SDS-

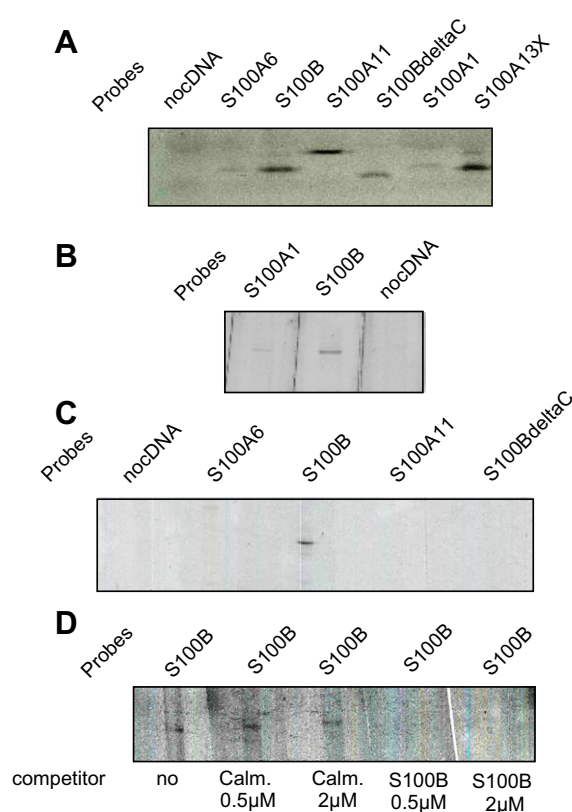


Fig. 4. Far Western analysis of purified ATAD3A-HIS-Myc. Purified ATAD3A-HIS-Myc was tested for S100 binding by Far Western. (A) S100 protein probes, *in vitro* translated and labeled with 35 S-Methionine/cysteine, analyzed by SDS-PAGE and autoradiographed. (B and C) Far Westerns were performed with all labeled S100 protein probes as indicated. (D) Far Western with labeled S100B probe in absence or presence of competitors in the hybridization media: calmodulin (Calm.) or S100B, at the indicated concentrations.

PAGE-separated and blotted ATAD3A-Myc-HIS. As can be seen in Fig. 4B and C, S100B binds specifically to ATAD3A-Myc-HIS in this assay while S100A6, S100A11 and S100B delta C-ter did not, with the latter indicating that the C-terminal part of S100B is important for interaction. S100A1 gave only a faint signal, but it has to be considered that its specific radioactivity is two times lower than with S100B (seven Met/Cys versus four). These data suggests that both, S100A1 and S100B, may be able to bind ATAD3 *in vivo*, even if S100A1 may have a lower affinity to ATAD3. Finally we tested again the specificity of ATAD3-Myc-HIS binding for S100B by using a Far Western competition assay with purified Calmodulin (a distant homolog of S100 proteins) and S100B. Addition of non-labeled S100B at 0.5–2 μ M counteracted the binding of the S100B probe while Calmodulin had no competitive effect at the same concentrations (Fig. 4C). Purified recombinant human ATAD3-Myc-HIS appears therefore to have similar properties as the native endogenous enzyme.

Discussion

In this work, we succeeded in the expression of ATAD3A-Myc-HIS in *S. cerevisiae*, using high-copy-number plasmid. The expressed ATAD3A-Myc-HIS is shown by cell fractionation to co-localize with the mitochondrial compartment and to resist extraction by some detergents like shown previously for endogenous ATAD3 in human cells [12,22], thus suggesting that ATAD3A-Myc-HIS may have reached a mitochondrial membrane insertion. We successfully used HIS-tag-based purification from

solubilized yeast extracts, following a urea-based denaturation/renaturation procedure, to obtain rather pure full-length ATAD3A-Myc-HIS, while earlier trials in several laboratories and different bacterial systems failed (personal data and communications).

Purified ATAD3 was tested successfully for its specific ability to bind S100B and S100A1 [16]. The results are fully consistent with *in vivo* data, showing that S100B and S100A1 are specific targets of ATAD3A, in contrast to other S100 proteins and Calmodulin. This result is not surprising as S100A1 is the closest homolog of S100B (63% sequence identity). S100 proteins are quite divergent, in particular in their C-terminal domains, where only S100B and S100A1 present some similarity. These C-terminal domains of S100B could be involved in ATAD3 interaction, since the C-terminally truncated S100B did not interact with ATAD3A-Myc-HIS in a Far Western assay. The C-terminal sequence of S100B (FMAFVAMVITACHEFFEHE) and of S100A1 (YVVLVAALTVACNNEFWENS, homologies underlined) show a high hydrophobicity of 42% and 50%, respectively (https://www.genscript.com/ssl-bin/site2/peptide_calculation.cgi). Since also the ATAD3 domain that binds to S100B with high affinity (K_D of $0.6 \pm 0.2 \mu\text{M}$, mapped to a.a. 290–310: RITVLEALRHPIQVSRRLSLR [16]) has a hydrophobicity of 38%, interaction with S100B and S100A1 may occur mainly via a hydrophobic interface. Additional ionic interactions cannot be excluded, since the ATAD3 binding motif is basic and S100A1/S100B binding motifs are acidic. All these observations contribute to an understanding of ATAD3-S100B interaction *in vivo* and *in vitro* and may explain the compensatory effects observed in S100A1 and S100B single knock-out animal [22].

Our study is the first achieving purification of full-length ATAD3, albeit at low yield, which is a major step for future *in vitro* studies. Earlier trials using bacterial expression systems and following different strategies failed with *E. coli* (DH5alpha, BHL21, Rosetta) with different time and temperature inductions. He and colleagues succeeded in separate expression and purification of N- and C-terminal halves of ATAD3, but these fragments may not allow studying the interplay between the N-terminal part and the motor function of the C-terminal ATPase domain [12]. The major advantage of our purification scheme is rapidity, with less than 4 h from yeast pellets, and reliability, as urea preserves much from any proteolytic activities. However, it may be suitable to continue efforts to purify ATAD3 under native conditions, since partial misfolding after denaturation/renaturation cannot be fully excluded and would hamper reconstitution of ATPase activity. We already succeeded in identifying four detergents for solubilization of ATAD3A-Myc-HIS, but the C-terminal HIS-tag did not bind the resin, probably due to shielding within the detergent micelle. A different procedure for native purification of ATAD3 may be necessary, for example by testing N-terminal tagging.

Recombinant ATAD3A will provide a very useful tool for manifold applications. It may be first suitable to raise novel polyclonal antibodies which have not yet extensively produced (only peptide-generated antibodies are available). Recombinant ATAD3 may also be suitable for phosphorylation studies, as ATAD3 is a potential substrate for kinases like PKC [23]. It would be interesting to look for activating phosphorylations potentially playing a role in homo-polymerization or functional activity of ATAD3 by Far Western. Purified ATAD3A-Myc-HIS may also be used to screen for potential substrates, although we failed to detect intrinsic ATPase activity with ATP alone, which is however expected since most ATPases need their specific substrate to hydrolyze ATP. Because ATAD3 is suspected to play a role in contacts between inner and outer mitochondrial membranes or between mitochondria and endoplasmic reticulum [15,23,1], ATAD3 should have specific interaction partners at these sites and putative candidates could be tested. These include cholesterol and phosphatidyl serine, which are both transferred from endoplasmic reticulum to mitochondria where

they are transformed into steroids and phosphatidyl ethanolamine, respectively [15,24]. This also includes RNA that can be imported into mitochondria such as 5S RNA, and some tRNA for which the transport is not yet understood [25], as well as possible ions fluxes or translational/translocation processes of mitochondria-imported proteins [26–28]. Finally, since ATAD3 seems located in yeast mitochondria, the ATAD3 transformed yeast cell may also represent an interesting *in vivo* model to study the cellular and molecular functions of ATAD3.

Conclusion

With the initial goal of purifying native human full-length ATAD3A-Myc-HIS, we succeeded in solubilizing ATAD3A-Myc-HIS by different detergents but these soluble forms did not bind to nickel resins. We succeeded however in purifying a significant amount of ATAD3A-Myc-HIS after urea denaturation/renaturation procedures, and this protein showed the ATAD3A-specific ability to bind S100B and S100A1. Recombinant ATAD3A may prove to be useful for manifold *in vitro* applications, e.g. to raise polyclonal antibodies which are not commercially available so far, or to test potential substrates and kinases that can promote ATAD3A ATPase-associated activity.

Acknowledgments

We would like to greatly thank Sabine Dalleau and Romain Charton who contributed to the massive yeast cell cultures and Jacques Baudier and Christian Delphin for S100 encoding plasmids and purified S100B and Calmodulin. I am also extremely grateful to Yuliya Lyubenova Dimitrova who daily helps me through enriching discussions.

References

- [1] M. Hoffmann, N. Bellance, R. Rossignol, W.J. Koopman, P.H. Willems, E. Mayatepek, O. Bossinger, F. Distelmaier, C. elegans ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development, PLoS ONE 4 (2009) e7644.
- [2] K.I. Zeller, A.G. Jegga, B.J. Aronow, K.A. O'Donnell, C.V. Dang, An integrated database of genes responsive to the Myc oncogenic transcription factor: identification of direct genomic targets, Genome Biol. 4 (2003) R69.
- [3] A. Hubstenberger, G. Labourdette, J. Baudier, D. Rousseau, ATAD 3A and ATAD 3B are distal 1p-located genes differentially expressed in human glioma cell lines and present *in vitro* anti-oncogenic and chemoresistant properties, Exp. Cell 314 (2008) 2870–2883.
- [4] M. Schaffrik, B. Mack, C. Matthias, J. Rauch, O. Gires, Molecular characterization of the tumor-associated antigen AAA-TOB3, Cell. Mol. Life Sci. 63 (2006) 2162–2174.
- [5] S. Da Cruz, I. Xenarios, J. Langridge, F. Vilbois, P.A. Parone, J.C. Martinou, Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane, J. Biol. Chem. 278 (2003) 41566–41571.
- [6] S. Da Cruz, J.C. Martinou, Purification and proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane, Methods Mol. Biol. 432 (2008) 101–116.
- [7] F. Piano, A.J. Schetter, D.G. Morton, K.C. Gonsalus, V. Reinke, S.K. Kim, K.J. Kempthues, Gene clustering based on RNAi phenotypes of ovary-enriched genes in *C. elegans*, Curr. Biol. 12 (2002) 1959–1964.
- [8] R.S. Kamath, J. Ahringer, Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*, Methods 30 (2003) 313–321.
- [9] R.S. Kamath, A.G. Fraser, Y. Dong, G. Poulin, R. Durbin, M. Gotta, A. Kanapin, N. Le Bot, S. Moreno, M. Sohrmann, Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi, Nature 421 (2003) 231–237.
- [10] F. Simmer, C. Moorman, A.M. van der Linden, E. Kuijk, P.V. van den Berghe, R.S. Kamath, A.G. Fraser, J. Ahringer, R.H. Plasterk, Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions, PLoS Biol. 1 (2003) E12.
- [11] B. Sonnichsen, L.B. Koski, A. Walsh, P. Marschall, B. Neumann, M. Brehm, A.M. Alleaume, J. Artelt, P. Bettencourt, E. Cassin, Fullgenome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*, Nature 434 (2005) 462–469.
- [12] J. He, C.C. Mao, A. Reyes, H. Sembongi, M. Di Re, C. Granycome, A.B. Clippingdale, I.M. Fearnley, M. Harbour, A.J. Robinson, S. Reichelt, J.N. Spelbrink, J.E. Walker, I.J. Holt, The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization, J. Cell Biol. 176 (2007) 141–146.
- [13] D.F. Bogenhagen, D. Rousseau, S. Burke, J. Biol. Chem. 283 (2008) 3665–3675.

- [14] A. Hubstenberger, N. Merle, R. Charton, G. Brandolin, D. Rousseau, J. Bioenerg. Biomemb. 42 (2010) 143–150.
- [15] B. Gilquin, E. Taillebourg, N. Cherradi, A. Hubstenberger, O. Gay, N. Merle, N. Assard, M.O. Fauvarque, S. Tomohiro, O. Kuge, J. Baudier, The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes, Mol. Cell. Biol. 30 (2010) 1984–1996.
- [16] B. Gilquin, B.R. Cannon, A. Hubstenberger, B. Moulouel, E. Falk, N. Merle, S. Kieffer, D. Rousseau, P.T. Wilder, D.J. Weber, J. Baudier, The calcium-dependent interaction between S100B and the mitochondrial AAA ATPase ATAD3A and the role of this complex in the cytoplasmic processing of ATAD3A, Mol. Cell. Biol. 30 (2010) 2724–2736.
- [17] J.W. Wallis, G. Chrebet, G. Brodsky, M. Rolfe, R. Rothstein, A hyper-recombination mutation in *S. cerevisiae* identifies a novel eukaryotic topoisomerase, Cell 58 (1989) 409–419.
- [18] C.L. Kuo, J.L. Campbell, Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* DNA replication genes: isolation of the CDC8 gene and two genes that compensate for the cdc8-1 mutation, Mol. Cell. Biol. 3 (1983) 1730–1737.
- [19] D.R. Gietz, A. Sugino, New yeast–*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites, Gene 74 (1988) 527–534.
- [20] C.C. Wu, N. Bal, J. Pérard, J. Lowe, C. Boscheron, E. Mintz, P. Catty, A cloned prokaryotic Cd²⁺ P-type ATPase increases yeast sensitivity to Cd²⁺, Biochem. Biophys. Res. Commun. 324 (2004) 1034–1040.
- [21] C. Dahout-Gonzalez, C. Ramus, E.P. Dassa, A.C. Dianoux, G. Brandolin, Conformation-dependent swinging of the matrix loop m2 of the mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* ADP/ATP carrier, Biochemistry 44 (2005) 16310–16320.
- [22] I. Marenholz, C.W. Heizmann, G. Fritz, S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology, Biochem. Biophys. Res. Com. 322 (2004) 111–1122.
- [23] H.Y. Fang, C.L. Chang, S.H. Hsu, C.Y. Huang, S.F. Chiang, S.H. Chiou, C.H. Huang, Y.T. Hsiao, T.Y. Lin, I.P. Chiang, W.H. Hsu, S. Sugano, C.Y. Chen, C.Y. Lin, W.J. Ko, K.C. Chow, ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel anti-apoptotic factor in lung adenocarcinoma cells, J. Cell Sci. 123 (2010) 1171–1180.
- [24] C. Osman, D.R. Voelker, T.J. Langer, Making heads or tails of phospholipids in mitochondria, J. Cell Biol. 10 (2011) 7–16.
- [25] I. Tarassov, P. Kamenski, O. Kolesnikova, O. Karicheva, R.P. Martin, I.A. Krasheninnikov, N. Entelis, Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria and mitochondrial translation, Cell Cycle 6 (2007) 2473–2477.
- [26] T. Hayashi, R. Rizzuto, G. Hajnoczky, T.P. Su, MAM: more than just a housekeeper, Trends Cell Biol. 19 (2009) 81–88.
- [27] S. Li, D. Rousseau, ATAD3, a vital mitochondrial membrane ATPase involved in tumor progression, J. Bioenerg. Biomemb. (2012), <http://dx.doi.org/10.1007/s10863-012-9424-5>.
- [28] C. Osman, D.R. Voelker, T. Langer, Making heads or tails of phospholipids in mitochondria, J. Cell Biol. 192 (2011) 7–16.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

ATAD3 (ATPase family AAA Domain-containing protein 3) est une ATPase découverte en 2003, identifiée d'abord parce que son gène est une cible de c-MYC [1] puis comme protéine transmembranaire de la membrane interne mitochondriale [2]. Elle appartient à la très grande famille des AAA-ATPases (ATPases Associated with diverse cellular Activities). Cependant, la fonction d'ATAD3 n'est pas encore connue bien que l'ensemble des études lui reconnaisse un rôle important. En effet, son expression est ubiquitaire, et elle est essentielle à l'embryogenèse, à la structuration du réseau mitochondrial et aux interactions fonctionnelles entre mitochondries et réticulum endoplasmique.

L'invalidation d'ATAD3 bloque le développement de *C. elegans* et de *D. melanogaster*, à des stades nécessitant une augmentation importante de la masse mitochondriale, en perturbant le réseau mitochondrial et ses interactions avec le réticulum endoplasmique. Les premiers organes affectés par l'invalidation d'ATAD3 dans le développement de *C. elegans* (stade L1) sont le tissu intestinal, jouant le rôle des tissus adipeux des mammifères, et les gonades. Pendant la période de ma thèse, pour aller plus loin dans la compréhension de la fonction mitochondriale d'ATAD3, nous avons utilisé la lignée cellulaire de souris 3T3-L1 comme modèle cellulaire de tissu adipeux blanc de mammifères. Par la modification stable et transitoire de l'expression d'ATAD3, j'ai pu étudié la fonction d'ATAD3 au cours de la différenciation des adipocytes 3T3-L1 induite par insuline.

Nous avons montré que (i) ATAD3 est surexprimée assez tôt au cours de la différenciation des cellules 3T3-L1 induite par insuline, au début de l'augmentation de la masse mitochondriale et des processus de remodelage mitochondriaux (ii) ATAD3 est essentielle et limitante pour la différenciation adipocytaire et la lipogenèse (iii) L'invalidation d'ATAD3 inhibe le remodelage mitochondrial et l'augmentation de la masse mitochondriale métabolique, sans affecter la voie de transduction de l'insuline ni l'augmentation, en aval, de la quantité de certaines protéines mitochondriales comme VDAC et ANT. Cependant l'invalidation inhibe l'accumulation d'autres protéines mitochondriales comme certains sous-unités du complexe OXPHOS et de la forme active de l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et (iiii) ces effets peuvent être restaurés par la ré-expression d'ATAD3 ou compensés par la surexpression de Drp1, et non par celle de Mfn2, deux acteurs principaux des processus de fission et de fusion mitochondriales.

L'ensemble de nos résultats montre que, dans les adipocytes blancs tels que les cellules 3T3-L1, ATAD3 contribue principalement à la biogenèse mitochondriale, en liaison avec le

remodelage de ce réseau, et à l'activation, en aval, des processus métaboliques mitochondriaux impliqués dans la formation de gouttelettes lipidiques.

En plus de mon projet majeur, j'ai contribué à quatre autres projets annexes. Le premier porte sur la purification d'ATAD3 humaine à partir de la levure. Nous avons réussi à solubiliser ATAD3A-Myc-HIS depuis les extraits de levure en utilisant plusieurs détergents. Ensuite, nous avons montré qu'ATAD3A-Myc-His dénaturée par l'urée peut se lier aux billes d'agarose-nickel et être renaturée et éluée pour obtenir ATAD3A-Myc-HIS hautement pure. Avec ATAD3 purifiée, nous pourrions tester son activité ATPasique et produire des anticorps polyclonal d'ATAD3 qui pourrait être plus efficace que les anticorps anti-peptide précédemment utilisés.

Le deuxième projet porte sur l'étude de l'effet du Resvératrol sur la masse mitochondriale et la lipogenèse dans les modèles d'adipocytes 3T3-L1 (murin) et SGBS (human Simpson-Golabi-Behmel Syndrome). Le Resvératrol est un polyphénol de la classe des stilbènes présent dans certains fruits comme les raisins, les mûres ou les cacahuètes. Chez l'animal, le Resvératrol induit une diminution du poids corporel. Il impacte le foie, le muscle et probablement le tissu adipeux. Dans le muscle et le foie, il induit l'augmentation de la masse mitochondriale. Cependant, l'effet du Resvératrol n'est pas précisé ou détaillé pour le tissu adipeux. C'est la raison pour laquelle nous avons étudié son effet dans les adipocytes blancs en se focalisant sur la masse mitochondriale. Les effets du Resvératrol sur l'adipogenèse et la lipogenèse induite par l'insuline ont été testés dans les lignées cellulaires d'adipocytes blancs chez la souris et l'homme, les modèles 3T3-L1 et SGBS. Nous avons observé que le Resvératrol inhibe la lipogenèse dans les deux lignées cellulaires. Chez les 3T3-L1, cette inhibition implique le blocage de l'augmentation de la masse mitochondriale, du remodelage du réseau mitochondrial et de la synthèse des protéines mitochondriales. De plus, nous avons montré que le Resvératrol inhibe l'adipogenèse et la lipogenèse précocement, très en amont dans la voie de signalisation d'insuline, à travers l'inhibition de l'activation d'Akt.

L'ensemble de ces résultats montre qu'au contraire des cellules de muscle et de foie, les adipocytes blancs traités au resvératrol présentent une inhibition de l'augmentation de la masse mitochondriale, nécessaire à la lipogenèse, à travers l'inhibition de la voie de signalisation de l'insuline, essentielle quand à elle à la synthèse des protéines impliquées dans ces différents processus. Cette observation pourrait contribuer à expliquer la perte de poids induit chez l'animal par le Resvératrol.

Concernant le troisième projet, j'ai contribué à la réalisation d'analyse de l'expression des isoformes d'ATAD3 dans des tissus de souris, de rat et de l'homme. A l'aide de plusieurs anticorps anti-peptidiques, j'ai réussi à identifier quelques isoformes. Ce travail fait l'objet d'une publication en cours de finalisation.

Le quatrième projet, qui a constitué en fait le début de mon travail de thèse, a été de rechercher des partenaires directs d'ATAD3 par FW (Far-Western). A partir de cellules en culture, j'ai produit des fractions cellulaires (Mitochondrie et Cytoplasme) qui ont été criblées par FW (incubation des protéines, électrotransférées sur membrane, avec des sondes protéiques d'ATAD3 radiomarquées (transcription et traduction *in vitro* avec méthionine S³⁵). J'ai utilisé comme sonde, la protéine entière ainsi que les deux moitiés, N et C terminales, car ATAD3 traverse la membrane interne (C-ter matriciel). J'ai testé des conditions d'hybridation hydrophile (favorisant l'interaction hydrophobe) et hydrophobe (favorisant l'interaction hydrophile). Plusieurs bandes intéressantes ont été séquencées en spectrométrie de masse et offre des possibilités de poursuivre ces études. Avec les partenaires potentiels purifiées et les mutants d'ATAD3, nous utiliserons le FW pour confirmer et tester les sites d'interaction d'ATAD3 avec ses partenaires. La découverte des partenaires d'ATAD3 contribuerait à la compréhension des fonctions d'ATAD3.

En résumé, l'ensemble des résultats de notre projet majeur montre que, dans les adipocytes blancs tels que les cellules 3T3-L1, ATAD3 contribue principalement à la biogenèse mitochondriale liée au remodelage du réseau mitochondrial et à l'activation, en aval, des processus métaboliques mitochondriaux impliqués dans la formation de gouttelettes lipidiques. Nous essayerons d'analyser la fonction d'ATAD3 *in vivo* afin d'élargir nos résultats *in vitro* à des études dans des adipocytes primaires et aussi confronter nos résultats à des contextes physiopathologiques.

BIBLIOGRAPGIE

- A. Marcinkiewicz, D. Gauthier, A. Garcia, D.L. Brasaemle, The phosphorylation of serine 492 of perilipin a directs lipid droplet fragmentation and dispersion, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 11901–11909.
- Achleitner, G., Gaigg, B., Krasser, A., Kainersdorfer, E., Kohlwein, S.D., et al., 1999. Association between the endoplasmic reticulum and mitochondria of yeast facilitates interorganelle transport of phospholipids through membrane contact. *Eur. J. Biochem.* 264, 545–553.
- Albring M, Griffith J, Attardi G. 1977. Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Apr;74(4):1348-52.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., et al., 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211–215.
- Ardail, D., Gasnier, F., Lermie, F., Simonot, C., Louisot, P., Gateau-Roesch, O., 1993. Involvement of mitochondrial contact sites in the subcellular compartmentalization of phospholipid biosynthetic enzymes. *J. Biol. Chem.* 268, 25985–25992.
- Barsoum, M. J., H. Yuan, A. A. Gerencser, G. Liot, Y. Kushnareva, et al. 2006. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *EMBO J.* 25:3900–3911.
- Bartz, R., Li, W. H., Venables, B., Zehmer, J. K., Roth, M. R., Welti, R., Anderson, R. G., Liu, P. and Chapman, K. D. (2007a). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J. Lipid Res.* 48, 837-847.
- Bartz, R., Zehmer, J. K., Zhu, M., Chen, Y., Serrero, G., Zhao, Y. and Liu, P. (2007b). Dynamic activity of lipid droplets: protein phosphorylation and GTP-mediated protein translocation. *J. Proteome Res.* 6, 3256-3265.
- Bereiter-Hahn, J., Voith, M., 1996. Distribution and dynamics of mitochondrial nucleoids in animal cells in culture. *Exp. Biol. Online* 1, 4.
- Berman, S. B., Chen, Y. B., Qi, B., McCaffery, J. M., Rucker, E. B., 3rd, Goebbels, S., Nave, K. A., Arnold, B. A., Jonas, E. A., Pineda, F. J. et al. (2009). Bcl-x L increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *J. Cell Biol.* 184, 707-719.
- Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D (2004) Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* 382: 527–533.
- Blaner, W. S., S. M. O'Byrne, N. Wongsiriroj, J. Kluwe, D. M. D'Ambrosio, H. Jiang, R. F. Schwabe, E. M. Hillman, R. Piantedosi, and J. Libien. 2009. Hepatic stellate cell lipid droplets: a specialized lipid droplet for retinoid storage. *Biochim Biophys Acta* 1791: 467–473.
- Boldogh IR, Pon LA Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol.* 2007 Oct;17(10):502-10.
- C. Londos, C. Sztalryd, J. Tansey, A. Kimmel, Role of PAT proteins in lipid metabolism, *Biochimie* 87 (2005) 45–49.
- Cai Q, Sheng ZH. Moving or stopping mitochondria: Miro as a traffic cop by sensing calcium. *Neuron* 2009;61:493–496.
- Cécile Sauvanet, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Claudine David, Pascale Belenguer, Manuel Rojo. (2010). *MEDECINE/SCIENCES*; 26 : 823-9.
- Chan DC. Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 2006 ; 125 : 1241-52.
- Chang, C.R. and Blackstone, C. (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* 282, 21583-21587
- Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 2009 ; 18 : R169-76.

- Chen, H., ²Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* 160, 189-200
- Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009) S-Nitrosylation of Drp1 mediates b-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102-105 75.
- Cipolat, S., de Brito, M., Zilio, O.D., Scorrano, B., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15927–15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D’Adamio, L., Derks, C., Dejaegere, T., Pellegrini, L., D’Hooge, R., Scorrano, L., and De Strooper, B. (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163-175
- Clark SL Jr. Cellular differentiation in the kidneys of new born mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 1957; 3:349-62.
- Cuervo, A.M., 2004. Autophagy: many paths to the same end. *Mol. Cell. Biochem.* 263, 55-72.
- Cui Z, Vance JE, Chen MH, Voelker DR, Vance DE (1993) Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N-methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J Biol Chem* 268: 16655–16663.
- Daum G, Vance JE (1997) Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res* 36: 103–130.
- De Brito, O.M. and Scorrano, L. (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000 ; 26 : 207-10.
- Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., and Hamel, C.P. (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum. Genet.* 109, 584-591
- Derek J. Milner, Manolis Mavroidis, Noah Weisleder, and Yassemi Capetanaki (2000) Desmin Cytoskeleton Linked to Muscle Mitochondrial Distribution and Respiratory Function. *The Journal of Cell Biology*, Volume 150, Number 6, September 18, 2000 1283–1297.
- Ding, H., Jiang, N., Liu, H., Liu, X., Liu, D., Zhao, F., Wen, L., Liu, S., Ji, L.L., Zhang, Y., 2010. Response of mitochondrial fusion and fission protein gene expression to exercise in rat skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1800 (3), 250–256.
- Dvorak, A. M., H. F. Dvorak, S. P. Peters, E. S. Shulman, D. W. MacGlashan, Jr., K. Pyne, V. S. Harvey, S. J. Galli, and L. M. Lichtenstein. 1983. Lipid bodies: cytoplasmic organelles important to arachidonate metabolism in macrophages and mast cells. *J Immunol* 131: 2965–2976.
- Ebneth A, Godemann R, Stamer K, Illenberger S, Trinczek B, Mandelkow E (1998) Overexpression of tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: implications for Alzheimer’s disease. *J Cell Biol* 143: 777–794
- Elachouri G, Vidoni S, Zanna C, Pattyn A, Boukhaddaoui H, Gaget K, Yu-Wai-Man P, Gasparre G, Sarzi E, Delettre C, Olichon A, Loiseau D, Reynier P, Chinnery PF, Rotig A, Carelli V, Hamel CP, Rugolo M, Lenaers G. (2011) OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res.* 21(1):12-20.
- English AR, Zurek N, Voeltz GK. Peripheral ER structure and function. *Curr Opin Cell Biol* 2009;21:596–602.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins., de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., and Scorrano, L. (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177-189
- G. Csordas, C. Renken, P. V´arnai et al., “Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria,” *Journal of Cell Biology*, vol.174, no. 7, pp. 915–921, 2006.

G. Szabadkai, K. Bianchi, P. Várnai et al., "Chaperone mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels," *Journal of Cell Biology*, vol. 175, no. 6, pp.901–911, 2006.

Geisler S, Holmstrom KM, Treis A, Skujat D, Weber SS, Fiesel FC, et al. The PINK1/Parkin-mediated mitophagy is compromised by PD-associated mutations. *Autophagy* 2010; 6:871-8.

Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., van der Bliek, A.M., 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 18792–18798.

Guillermo López-Lluch¹, Pablo M. Irusta², Plácido Navas¹, and Rafael de Cabo³, 2008. MITOCHONDRIAL BIOGENESIS AND HEALTHY AGING. *Exp Gerontol.* 2008 September ; 43(9): 813–819.

H. Ploegh, A lipid-based model for the creation of an escape hatch from the endoplasmic reticulum, *Nature* 448 (2007) 435–438.

H. Robenek, O. Hofnagel, I. Buers, M.J. Robenek, D. Troyer, N.J. Severs, Adipophilinenriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis, *J. Cell Sci.* 119 (2006) 4215–4224.

Haghnia M, Cavalli V, Shah SB, Schimmelpfeng K, Bruschi R, Yang G, Herrera C, Pilling A, Goldstein LS. Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynein membrane attachment. *Mol Biol Cell* 2007;18:2081–2089.

Haghnia M, Cavalli V, Shah SB, Schimmelpfeng K, Bruschi R, Yang G, Herrera C, Pilling A, Goldstein LS. Dynactin is required for coordinated bidirectional motility, but not for dynein membrane attachment. *Mol Biol Cell* 2007;18:2081–2089.

Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., Lippincott-Schwartz, J., 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* 141, 656–667.

Hajek, P., Chomyn, A., Attardi, G., 2007. Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J. Biol. Chem.* 282, 5670–5681.

Han, X.-J., Lu, Y.-F., Li, S.-A., Kaitsuka, T., Sato, Y., et al., 2008. CaM kinase Ia-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* 182, 573–585.

Heid, H. W., and T. W. Keenan. 2005. Intracellular origin and secretion of milk fat globules. *Eur J Cell Biol* 84: 245–258.

Hidenori Otera and Katsuyoshi Mihara. (2011) Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J. Biochem.* 2011;149(3):241–251.

Hollenbeck PJ, Saxton WM. The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 2005;118:5411–5419.

Hom, J. and S.S. Sheu, Morphological dynamics of mitochondria--a special emphasis on cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol*, 2009. 46(6): p. 811-20.

Hom, J.R., Gewandter, J.S., Michael, L., Sheu, S.S., Yoon, Y., 2007. Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis. *J. Cell. Physiol.* 212, 498–508.

Hoppins S, Lackner L, Nunnari J. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* 2007 ; 76 : 751-80.

Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J.M., Nunnari, J., 2009. Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J. Cell Biol.* 184, 569–581.

Hoppins, S., Nunnari, J., 2009. The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochim. Biophys. Acta* 1793, 20–26.

Ishihara, N., Eura, Y., and Mihara, K. (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* 117, 6535-6546

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966-2977

Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., et al., 2009. Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat. Cell Biol.* 11, 958–966.

- Istvan R. Boldogh and Liza A. Pon (2007) Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol.* 17(10):502-10.
- J. Vance, Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 75 (2003) 69–111.
- Jendrach, M., Pohl, S., Voith, M., Kowald, A., Hammerstein, P., Bereiter-Hahn, J., 2005. Morpho-dynamic changes of mitochondria during aging of human endothelial cells. *Mech. Aging Dev.* 126, 813–821.
- Ju, W.-K., Liu, Q., Kim, K.Y., Croston, J.G., Lindsey, J.D., et al., 2007. Elevated hydrostatic pressure triggers mitochondrial fission and decreases cellular ATP in differentiated RGC-5 cell. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 2145–2151.
- Jürgen Bereiter-Hahn and Marina Jendrach, Mitochondrial Dynamics (2010). In Kwang W. Jeon, editor: *International Review of Cell and Molecular Biology*, Vol. 284, Burlington: Academic Press, pp. 1-65.
- K.D. Lardizabal, J.T. Mai, N.W. Wagner, A. Wyrick, T. Voelker, D.J. Hawkins, DGAT2 is a new diacylglycerol acyltransferase gene family. Purification, cloning, and expression in insect cells of two polypeptides from *Mortierella ramanniana* with diacylglycerol acyltransferase activity, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38862–38869.
- K.K. Buhman, H.C. Chen, R.V. Farese, Jr., The enzymes of neutral lipid synthesis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 40369–40372.
- Khan AH, Pessin JE. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signalling pathways. *Diabetologia.* 2002 Nov;45(11):1475-83.
- King SJ, Schroer TA. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* 2000;2:20–24.
- King SJ, Schroer TA. Dynactin increases the processivity of the cytoplasmic dynein motor. *Nat Cell Biol* 2000;2:20–24.
- Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325: 477–481.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858–862
- Kukat C, Wurm CA, Spähr H, Falkenberg M, Larsson NG, Jakobs S. 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 16;108(33):13534-9
- Kyle E. Miller and Michael P. Sheetz (2004) Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of Cell Science* 117, 2791-2804.
- L. Kuerschner, C. Moessinger, C. Thiele, Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets, *Traffic* 9 (2008) 338–352.
- Landes T, Leroy I, Bertholet A, et al. OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* 2010 ; 21 : 593-8.
- Langford GM. Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 2002;3:859–865.
- Lebiedzinska, M., Szabadakai, G., Jones, A.W.E., Duszynski, J., Wieckowski, M.R., 2009. Interactions between the endoplasmic reticulum, mitochondria, plasma membrane and other subcellular organelles. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1805–1816.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., Youle, R.J., 2004. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1 and Opa1 in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 5001–5011.
- Lehner, R., Z. Cui, and D. E. Vance. 1999. Subcellular localization, developmental expression and characterization of a liver triacylglycerol hydrolase. *Biochem J* 338: 761–768.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson, and M.M. Cox, *Lehninger principles of biochemistry*. 4th ed. 2005, New York: W.H. Freeman. 1 v. (various pagings).
- Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009 ; 89 : 799-845.

Lipsky NG, Pagano RE (1983) Sphingolipid metabolism in cultured fibroblasts: microscopic and biochemical studies employing a fluorescent ceramide analogue. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2608–2612.

Lyamzaev, K.G., Pletjushkina, O.Y., Saprunova, V.B., Bakeeva, L.E., Chernyak, B.V., Skulachev, V.P., 2004. Selective elimination of mitochondria from living cells induced by inhibitors of bioenergetic functions. *Biochem. Soc. Trans.* 32, 1070–1071.

M. Wältermann, A. Hinz, H. Robenek, D. Troyer, R. Reichelt, U. Malkus, H. Galla, R. Kalscheuer, T. Stöveken, P.V. Landenberg, A. Steinbüchel, Mechanism of lipid-body formation in prokaryotes: how bacteria fatten up, *Mol. Microbiol.* 55 (2005) 750–763.

Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Díaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2005) Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6, 853–59.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., et al., 2010. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* 189, 211–221.

Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J. (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747–52.

Meléndez, A. and Levine, B. Autophagy in *C. elegans* (August 24, 2009), *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.147.1

Melo, R. C., H. D'Avila, H. C. Wan, P. T. Bozza, A. M. Dvorak, and P. F. Weller. 2011. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. *J Histochem Cytochem* 59: 540–556.

Merkwirth, C. and Langer, T. (2008) Mitofusin 2 builds a bridge between ER and mitochondria. *Cell* 135, 1165–1167

Misaka, T., Miyashita, T., Kubo, Y., 2002. Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* 277, 15834–15842.

Miwa, S., Lawless, C., Zglinicki, T.V., 2008. Mitochondrial turnover in liver is fast in vivo and is accelerated by dietary restriction: application of a simple dynamic model. *Aging Cell* 7, 920–923.

Mizushima, N., Ohsumi, Y., Yoshimori, T., 2002. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct. Funct.* 27, 421–429.

Mouli, K.P., Twig, G., Shirihai, O.S., 2009. Frequency and selectivity of mitochondrial fusion are key to its quality maintenance function. *Biophys. J.* 96, 3509–3518.

Murphy, D. J. 2001. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. *Prog Lipid Res* 40: 325–438.

Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., and Hirose, S. (2006) MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* 7, 1019–1022

Nakamura, N., Kimura, Y., Tokuda, M., Honda, S., Hirose, S., 2006. MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* 7, 1019–1022.

Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, et al. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 2010; 8:e1000298.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., Youle, R.J., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803.

O. M. de Brito and L. Scorrano, “Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria,” *Nature*, vol. 456, no. 7222, pp. 605–610, 2008.

Okamoto K, Shaw JM. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet* 2005 ; 39 : 503–36.

Olga Martins de Brito and Luca Scorrano, 2010. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum–mitochondria relationship. *The EMBO Journal* 29, 2715–2723.

Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743–7746

Oliver I. Wagner et al. (2004) Mechanisms of Mitochondria–Neurofilament Interactions. *The Journal of Neuroscience*, Volume 23, Number 27, pages 9046–58.

P. Boström, M. Rutberg, J. Ericsson, P. Holmdahl, L. Andersson, M. Frohman, J. Borén, S. Olofsson, Cytosolic lipid droplets increase in size by microtubule-dependent complex formation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1945–1951.

Park, Y.Y., Lee, S., Karbowski, M., Neutzner, A., Youle, R.J., Cho, H., 2010. Loss of MARCH5 mitochondrial E3 ubiquitin ligase induces cellular senescence through dynamin-related protein 1 and mitofusin 1. *J. Cell Sci.* 123, 619–626.

Priault, M., B. Salin, J. Schaeffer, F. M. Vallette, J. P. di Rago, et al. 2005. Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ.* 12:1613–1621.

R. Rizzuto, P. Pinton, W. Carrington et al., “Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses,” *Science*, vol. 280, no. 5370, pp. 1763–1766, 1998.

R. Sturmey, P. O’Toole, H. Leese, Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial:lipid association in the porcine oocyte, *Reproduction* 132 (2006) 829–837.

Rebecca L. Frederick and Janet M. Shaw¹ (2007) Moving Mitochondria: Establishing Distribution of an Essential Organelle. *Traffic* 2007; 8: 1668–1675

Renken, C., Hsieh, C.E., Marko, M., Rath, B., Leith, A., Wagenknecht, T., et al., 2009. Structure of frozen-hydrated triad junctions: a case study in motif searching inside tomograms. *J. Struct. Biol.* 165, 53–63.

Rizzuto, R., Pinton, P., Carrington, W., Fay, F.S., Fogarty, K.E., Lifshitz, L.M., Tuft, R.A., Pozzan, T., 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280, 1763–1766.

Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 2002 ; 115 : 1663-74.

Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:519–529.

Rusinol AE, Cui Z, Chen MH, Vance JE (1994) A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J Biol Chem* 269: 27494–27502.

S. Cases, S.J. Stone, P. Zhou, E. Yen, B. Tow, K.D. Lardizabal, T. Voelker, R.V. Farese, Jr., Cloning of DGAT2, a second mammalian diacylglycerol acyltransferase, and related family members, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38870–38876.

Soltys BJ, Gupta RS (1992) Interrelationships of endoplasmic reticulum, mitochondria, intermediate filaments, and micromicrotubules—a quadruple fluorescence labeling study. *Biochem Cell Biol* 70: 1174–1186.

Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K., and Ryan, M.T. (2004) Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* 117, 1201–1210

Stone SJ, Vance JE (2000) Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J Biol Chem* 275: 34534–34540.

T. Hayashi and T. P. Su, “Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival,” *Cell*, vol. 131, no. 3, pp. 596–610, 2007.

T. Hayashi, R. Rizzuto, G. Hajnoczky, and T. P. Su, “MAM: more than just a housekeeper,” *Trends in Cell Biology*, vol. 19, no. 2, pp. 81–88, 2009.

T. Simmen, E. M. Lynes, K. Gesson, and G. Thomas, “Oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum: tight links to the mitochondria-associated membrane (MAM),” *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1798, no. 8, pp. 1465–1473, 2010.

T. Simmen, J. E. Aslan, A.D. Blagoveshchenskaya et al., “PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis,” *The EMBO Journal*, vol. 24, no. 4, pp. 717–729, 2005.

- Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* 282, 11521-11529
- Tan W, Colombini M. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta.* 2007.
- Thomson M (2003) Does cholesterol use the mitochondrial contact site as a conduit to the steroidogenic pathway? *Bioessays* 25: 252–258
- Tobias C. Walther and Robert V. Farese Jr (2009) The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta.* 1791(6): 459-466.
- Twig, G., Elorza, A. J. Molina, H. Mohamed, J. D. Wikstrom, et al. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27:433–446.
- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., et al., 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27, 433–446.
- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., Sesaki, H., 2009. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J. Cell Biol.* 186, 805–816.
- Wang K, Klionsky DJ. 2011. Mitochondria removal by autophagy. *Autophagy.* 2011 Mar;7(3):297-300.
- Willems, P.H.G.M., Smeitink, J.A.M., Koopman, W.J.H., 2009. Mitochondrial dynamics in human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1773–1782.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinski, T.J., Cassidy-Stone, A., Nunnari, J., 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p. Is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* 160, 303–311.
- Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *J Clin Invest* 2005;115:2656–2664.
- Yi Guo, Kimberly R. Cordes, Robert V. Farese Jr and Tobias C. Walther (2009) Lipid droplets at a glance. *Journal of Cell Science* 122, 749-752.
- Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H., Inatome, R., and Yanagi, S. (2006) A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.* 25, 3618-3626
- Yonashiro, R., Sugiura, A., Miyachi, M., Fukuda, T., Matsushita, N., Inatome, R., Ogata, Y., Suzuki, T., Dohmae, N., and Yanagi, S. (2009) Mitochondrial ubiquitin ligase MITOL ubiquitinates mutant SOD1 and attenuates mutant SOD1-induced reactive oxygen species generation. *Mol. Biol. Cell.* 20, 4524-4530
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5409-5420
- Yoon, Y., Pitts, K.R., McNiven, M.A., 2001. Mammalian dynamin-like protein DLP1 tubulates membranes. *Mol. Biol. Cell* 12, 2894–2905.
- Zeviani M, Tiranti V, Piantadosi C. Mitochondrial disorders. 1998. *Medicine (Baltimore).* Jan;77(1):59-72.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., et al., 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449–451.
- Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M., and McBride, H.M. (2007) The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J. Cell Sci.* 120, 1178-1188