



**HAL**  
open science

# Étude de l'effet Warburg, à l'origine du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Noureddine Hammad

► **To cite this version:**

Noureddine Hammad. Étude de l'effet Warburg, à l'origine du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2018. Français. NNT : 2018BORD0180 . tel-02091494

**HAL Id: tel-02091494**

**<https://theses.hal.science/tel-02091494>**

Submitted on 5 Apr 2019

**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 PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE  
**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ Biologie Cellulaire et Physiopathologie

**Par Noureddine HAMMAD**

**TITRE**

**Étude de l'effet Warburg, à l'origine du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, chez  
la levure *Saccharomyces cerevisiae***

Sous la direction de Anne DEVIN

Soutenue le 03 Décembre 2018

Membres du jury :

M. Eric Fontaine	Professeur, Université Joseph Fourier, Grenoble	Rapporteur
Mme. Anne Lombès	Directeur de recherche, INSERM, Paris	Rapporteur
M. Bertrand Beauvoit	Maître de conférences, Université de Bordeaux	Examineur
Mme. Geneviève Dujardin	Directeur de Recherche, CNRS, Paris	Examineur
M. Michel Rigoulet	Professeur émérite, Université de Bordeaux	Invité
Mme. Anne Devin	Directeur de Recherche, CNRS, Bordeaux	Directrice de thèse



---

**Titre : Étude de l'effet Warburg, à l'origine du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae***

**Résumé :** Nous avons étudié les relations entre les différentes voies du métabolisme énergétique lors de la mise en place des effets Crabtree et Warburg. L'effet du glucose sur le métabolisme énergétique de *S. cerevisiae* se traduit dans un premier temps par une inhibition cinétique du métabolisme oxydatif (effet Crabtree). Après l'ajout de glucose aux cellules, nous avons mis en évidence l'accumulation d'un intermédiaire de la glycolyse, le F1,6bP. Ceci induit une diminution drastique du rapport G6P/F1,6bP. Or, il a été montré que le G6P stimule et le F1,6bP inhibe l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale « *in-situ* ». L'utilisation de mutants et la modulation de ce rapport nous a permis de montrer que l'induction de l'effet Crabtree chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est dû à une diminution du rapport G6P/F1,6bP. Parallèlement, le glucose induit un réarrangement génétique qui à terme conduit à un effet Warburg. Nous avons mis en évidence une diminution, au cours du temps du contenu mitochondrial par effet de dilution, suite à un arrêt de la biogenèse mitochondriale (répression de *HAP4*). Nous avons pu montrer que cette diminution quantitative des OXPHOS est sans effet sur la synthèse d'ATP cellulaire. Ceci est dû à une augmentation du flux de synthèse d'ATP glycolytique. L'utilisation de mutants *HAP4*<sup>↑</sup>, nous a permis de montrer qu'il n'y a pas de lien simple entre prolifération et répression des OXPHOS. Bien que le flux glycolytique diminue dans les conditions de maintien des OXPHOS, ceci est sans effet notable sur la vitesse de prolifération. Ceci est un rare exemple d'une situation biologique où l'on observe un découplage entre métabolisme énergétique et prolifération.

---

**Mots clés :** Effet Crabtree ; effet Warburg ; *Saccharomyces cerevisiae* ; cellule tumorale ; métabolisme énergétique ; glycolyse ; oxydations phosphorylantes ; chaîne respiratoire.

---

**Title : Study of the Warburg effect, on the origin of the energy metabolism of the cancer cell, in yeast *Saccharomyces cerevisiae***

**Abstract :** We used the yeast Crabtree (+) model to study the relationships between the energy metabolism pathways during the implementation of the Warburg effect. The effect of glucose on *S. cerevisiae* energetic metabolism results initially in a kinetic inhibition of the oxidative metabolism (Crabtree effect). Rapidly after the addition of glucose, we found an accumulation of F1, 6bP. This induces a drastic reduction in the ratio G6P / F1,6bP. Moreover, it has been shown that G6P stimulates and F1,6bP inhibits the activity of the respiratory chain "in-vitro". Mutants and the modulation of this ratio allowed us to show that the induction of the Crabtree effect is due to a decrease in the G6P / F1,6bP ratio. In parallel with the implementation of the Crabtree effect, glucose induces a genetic rearrangement that leads to a Warburg effect. We showed a decrease over time of mitochondrial enzymatic equipment by dilution effect, due to a halt of mitochondrial biogenesis (transcriptional repression of *HAP4*). We have been able to show that this decrease in respiratory capacity has no effect on the cellular capacity for ATP synthesis. This is due to the increase in glycolytic ATP synthesis flux. Furthermore, the use of mutants where there is no repression of mitochondrial metabolism upon glucose addition allowed us to show that there is no simple link between OXPHOS activity and cell proliferation. i.e. Mitochondrial metabolism repression/high glycolytic flux is not mandatory to allow a rapid cell proliferation. This is a rare example where energetic metabolism and cell proliferation are uncoupled.

**Keywords :** Crabtree effect ; Warburg effect ; *Saccharomyces cerevisiae* ; tumor cell ; energy metabolism ; glycolysis ; oxidative phosphorylation ; respiratory chain.





# Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé dans le laboratoire « métabolisme énergétique cellulaire » de l'Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire, IBGC du CNRS.

Mes premiers remerciements vont sans doute à ma chère directrice de thèse Dr Anne DEVIN et à notre doyen de laboratoire Michel RIGOLET.

Anne, Je te remercie d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de réaliser cette thèse.

Michel, merci pour la confiance que vous m'avez accordée et pour tout le temps que vous m'avez consacré.

Je vous remercie aussi pour votre grande compétence, votre rigueur scientifique, et vos précieux conseils. Je vous remercie également de m'avoir contaminé par votre enthousiasme pour la science. Vous avez été scientifiquement mais aussi humainement des modèles pour moi. Il n'existe pas d'expression charentaise assez forte pour vous exprimer ma gratitude, j'espère seulement pouvoir un jour vous renvoyer l'ascenseur.

Je témoigne ma gratitude à Nicole AVÉRET pour sa gentillesse, son dévouement pour le bon fonctionnement de laboratoire, et surtout pour son savoir-faire quand il s'agit d'une Prep de Mito.

Je tiens à exprimer également tous mes remerciements aux membres du jury, qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci, à Mme. Geneviève DUJARDIN, Directeur de recherche au CNRS (Paris) d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse, à Mme



---

Anne LOMBES, Directeur de recherche à l'INSERM (Paris) et à M. Eric FONTAINE, Professeur de l'Université Joseph Fourier (Grenoble) d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie également sincèrement :

La commission européenne pour m'avoir accordé le financement de mon doctorat, dans le cadre du programme **European Union - Erasmus Mundus Action 2 : EU-METALIC II**.

La direction des relations internationales de l'université de Bordeaux, plus particulièrement Mme. Anna GERYKOVA pour son soutien administratif durant toute la période de ma mobilité en FRANCE.

Enfin je tiens à remercier tous les membres que j'ai pu côtoyer dans le laboratoire : Christine, Stéphane RANSAC, Stéphane DUVEZIN-CAUBET, Jean-Pierre MAZAT, Louise INJARABIAN, Benoît MARTEYN, Élodie COUGOUILLES, Arnaud MOURIER, Manuel ROJO, Patrick PAUMARD, Marie-France GIRAUD, Isabelle LARRIEU et Corinne SANCHEZ. Mes deux partenaires de thèse Élodie ROUSSARIE, et Monica ROSAS-LEMUS. Merci aussi à tous les membres de l'IBGC du sous-sol au sixième étage qui m'ont soutenu et supporté.

Ma famille et mes amis, notamment Nadhir HOUARI et Ibrahim DAHAOUI pour leur soutien tout au long de ces années de thèse.

Merci à tous ceux que j'aurais pu involontairement oublier.

*A Maman et Papa,*

*A Amel, Hanane et Khadidja,*

*A ma famille HAMMAD et DJEDID,*

*A mon fils Abderrahman (Rahimo)... Ton papa.*

## Liste des symboles

$\alpha$ -KGDH :  $\alpha$ -cétoglutarate

$\Delta\psi$  : Différence de potentiel électrique transmembranaire

$\Delta G'_{ox-red}$  : Potentiel redox

$\Delta G'_p$  : Potentiel phosphate

$\Delta pH$  : Gradient de pH

$\Delta\tilde{\mu}H^+$  : Différence de potentiel électrochimique en protons

**1,3 bPG** : 1,3 bisphosphoglycérate

**2-HG** : 2-hydroxyglutarate

**ADN** : Acide desoxyribonucléique

**ADP** : Adénosine 5' di-phosphate

**ALDH** : Alcool déshydrogénase

**AMP** : Adénosine 5' monophosphate

**AMPC** : Adénosine 5' monophosphate cyclique

**AMPK** : AMP-activated protein kinase

**ANT** : Transporteur de nucléotides adényliques

**APS** : Persulfate d'ammonium

**ARN** : Acide ribonucléique

**ARNm** : Acide ribonucléique messenger

**ATP** : Adénosine 5' triphosphate

**BSA** : Bovinum Serum Albuminin

---

**CCCP** : Carbonyl Cyanide m-chlorophenyl hydrazone

**cdk** : Kinase dépendante des cyclines

**CHX** : Cycloheximide

**CoA** : Coenzyme A

**ctrl** : Condition contrôle

**CYB2** : CYtochrome B

**CYC1** : CYtochrome C1

**DHAP** : Dihydroxyacétone phosphate

**DLD1** : D-Lactate Dehydrogenase 1

**DO** : Densité Optique

**DTT** : Dithiothréitol

**E-OH** : Ethanol

**EDTA** : Acide éthylène diamine tétraacétique

**EGTA** : Ethylene glycol-bis( $\beta$ -aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid

**Elm1** : ELongated Morphology

**ESM** : Erreur standard de la moyenne

**F1,6bP** : Fructose-1,6-bisphosphate

**F2,6bP** : Fructose-2,6-bisphosphate

**F6P** : Fructose-6-phosphate

**FAD / FADH<sub>2</sub>** : Flavine adénine dinucléotide oxydé/réduit

**G6PDH** : Glucose-6-phosphate déshydrogénase

**G6P** Glucose-6-phosphate

**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**glc** : Glucose

**GLUT** : Glucose transporter

**Gly-PDH** : Glycérol-phosphate déshydrogénases

---

**Gly3-P** : Glycéraldéhyde-3-phosphate

**HAP** : Heme activator protein

**HIF-1** : Hypoxia Inducible Factor

**HK** : Hexokinase

**HXK2** : Hexokinase 2

**HXT** : Hexose transporter

**IDH** : Isocitrate déshydrogénase

**LDH** : Lactate déshydrogénase

**Mig** : Multicopy Inhibitor of GAL gene expression

**MPC** : Mitochondrial pyruvate carrier

**NAD<sup>+</sup> / NADH** : Nicotinamide adénine dinucléotide oxydé/réduit

**NADP<sup>+</sup>/NADPH** : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé/réduit

**OXPHOS** : Oxydation phosphorylante

**PBS** : Tampon phosphate salin

**PDC** : Pyruvate décarboxylase

**PDH** : Pyruvate déshydrogénase

**PDHK** : Pyruvate déshydrogénase kinase

**PDHP** : Pyruvate déshydrogénase phosphatase

**PEP** : Phosphoénol pyruvate

**PFK** : Phosphofructokinase

**PGI** : Phosphoglucoseisomérase

**PGK** : Phosphoglycérate kinase

**PHD** : Prolyl-hydroxylases

**Pi** : Phosphate inorganique

**PK** : Pyruvate kinase

**Rapa** : Rapamycine

---

**Rgt** : Restores Glucose Transport

**RSV** : Respiratory State Value

**Sak1** : Snf1 Activating Kinase

**SDS** : Dodécyl sulfate de sodium

**SDS-PAGE** : Sodium dodécylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis

**Snf** : Sucrose NonFermenting

**SUC2** : SUCrose

**TCA** : Acide trichloroacétique

**TEMED** : Tétraméthylènediamide

**TET** : triéthylétain

**tet** : tétracycline

**Tos3** : Target Of Sbf

**UDO** : Unité de Densité Optique

**URA3** : URAcil requiring

**UTP** : Uridine triphosphate

**VHL** : Von Hippel-Lindau

**WT** : Souche sauvage

**YNB** : Yeast Nitrogen Base

**YPD** : Yeast peptone dextrose

**ZWF** : ZWischenFerment

# *Table des matières*

<b>1</b>	<b>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	<b>1</b>
	INTRODUCTION . . . . .	1
<b>1</b>	<b>Mécanismes de l'oxydation du glucose</b>	<b>7</b>
1.1	Entrée du glucose dans la cellule . . . . .	8
1.2	La glycolyse . . . . .	10
1.3	Devenir du pyruvate . . . . .	10
1.3.1	En absence d'oxygène (anaérobie) . . . . .	12
1.3.2	En présence d'oxygène (aérobie) . . . . .	12
1.4	La respiration mitochondriale . . . . .	14
1.4.1	Le transport et la conversion du pyruvate en acétyl-CoA . . . . .	14
1.4.2	L'oxydation de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs et formation des coenzymes réduits . . . . .	15
1.4.3	Réoxydation des coenzymes réduits et synthèse d'ATP par le sys- tème des OXPHOS . . . . .	17
1.5	Régulation du processus d'oxydation du glucose . . . . .	19
1.5.1	Régulation allostérique . . . . .	19
1.5.2	Régulation thermodynamique . . . . .	20
1.6	Rôle du glucose dans la prolifération cellulaire . . . . .	23

---

<b>2 La glycolyse aérobie (effet Warburg)</b>	<b>27</b>
2.1 Découverte de la glycolyse aérobie (effet Warburg) . . . . .	27
2.2 L'origine du développement de l'effet Warburg . . . . .	28
2.2.1 c-myc, un acteur clé dans le développement de l'effet Warburg . .	29
2.2.2 Le complexe HIF-1, une relation étroite avec le phénotype de l'effet Warburg . . . . .	29
<b>3 Le projet de thèse :</b>	<b>33</b>
3.1 L'effet Warburg, un seul phénotype, mais plusieurs contextes de mise en place . . . . .	33
3.1.1 Effet Warburg, une adaptation métabolique pour répondre aux exigences du métabolisme prolifératif . . . . .	34
3.1.2 Effet Warburg, une conséquence d'une altération enzymatique mitochondriale . . . . .	38
3.1.3 Effet Warburg, une adaptation métabolique à un micro-environnement	40
3.2 Origine de l'hétérogénéité des mécanismes d'induction de l'effet Warburg	40
3.2.1 Hétérogénéité des mécanismes de la transformation maligne . . .	40
3.2.2 Variations permanentes dans les conditions du micro-environnement (disponibilité de l'oxygène et nutriments) . . . . .	41
3.2.3 Hétérogénéité cellulaire dans la tumeur . . . . .	41
3.2.4 Effet de la culture cellulaire « <i>in-vitro</i> » . . . . .	42
3.3 L'effet Warburg, procure-il à la cellule cancéreuse l'avantage de se proliférer plus rapidement? . . . . .	42
<b>4 Le modèle levure pour étudier la cinétique d'induction de l'effet Warburg</b>	<b>45</b>
4.1 La répression glucose chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . . . . .	47
4.2 Mécanisme de la répression glucose chez <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	49
4.2.1 La voie de signalisation Snf3/Rgt2 . . . . .	50

---

4.2.2	La voie de signalisation Snf1 . . . . .	51
4.2.3	La sous-unité Hap4p et la répression glucose . . . . .	53
	<b>L'objectif du projet de thèse</b>	<b>55</b>
<b>2</b>	<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>57</b>
<b>5</b>	<b>Culture cellulaire et conditions de culture</b>	<b>59</b>
5.1	Matériels biologiques, conditions de croissance et milieux de cultures . .	59
5.1.1	Souches de levures et de bactéries . . . . .	59
5.1.2	Vecteurs d'expression utilisés (plasmides) . . . . .	60
5.1.3	Milieux de culture et conditions de croissance . . . . .	61
5.1.4	Volume cellulaire et détermination du nombre de cellules . . . . .	63
<b>6</b>	<b>Techniques de biologie moléculaire</b>	<b>67</b>
6.1	Récupération de l'ADN plasmidique . . . . .	67
6.2	Transformation de levures <i>S. cerevisiae</i> par la méthode à l'acétate de lithium	68
<b>7</b>	<b>Techniques de biochimie</b>	<b>71</b>
7.1	Mesure du flux de consommation d'oxygène . . . . .	71
7.1.1	Principe . . . . .	71
7.1.2	Mesure de la respiration sur cellules entières (levures) . . . . .	72
7.1.3	Mesure de la respiration sur sphéroplastés perméabilisés . . . . .	73
7.2	Quantification des cytochromes sur cellules entières . . . . .	74
7.2.1	Principe . . . . .	74
7.2.2	Protocole . . . . .	76



---

7.3	Dosage des hexoses phosphates . . . . .	77
7.3.1	Principe . . . . .	77
7.3.2	Arrêt du métabolisme et extraction des métabolites . . . . .	77
7.3.3	Dosage du glucose-6-phosphate (G6P) . . . . .	78
7.3.4	Dosage du fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP) . . . . .	78
7.4	Dosage des nucléotides phosphates (ATP, ADP) . . . . .	79
7.5	Dosage des nucléotides phosphates (Méthode N°02) . . . . .	80
7.6	Dosage du phosphate inorganique (Pi) . . . . .	81
7.7	Dosage du glucose . . . . .	81
7.7.1	Principe . . . . .	81
7.7.2	Protocole . . . . .	82
7.8	Dosage de l'éthanol . . . . .	83
7.8.1	Principe . . . . .	83
7.8.2	Protocole . . . . .	84
7.8.3	Note sur le calcul des flux : consommation de glucose et production d'éthanol . . . . .	85
7.9	Préparation de sphéroplastes de la levure <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	86
<b>8</b>	<b>Techniques d'analyse des protéines</b>	<b>89</b>
8.1	Extraction des protéines de levure . . . . .	89
8.2	Dosage des protéines totales par la méthode du Biuret . . . . .	90
8.2.1	Principe . . . . .	90
8.2.2	Protocole . . . . .	90
8.3	Electrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	91
8.3.1	Principe . . . . .	91

---

8.3.2	Protocole . . . . .	91
8.4	Transfert des protéines et méthode de western-blot . . . . .	92
8.5	Microscopie électronique . . . . .	93
<b>3</b>	<b>RÉSULTATS ET DISCUSSIONS</b>	<b>95</b>
<b>9</b>	<b>Cinétique d'induction de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i> (WT)</b>	<b>97</b>
9.1	Caractérisation de l'effet Warburg dans le modèle d'étude (Euroscarf BY4742) . . . . .	97
9.1.1	Influence de l'ajout de glucose sur la prolifération cellulaire de <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	97
9.1.2	Consommation de glucose . . . . .	101
9.1.3	Mise en évidence du métabolisme fermentaire en aérobiose, après l'ajout du glucose . . . . .	103
9.1.4	Évolution du flux de la respiration mitochondriale de <i>S. cerevisiae</i>	106
9.2	Étude du métabolisme énergétique de <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout du glucose . . . . .	108
9.2.1	La réoxydation du NADH cytosolique : respiration mitochondriale Vs fermentation alcoolique . . . . .	111
9.2.2	La fermentation du glucose en aérobiose, pourquoi les cellules recourent à un tel métabolisme? . . . . .	114
9.3	Le métabolisme énergétique de <i>S. cerevisiae</i> , avant et après l'ajout du glucose . . . . .	117
9.4	L'accélération de la vitesse de prolifération et l'induction de l'effet Warburg : une mise en place parallèle . . . . .	119
9.5	Origine de la diminution du flux de la respiration mitochondriale . . . . .	120
9.6	Origine de la diminution du compartiment mitochondrial après l'ajout du glucose . . . . .	130

---

9.6.1	Effet du glucose sur la dégradation du compartiment mitochondrial . . . . .	130
9.6.2	Effet du glucose sur la biogenèse du compartiment mitochondrial	132
<b>10</b>	<b>Effet de la délétion de l'H XK2 sur l'induction de l'effet Warburg</b>	<b>139</b>
10.1	Le métabolisme oxydatif de la souche $\Delta h x k 2$ en condition de contrôle (sans glucose) . . . . .	140
10.2	La délétion du gène <i>H X K 2</i> , influence-t-elle le flux glycolytique? . . . . .	142
10.3	La vitesse de prolifération cellulaire est-elle affectée par la délétion de l'hexokinase II? . . . . .	144
10.4	Délétion d' <i>H X K 2</i> , quel effet sur le métabolisme énergétique de <i>S. cerevisiae</i> lors du basculement métabolique? . . . . .	147
10.4.1	Évolution du flux de production d'éthanol de <i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta h x k 2$ ) après l'ajout du glucose . . . . .	148
10.4.2	Évolution du flux de la respiration mitochondriale de <i>S. cerevisiae</i> ( $\Delta h x k 2$ ) après l'ajout du glucose . . . . .	150
10.4.3	La réoxydation du NADH cytosolique après la délétion de l'hexokinase II : respiration mitochondriale Vs fermentation alcoolique . . . . .	151
10.4.4	La diminution du flux de consommation de glucose, quel effet pour le flux de synthèse d'ATP? . . . . .	152
10.4.5	Influence de la délétion de l'hexokinase II sur le rapport ATP/ADP	154
10.4.6	Le couplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP dans la souche $\Delta h x k 2$ , après l'ajout du glucose . . . . .	157
10.4.7	Origine de la diminution de la respiration mitochondriale dans les cellules $\Delta h x k 2$ , après l'ajout du glucose . . . . .	160
10.5	Origine de la diminution du compartiment mitochondrial après l'ajout du glucose . . . . .	162
10.6	Effet de la délétion de l'Hexokinase II sur le turn-over de Hap4p . . . . .	165

<b>11 Effet de la surexpression de <i>HAP4</i> sur l'induction de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i></b>	<b>167</b>
11.1 Effet de la surexpression de <i>HAP4</i> sur le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i> (condition de contrôle, sans glucose) . . . . .	168
11.2 Effet de la surexpression de <i>HAP4</i> sur la cinétique d'induction de l'effet Warburg . . . . .	170
11.2.1 Évolution de la vitesse de prolifération cellulaire après l'ajout du glucose . . . . .	170
11.2.2 Influence de la surexpression de <i>HAP4</i> sur le basculement métabolique chez <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout de glucose . . . . .	172
• <i>La surexpression de HAP4 retarde la mise en place de l'effet Warburg chez S. cerevisiae</i> . . . . .	178
11.3 Origine de la diminution du flux de consommation de glucose dans les cellules $\Delta hap4hap4\uparrow$ . . . . .	179
11.3.1 Évolution du rapport ATP/ADP dans la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose . . . . .	181
11.4 Origine de la diminution du flux respiratoire dans les cellules $\Delta hap4hap4\uparrow$	183
11.5 <i>Les mitochondries des cellules <math>\Delta hap4hap4\uparrow</math> sont-elles toutes fonctionnelles?</i>	185
• <i>Le maintien d'un compartiment mitochondrial élevé en présence du glucose augmente le phénomène du « leak actif »</i> . . . . .	189
11.6 Origine de la diminution du compartiment mitochondriale en présence de glucose malgré la surexpression de <i>HAP4</i> . . . . .	189
<b>12 L'induction de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i>, souche <math>\Delta hxx2hap4\uparrow</math></b>	<b>193</b>
12.1 Le métabolisme de la souche $\Delta hxx2hap4\uparrow$ en condition contrôle (sans glucose) . . . . .	194
12.2 Effet de la délétion de l' <i>HXX2</i> sur le turn-over de Hap4p exogène . . . . .	196
12.3 Cinétique d'induction de l'effet Warburg dans la souche $\Delta hxx2hap4\uparrow$ . . . . .	201

12.3.1 Flux de la respiration mitochondriale de la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose . . . . .	201
12.3.2 Flux glycolytique et flux de production d'éthanol dans les cellules $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout du glucose . . . . .	203
12.3.3 Évolution de la vitesse de prolifération cellulaire après l'ajout du glucose . . . . .	206
12.4 Origine de la diminution du flux du métabolisme oxydatif dans la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout du glucose . . . . .	207
12.4.1 Évolution du rapport ATP/ADP dans les cellules $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose . . . . .	210
12.4.2 Le couplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP dans les cellules $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose . . .	212
12.5 <i>Les mitochondries des cellules <math>\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow</math> sont-elles toutes fonctionnelles ?</i>	215
12.6 Origine de la diminution du compartiment mitochondrial dans la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose . . . . .	217
<i>La combinaison de la délétion de l'HXK2 avec la surexpression de HAP4, n'empêche pas la mise en place de l'effet Warburg chez S. cerevisiae . . . . .</i>	218
<b>13 L'effet Crabtree est induit par les hexoses phosphates dérivés de la glycolyse</b>	<b>221</b>
13.1 Variations de la concentration d'ADP et du phosphate inorganique libre (Pi) . . . . .	222
13.2 Inhibition de la chaîne respiratoire par le F1,6bP . . . . .	226
13.3 La délétion de l'hexokinase II empêche la mise en place de l'effet Crabtree	227
13.4 La surexpression de <i>HAP4</i> empêche la mise en place de l'effet Crabtree .	230
13.5 Origine de l'absence de l'induction de l'effet Crabtree dans les cellules mutées . . . . .	232
13.5.1 La sensibilité à l'inhibition médiée par le F1,6bP est-elle maintenue dans les souches mutées ? . . . . .	232

13.5.2 Le rapport G6P / F1,6bP, un paramètre clé pour l'induction de l'effet Crabtree . . . . .	234
Discussion . . . . .	236
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>239</b>



## Table des figures

1.1	Voie de dégradation du glucose (La glycolyse) . . . . .	11
1.2	Mécanismes de réoxydation du NADH cytosolique en aérobiose, chez les eucaryotes supérieurs : Navette Malate/Aspartate et glycérol-3-phosphate	14
1.3	Cycle de Krebs . . . . .	16
1.4	Schéma de la chaîne respiratoire de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . .	18
1.5	Mode de transduction du signal stimulant la prolifération cellulaire chez les organismes pluricellulaires (mammifères) . . . . .	24
1.6	Interconnexions entre la glycolyse et les voies de biosynthèse anaboliques	26
3.1	Mécanismes de régulation des isoformes de la pyruvate kinase . . . . .	37
3.2	Mécanisme de l'induction du signal de réponse à l'hypoxie par les intermédiaires du cycle de Krebs (succinate, fumarate) et le 2-Hydroxyglutarate (2-HG) . . . . .	39
4.1	Schéma simplifié du mécanisme de la répression glucose chez <i>S. cerevisiae</i>	52
7.1	Structure de l'hème . . . . .	75
9.1	Effet du glucose sur la prolifération de <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	98
9.2	Cinétique d'évolution de la vitesse de prolifération de <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout du glucose . . . . .	99
9.3	Dosage du glucose dans le milieu extra-cellulaire . . . . .	102



---

9.4	Évolution du flux de consommation de glucose chez <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout du glucose . . . . .	103
9.5	Dosage de l'éthanol dans le milieu extra-cellulaire . . . . .	104
9.6	Évolution du flux de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout du glucose . . . . .	105
9.7	Effet du glucose sur la respiration de <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	107
9.8	Tendance d'évolution du flux du métabolisme oxydatif et fermentaire chez <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout du glucose . . . . .	111
9.9	Origine de flux des électrons à travers la chaîne respiratoire dans les conditions de disponibilité de plusieurs substrats . . . . .	112
9.10	Flux d'oxydation de NADH assuré par les deux systèmes : OXPHOS et fermentation . . . . .	113
9.11	Flux de synthèse d'ATP assuré par la glycolyse « G » et les OXPHOS « R » dans la souche sauvage de <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout de glucose . . . . .	117
9.12	Mécanisme de synthèse d'ATP chez <i>S. cerevisiae</i> lors de la prolifération sur lactate . . . . .	118
9.13	Évolution du contenu en cytochromes dans <i>S. cerevisiae</i> après l'ajout du glucose . . . . .	122
9.14	Évolution du flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochromes . . . . .	123
9.15	Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de <i>S. cerevisiae</i> , avant et après l'ajout de glucose . . . . .	125
9.16	Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) de <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout de glucose . . . . .	126
9.17	Évolution du flux de la respiration découplée en fonction de la concentration en cytochromes . . . . .	127
9.18	Effet du glucose sur l'induction du processus d'autophagie (A) et/ou mitophagie (B), chez <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	132
9.19	Effet de l'ajout du glucose sur l'expression de <i>HAP4</i> chez <i>S. cerevisiae</i> . . .	133

9.20	Tendance d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes chez <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout du glucose . . . . .	134
10.1	Effet de la délétion de l' <i>HXK2</i> sur la prolifération et le métabolisme oxydatif de <i>S. cerevisiae</i> (condition contrôle) . . . . .	141
10.2	Dosage du glucose et d'éthanol dans le milieu extra-cellulaire (souche sauvage et $\Delta hxk2$ ) . . . . .	142
10.3	Évolution du flux de consommation de glucose chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ), après l'ajout du glucose . . . . .	143
10.4	Effet du glucose sur la prolifération de <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ) . . . . .	145
10.5	Évolution du flux de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ), après l'ajout du glucose . . . . .	148
10.6	Effet du glucose sur la respiration de <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ) . . . . .	150
10.7	Flux d'oxydation du NADH assuré par les deux systèmes : OXPHOS et fermentation, dans les cellules sauvages et $\Delta hxk2$ . . . . .	152
10.8	Flux de synthèse d'ATP assuré par la glycolyse « G » et les OXPHOS « R » dans la souche sauvages et $\Delta hxk2$ , après l'ajout de glucose . . . . .	154
10.9	Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de la souche $\Delta hxk2$ , avant et après l'ajout de glucose . . . . .	158
10.10	Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) de <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	159
10.11	Évolution du contenu en cytochromes dans la souche $\Delta hxk2$ , après l'ajout du glucose . . . . .	161
10.12	Effet de l'ajout du glucose sur l'expression de <i>HAP4</i> chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ) . . . . .	163
10.13	Tendance d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes dans la souche $\Delta hxk2$ , après l'ajout du glucose	164
10.14	Effet de la délétion de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p . . . . .	166

---

11.1 Effet de la surexpression de <i>HAP4</i> sur la prolifération et le métabolisme oxydatif de <i>S. cerevisiae</i> (condition contrôle) . . . . .	169
11.2 Effet du glucose sur la prolifération de la souche it $\Delta hap4hap4\uparrow$ . . . . .	170
11.3 Évolution du flux de consommation de glucose chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose . . . . .	174
11.4 Évolution du flux de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose . . . . .	175
11.5 Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$ , avant et après l'ajout de glucose . .	177
11.6 Flux de synthèse d'ATP assuré par la glycolyse « G » et les OXPHOS « R », dans la souche sauvage et $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose . . . . .	180
11.7 Évolution du contenu en cytochromes de la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout du glucose . . . . .	184
11.8 Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	185
11.9 Évolution du flux respiratoire endogène en fonction de la concentration du cytochrome c et $c_1$ , après l'ajout de glucose . . . . .	187
11.10 Effet de l'ajout du glucose sur l'expression de <i>HAP4</i> chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) . . . . .	190
11.11 Tendance d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes dans la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout du glucose . . . . .	191
12.1 Effet de la délétion de l' <i>HXK2</i> et la surexpression de <i>HAP4</i> sur le métabolisme oxydatif de <i>S. cerevisiae</i> (condition contrôle) . . . . .	195
12.2 Effet de la délétion de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p exogène	197
12.3 Le système Ubiquitine/protéasome . . . . .	199
12.4 Processus de dégradation de Hap4p chez <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	200

12.5 Tests d'immunoprécipitation de la protéine Hap4p, issus de l'expression du gène <i>HAP4</i> exogène, lors de la prolifération sur glucose (souche $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) . . . . .	201
12.6 Effet de la diminution du turn-over de Hap4p sur le métabolisme oxydatif de la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , en présence de glucose . . . . .	202
12.7 Évolution du flux de consommation de glucose et de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hap4hap4\uparrow$ et $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	204
12.8 Flux de synthèse d'ATP totale assuré par les deux systèmes : la glycolyse « G » et les OXPHOS « R », dans les cellules $\Delta hap4hap4\uparrow$ et $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , après l'ajout du glucose . . . . .	206
12.9 Effet du glucose sur la prolifération de la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$ . . . . .	207
12.10 Évolution du flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochromes chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hxk2$ , $\Delta hap4hap4\uparrow$ , $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	208
12.11 Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , avant et après l'ajout de glucose . . . . .	213
12.12 Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hxk2$ , $\Delta hap4hap4\uparrow$ et $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	214
12.13 Évolution du flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochromes $cc_1$ . . . . .	216
12.14 Tendence d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes dans la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , après l'ajout du glucose . . . . .	218
12.15 Images de microscopie électronique de cellules de <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hxk2$ , $\Delta hap4hap4\uparrow$ et $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	220
13.1 Flux de la respiration endogène et découplée de <i>S. cerevisiae</i> , avant et après l'ajout de glucose . . . . .	224

---

13.2 Concentrations intracellulaires en métabolites (G6P, F1,6bP, ATP, ADP et Pi) chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage), avant et après l'ajout de glucose . . . . .	225
13.3 Effet du G6P et F1,6bP sur le flux de la respiration non phosphorylante de mitochondries isolées de <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	227
13.4 Flux de la respiration endogène et découplée de la souche $\Delta h x k 2$ de <i>S. cerevisiae</i> , avant et après l'ajout du glucose . . . . .	228
13.5 Évolution de concentrations intracellulaires en métabolites (G6P, F1,6bP, ATP, ADP et Pi) chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta h x k 2$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	229
13.6 Flux de la respiration endogène et découplée de la souche $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ de <i>S. cerevisiae</i> , avant et après l'ajout du glucose . . . . .	230
13.7 Évolution des concentrations intracellulaires des métabolites (G6P, F1,6bP, ATP, ADP et Pi) chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	231
13.8 Effet des hexoses (G6P, F1,6bP) sur l'activité de la chaîne respiratoire dans des sphéroplastes perméabilisés de <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ et $\Delta h x k 2$ ) . . . . .	233
13.9 Évolution du rapport entre les concentrations intracellulaires du G6P et F1,6bP chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ et $\Delta h x k 2$ ), après l'ajout du glucose . . . . .	234
13.10 Effet du glucose sur l'induction de l'effet Crabtree chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta h x k 2$ et $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ ), cultivées en galactose (2 %) . . . . .	236

## Liste des tableaux

1.1	Régulateurs allostériques des voies de dégradation du glucose par les métabolites . . . . .	20
5.1	Souches de levures et de bactéries utilisées . . . . .	60
5.2	Composition des milieux de culture utilisés . . . . .	61
5.3	Évolution du poids sec en mg par unité DO en fonction du temps et les conditions de culture (avant/après l'ajout du glucose) . . . . .	63
5.4	Évolution du volume cellulaire et du nombre de cellules en fonction du temps et les conditions de culture (avant/après l'ajout du glucose) . . . .	65
7.1	Composition du mélange réactionnel pour le dosage de glucose . . . . .	82
7.2	Composition du mélange réactionnel pour le dosage de l'éthanol . . . . .	84
9.1	Évolution de la vitesse spécifique de croissance de <i>S. cerevisiae</i> (WT) après l'ajout du glucose . . . . .	100
9.2	Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> , après l'ajout du glucose . . . . .	106
9.3	Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP au cours de la mise en place de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	115
10.1	Évolution du taux de croissance spécifique ( $\mu^{-1}$ ) de <i>S. cerevisiae</i> après l'ajout du glucose . . . . .	146
10.2	Évolution du taux de croissance spécifique ( $\mu^{-1}$ ) de <i>S. cerevisiae</i> après l'ajout du glucose . . . . .	147

---

10.3 Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ), après l'ajout du glucose .	149
10.4 Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP au cours de la mise en place de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hxk2$ ) . .	155
11.1 Évolution du taux de croissance spécifique ( $\mu^{-1}$ ) de <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose . . . . .	171
11.2 Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose . . . . .	176
11.3 Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP au cours de la mise en place de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage et $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) . . . . .	182
12.1 Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hap4hap4\uparrow$ et $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	205
12.2 Taux de diminution du flux de la respiration endogène et concentration en cytochromes ( $cc_1$ et b) chez <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hxk2$ , $\Delta hap4hap4\uparrow$ , $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	209
12.3 Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP dans <i>S. cerevisiae</i> (sauvage, $\Delta hxk2$ , $\Delta hap4hap4\uparrow$ , $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose . . . . .	211

# 1

PARTIE

## ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE





---

## INTRODUCTION

Le cancer est un terme qui a été utilisé en médecine depuis l'Antiquité classique. À cette époque il désignait un grand nombre de maladies qui se manifestent par des lésions tissulaires locales [202]. Aujourd'hui, le terme « cancer » regroupe toutes les maladies dont le mode de développement est lié à un défaut dans les mécanismes régulant la prolifération cellulaire [107].

Les recherches récentes menées sur les mécanismes régulant la prolifération cellulaire montrent qu'il existe une étroite relation entre différenciation, prolifération et apoptose [90, 12]. Le passage d'un état à l'autre est sous la dépendance de trois groupes de protéines codées par trois catégories de gènes : les proto-oncogènes qui codent pour les protéines régulant le signal de stimulation du cycle cellulaire, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes qui codent pour les protéines régulant le signal de déclenchement de l'apoptose. Une altération dans l'un de ces trois systèmes peut conduire à une dérégulation de la prolifération cellulaire [120, 188, 22, 231, 218].

Pour proliférer, les cellules eucaryotes passent par plusieurs phases morphologiquement distinctes, formant ce qu'on appelle le cycle cellulaire. Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est composé d'une succession de quatre phases : G1, S, G2 et M, au cours desquelles la cellule couple croissance (G1, S) et division (G2, M). En fonction de la progression dans ces différentes phases du cycle cellulaire, la demande des cellules en énergie et en précurseurs de biomolécules est très variable [82]. Pour s'ajuster à cette demande, les cellules en prolifération doivent réaliser une série de modulations de leurs métabolismes énergétique et intermédiaire, afin d'apporter suffisamment d'énergie (ATP), de précurseurs de biomolécules (acides aminés, lipides et nucléotides) et de pouvoir réducteur (NADPH), nécessaires à la réplication de l'ADN et la synthèse des macromolécules (ribosomes, enzymes, etc.) [82].

Chez les mammifères, le glucose joue un rôle très important dans le métabolisme des cellules en prolifération [38]. Ce dernier est la principale source de carbone et d'énergie pour notre organisme. Son oxydation permet non seulement la production d'ATP, mais aussi de fournir les métabolites intermédiaires précurseurs de biomolécules

---

(acides aminés, NADPH, etc.).

Plusieurs études menées sur le métabolisme tumoral ont mis en évidence des modulations majeures dans le métabolisme glucidique des cellules cancéreuses [51]. En effet, il a été montré un rôle de c-Myc (facteur de transcription [127, 19] muté dans plusieurs types de cancer [59, 166]) dans la modulation de l'expression de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme du glucose, parmi ces gènes, on trouve ceux de la lactate déshydrogénase A (LDH-A), le transporteur de glucose GLUT1, l'Hexokinase 2, la Phospho-Fructo-Kinase (PFK) et l'énolase 1 (EN01) [130, 186, 222, 146].

Aujourd'hui, l'étude des mécanismes impliqués dans la modulation du métabolisme tumoral et leur lien avec la transformation maligne est devenue un sujet d'actualité. Le nombre de publications sur le métabolisme tumoral ne cesse d'augmenter ces deux dernières décennies [187], alors que les questions sur les régulations spécifiques du métabolisme énergétique de la cellule tumorale ont été soulevées il y a plus de 60 ans.

Entre 1924 et 1927, Otto Warburg et ses collaborateurs ont réalisé une série d'expériences dans lesquelles, ils ont mesuré les activités des deux voies du métabolisme énergétique (glycolyse et respiration mitochondriale) sur de nombreuses lignées de cellules tumorales et normales. Ils ont constaté que contrairement aux cellules différenciées, qui en présence d'oxygène utilisent préférentiellement la respiration mitochondriale (effet Pasteur), les cellules cancéreuses, que ce soit en présence ou en absence d'oxygène, utilisent principalement la fermentation lactique pour la conversion d'énergie [250, 248]. Aujourd'hui, cette particularité métabolique des cellules cancéreuses porte le nom d'« effet Warburg » ou « glycolyse aérobie ».

En se basant sur leurs résultats, O. Warburg postula en 1956 dans son célèbre papier « *On the Origin of Cancer Cells* », qu'une altération irréversible du métabolisme respiratoire, associée à une augmentation du flux glycolytique est la cause fondamentale du cancer [249].

Bien que, la glycolyse aérobie ait été caractérisée dans la plupart des types de cancer, cette particularité métabolique n'est pas exclusive aux cellules cancéreuses. A la même époque que Mr. Warburg, Mr. Herbert G Crabtree était aussi très intéressé par le métabolisme tumoral. Peu convaincu par les conclusions de Warburg sur la relation

---

de la glycolyse aérobie avec le caractère malin des cellules tumorales, il montra que la glycolyse aérobie n'est pas une caractéristique spécifique aux cellules malignes. En utilisant les techniques développées par Warburg, Crabtree montra que la glycolyse aérobie est présente dans d'autres lésions tissulaires non malignes, caractérisées par une activation de la prolifération cellulaire [53].

En 1929, Crabtree a mis en évidence une autre particularité métabolique. Outre la glycolyse aérobie, Crabtree montra que l'ajout de glucose au milieu de culture des cellules cancéreuses, induit une inhibition de la respiration, d'environ 10-20 %, alors que pour les cellules normales, une légère stimulation de la respiration peut être observée après l'ajout de glucose. Ce phénomène porte aujourd'hui le nom de l'effet Crabtree [54].

Dans la littérature, l'utilisation du terme « effet Crabtree » est l'objet d'une confusion. L'effet Crabtree est défini comme une inhibition partielle et immédiate de la respiration mitochondriale, après l'ajout du glucose au milieu de culture [54]. Toutefois, dans la littérature, le terme « effet Crabtree » est souvent utilisé plutôt pour désigner l'ensemble du phénotype que certaines levures développent après l'ajout d'une concentration importante de glucose dans leur environnement [200, 63, 183]. En effet, l'effet Crabtree correspond à une régulation cinétique du métabolisme énergétique des cellules. Cette régulation est en étroite relation avec les variations court-terme des concentrations cytosoliques des différents intermédiaires de la glycolyse (glucose-6-phosphate, fructose-6-phosphate) et du phosphate inorganique libre (Pi) après l'ajout de glucose [136, 207]. Or, sur le long terme (effet Warburg), les modulations du métabolisme énergétique des cellules sont principalement dues à une régulation génétique (stimulation/répression transcriptionnelle) induite par le glucose [128, 238, 40, 254, 233, 191, 210, 219].

Chez certains types de levures, telles que *Saccharomyces cerevisiae*, l'ajout d'une concentration élevée de glucose (plus de 5 g/l en comparaison à la concentration en glucose circulante chez le mammifère de 1 g/l) induit une inhibition partielle et immédiate de la respiration mitochondriale (effet Crabtree) [53, 63, 84]. Après quelques heures, les cellules de *S. cerevisiae* développent un phénotype métabolique très similaire de celui des cellules tumorales appelé « répression glucose » [128, 39, 92]. Chez la levure la répression glucose est caractérisée par : 1) une consommation accrue du glucose, 2)

---

une répression de la respiration et 3) la fermentation du pyruvate en présence d'oxygène [210]. De même que pour l'effet Warburg, le phénotype de la répression glucose est associé à une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire [210].

Les données expérimentales cumulées sur les caractéristiques phénotypiques de l'effet Warburg de la cellule cancéreuse et la répression glucose de la levure suggèrent que « effet Warburg » et « répression glucose » sont deux appellations utilisées pour désigner un seul phénotype [71, 70, 180]. Il s'agit du phénomène de la répression de la respiration et la fermentation du glucose en aérobiose, dans des cellules proliférant rapidement.

Cependant, malgré cette similitude phénotypique, dans la littérature, nous trouverons que les problématiques scientifiques soulevés par l'effet Warburg et la répression glucose sont différentes.

Chez les cellules de mammifères, la question relative à l'effet Warburg porte principalement sur les mécanismes à l'origine de la mise en place de cet effet, ainsi les relations qui peuvent exister entre le développement de l'effet Warburg et l'augmentation de la vitesse de prolifération.

Alors que, chez la levure, la question relative à la répression glucose est différente. La problématique de la répression glucose chez la levure n'est pas l'augmentation de la vitesse de prolifération, mais plutôt la baisse du rendement : quantité de biomasse produit par quantité de glucose consommé [219]. En effet, pour les industriels de la biotechnologie, la transformation du glucose en éthanol, dans des conditions où on cherche à produire de la biomasse, représente une perte économique considérable. De ce fait le questionnement relatif à la répression glucose porte sur la possibilité d'empêcher ou de réduire le déclenchement du métabolisme fermentaire, après l'ajout de glucose.

Dans la littérature, la grande majorité des études réalisées sur les relations existantes entre le développement de l'effet Warburg et la capacité de proliférer plus rapidement a été réalisée sur des cellules de mammifères. Aujourd'hui, malgré le nombre conséquent de résultats cumulés, nous ne sommes toujours pas en mesure d'établir de façon précise pourquoi la fermentation de glucose en aérobiose est corrélée avec une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire. En effet, une des difficultés de l'étude de l'effet Warburg sur un modèle mammifère réside dans l'hétérogénéité génétique et pathologique

---

du modèle de cellules tumorales (maligne et bénigne) [228].

Le constat relatif à l'effet Warburg chez les cellules tumorales et la répression glucose chez la levure, suggère que le phénotype de fermentation de glucose en aérobiose est universel dans les cellules à prolifération rapide. Toutefois, les mécanismes responsables de son induction sont hétérogènes et type cellulaire dépendantes [264]. En effet, aujourd'hui, il est admis qu'il n'existe pas un mécanisme universel pour expliquer le phénotype de l'effet Warburg [67, 228].

L'effet Warburg est un phénotype de modification du métabolisme énergétique. Ce dernier (métabolisme énergétique) est formé d'une série de réactions d'oxydoréduction et de phosphorylation, qui visent la conversion de l'énergie potentiel de glucose en une forme d'énergie utilisable par la cellule. Si le type cellulaire, la situation métabolique, ou le besoin énergétique changent, ces réactions restent toujours soumises aux mêmes lois strictes de la chimie (thermodynamique). Par exemple en ce qui concerne la glycolyse : entre une cellule normale, une cellule tumorale ou une cellule de levure, nous n'aurons forcément pas les enzymes exprimées avec une même quantité, et/ou avec les mêmes isoformes. Mais, malgré cette différence quantitative et qualitative des enzymes de la glycolyse, cette dernière, reste toujours soumise aux contraintes du potentiel redox cytosolique (déterminé par le rapport  $\text{NADH,H}^+/\text{NAD}^+$ ) et du potentiel phosphate (déterminé par le rapport  $\text{ATP}/\text{ADP}$ .  $\text{P}_i$ ) de la cellule.

En aérobiose, la fermentation lactique/alcoolique a pour première fonction, la réoxydation du  $\text{NADH,H}^+$  cytosolique dans des conditions où la vitesse de réduction du  $\text{NAD}^+$  par la glycolyse dépasse la capacité du système des OXPHOS dans la régénération du  $\text{NAD}^+$ . Cependant, ce schéma général du métabolisme énergétique des cellules différenciées ne semble pas conservé chez les cellules qui prolifèrent rapidement. De nombreuses lignées cellulaires (levure, certains types de cellules tumorales) couplent une diminution de l'activité du système des OXPHOS, en faveur de la fermentation lactique/alcoolique à l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire [264]. En outre, il a été montré que la répression du métabolisme fermentaire (délétion du gène *LDH-A*), permettait de restaurer le flux respiratoire et diminuer la vitesse de prolifération dans des lignées de cellules tumorales présentant un effet Warburg [83], suggérant ainsi une relation

---

évidente entre la vitesse de prolifération et la fermentation du glucose en aérobiose.

Pour comprendre les relations existantes entre la répression du métabolisme oxydatif, la fermentation du glucose en aérobiose et la vitesse rapide de prolifération, il est indispensable d'effectuer une étude qui permet de suivre dans le temps les modulations du métabolisme énergétique mises en place au cours de la transition d'un métabolisme "de base" d'une cellule différenciée, vers un métabolisme prolifératif.

Ainsi, pour pouvoir élucider la relation entre le développement de l'effet Warburg et l'augmentation de la vitesse de prolifération, nous avons essayé dans ce travail de thèse une nouvelle approche, celle de l'étude la cinétique d'évolution du métabolisme énergétique au cours de la mise en place de l'effet Warburg chez la levure *S. cerevisiae*.

Dans la suite de cette partie, nous allons développer plus avant :

- le métabolisme glucidique chez les eucaryotes (mammifère et levure), les points de régulation de ce dernier et le rôle du glucose dans la réponse à la demande en énergie et en carbone chez les cellules en prolifération.
- La glycolyse aérobie (effet Warburg) chez les cellules cancéreuses et les mécanismes moléculaires responsables de sa mise en place.
- Le métabolisme énergétique de la levure *S. cerevisiae*, la répression glucose chez la levure et les mécanismes moléculaires impliqués dans sa mise en place.
- La problématique et le contexte de notre étude, ainsi que le choix de la levure *S. cerevisiae* comme modèle cellulaire pour réaliser l'étude de cinétique d'induction de l'effet Warburg.

## *Mécanismes de l'oxydation du glucose*

Dans les cellules eucaryotes les glucides représentent la principale source de carbone et d'énergie. Principalement formés d'hexoses (glucose, galactose, fructose, mannose), les glucides existent dans la nature dans la plupart des cas sous forme polymérique (amidon, glycogène, lactose, maltose, saccharose). Pour les rendre utilisables par la cellule, une hydrolyse préalable de ces polymères en monomère (sucre simple) est nécessaire.

Chez les mammifères, l'hydrolyse des glucides en sucres simples se fait principalement enzymatiquement au niveau de l'intestin. Tandis que chez la levure *S. cerevisiae* l'hydrolyse des glucides, tels que le saccharose est réalisée par des invertases extracellulaires, ( $\beta$ -D-fructosidase, saccharose hydrolase), qui hydrolysent le saccharose en glucose et en fructose [255, 158].

Après hydrolyse, le glucose est le sucre simple le plus abondant. Le glucose occupe une position centrale dans le métabolisme. Suite à son import au sein de la cellule, il a trois destinées majeures : il peut être oxydé en pyruvate par les enzymes de la glycolyse ; il peut aussi être oxydé par la voie des pentoses phosphates pour donner du ribose-5-phosphate (précurseur d'acides nucléiques) et le NADPH (pouvoir réducteur nécessaire aux réactions de biosynthèses) ; il peut enfin être mis en réserve sous forme de polysaccharides (amidon, glycogène).



## 1.1 Entrée du glucose dans la cellule

Chez les eucaryotes, le passage du glucose du milieu extracellulaire vers le cytoplasme se fait par diffusion facilitée. En effet, le glucose est une molécule polaire hydrophile, son passage à travers la membrane plasmique n'est possible qu'à travers des structures glycoprotéiques incorporées dans la membrane plasmique appelées perméases ou transporteurs du glucose.

Dans les cellules humaines, quatorze isoformes de perméases de type GLUT ont été mises en évidence [234]. Parmi ces isoformes, seules cinq (GLUT1 à GLUT5) ont été réellement caractérisées en termes de transport. L'expression de certaines de ces isoformes, qui présentent des caractéristiques cinétiques distinctes, dépend essentiellement de la spécificité fonctionnelle des tissus. Alors que, GLUT1 et GLUT3 sont présents dans tous les tissus des mammifères, GLUT2 est essentiellement exprimé dans les hépatocytes, les cellules  $\beta$  des îlots de Langerhans et les cellules de la membrane basolatérale de l'intestin grêle [103]. GLUT4, est exprimé plus spécifiquement dans les tissus cibles de l'insuline : le muscle squelettique et le tissu adipeux. GLUT5 présente une meilleure affinité pour le fructose que pour le glucose. Il a été caractérisé pour la première fois, dans des entérocytes et dans des spermatozoïdes [33, 75]. Des études récentes montrent que GLUT5 est aussi présent dans le muscle. Même s'il est peu abondant dans ce tissu par rapport aux cellules entérocytaires, GLUT5 est le deuxième transporteur le plus exprimé dans les cellules musculaires striées après GLUT4 [229].

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le transport du glucose est assuré par des perméases de type HXT (hexose transporter). Le séquençage du génome de cette levure a révélé qu'elle possède 17 isoformes d'HXT [139, 144]. Ces transporteurs membranaires ont une affinité élevée pour le glucose [24], et peuvent aussi transporter le fructose et le mannose [18].

Contrairement aux organismes pluricellulaires pour lesquels l'expression des différentes isoformes de transporteurs du glucose est tissu-spécifique et la concentration en glucose extracellulaire est quasi constante, les organismes unicellulaires peuvent subir des variations drastiques de la concentration des différentes sources de carbone dans

leur environnement. Chez *S. cerevisiae*, l'expression des différentes isoformes d'HXT est intimement liée à la concentration extracellulaire de leurs substrats (glucose, fructose et mannose).

En fonction de leurs affinités pour le glucose, les HXT sont divisés en 3 catégories distinctes.

- ▶ HXT à faible affinité avec un  $K_m$  de 40 à 100 mM. Dans cette catégorie on trouve HXT1 et HXT3 [204] ;
- ▶ HXT à affinité modérée avec un  $K_m$  de 10 à 15 mM. Dans cette catégorie on trouve HXT4 et HXT5 [204, 74] ;
- ▶ HXT à haute affinité avec un  $K_m$  de 1 à 3 mM. Dans cette catégorie on trouve HXT6 et HXT7 [204].

HXT2 peut exister sous 2 conformations : une avec une affinité élevée ( $K_m$  2 mM) et une autre avec une affinité modérée ( $K_m$  10 mM), en fonction de la concentration du glucose dans l'environnement [204].

HXT5, HXT6 et HXT7 sont principalement exprimés dans des conditions de stress suite à un appauvrissement en glucose [73, 94, 243, 135].

Le transport du glucose à travers les GLUT/HXT se fait selon le principe de diffusion facilitée. En fonction du gradient de concentration, ces perméases vont permettre le passage du glucose du côté le plus concentré (milieu extracellulaire) vers le côté moins concentré (cytoplasme). Ce gradient de concentration est maintenu, car suite à son import, le glucose est immédiatement recruté et phosphorylé par une hexokinase générant le glucose-6-phosphate (G6P).

Cette étape de phosphorylation du glucose en G6P est primordiale, car non seulement elle empêche le glucose de ressortir vers l'extérieur, mais elle lui permet aussi, de s'engager dans plusieurs voies métaboliques, telles que la glycolyse.

## 1.2 La glycolyse

Chez les eucaryotes, la glycolyse est la première voie métabolique dans le processus de conversion de l'énergie. Se déroulant entièrement dans le cytosol, la glycolyse est composée de dix réactions enzymatiques (**Figure 1.1**).

Une glycolyse complète permet l'oxydation d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, conduisant ainsi à la formation de deux molécules d'ATP et deux NADH,H<sup>+</sup>, selon la réaction globale suivante :

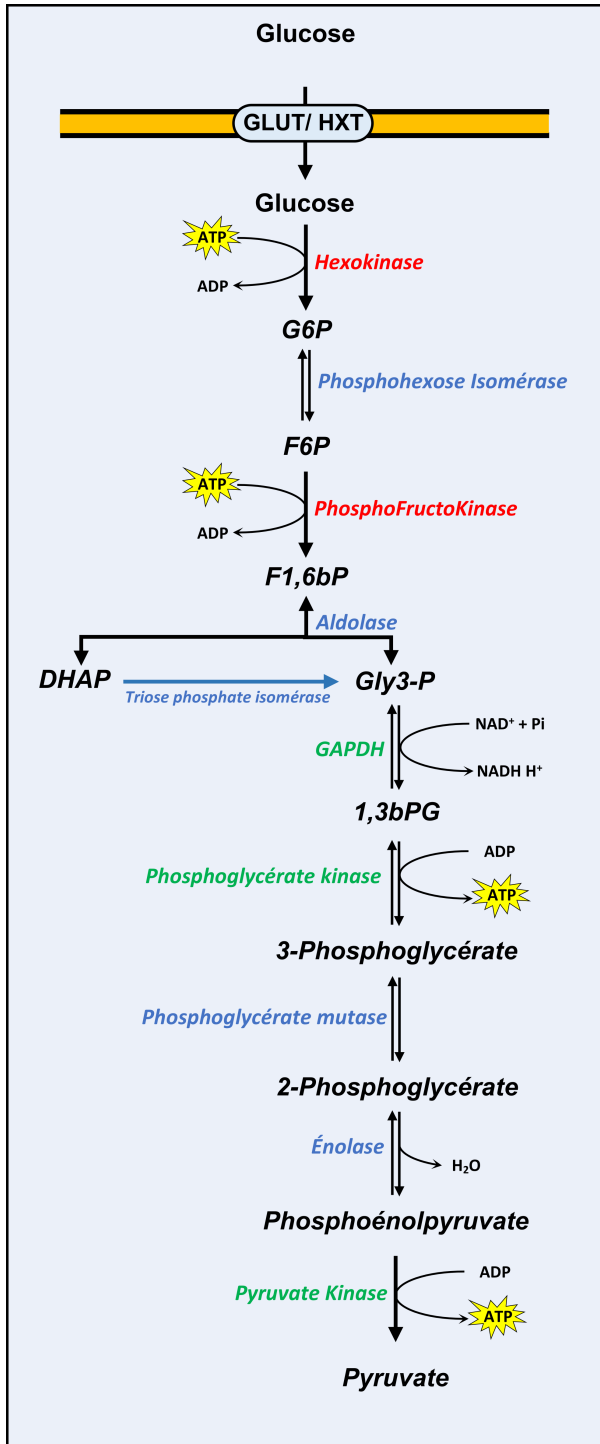


## 1.3 Devenir du pyruvate

Au cours du processus d'oxydation du glucose, l'état redox cytosolique du couple NADH,H<sup>+</sup>/NAD<sup>+</sup> cytosolique joue un rôle très important dans la régulation du flux des différentes voies de synthèse d'ATP (glycolyse et respiration mitochondriale) [115].

Dans le cytosol, la conversion d'une molécule du glucose en deux molécules de pyruvate par la glycolyse est accompagnée de la réduction de deux NAD<sup>+</sup>.

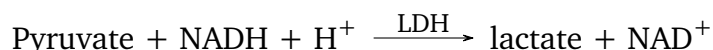
Afin de maintenir un état redox favorable à la glycolyse, le NADH,H<sup>+</sup> produit doit être réoxydé. Chez les eucaryotes, le mécanisme de réoxydation du NADH,H<sup>+</sup> dépend principalement de la disponibilité en oxygène, de l'état énergétique de la cellule et d'un système des oxydations phosphorylantes (OXPHOS) fonctionnel.



**Figure 1.1 – Voie de dégradation du glucose (La glycolyse).** Une molécule du glucose est transportée vers le cytosol par diffusion facilitée via un transporteur du glucose (GLUT/HXT). (1) Une fois dans le cytosol, la molécule de glucose est recrutée par une hexokinase qui transfère un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP donnant une molécule de glucose-6-phosphate (G6P), cette réaction est irréversible. (2) Le G6P est ensuite recruté par une phosphohexose isomérase, cette enzyme catalyse l'isomérisation du G6P en fructose-6-phosphate (F6P). Cette réaction est réversible. (3) La troisième réaction est catalysée par la phosphofructokinase (PFK), elle consiste au transfert d'un groupement phosphate à partir d'une molécule d'ATP au F6P pour donner le fructose 1,6 bisphosphate (F1,6bP), cette réaction est irréversible. (4) Le F1,6bP est scindé en 2 trioses : le glycéraldéhyde-3-phosphate (Gly3-P) et la dihydroxyacétone phosphate (DHAP). (5) Dans la suite de la glycolyse, seul le Gly3-P qui va être utilisé : il y a donc conversion de la DHAP en Gly3-P par la triose-phosphate isomérase. (6) Le Gly3-P est en suite recruté par la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH), cette dernière catalyse le transfert d'un phosphate inorganique libre (Pi) du cytoplasme au Gly3-P donnant le 1,3 bisphosphoglycérate (1,3 bPG). Cette réaction est réversible et est couplée à la réduction d'une molécule de NAD<sup>+</sup> en NADH,H<sup>+</sup>. (7) Le 1,3 bPG est déphosphorylé par la phosphoglycérate kinase donnant le 3-phosphoglycérate. Cette réaction est réversible et est couplée à la formation d'une molécule d'ATP. (8) Le 3-phosphoglycérate est converti en 2-phosphoglycérate par la phosphoglycérate mutase. Cette réaction est réversible. (9) L'énolase catalyse la déshydratation du 2-phosphoglycérate pour donner le phosphoénolpyruvate (PEP) et une molécule d'eau. Cette réaction est réversible. (10) La dernière étape de la glycolyse est catalysée par la pyruvate kinase. Elle consiste à la conversion du PEP en pyruvate. Cette réaction est irréversible et est couplée à la formation d'une molécule d'ATP.

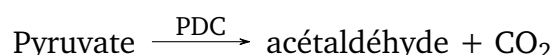
### 1.3.1 En absence d'oxygène (anaérobie)

En anaérobiose, en hypoxie, ou lorsque les cellules ne disposent pas de mitochondries (hématie) le pyruvate est utilisé comme accepteur final d'électrons, il est réduit en lactate par la lactate déshydrogénase selon la réaction suivante.

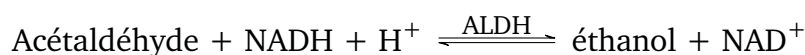


Ce mécanisme de régénération du  $\text{NAD}^+$  en anaérobiose est appelé la fermentation lactique. Chez la levure telle que *S. cerevisiae*, le pyruvate n'est pas réduit en lactate mais en éthanol. Dans ce cas la régénération du  $\text{NAD}^+$  se fait en deux étapes :

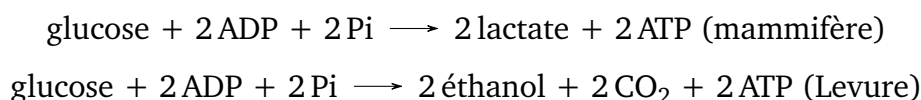
1. Le pyruvate est décarboxylé en acétaldéhyde par la pyruvate décarboxylase. Cette réaction est irréversible.



2. L'acétaldéhyde est réduit en alcool ou éthanol par l'alcool déshydrogénase. La réaction est couplée à l'oxydation du  $\text{NADH}, \text{H}^+$  formé lors de la glycolyse.



Ce mécanisme de régénération du  $\text{NAD}^+$  en anaérobiose chez la levure est appelé la fermentation alcoolique. Dans les conditions de fermentation (lactique ou alcoolique), le rendement énergétique de l'oxydation d'une molécule du glucose est considérablement plus faible qu'en aérobie (voir ci-dessous).



### 1.3.2 En présence d'oxygène (aérobie)

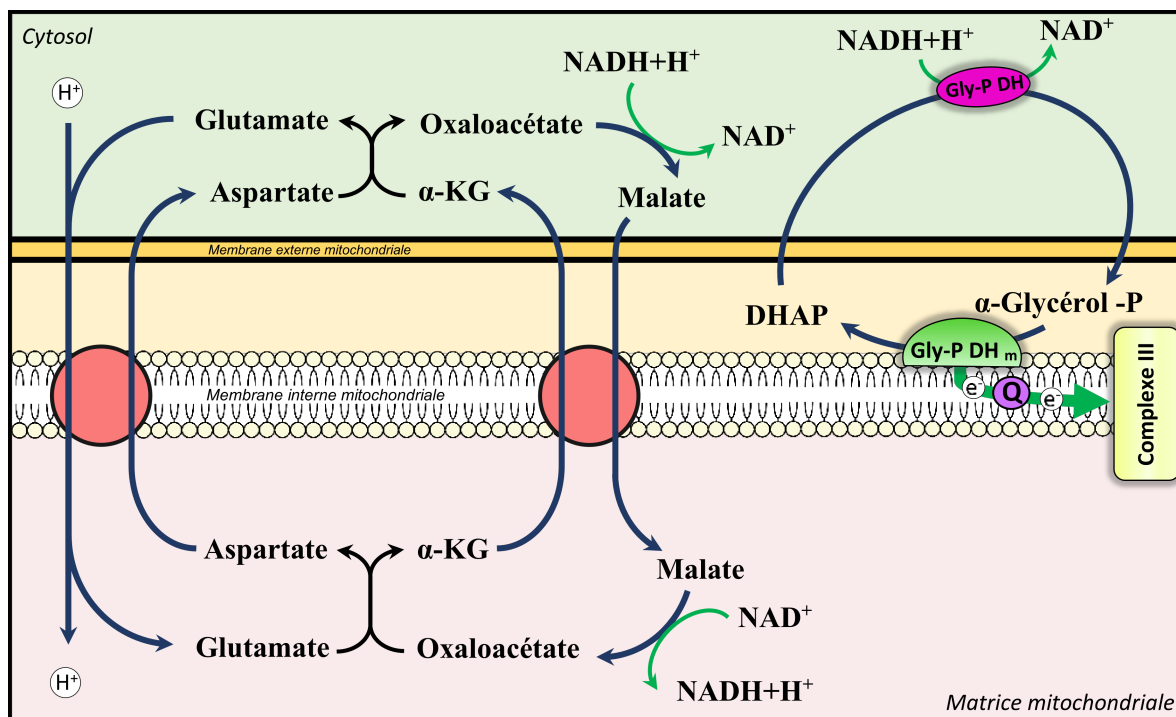
En raison de sa fonction d'accepteur final d'électrons, l'oxygène joue un rôle très important dans le processus de la respiration mitochondriale. Lorsque celui-ci est disponible, les complexes de la chaîne respiratoire vont pouvoir libérer leurs sites de liaison

d'électrons en cédant les électrons captés à partir de l'oxydation des coenzymes réduits (NADH, FADH<sub>2</sub>, succinate, QH<sub>2</sub>) à l'oxygène, permettant ainsi la réalisation d'un autre cycle d'oxydation.

L'oxydation des coenzymes réduits et donc le transfert d'électrons à travers les complexes de la chaîne respiratoire est couplée à un transfert vectoriel de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie et un gradient de proton (force protomotrice) est donc établi de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie.

La membrane interne mitochondriale étant quasi imperméable, le pyruvate (anion organique), ne peut la franchir qu'à travers une protéine transporteur [29] qui utilise le gradient de protons établi par la chaîne respiratoire pour transférer le pyruvate vers la matrice mitochondriale en même temps qu'un proton H<sup>+</sup> [105]. Dans la matrice mitochondriale, le pyruvate sera oxydé en CO<sub>2</sub> et H<sub>2</sub>O par le cycle de Krebs. Le résultat de cette oxydation est la formation de trois NADH,H<sup>+</sup>, un FADH<sub>2</sub> et un GTP ou un ATP par molécule de pyruvate. Les coenzymes réduits (NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) seront ensuite oxydés par la chaîne respiratoire et l'ATP synthase utilisera le gradient électrochimique en protons généré par cette oxydation pour former des molécules d'ATP. L'ensemble de ces réactions enzymatiques forme le processus des oxydations phosphorylantes (OXPHOS).

Les coenzymes NAD<sup>+</sup> et NADH,H<sup>+</sup> ne peuvent pas franchir la membrane interne de la mitochondrie. Chez les eucaryotes supérieurs, les deux navettes malate-aspartate et glycérol-3-phosphate sont deux mécanismes par lesquels le pouvoir réducteur (2H<sup>+</sup> + 2e<sup>-</sup>) du NADH cytosolique est transféré vers un NAD<sup>+</sup> de la matrice mitochondriale (**Figure 1.2**). De cette façon le NADH formé lors de la glycolyse est régénéré en NAD<sup>+</sup> au sein de la matrice mitochondriale.



**Figure 1.2 – Mécanismes de réoxydation du NADH cytosolique en aérobiose, chez les eucaryotes supérieurs : Navette Malate/Aspartate et glycérol-3-phosphate.** À gauche, la réduction de l'oxaloacétate en malate dans le cytosol par une malate déshydrogénase, assure l'oxydation d'un  $\text{NADH}, \text{H}^+$  cytosolique en  $\text{NAD}^+$ . Le malate est ensuite transporté dans la matrice mitochondriale où une malate déshydrogénase l'oxyde en oxaloacétate avec réduction d'un  $\text{NAD}^+$  matriciel en  $\text{NADH}$ . L'oxaloacétate ainsi produit dans la mitochondrie, ne peut franchir la membrane mitochondriale, une réaction de transamination le transformera en aspartate qui, lui, traverse cette membrane. Une deuxième transamination dans le cytosol redonnera de l'oxaloacétate. À droite, deux glycérol-phosphate déshydrogénases (Gly-PDH) différentes participent à cette navette : une, cytosolique ; l'autre, mitochondriale, située sur la face externe de la membrane interne. Dans le cytosol, la Gly-PDH convertit un  $\text{NADH}, \text{H}^+$  cytosolique en  $\text{NAD}^+$  en réduisant la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) en glycérol-3-phosphate. Dans l'espace intermembranaire mitochondrial, la Gly-PDH mitochondriale couple l'oxydation du glycérol-3-phosphate en DHAP au transfert de deux électrons au complexe III de la chaîne respiratoire, via une ubiquinone.

## 1.4 La respiration mitochondriale

L'oxydation du pyruvate par la respiration mitochondriale est divisée en trois (3) grandes étapes :

### 1.4.1 Le transport et la conversion du pyruvate en acétyl-CoA

Chez la levure, la drosophile et l'homme, deux protéines transporteurs de type MPC pour « mitochondrial pyruvate carrier » ont été identifiées comme essentielles pour le

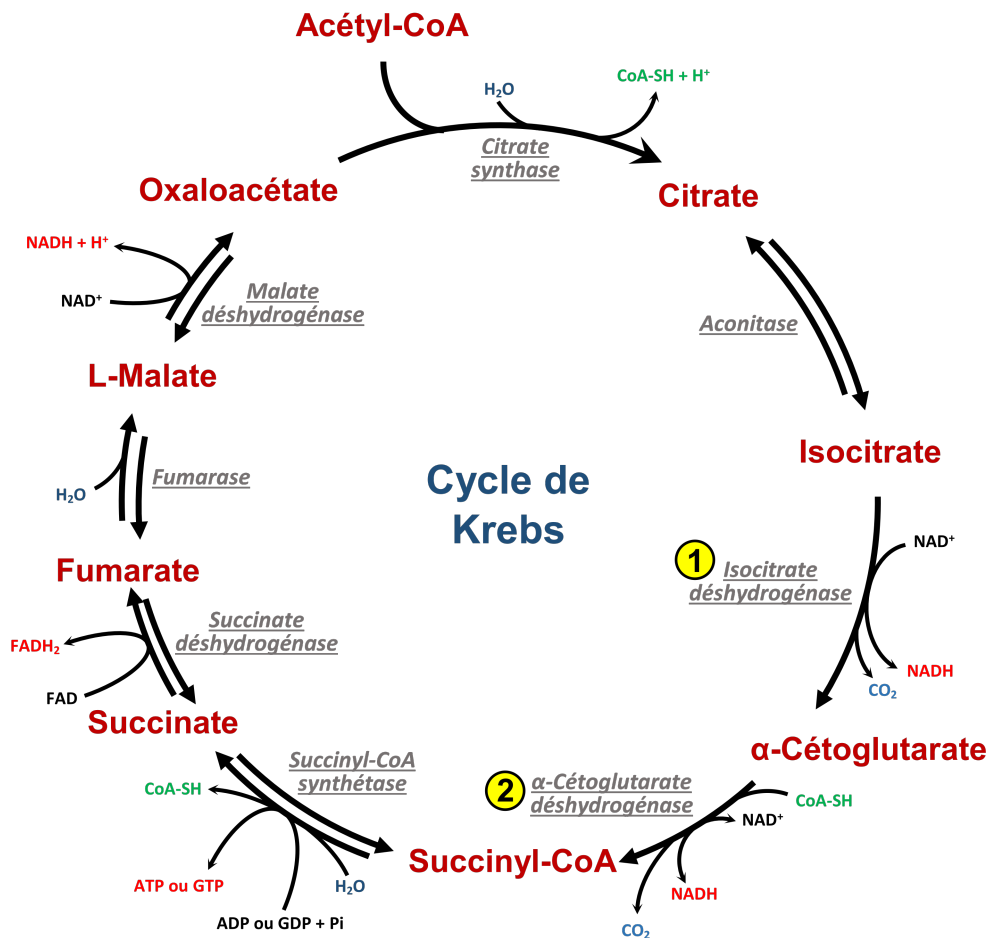
passage du pyruvate vers la matrice mitochondriale [29].

Dans la matrice mitochondriale, le pyruvate est recruté par le complexe enzymatique pyruvate déshydrogénase qui catalyse la décarboxylation oxydative du pyruvate en acétyl-CoA. La pyruvate déshydrogénase est un gros complexe multienzymatique accroché à la face matricielle de la membrane interne de la mitochondrie. Il regroupe trois activités enzymatiques : la pyruvate déshydrogénase, la dihydrolipoyltransacétylase et la dihydrolipoyl déshydrogénase. La conversion du pyruvate en acétyl-CoA par ce complexe est réalisée en plusieurs étapes, elle nécessite l'implication de plusieurs coenzymes : le thiamine pyrophosphate (TPP), le lipoamide, le FAD, le NAD<sup>+</sup> et le coenzyme A (CoA). Ce dernier sera recyclé à la fin de la 2<sup>ème</sup> étape (le cycle de Krebs).

#### 1.4.2 L'oxydation de l'acétyl-CoA dans le cycle de Krebs et formation des coenzymes réduits

Le cycle de Krebs est une série de huit réactions successives d'oxydoréduction. Chez les eucaryotes, ce cycle est réalisé en totalité dans la matrice mitochondriale. Il aboutit à l'oxydation de l'acétyl-CoA en CO<sub>2</sub>, la régénération du coenzyme A et la réduction des coenzymes NADH,H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub> (**Figure 1.3**).





• Régulation allostérique

① +  $Ca^{2+}$

– ATP

– Succinyl-CoA

– NADH

② +  $Ca^{2+}$

+ ADP

– ATP

– NADH

**Figure 1.3 – Cycle de Krebs.** Les réactions du cycle de Krebs sont soumises à une régulation allostérique par l'ATP, ADP, succinyl-CoA, NADH et  $Ca^{2+}$ . Le  $Ca^{2+}$  et l'ADP stimulent le cycle de Krebs au niveau des réactions de conversion de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate puis en succinyl-CoA. Tandis que l'ATP, la succinyl-CoA et le NADH jouent le rôle contraire (inhibition)

### 1.4.3 Réoxydation des coenzymes réduits et synthèse d'ATP par le système des OXPHOS

Chez les eucaryotes, le système des OXPHOS (oxydations phosphorylantes) est le mécanisme par lequel la majeure partie de l'ATP cellulaire est synthétisée [209]. Comme son nom l'indique ce système est composé de deux séries de réactions enzymatiques de natures différentes : oxydoréduction puis phosphorylation.

#### 1.4.3.1 Les réactions d'oxydoréduction (la chaîne respiratoire)

Les réactions d'oxydoréduction correspondent à la réoxydation du NADH formé à partir de NAD<sup>+</sup> lors de l'oxydation des nutriments en aérobiose, et le transfert des électrons cédés par le NADH vers l'oxygène, l'accepteur terminal. Ces réactions sont exergoniques, l'énergie libérée est utilisée pour déplacer des protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire, générant ainsi un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ce mécanisme fait intervenir un ensemble de complexes enzymatiques intégrés à la membrane interne mitochondriale. Il s'agit de la chaîne respiratoire.

Chez les eucaryotes supérieurs, la chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes protéiques :

- Le complexe I ou la NADH-Coenzyme Q oxydoréductase ;
- Le complexe II ou la succinate Coenzyme Q oxydoréductase ;
- Le complexe III ou la Coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase ;
- Le complexe IV ou la cytochrome c oxydase.

En plus de ces complexes non mobiles, la chaîne respiratoire contient aussi deux transporteurs d'électrons mobiles qui jouent le rôle de navette d'électrons entre les complexes de la chaîne respiratoire : le coenzyme Q et le cytochrome c. Le coenzyme Q transporte les électrons depuis le complexe I et II vers le complexe III. Alors que le cytochrome c transporte les électrons depuis le complexe III vers le complexe IV.

Les complexes I, III et IV couplent le transfert des électrons de haut potentiel du NADH vers l'oxygène, à une extrusion de protons depuis la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Contrairement aux complexes I, III et IV qui traversent tous

la membrane interne, le complexe II est ancré à la membrane interne et orienté vers la face matricielle de la mitochondrie. Il est le seul complexe de la chaîne respiratoire qui ne participe pas au pompage des protons. Il catalyse le transfert des électrons du  $\text{FADH}_2$  vers le coenzyme Q. Le complexe II est aussi une enzyme de cycle de Krebs.

Chez la levure *S. cerevisiae*, la chaîne respiratoire ne contient pas de complexe I. Il est substitué par trois NADH déshydrogénases. Deux d'entre elles sont des isoformes externes, elles sont accrochées à la membrane interne du côté de l'espace intermembranaire. Il s'agit de Nde1p et Nde2p. La troisième est une déshydrogénase interne ancrée dans la membrane interne du côté matrice mitochondriale, il s'agit de N dip (Figure 1.4).

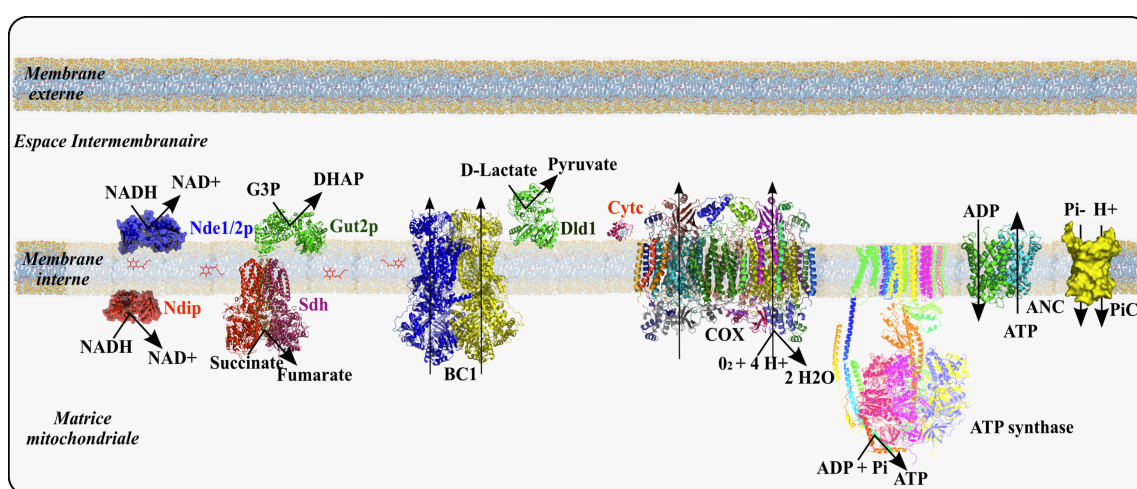


Figure 1.4 – Schéma de la chaîne respiratoire de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, seuls les complexes III et IV ont la capacité de pomper des protons.

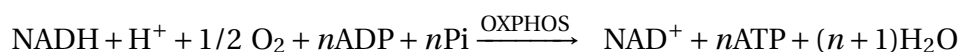
#### 1.4.3.2 Les réactions de phosphorylation (ATP synthase)

La membrane interne mitochondriale n'est que faiblement perméable aux protons. Ainsi, lors de l'extrusion des protons par la chaîne respiratoire depuis la matrice vers l'espace intermembranaire, une différence de potentiel électrochimique en protons ( $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ ) est établie de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale [167]. Cette différence de potentiel électrochimique contient une composante chimique ( $\Delta\text{pH}$ ) et une composante électrique ( $\Delta\psi$ ).

L'ATP synthase est un complexe enzymatique intégré à la membrane interne mitochondriale, il est formé de deux domaines, un domaine transmembranaire appelé  $F_0$  et un domaine  $F_1$  hydrosoluble dans la matrice mitochondriale.

Selon la théorie chimio-osmotique de "Peter Mitchell", ce complexe couple la dissipation du potentiel électrochimique en protons par diffusion facilitée de protons à travers le domaine  $F_0$ , à la phosphorylation de l'ADP présent dans la matrice mitochondriale catalysée par le domaine  $F_1$  en présence de  $P_i$ , conduisant ainsi à la synthèse d'ATP. L'ATP ainsi synthétisé est ensuite exporté vers le cytosol par l'intermédiaire du transporteur mitochondrial de nucléotides adényliques (translocase).

La réaction globale catalysée par les oxydations phosphorylantes peut donc s'écrire :



Où  $n$  représente le nombre de molécules d'ATP synthétisées par molécule de NADH oxydée.

## 1.5 Régulation du processus d'oxydation du glucose

### 1.5.1 Régulation allostérique

Dans les cellules différenciées, la régulation allostérique par les métabolites occupe une place importante dans la régulation du processus d'oxydation du glucose (glycolyse, cycle de Krebs et respiration mitochondriale). En effet l'ensemble des enzymes qui catalysent les réactions irréversibles de ces voies métaboliques sont soumises à la régulation allostérique par les métabolites (acétyl-CoA, ATP, ADP, NADH). Dans le **tableau 1.1** sont résumés les principaux points de régulation allostérique du processus d'oxydation du glucose.

Toutefois, dans les cellules eucaryotes, il a été montré que les cellules peuvent moduler ou contourner l'effet d'inhibition allostérique par les métabolites, notamment l'ATP et le G6P, par l'expression d'autres isoformes d'enzymes [156, 179]. À titre d'exemple,

Tableau 1.1 – Régulateurs allostériques des voies de dégradation de glucose par les métabolites.

<i>Enzyme</i>	<i>Voie métabolique</i>	<i>Effecteur</i>	<i>Effet allostérique</i>
Hexokinase I, II	glycolyse	G6P	inhibition
PFK-1	glycolyse	ATP, citrate	inhibition
		AMP, F2,6bP	stimulation
Pyruvate Kinase	glycolyse	ATP	inhibition
		F2,6bP	stimulation
IDH	cycle de Krebs	ATP, NADH, succinyl-CoA	inhibition
		Ca <sup>2+</sup>	stimulation
$\alpha$ -KGDH	cycle de Krebs	ATP, NADH	inhibition
		ADP, Ca <sup>2+</sup>	stimulation
Cytochrome-c- oxydase	chaîne respiratoire	ATP	inhibition
		ADP	stimulation

chez les mammifères, la première réaction de la glycolyse peut être catalysé par trois isoformes d'hexokinase : l'hexokinase I, l'hexokinase II, et la glucokinase. Cette dernière est exprimée plus particulièrement dans les cellules hépatiques. Elle possède la particularité de ne pas être inhibée par le G6P [71].

### 1.5.2 Régulation thermodynamique

D'un point de vue thermodynamique, la cellule est un système ouvert qui échange en permanence de l'énergie et de la matière avec son environnement. Au sein de la cellule, les réactions qui constituent le métabolisme énergétique ne sont qu'une forme de conversion de l'énergie potentielle de l'environnement vers une forme utilisable par la cellule : le potentiel phosphate. Le processus de conversion d'énergie à partir du

glucose (glycolyse, cycle de Krebs et chaîne respiratoire) consiste à la conversion de l'énergie potentielle de ce dernier en trois formes successives d'énergie : potentiel redox ( $\Delta G'_{\text{ox-red}}$ ), potentiel électrochimique ( $\Delta \tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ ) et potentiel phosphate ( $\Delta G'_{\text{p}}$ ).

Au cours de la glycolyse et le cycle de Krebs, l'oxydation du glucose en dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ) aboutit à la réduction des espèces oxydées ( $\text{NAD}^+$  et  $\text{FAD}$ ), en induisant ainsi l'augmentation de la différence du potentiel avec les espèces réduites ( $\text{NADH, H}^+$  et  $\text{FADH}_2$ ) au niveau de la matrice mitochondriale. Le saut de potentiel redox ( $\Delta G'_{\text{ox-red}}$ ), rend favorable l'oxydation du  $\text{NADH, H}^+$  et  $\text{FADH}_2$  au niveau des complexes de la chaîne respiratoire. Cette oxydation est couplée à un transfert de protons ( $\text{H}^+$ ) contre leur gradient de concentration de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire mitochondrial. C'est ainsi que l'énergie du potentiel redox est convertie en potentiel électrochimique ( $\Delta \tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ ) ou force proton-motrice. En dernière étape, l'ATP synthase transforme cette force proton-motrice en potentiel phosphate ( $\Delta G'_{\text{p}} = \Delta G'^{\circ}_{\text{p}} + RT \ln \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{Pi}]}$ ) par la synthèse de l'ATP.

Dans la cellule, le potentiel phosphate ( $\Delta G'_{\text{p}}$ ) est majoritairement déterminé par le rapport entre les concentrations de l'ATP et l'ADP cytosolique libre.

Les réactions de conversion d'énergie évoluent toujours vers le sens du maintien d'un état dynamique stationnaire entre consommation et production d'énergie. Ceci implique que toute variation du besoin des cellules en énergie aura pour conséquence le déplacement de cet état stationnaire vers le sens de compensation de cette variation d'état.

Le potentiel phosphate joue un rôle très important dans la régulation du flux de l'ensemble des voies de dégradation du glucose (la glycolyse, le cycle de Krebs et les OXPHOS). En effet en raison de l'organisation en cascade de ces voies métaboliques (le produit de la réaction en amont est le substrat de la réaction en aval), l'activité de l'ATP synthase dans la phosphorylation de l'ADP (dernière réaction du processus) régule l'ensemble du système de l'oxydation du glucose. En effet, il a été montré que la régulation de l'ATP synthase par le rapport ( $\text{ATP}/\text{ADP.Pi}$ ) est plus thermodynamique que cinétique, de sorte que l'activité de cette dernière dépend principalement du rapport entre les concentrations intracellulaires de l'ATP, l'ADP et le phosphate inorganique libre

cytosolique [134, 81].

Par exemple, dans une situation métabolique où le flux d'hydrolyse de l'ATP est moins important que le flux de sa synthèse, la balance du rapport des concentrations ATP/ADP évolue en faveur de l'ATP et induit par conséquent l'augmentation du potentiel phosphate cytosolique ( $\Delta G'_{pc}$ ). Ce dernier ainsi augmenté, la réaction de phosphorylation de l'ADP par l'ATP synthase devient thermodynamiquement "défavorable" et l'activité de l'ATP synthase diminue par conséquent.

Or, la diminution de l'activité de l'ATP synthase ralentit le flux de conversion du potentiel redox en force proton-motrice ( $\Delta\tilde{\mu}H^+$ ) au niveau de la chaîne respiratoire. Ensuite, l'accumulation des coenzymes réduits (NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) dans la matrice mitochondriale, rend difficile les réactions de réduction du NAD<sup>+</sup> et FAD au niveau de la matrice mitochondriale (augmentation importante du  $\Delta G'_{ox-red}$ ). Dans la mesure où les réactions du cycle de Krebs sont pour la plupart des réactions de réduction de NAD<sup>+</sup> ou FAD, l'augmentation du potentiel redox matriciel induit le ralentissement du cycle de Krebs.

Dans le cytosol, le potentiel redox cytosolique déterminé par le couple NADH/NAD<sup>+</sup> cytosolique est un paramètre très important dans la détermination du flux glycolytique. En effet, la cinquième réaction de la glycolyse qui consiste en l'oxydation du Gly3-P en 1,3bPG par la GAPDH, implique un transfert d'électrons et nécessite la disponibilité d'un accepteur : le NAD<sup>+</sup> (voir **figure 1.1**).

Dans les conditions d'augmentation du potentiel phosphate, l'augmentation du potentiel redox de la matrice mitochondriale résultant du ralentissement du système des OXPHOS, rend les réactions de la navette malate-aspartate et glycérol-3-phosphate thermodynamiquement défavorable. Ceci se traduit par une augmentation du potentiel redox cytosolique (augmentation de la concentration du NADH cytosolique). Cette augmentation du potentiel redox cytosolique "freine" la glycolyse.

## 1.6 Rôle du glucose dans la prolifération cellulaire

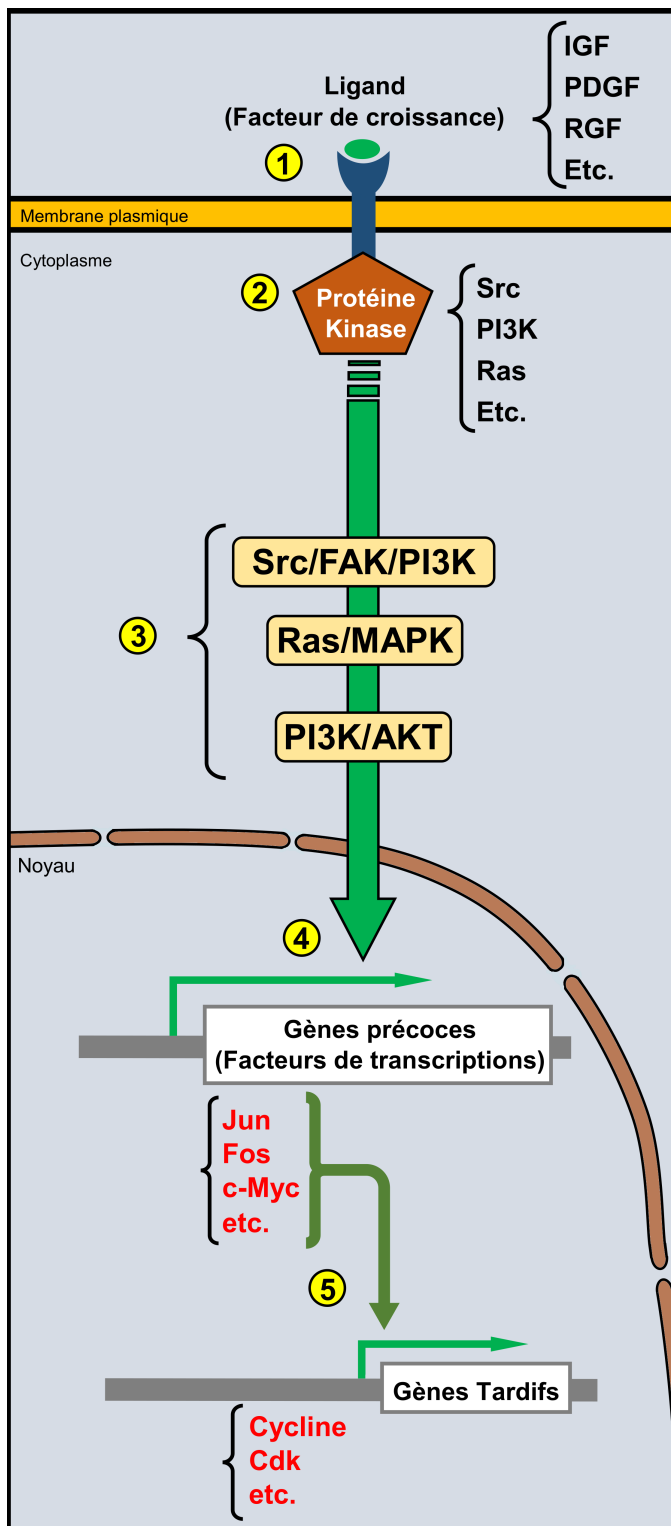
Chez les organismes unicellulaires (bactérie et levure), la prolifération et la croissance cellulaire sont directement influencées par les conditions environnementales. En effet, la disponibilité de nutriments dans l'environnement engendre chez ces derniers un signal qui déclenche le processus de prolifération cellulaire (croissance et production de biomasse).

Chez les mammifères, l'induction de la prolifération ne dépend pas seulement de l'abondance de nutriments, mais de signaux extérieurs médiés par des facteurs de croissance (IGF, PDGF, EGF) et des cytokines. L'expression des gènes impliqués dans la prolifération cellulaire est sous le contrôle d'un système très complexe formé de protéines (kinase/phosphatase), organisé en cascade de signalisation (**Figure 1.5**).

Les voies PI3K/AKT/mTOR, Ras/MAPK et Src/FAK sont les voies de signalisation les plus connues pour leurs rôles dans la transduction du signal régulant l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose, la croissance et la prolifération cellulaire [90, 12]. Parmi les gènes cibles on trouve un grand nombre de gènes impliqués dans le métabolisme, principalement, celui du glucose [253, 11, 67].

Akt, mTor, PI3k, Ras et c-Myc sont des protéines kinases jouant un rôle clé dans la transduction du signal régulant l'expression des gènes impliqués dans l'apoptose, la croissance et la prolifération cellulaire [90, 12]. Les études sur les mécanismes de la transformation maligne ont mis en évidence qu'une mutation (activation) d'une seule protéine (proto-oncogène) impliquée dans ces trois voies de signalisation est suffisante pour induire une prolifération cellulaire incontrôlée. Il a été mis en évidence que dans la majorité des cancers, *AKT*, *mTOR*, *PI3K*, *RAS* et *c-myc* sont mutés et continuellement actifs [120, 188, 22, 231, 218].





**Figure 1.5 – Mode de transduction du signal stimulant la prolifération cellulaire chez les organismes pluricellulaires (mammifères).** De façon générale, le signal stimulant la prolifération chez les cellules de mammifères, est composé de cinq grandes étapes, qui se manifestent de façon séquentielle formant ce qu'on appelle une voie de signalisation : (1) Fixation du ligand (facteur de croissance, cytokine) sur son récepteur et activation du récepteur transmembranaire ; (2) Activation d'une protéine cytoplasmique associée au récepteur ; (3) La protéine associée une fois activée, déclenche une série de phosphorylation de protéines cytoplasmiques, catalysées par des protéines-kinases, formant ainsi une cascade de transduction du signal (Src/FAK/PI3K, Ras/MAPK, PI3K/AKT) vers le noyau ; (4) Activation de l'expression d'une famille de gènes de réponse précoces (facteurs de transcription nucléaires rapidement transcrit après le signal stimulant la prolifération : Jun, Fos, Myc, etc.) ; (5) Activation de l'expression d'une famille de gènes dite tardifs par les facteurs de transcription nucléaires : Jun, Fos, Myc, etc. Parmi ces gènes on trouve ceux des cyclines et des cdk qui ont un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en phase G1.

Chez les eucaryotes, le cycle cellulaire est composé d'une succession de quatre phases : G1, S, G2 et M, au cours desquelles la cellule couple croissance et division. Durant les phases de croissance G1 et S, la cellule va dupliquer son contenu cellulaire et augmente par conséquent en biomasse et en volume, jusqu'à atteindre un volume critique qui lui permet de rentrer en phase de division (G2 et M) [218].

La duplication du contenu cellulaire durant l'étape de croissance implique un besoin important en énergie (ATP) et en précurseurs de biomolécules (nucléotides, acides aminés, lipides, etc). Les recherches sur les mécanismes de régulation du cycle cellulaire ont mis en évidence une activité de synthèse protéique importante durant la phase G1, accompagnée d'une augmentation d'assimilation d'acides aminés de l'ordre de 50%, et cela même avant l'initiation de la réplication de l'ADN [218, 213, 214]. Ainsi il a été montré qu'une carence en nutriment provoquait une prolongation de la phase G1 [194]. Ce qui laisse suggérer qu'une quantité suffisante en énergie et intermédiaires métaboliques est nécessaire pour soutenir les voies anaboliques et permettre le passage à la phase de division M.

Dans ces conditions de croissance, le glucose occupe un rôle important. Il sert non seulement à la production d'ATP, mais participe également comme source d'intermédiaires métaboliques nécessaires à la synthèse de biomolécules (**Figure 1.6**).

A travers la glycolyse, le glucose peut fournir :

- ☞ Des riboses (nécessaires à la synthèse de nucléotides) et du NADPH (nécessaires aux voies de biosynthèse[4]), par la fourniture du G6P à la voie des pentoses phosphates [237] ;
- ☞ Des acides aminés non essentiels (alanine à partir du pyruvate ; sérine et cystéine à partir du 3 phosphoglycérate ; etc). [147] ;
- ☞ Du glycérol à partir de la dihydroxyacétone phosphate (DHAP) et du citrate à partir du pyruvate pour la biosynthèse des lipides, nécessaires à la formation des membranes plasmiques [67].

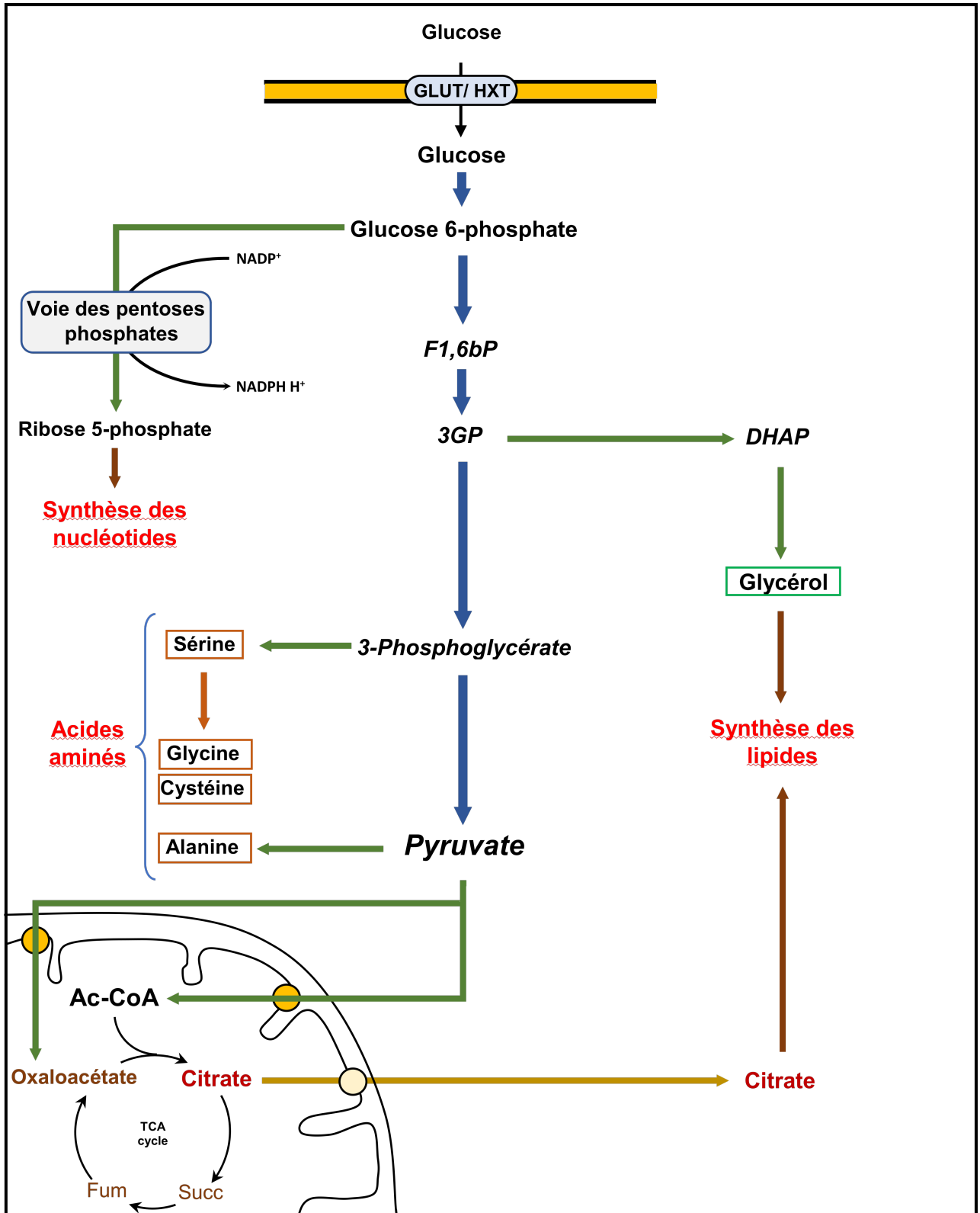


Figure 1.6 – Interconnexions entre la glycolyse et les voies de biosynthèse anaboliques.

# *La glycolyse aérobie (effet Warburg)*

### 2.1 Découverte de la glycolyse aérobie (effet Warburg)

Au début du 20<sup>ème</sup> siècle, la mise en évidence de la relation entre oxygène et le processus de fermentation (effet Pasteur), a fait de l'étude du métabolisme énergétique un sujet d'actualité. Bon nombre de chimistes et médecins de cette époque ont cherché à comprendre les relations qui existent entre la disponibilité en oxygène et le métabolisme fermentaire.

Mr. Otto Warburg qui étudiait le métabolisme énergétique des mammifères, constata en 1924, que l'ajout du glucose à des cellules tumorales (carcinome) en culture aérobie, conduisait à l'apparition d'une quantité importante de lactate dans le milieu de culture [250]. Curieux de ce résultat qui contrariait en quelque sorte les conclusions de Louis PASTEUR, Warburg développa une technique permettant de quantifier de façon précise le taux de production du lactate et de consommation d'oxygène, dans des coupes fines de tissus normaux et cancéreux (200 à 300  $\mu\text{m}$ ). Étonnement, Warburg mis en évidence que les cellules tumorales ne semblent pas suivre le schéma décrit par Louis PASTEUR pour les cellules normales, concernant l'inhibition du processus de la fermentation par l'oxygène. En appliquant sa technique de mesure, Warburg constata que les cellules d'hépatome isolées à partir d'un foie de rat « Flexner-Jobling », consommaient environ 10 fois plus de glucose et produisaient une quantité importante de lactate, alors que l'oxygène était présent à une quantité suffisante pour permettre une respiration

mitochondriale [251, 248, 45].

Pour expliquer ces observations, Mr Warburg proposa en 1956 une explication mécanique quant à l'origine de la glycolyse aérobie. Selon lui, la production du lactate en aérobose est une sorte d'alternative utilisée par la cellule cancéreuse pour garantir sa survie suite à un dysfonctionnement irréversible des fonctions mitochondriales. Otto Warburg formula l'hypothèse qu'une altération irréversible de la respiration mitochondriale est à l'origine du développement du cancer [249].

Aujourd'hui, avec le progrès des connaissances sur l'origine et les mécanismes de la transformation maligne, l'hypothèse de Warburg sur l'origine de la prolifération incontrôlée des cellules n'est plus admise pour deux raisons :

La première est que la glycolyse aérobie n'est pas directement liée au caractère malin. De nombreuses autres lignées de cellules de mammifères (lymphocytes et fibroblastes) et certaines souches de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) développent une glycolyse aérobie en conditions de prolifération, [151, 47]. Chez des lymphocytes en culture, après stimulation de la prolifération, il a été montré que ces cellules convertissent une quantité importante du glucose consommé en lactate [211, 247, 110, 28].

La deuxième raison est que le développement de la glycolyse aérobie peut être indépendant du fait que les mitochondries sont fonctionnelles ou non. Il a été montré dans certains types de cellules cancéreuses que les mitochondries sont fonctionnelles (consommation d'oxygène couplée à la synthèse d'ATP) alors qu'elles présentent une glycolyse aérobie [171, 83]. Une diminution quantitative en mitochondries pourrait conduire à une glycolyse aérobie.

## 2.2 L'origine du développement de l'effet Warburg

Depuis la découverte de l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses, la question relative aux mécanismes responsables de sa mise en place a été soulevée. Durant les deux dernières décennies, le développement des outils d'analyse de biologie moléculaire a permis de mettre en évidence que l'effet Warburg n'est pas le résultat d'un dérèglement

anarchique du métabolisme tumoral, mais plutôt le résultat d'une reprogrammation génétique ordonnée par des oncogènes [166]. En effet, il a été mis en évidence l'implication de plusieurs oncogènes dans la reprogrammation du métabolisme des cellules cancéreuses, notamment les oncogènes *AKT*, *mTOR*, *PI3K*, *Ras* et *c-myc*. La plupart des cellules tumorales mutées pour ces oncogènes, développent un flux glycolytique important [58, 221, 102, 256, 198].

### 2.2.1 *c-myc*, un acteur clé dans le développement de l'effet Warburg

Dans le processus de transduction du signal stimulant la prolifération cellulaire, le facteur de transcription Myc se trouve en aval [166]. Ce dernier coordonne et régule l'expression d'un nombre très important de gènes impliqués notamment dans la régulation du cycle cellulaire, de la synthèse protéique et du métabolisme énergétique et intermédiaire [77, 165]. En raison de son emplacement dans la cascade de déclenchement du processus de la prolifération, *c-myc* peut se trouver continuellement exprimé, dans un grand nombre de cancer [166]. En effet, une surexpression *c-myc* a été associée au développement de plus de 40 % des cancers chez l'homme [59].

Les recherches scientifiques récentes sur le rôle de *c-Myc* dans la régulation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses ont montré que *c-Myc* contrôle l'expression de nombreux gènes qui ont une relation directe avec le développement du phénotype de l'effet Warburg. Il a été montré que *c-Myc* peut stimuler l'expression des gènes de la glycolyse (l'Hexokinase 2, Phospho-Fructo-Kinase et l'énolase 1), du transport du glucose (GLUT1), du métabolisme fermentaire : la lactate déshydrogénase-A (LDH-A) ([146, 222]), contribuant ainsi à la mise en place des caractéristiques phénotypiques de l'effet Warburg. En effet, dans un modèle de cellules hépatiques de souris, il a été montré que la surexpression de *c-myc* induisait une augmentation importante du flux de la glycolyse, accompagnée d'une synthèse accrue d'acide lactique [239].

### 2.2.2 Le complexe HIF-1, une relation étroite avec le phénotype de l'effet Warburg

Le complexe HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor*), est un facteur de transcription qui coordonne la réponse cellulaire à une carence en oxygène (hypoxie) [98, 27, 220]. Le

complexe HIF-1 est composé de deux sous-unités : une sous-unité régulatrice HIF-1 $\alpha$  et une sous-unité constitutive HIF-1  $\beta$  [118, 245].

En normoxie, la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est hydroxylée par une prolyl-hydroxylases (PHD). Cette hydroxylation favorise l'association de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  avec l'onco-suppresseur VHL (von Hippel-Lindau), ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, la PHD est inhibée, entraînant la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  [138, 31, 154, 168]. La sous-unité  $\alpha$  ainsi stabilisée va permettre la formation du complexe HIF-1 qui par la suite stimulera l'expression des gènes impliqués dans la survie en hypoxie, en particulier, les gènes codant pour les transporteurs de glucose (GLUT1-3), les enzymes glycolytiques y compris l'hexokinase 2 (HK2) et la lactate déshydrogénase A [131, 160, 193, 246]. HIF-1 inhibe également la respiration mitochondriale via l'inhibition du cycle de Krebs. En effet, HIF-1 stimule l'expression de la pyruvate déshydrogénase kinase (PDHK). Cette dernière régule avec la pyruvate déshydrogénase phosphatase (PDHP) l'activité du complexe pyruvate déshydrogénase (PDH). La PDHK phosphoryle et inactive la PDH et la PDHP déphosphoryle et active la PDH. L'expression importante de la PDHK favorise la phosphorylation et l'inactivation de la PDH, empêchant ainsi la conversion du pyruvate en acétyl-CoA [193].

La réponse cellulaire à l'hypoxie via le complexe HIF-1 [27, 98, 220] est sensiblement semblable à l'effet Warburg. Elle est caractérisée par une augmentation concomitante du flux de la glycolyse et de production de lactate, ainsi qu'une diminution du flux respiratoire mitochondrial [131, 160, 193, 246]. Toutefois, la réponse cellulaire à l'hypoxie médiée par HIF-1 ne devrait pas induire une stimulation de la prolifération, au contraire, elle est sensée être associée à l'arrêt de la prolifération cellulaire [130]. En effet, dans les cellules "normales", il a été rapporté que HIF-1 peut contrer l'activité de c-Myc par plusieurs mécanismes. Par exemple, il a été montré que HIF-1 peut lier c-Myc et inhibe l'activité de facteur de transcription de c-Myc, tout en activant un antagoniste de c-Myc, Mxi-1, contribuant ainsi à l'arrêt du cycle cellulaire [49, 97, 137].

Cependant, dans les cellules tumorales, cet effet répressif de HIF-1 sur la protéine c-Myc semble perdu quand cette dernière est mutée [130]. En effet, des études récentes ont montré que contrairement aux cellules "normales", le complexe HIF-1 et c-Myc

coopèrent ensembles pour réguler le métabolisme énergétique des cellules tumorales [130]. Il a été montré que c-Myc mutée peut induire la stabilisation de la sous-unité  $\alpha$  de HIF-1 en normoxie. Dans une lignée cellulaire de lymphome de Burkitt il a été trouvé que, c-Myc coopère avec HIF-1 pour inhiber la respiration mitochondriale en normoxie, contribuant ainsi au développement de l'effet Warburg [130].





### *Le projet de thèse :*

#### *Étude de l'effet Warburg, à l'origine du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae**

#### **3.1** L'effet Warburg, un seul phénotype, mais plusieurs contextes de mise en place

Au cours de ces deux dernières décennies, l'étude de l'effet Warburg a été le sujet d'un grand nombre de projets de recherche. Nombreux sont les résultats qui suggèrent une relation évidente entre le développement du phénotype de l'effet Warburg et la capacité à proliférer rapidement [5, 175, 37, 95]. Cependant, malgré le nombre conséquent de données cumulées sur les mécanismes impliqués dans la mise en place de l'effet Warburg, il est toujours impossible de déterminer le lien physiologique entre le développement de l'effet Warburg et l'augmentation de la vitesse de prolifération.

En effet, dans la littérature, les avis sur l'intérêt physiologique des cellules tumorales

à développer l'effet Warburg sont très partagés. Les mécanismes métaboliques et moléculaires responsables de sa mise en place se révèlent très hétérogènes chez les cellules cancéreuses, suggérant ainsi plusieurs contextes au développement de l'effet Warburg.

### **3.1.1 Effet Warburg, une adaptation métabolique pour répondre aux exigences du métabolisme prolifératif**

Chez la levure (*S. cerevisiae*) et certains types de cancer, il a été montré que les cellules, dans des conditions de prolifération rapide répriment le métabolisme oxydatif et fermentent le glucose en aérobiose. En effet, chez ces types cellulaires, le compartiment mitochondrial est intact et peut assurer sa fonction de synthèse d'ATP à partir des oxydations phosphorylantes, toutefois son activité se trouve diminuée dans les cellules. Dans des lignées de cellules tumorales présentant un effet Warburg, il a été montré que la répression du métabolisme fermentaire (délétion de LDH-A), permettrait une augmentation du flux respiratoire couplée à une diminution de la vitesse de prolifération [83], suggérant ainsi une corrélation entre la capacité à proliférer rapidement et le développement de l'effet Warburg.

Les études cinétiques menées sur les différentes enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique des cellules en prolifération, ont révélé que la glycolyse n'est plus régulée de la même façon que dans des cellules différenciées. Plusieurs modifications quantitatives et qualitatives ont été mises en évidence, principalement au niveau des enzymes qui catalysent les étapes clés dans la régulation du flux glycolytique (hexokinase, PFK et pyruvate kinase). [241, 156, 50, 48]. Dans une lignée cellulaire d'hépatome de rat AS-30D, il a été montré que les deux enzymes clés de la glycolyse : l'hexokinase II et la PFK sont largement surexprimées par rapport à une lignée d'hépatocytes normales [156, 179, 196]. De plus, il a été montré que, certaines isoformes d'enzymes de la glycolyse (PKM2), sont spécifiquement exprimées dans ces cellules, contrairement aux cellules différenciées [241, 50, 48].

#### **☞ La phosphofructokinase (PFK)**

Dans les cellules différenciées, la Phosphofructokinase 1 (PFK1) est l'enzyme la plus régulée de la glycolyse, son activité est étroitement liée aux besoins de la cellule en

ATP et en intermédiaires métaboliques [170]. Avec l'hexokinase, la PFK1 détermine en grande partie le flux glycolytique [156].

Dans des cellules différenciées non proliférantes, l'activité de la PFK1 est déterminée en grande partie par le niveau de disponibilité de l'ATP (déterminé par le rapport ATP/ADP), la concentration du citrate et le F2,6bP (voir **chapitre 1**). L'inhibition de la PFK par l'ATP et le citrate est réalisée de façon "séquentielle" de sorte que l'augmentation de la concentration de l'ATP et donc le rapport ATP/ADP induit le ralentissement du système des OXPHOS, ainsi que le cycle de Krebs au niveau de l'isocitrate déshydrogénase, ce qui induit une accumulation du citrate. La concentration du citrate ainsi augmentée va ralentir d'avantage le flux de la glycolyse à travers l'inhibition de la PFK.

Chez les mammifères, la PFK existe sous trois isoformes (C, L et M) chacune possédant des propriétés cinétiques distinctes. L'isoforme M est la plus sensible au F2,6BP, et est exprimé spécifiquement dans le muscle squelettique. L'isoforme C est principalement exprimé dans les plaquettes, Tandis que l'isoforme L est la moins sensible à l'inhibition par le citrate et se trouve principalement dans les hépatocytes et les cellules rénales [170].

Il a été montré que les cellules cancéreuses mutées pour les oncogènes AKT, mTOR, PI3K, Ras et c-myc peuvent bypasser ce point de contrôle du flux de la glycolyse, grâce à l'expression d'une autre isoforme de la PFK1 possédant des propriétés cinétiques différentes, moins sensible à l'inhibition par le citrate et l'ATP, mais plus sensible à l'activation par le F2,6bP. Ceci joue en faveur d'une assimilation plus importante de la source de carbone à travers la glycolyse.

En effet, il a été montré que les isoformes de PFK1 exprimées dans les cellules cancéreuses n'exercent aucun contrôle significatif sur le flux de la glycolyse et sont préférentiellement celles pour lesquelles la sensibilité au citrate est faible (essentiellement isoforme L) [225].

### ☞ *La pyruvate Kinase*

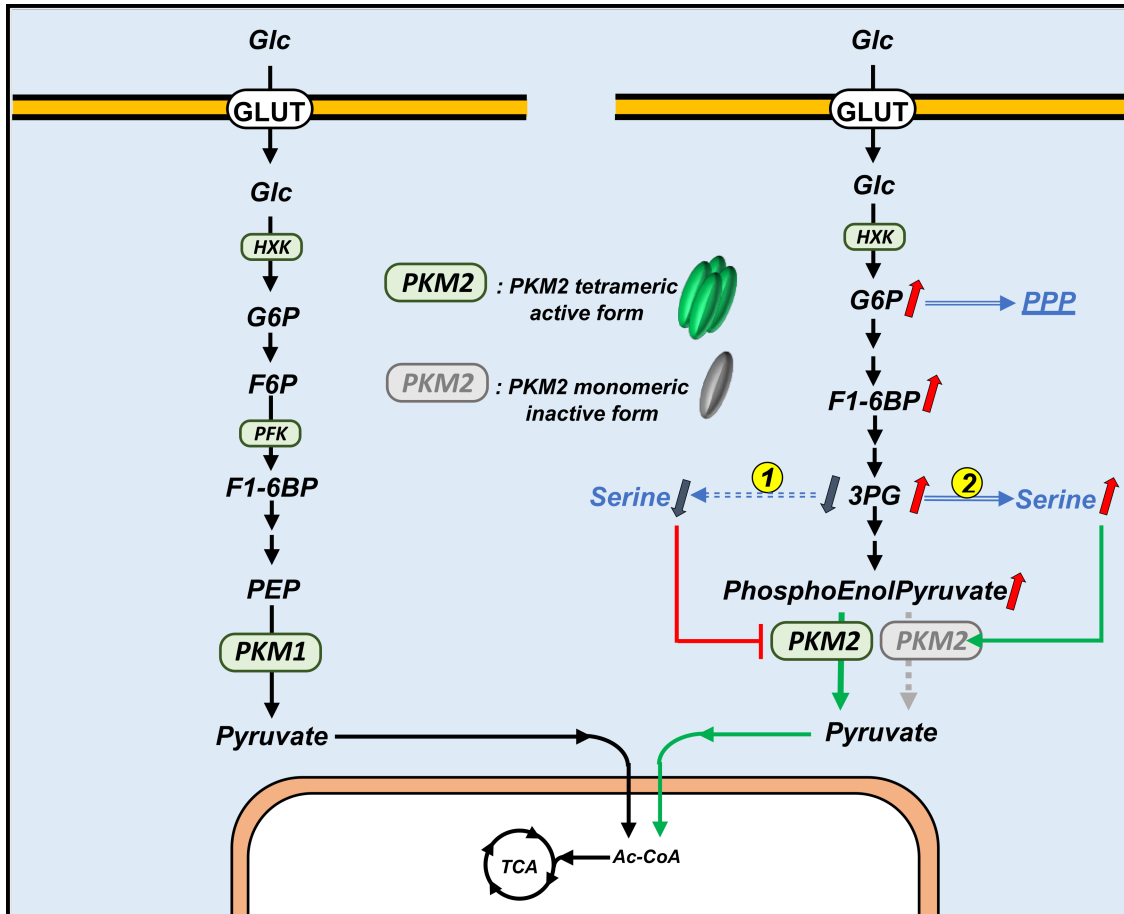
La pyruvate kinase (PK) catalyse la dernière étape de la glycolyse, qui aboutit à la formation du pyruvate à partir du PEP. PKM1 et PKM2 sont deux isoformes de la pyruvate

kinase possédant des propriétés catalytiques très différentes. PKM1 est caractérisée par une activité catalytique élevée, Tandis que PKM2 possède une activité catalytique modérée. Contrairement à PKM1 qui est toujours active, PKM2 peut se trouver sous deux formes : une forme monomérique (inactive) et une forme tétramérique (active) (**Figure 3.1**). Le passage d'une forme à l'autre est contrôlé par une phosphotyrosine kinase [48, 116]. Cette isoforme de PK est exprimée spécifiquement dans les cellules à activité anabolique importante (cellules en prolifération) [116, 48], tandis que dans les cellules différenciées, seul l'isoforme 1 qui est exprimée. Il a été montré que les cellules cancéreuses exprimant seulement PKM1 présentent un défaut de prolifération [48, 5].

En effet, PKM2 peut fonctionner comme une « vanne ». En fonction des besoins de la cellule, PKM2 peut soit (sous sa forme active) favoriser la synthèse d'ATP et le citrate en accélérant la conversion du PEP en pyruvate, soit (sous sa forme inactive) favoriser l'accumulation des intermédiaires de la glycolyse, notamment le G6P pour la voie des pentoses phosphates, la DHAP pour la synthèse du glycérol et le 3Gly-P pour la synthèse de la sérine [5, 140].

De plus, il a été montré que PKM2 est sensible à la concentration cytosolique du F1,6bP et de la sérine de sorte que l'accumulation de la sérine et/ou F1,6bP stimule l'activité de PKM2 [44, 106] afin de favoriser le flux glycolytique, alors que la diminution de la sérine et/ou le F1,6bP inhibe la PKM2 favorisant ainsi l'accumulation des intermédiaires qui seront utilisés dans les voies de biosynthèse (**Figure 3.1**).

Dans les cellules en prolifération, l'expression de l'isoforme PKM2 semble donc nécessaire pour soutenir la prolifération cellulaire [50, 48]. Il a été montré qu'une activation permanente de PKM2 peut altérer l'équilibre de répartition du substrat entre les voies cataboliques et les voies anaboliques. En effet, il a été montré que le traitement « *in vitro* » et « *in vivo* » des cellules en prolifération par des activateurs de PKM2 induit une diminution importante de la sérine et du ribose 5-phosphate [5].



**Figure 3.1 – Mécanismes de régulation des isoformes de la pyruvate kinase.** PKM1 a une activité catalytique constitutivement élevée. L'activité de PKM2 est soumise à une régulation allostérique. PKM1 est constitutivement actif car il forme un tétramère stable, tandis que PKM2 peut exister soit en tant que tétramère actif soit en tant que monomère inactif. Lorsque la sérine est abondante, PKM2 est pleinement active permettant l'utilisation maximale du glucose par la glycolyse. Lorsque le niveau de sérine baisse, il se produit une atténuation de l'activité de PKM2 qui redirige les carbones dérivés du glucose dans la voie de biosynthèse de la sérine.

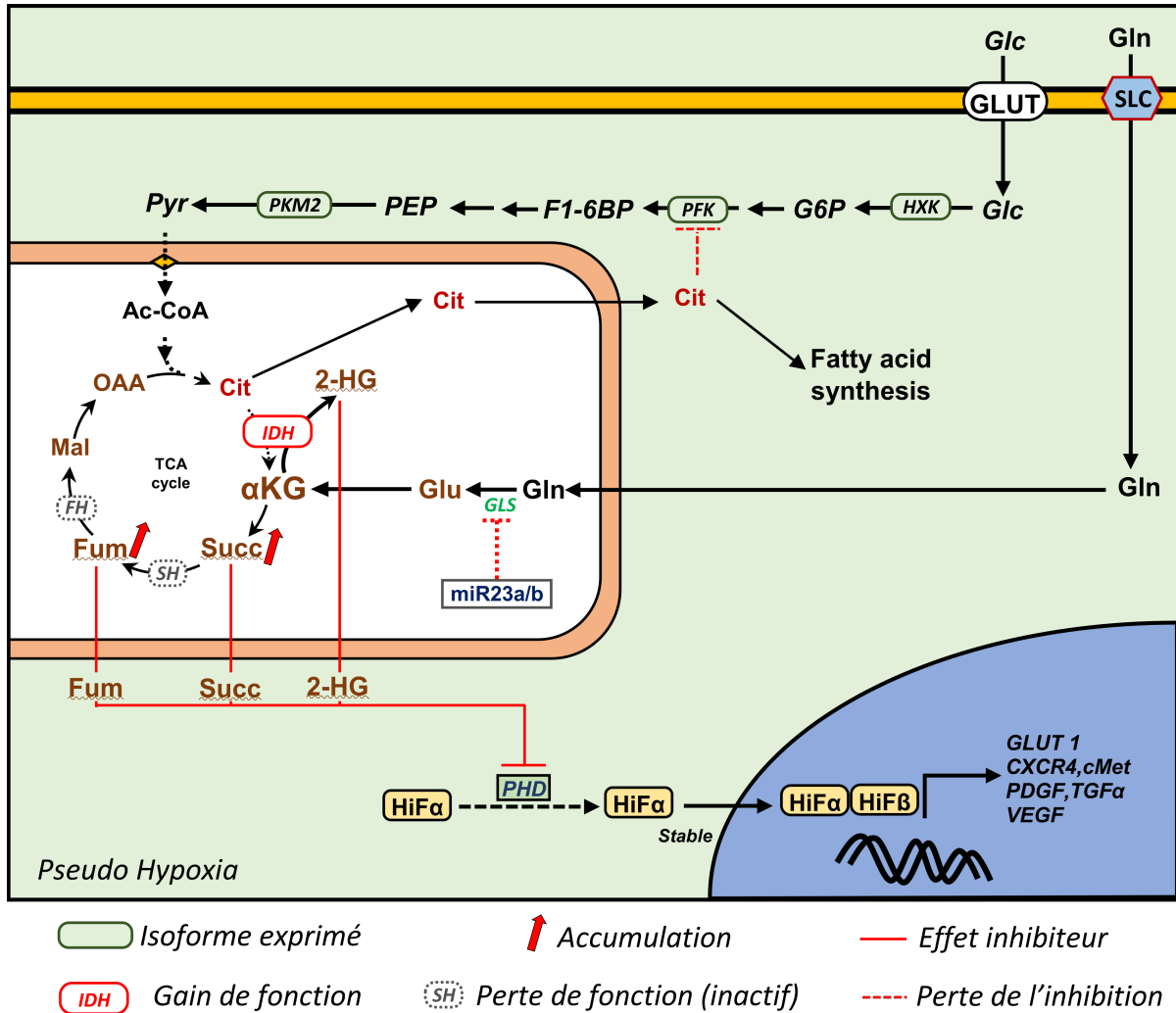
### 3.1.2 Effet Warburg, une conséquence d'une altération enzymatique mitochondriale

Bien que les études récentes sur le métabolisme tumoral, aient montré que l'hypothèse d'Otto Warburg qui suggère qu'une altération des fonctions mitochondriales est la cause fondamentale du cancer n'est pas valide pour tous les cancers, cette dernière reste valide pour certains types de cancer. En effet, il a été mis en évidence des altérations majeures au niveau des enzymes du cycle de Krebs ayant une relation directe avec la transformation oncogénique, surtout avec le développement du phénotype de l'effet Warburg.

Dans les mitochondries, l' $\alpha$ -cétoglutarate est formé de l'oxydation de l'isocitrate par l'isocitrate déshydrogénase (IDH) dans le cycle de Krebs, et à partir du glutamate par la glutamate déshydrogénase. La famille des enzymes prolyl-hydroxylases (PHD) responsable de l'induction de la dégradation de la sous unité HIF-1 $\alpha$  sont  $\alpha$ -cétoglutarate dépendantes [258]. L'accumulation de l' $\alpha$ -cétoglutarate dans la matrice mitochondriale en hypoxie induit l'inhibition des PHDs. Dans le cycle de Krebs, en normoxie, l' $\alpha$ -cétoglutarate est converti en succinate puis en fumarate par l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase et la succinate déshydrogénase respectivement. Chez de nombreux types de cancer (paragangliomes, tumeurs stromales gastriques, leucémies aiguës des lymphocytes T, léiomyomatose utérine, cavernomes cérébraux, cancer du sein, etc.) il a été mis en évidence une relation entre le développement du phénotype de l'effet Warburg et l'altération (perte de fonction) des enzymes catalysant la conversion de l' $\alpha$ -cétoglutarate en malate (succinate déshydrogénase et fumarate hydratase) [14, 15, 236]. En effet, le succinate et le fumarate sont des analogues structuraux de l' $\alpha$ -cétoglutarate et il a été montré que ces deux intermédiaires du cycle de Krebs peuvent inhiber la PHD [132, 119], conduisant ainsi à la stabilisation de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  et le déclenchement de la glycolyse aérobie en aérobiose (**Figure 3.2**) .

De plus, dans certains types de cancer (leucémies aiguës myéloïdes, chondrosarcome) il a été mis en évidence des altérations majeures au niveau de l'IDH (gain de fonction) [85, 3]. En effet, il a été montré que l'IDH des cellules tumorales est capable de produire un nouveau métabolite : le 2-hydroxyglutarate (2-HG) à partir de l' $\alpha$ -cétoglutarate [60]. Le 2-hydroxyglutarate est aussi un analogue structural de l' $\alpha$ -cétoglutarate capable de

provoquer le développement de la glycolyse aérobie de la même manière que le succinate et le fumarate (Figure 3.2) [259, 263].



**Figure 3.2 – Mécanisme de l'induction du signal de réponse à l'hypoxie par les intermédiaires du cycle de Krebs (succinate, fumarate) et le 2-Hydroxyglutarate (2-HG).** La majorité des changements dans l'expression des gènes observés en réponse à l'hypoxie sont dus au complexe HIF-1. La dégradation rapide de la sous-unité HIF-1 $\alpha$  est diminuée par l'inhibition compétitive des enzymes prolyl hydroxylases (PHD) dépendantes de l'oxygène par le succinate, fumarate et 2-HG. L'accumulation de ces métabolites est due à une mutation de perte de fonction de la fumarate hydratase et la succinate déshydrogénase et une mutation de gain de fonction de l'isocitrate déshydrogénase. L'inhibition des PHDs conduit à la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  par une diminution de son taux d'hydroxylation et induit par conséquent la majorité des changements d'expression génique observés en réponse à l'hypoxie. Ceci permet une réponse cellulaire "hypoxique" même en présence d'oxygène.



### 3.1.3 Effet Warburg, une adaptation métabolique à un micro-environnement

Dans les conditions *in-vivo*, les cellules tumorales se trouvent le plus souvent dans une masse tissulaire (tumorale) où la disponibilité de nutriments et d'oxygène n'est pas homogène et fait l'objet de variations permanentes [159, 99, 96]. En effet, des études sur le métabolisme tumoral suggèrent que dans certaines situations, la glycolyse aérobie n'est qu'une adaptation à une carence temporaire ou permanente en oxygène du micro-environnement [265, 96]. Il a été démontré que dans un même type de cancer, les cellules peuvent se trouver sous deux configurations dépendantes du micro-environnement : une qui se base sur la glycolyse aérobie, et une autre qui se base principalement le métabolisme oxydatif pour se maintenir et proliférer [96].

## 3.2 Origine de l'hétérogénéité des mécanismes d'induction de l'effet Warburg

Le phénotype de l'effet Warburg est un phénomène qui touche directement le métabolisme énergétique cellulaire. Ce dernier est régulé et influencé par un ensemble de paramètres cinétiques, génétiques et environnementaux. Avec le développement des outils moléculaires et biochimiques, il a été montré qu'une cellule cancéreuse est unique à la fois par son profil génétique et par son environnement. En effet, l'hétérogénéité des résultats sur les mécanismes impliqués dans la mise en place de l'effet Warburg chez les cellules cancéreuses est en grande partie due à l'hétérogénéité du modèle d'étude lui-même.

L'hétérogénéité du modèle des cellules tumorales est due à plusieurs facteurs, parmi les plus "pertinents" on peut citer :

### 3.2.1 Hétérogénéité des mécanismes de la transformation maligne

Le processus de la transformation maligne est unique pour chaque cellule. Dans le processus de l'oncogenèse, les cellules accumulent un ensemble de mutations génétiques au niveau des gènes régulant le devenir de la cellule (différentiation, croissance ou

prolifération), certaines cellules présentent des mutations au niveau de *AKT* et *Ras*, certaines d'autres au niveau de *c-myc*, tandis que d'autres cumulent *AKT* et HIF-1. Le profil oncogénique joue un rôle important dans le phénotype cancéreux de la cellule cancéreuse, en particulier au niveau du métabolisme. À titre d'exemple, il a été montré que l'oncogène *c-Myc* peut dans certaines conditions inhiber la biogenèse mitochondriale [130], tandis que dans d'autres types cellulaires tumoraux, *c-Myc* peut exercer l'effet contraire et stimule la biogenèse mitochondriale [96].

### **3.2.2 Variations permanentes dans les conditions du micro-environnement (disponibilité de l'oxygène et nutriments)**

Contrairement aux conditions standards de croissance *in-vitro*, en *in-vivo*, dans le microenvironnement d'une tumeur, les cellules cancéreuses font face à des situations de variations de disponibilité de nutriments et d'oxygène [159, 99, 96]. Ces situations peuvent être transitoires ou permanentes, plus ou moins courtes ou longues. En fonction de la situation, les effets de ces variations sur le métabolisme énergétique et intermédiaire de la cellule cancéreuse sont très différents. Ils peuvent être une simple régulation allostérique ou post-traductionnelle pour une situation courte, une régulation transcriptionnelle pour une situation plus ou moins longue, ou même par un réarrangement génétique pour une situation permanente. La variabilité permanente et anarchique du micro-environnement peut affecter significativement le profil génétique de la cellule survivante, ce qui contribue au développement d'un profil génétique unique à chaque cellule cancéreuse [87]. En effet, il a été montré que les conditions du micro-environnement déterminent en grande partie le comportement de la cellule cancéreuse, notamment le métabolisme énergétique [224], dans une même masse tumorale on peut trouver des profils métaboliques différents [228, 87].

### **3.2.3 Hétérogénéité cellulaire dans la tumeur**

Le concept de l'hétérogénéité cellulaire, provient du fait qu'une masse tumorale est composée d'un ensemble très hétérogène de cellules comprenant des cellules cancéreuses avec des profils génétiques différents [159] et des cellules normales telle que les fibro-

blastés associés au cancer (CAF), des macrophages, des lymphocytes, etc [87]. Au sein d'une tumeur, ces cellules vivent le plus souvent en coopération et participent toutes au développement du phénotype de la tumeur [228, 87].

### 3.2.4 Effet de la culture cellulaire « *in-vitro* »

En comparaison avec l'environnement naturel dans lequel une cellule cancéreuse évolue « *in-vivo* », l'environnement d'une culture « *in-vitro* » est très différent, surtout en ce qui concerne les conditions trophiques et d'oxygénation. Dans le cadre d'une étude sur l'effet Warburg, de telles différences environnementales sont susceptibles d'affecter significativement le métabolisme énergétique cellulaire [101], et conduire à des interprétations fausses [122]. Dans une lignée cellulaire d'astrocytes normaux, il a été montré que l'environnement de croissance *in-vitro*, peut provoquer des altérations dans le métabolisme lipidique et des modulations notoires dans l'activité de la chaîne respiratoire très semblables à celles observées dans des astrocytes tumoraux, contribuant ainsi à une dépendance à la glycolyse pour la production d'ATP [129].

## 3.3 L'effet Warburg, procure-il à la cellule cancéreuse l'avantage de se proliférer plus rapidement ?

Bien que l'effet Warburg peut être développé par des lignées de cellules tumorales dans d'autres contextes (altération mitochondriale, adaptation environnementale), aujourd'hui, la corrélation entre le développement de l'effet Warburg et l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire semble évidente. En effet, la tendance des cellules (levures, certains types de cancer) à restaurer le métabolisme oxydatif après la répression du métabolisme fermentaire, suggère que les adaptations métaboliques caractéristiques de l'effet Warburg sont en grande partie une réponse cellulaire à un besoin spécifique des cellules en prolifération.

Nous avons vu dans l'introduction, que le métabolisme énergétique est au centre des adaptations métaboliques qui sont en relation directe avec le phénotype de l'effet Warburg. Toutes les cellules en prolifération qui développent la glycolyse aérobie présentent

des modulations importantes du métabolisme énergétique. Cependant, nous n'avons pas assez d'informations sur la cinétique d'évolution de ce dernier au cours de la première phase d'induction de la glycolyse aérobie (effet Warburg).

L'acceptation de l'idée que l'effet Warburg est le résultat d'une succession d'adaptations métaboliques et moléculaires en réponse à un signal stimulant la prolifération cellulaire, nous conduit à soulever la question suivante :

*Quelle est la cinétique de mise en place de l'effet Warburg dans le temps, à partir du signal stimulant la prolifération, jusqu'à l'arrivée à l'état de prolifération rapide ?*

Le phénotype de l'effet Warburg regroupe un ensemble de modulations du métabolisme énergétique des cellules qui sont :

- Une consommation importante de glucose ;
- La fermentation du glucose en lactate/éthanol en aérobiose ;
- La répression du métabolisme respiratoire.

Dans le métabolisme prolifératif, si l'augmentation du flux de consommation de substrat semble logique, dans la mesure où les cellules ont besoin d'un apport de source de carbone important, afin de pouvoir construire les macromolécules. La répression du métabolisme respiratoire et la fermentation du glucose en aérobiose quant à elles restent un phénomène métabolique mal compris pour les cellules en prolifération. Car, en termes de rendement énergétique, cela représente une perte d'énergie considérable pour une cellule avec une activité anabolique importante.

Une meilleure compréhension de la tendance des cellules à réprimer le métabolisme oxydatif en faveur du métabolisme fermentaire implique nécessairement une étude approfondie en « *in-vivo* » de la cinétique d'évolution du métabolisme énergétique avant, pendant et après le processus d'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire.

Cependant, la faisabilité de cette étude de la cinétique d'induction de l'effet Warburg chez les cellules cancéreuses est conditionnée par la disponibilité d'un modèle cellulaire ou on peut induire l'effet Warburg. À l'heure actuelle aucun modèle eucaryote mammifère ne permet l'induction de l'effet Warburg dans des conditions *in-vivo*. En effet, l'étude de la cinétique d'induction de l'effet Warburg chez un modèle mammifère dans des

conditions expérimentales qui respectent les conditions de l'environnement *in-vivo* des cellules est quasi impossible et cela pour un grand nombre de raisons (voir ci-dessus).

Un modèle eucaryote qui permet de réaliser une telle étude de la cinétique d'induction de l'effet Warburg au cours du temps est la levure Crabtree positive.

# *Le modèle levure pour étudier la cinétique d'induction de l'effet Warburg*

La levure *Saccharomyces cerevisiae* est un organisme eucaryote, unicellulaire, appartenant au règne des champignons. Aussi facile à manipuler qu'une bactérie, *S. cerevisiae* fait partie des modèles eucaryotes les plus étudiés et les plus utilisés dans les laboratoires [223, 125]. Grâce à ses propriétés physiologiques et métaboliques, *S. cerevisiae* est le modèle d'étude par excellence, pour étudier les grands principes de régulation du métabolisme énergétique chez les eucaryotes [182].

*S. cerevisiae* est une levure anaérobie facultative. En fonction de la disponibilité de l'oxygène, du type et le niveau d'abondance de la source de carbone, *S. cerevisiae* peut basculer entre trois types de métabolismes possibles : Métabolisme respiratoire ; Métabolisme fermentaire et Métabolisme mixte (respiro-fermentaire).

### ❶ Métabolisme respiratoire

Le métabolisme respiratoire correspond à l'oxydation du substrat au niveau des mitochondries en présence de l'oxygène. Cette voie est la seule utilisée lorsque les cellules se développent sur substrat non fermentescible. Dans le cas du glucose, l'utilisation de la respiration mitochondriale comme principale voie de synthèse d'ATP n'est possible que pour de faibles concentrations en glucose. Tout comme chez le mammifère, le pyruvate est transporté vers la matrice mitochondriale puis converti en acétyl-CoA. Ce

dernier sera oxydé dans le cycle de Krebs, afin de fournir les équivalents réducteurs (NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>), qui seront utilisés par le système des OXPHOS pour la synthèse de molécules d'ATP. En fonction du substrat carboné, l'origine du pyruvate est différente. Il peut provenir de la glycolyse, dans le cas d'une utilisation du glucose, du fructose ou du galactose comme source de carbone, ou bien par des réactions enzymatiques particulières en niveau du cytosol, dans le cas d'une utilisation du lactate ou de l'éthanol comme source de carbone.

Pour *S. cerevisiae*, la particularité du lactate, est que ce dernier est un substrat dit purement respiratoire. En présence de lactate comme seule source de carbone dans le milieu de culture, la disponibilité de l'oxygène est nécessaire pour pouvoir métaboliser le lactate. En effet, dans *S. cerevisiae*, le lactate est converti en pyruvate dans l'espace intermembranaire mitochondrial grâce à deux lactate déshydrogénases, liées à la face externe de la membrane interne mitochondriale : la première est la flavocytochrome-b2 (Cyb2) qui catalyse l'oxydation de l'isomère L-lactate, tandis que la deuxième est la D-lactate cytochrome c oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'isomère D-lactate.

La réaction de l'oxydation du lactate par ces deux déshydrogénases est irréversible et est couplée à un transfert d'électrons. Pour chaque oxydation, deux électrons sont récupérés du lactate par la déshydrogénase et transférés au cytochrome c, qui à son tour transporte ces électrons vers le complexe IV, qui à son tour cède ses électrons à l'oxygène, l'accepteur final.

## ② Métabolisme fermentaire

Cette voie est utilisée quand l'apport en oxygène est insuffisant ou nul. Le processus de la fermentation chez *S. cerevisiae* est exactement le même que chez les mammifères, à l'exception que le produit final de la réduction du pyruvate n'est pas le lactate mais l'éthanol (voir **chapitre 1**).

## ③ Métabolisme mixte (respiro-fermentaire)

Le métabolisme respiro-fermentaire ou mixte correspond à l'utilisation concomitante des voies métaboliques : la fermentation et la respiration mitochondriale en présence

d'oxygène. Chez *S. cerevisiae*, la disponibilité du glucose dans l'environnement à une concentration élevée (plus de 5 g/l ou 30 mM) induit une déviation de son métabolisme énergétique principalement mitochondrial vers un métabolisme plus glycolytique, qui a pour effet la répression de la respiration mitochondriale et le déclenchement de la fermentation, malgré la présence d'oxygène ([53, 63, 84]. Dans la littérature, ce phénomène est connu sous le nom de la répression glucose [128, 39].

## 4.1 La répression glucose chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

La répression glucose chez la levure est un phénomène qui a été mis en évidence avant l'effet Warburg. À cette époque, on parlait plus d'une capacité de certaines levures à utiliser à la fois les OXPHOS et la fermentation en aérobiose, pour métaboliser les hydrates de carbone [53], que d'une répression glucose.

Après la mise en évidence de la glycolyse aérobie « i.e effet Warburg » chez les cellules cancéreuses par Mr. Otto Warburg (1923- 1927), Mr H.G Crabtree a publié en 1928, un papier intitulé « *The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths* », dans lequel il a défini l'effet Warburg comme un phénotype déjà existant chez certains types de levures [53]. Dans ce papier Crabtree a aussi montré que l'effet Warburg n'est pas exclusif aux cellules cancéreuses, mais que d'autres cellules issues de tumeurs bénignes présentent aussi ce phénotype de l'effet Warburg.

Depuis, l'effet Warburg et la répression glucose ont fait l'objet de nombreuses études très approfondies, les données expérimentales cumulées sur les mécanismes d'induction de ces deux phénomènes montrent que la glycolyse aérobie chez la cellule cancéreuse et la répression glucose chez la levure sont deux appellations d'un même phénomène biologique [71].

Quelle que soit l'appellation (effet Warburg, glycolyse aérobie, répression catabolique) ou le type cellulaire (levure, mammifère), dans toutes les cellules où l'on a caractérisé une fermentation du glucose en présence d'oxygène, les caractéristiques métaboliques et phénotypiques citées ci-dessous ont été toujours observées :



- Une consommation accrue du glucose ;
- Un flux glycolytique important ;
- La fermentation du pyruvate en présence d'oxygène ;
- Une augmentation dans la vitesse de prolifération.

En ce qui concerne la régulation du métabolisme énergétique et intermédiaire lors de l'effet Warburg, il semble évident que toutes les cellules en prolifération partagent des principes communs de régulation du métabolisme énergétique et intermédiaire [70, 171, 80], c'est-à-dire une stimulation de l'apport de glucose par l'expression des transporteurs de glucose à faible affinité, stimulation de la glycolyse et activation des voies de biosynthèse des lipides, des acides aminés, des nucléotides, etc.

Entre la levure *S. cerevisiae* et la cellule mammifère, les principes de régulation allostérique et thermodynamique de la glycolyse et du système des OXPHOS sont très conservés. Ainsi, tout changement du flux glycolytique implique des modifications qualitatives et quantitatives aux niveaux des points de contrôle cinétique de la glycolyse (hexokinase, PFK et pyruvate kinase).

Chez *S. cerevisiae*, lors la glycolyse aérobie, il a été montré que la plupart des enzymes de la glycolyse sont surexprimées [80, 233]. Ainsi, certaines isoformes d'enzymes qui catalysent les étapes contrôlantes du flux de la glycolyse sont spécifiquement exprimés dans ces conditions. Par exemple, pendant la croissance sur glucose, l'hexokinase II (homologue de la glucokinase qui est surexprimée dans les cellules tumorales et la seule isoforme qui n'est pas rétroinhibée par le G6P) est la principale hexokinase exprimée [112, 177, 2]. D'autre part, il a été montré que la disponibilité du glucose dans l'environnement induit la répression de l'expression de l'isoforme Pyk2 de la pyruvate kinase et l'activation de l'expression d'une autre isoforme : Pyk1 [24]. La particularité de l'isoforme Pyk1 est que son activité est régulée par la concentration du F1,6bP, une concentration élevée de F1,6BP induit l'activation de la Pyk1 [114, 123]. Chez la levure, il a été montré que lors de la croissance sur glucose, le F1,6bP a tendance à s'accumuler dans le cytosol [47], ce qui suggère un contrôle du flux la glycolyse via cet intermédiaire à travers la régulation de l'activité de la pyruvate kinase (Pyk1).

Comme la PKM2 chez les cellules cancéreuses, l'isoforme Pyk1 de levure a été proposée comme acteur principal dans le maintien de l'homéostasie entre les voies cataboliques et les voies de biosynthèse, lors de la croissance sur glucose comme source carbonée [195, 21]. De plus, la synthèse des acides aminés et des protéines (ribosomes) est nécessaire pour soutenir la prolifération [21]. Il a été montré que l'activité et le niveau d'expression de Pyk1, par l'intermédiaire des métabolites exercent un effet régulateur sur l'expression de nombreux gènes impliqués dans la glycolyse (glycérol-3 -phosphatase déshydrogénase, phosphoglycérate mutase et énoïase2), dans la biogenèse (ribosomes) et dans la biosynthèse des acides aminés [21].

En ce qui concerne la PFK, cette dernière ne semble pas subir des modifications significatives au niveau de son expression, lors de la prolifération sur glucose [111]. Cependant, elle est très active au cours la glycolyse aérobie, en raison de l'augmentation du flux de la glycolyse en amont et l'accumulation de son activateur allostérique F2,6bP [203]. Cependant, une étude plus récente a montré que l'effet activateur du F2,6bP sur la PFK est significatif seulement lors de la transition métabolique (déclenchement du métabolisme fermentaire) [23]. Une fois que les cellules prolifèrent sur glucose, l'effet allostérique du F2,6bP sur la PFK est non significatif [142].

## 4.2 Mécanisme de la répression glucose chez *S. cerevisiae*

Chez la levure *S. cerevisiae*, le glucose est la source de carbone préférentielle [238]. Quand le glucose est abondant, les gènes codant pour les enzymes requises à l'utilisation des autres sources de carbone alternatives sont réprimés. Ce phénomène est connu sous le nom « répression catabolique » [238].

Les régulations métaboliques induites par le glucose dans *S. cerevisiae* se manifestent à plusieurs niveaux : régulations allostériques, transcriptionnelles, post-transcriptionnelles et post-traductionnelles [238, 39].

L'effet du glucose sur l'expression génique se traduit par deux actions différentes. Le premier est un effet d'activation, qui va concerner les gènes qui codent pour les enzymes de la glycolyse, les transporteurs du glucose ainsi que d'autres protéines essentielles

pour la biosynthèse (ribosomes, etc.) [238, 39, 121]. Tandis que le deuxième est un effet de répression, qui va concerner principalement les gènes qui codent pour les enzymes impliquées dans l'utilisation des autres substrats sources de carbone, les enzymes du cycle de Krebs, les enzymes de la néoglucogenèse, les complexes de la chaîne respiratoire etc. [238, 39, 121, 121].

La répression glucose induit deux voies de signalisation principales :

#### 4.2.1 La voie de signalisation Snf3/Rgt2

La voie Snf3/Rgt2 est une cascade de signalisation chez la levure, impliquée dans la répression glucose. La détection du glucose est assurée par deux protéines transmembranaires appartenant à la famille des transporteurs d'hexoses : Snf3 et Rgt2. [124, 39] Ces deux protéines ont la particularité de pouvoir déterminer le niveau de disponibilité du glucose dans l'environnement, Snf3 détecte les concentrations faibles du glucose, alors que Rgt2 détecte les concentrations élevées du glucose [189, 190]. Snf3 et Rgt2 sont aussi capables de déterminer le rapport entre la concentration du glucose extra et intracellulaire [126]. Grâce à cette fonction de « sensor » de glucose de Snf3 et Rgt2, la levure peut coordonner et réguler l'expression (répression, activation) des gènes impliqués dans le métabolisme énergétique en fonction de la concentration du glucose disponible dans son environnement [238].

La disponibilité du glucose à une concentration élevée (30mM) induit l'activation de Rgt2, et engendrent par conséquent un signal (dont le mécanisme n'est pas encore déterminé) qui inhibe le facteur de répression Rgt1 [128]. L'inhibition de Rgt1 va lever la répression sur les gènes codant pour les transporteurs de glucose à faible affinité (HXT1 et HXT3), le facteur de transcription Mig2 et l'hexokinase II [192, 64]. La protéine Mig2 exprimée migre vers le noyau pour inhiber l'expression du gène SUC2 qui code pour « Sucrose transport protein » [192, 152].

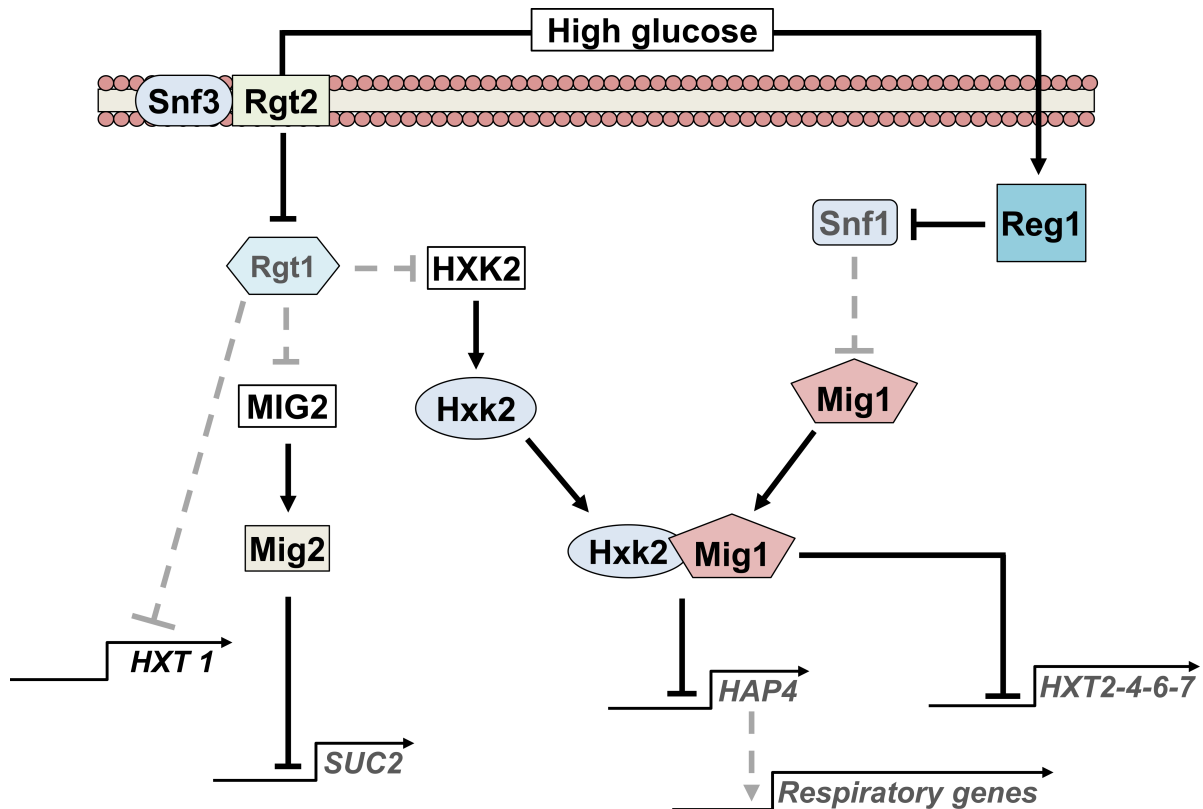
#### 4.2.2 La voie de signalisation Snf1

Chez les eucaryotes, la famille de protéines kinases Snf1/AMPK est fortement conservée [109, 57, 216]. Elle joue un rôle majeur dans l'homéostasie énergétique chez les mammifères, les plantes et les champignons [109]. Chez la levure, l'activité de Snf1 est directement liée à la disponibilité du glucose dans l'environnement [257, 254, 161], elle joue un rôle crucial dans la régulation de l'adaptation métabolique liée à la limitation du glucose et la croissance sur d'autres sources de carbone (saccharose, galactose, éthanol) [238, 92, 40].

Quand la concentration du glucose est faible dans l'environnement cellulaire, Snf1 est phosphorylée et activée par trois kinases en amont, Sak1, Elm1 et Tos3 [117, 232], Snf1 ainsi activée va phosphoryler et inactiver le facteur de répression Mig1. L'inactivation de Mig1 va permettre l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme des autres sources de carbone notamment les gènes de la respiration, de la néoglucogenèse, des transporteurs d'hexoses à haute affinité (HXT2-4-6-7). [238, 39, 121, 121].

Quand le glucose est abondant (30 mM), le complexe Snf1 kinase est inactivée par auto-inhibition suite à l'interaction entre son domaine catalytique N-terminal et son domaine régulateur C-terminal [128], Snf1 ainsi inactivé va permettre la déphosphorylation du facteur de répression Mig1. Ce dernier déphosphorylé, forme un complexe avec l'hexokinase II et migre vers le noyau [192, 64, 1]. Une fois au noyau, le complexe Mig1-HXK2 se lie aux promoteurs des gènes cibles de Mig1 et réprime leurs expressions. Parmi les gènes cibles du complexe Mig1-HXK2, on trouve principalement les gènes codant pour les protéines impliquées dans les réactions des oxydations phosphorylantes (OXPHOS), les transporteurs à haute affinité (HXT2, 4, 6, 7), les enzymes de la néoglucogenèse (**Figure 4.1**) [169, 238, 39, 121, 210].

Chez *S. cerevisiae* l'effet de répression par le glucose de la respiration mitochondriale est exercé principalement par la répression de la transcription de la sous-unité Hap4p [210].



**Figure 4.1 – Schéma simplifié du mécanisme de la répression glucose chez *S. cerevisiae*.** À une concentration élevée de glucose (30 mM), Rgt2 détecte la présence du glucose et inhibe Rgt1. L'inhibition de Rgt1 permet de lever de la répression sur les gènes qui codent pour le transporteur de glucose de faible affinité HXT1, le facteur de transcription Mig2 et l'hexokinase II. La protéine Mig2 exprimée migre vers le noyau pour inhiber le gène SUC2. D'autre part la détection d'une forte concentration de glucose induit l'auto-inhibition de Snf1 Kinase. L'inactivation de Snf1 permet la déphosphorylation de Mig1. Ce dernier forme un complexe avec l'hexokinase II, et migrent tous les deux vers le noyau. Une fois dans le noyau le complexe Mig1-Hxk2 se lie aux promoteurs des gènes cibles de Mig1 et réprime les gènes non nécessaires à la croissance sur glucose. Parmi les gènes les plus importants réprimés par le complexe Mig1-Hxk2, on a le gène HAP4, qui code pour la sous-unité régulatrice (Hap4p) du complexe HAP. Flèche noire continue : un signal d'activation. Ligne noire coupée : un signal de répression. Lignes gris discontinues : un signal supprimé suite à l'inhibition de la protéine/expression de la protéine en amont.

### 4.2.3 La sous-unité Hap4p et la répression glucose

La protéine Hap4p est une sous-unité qui fait partie du complexe de transcription HAP. Le complexe HAP est constitué de quatre sous-unités, Hap2p, Hap3p et Hap5p sont les sous-unités constitutives [185, 162], tandis que Hap4p est la sous-unité régulatrice du complexe [89]. Le complexe HAP est directement lié à la biogenèse mitochondriale, il s'agit du complexe transcriptionnel responsable de l'activation de l'expression de nombreux gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs, les enzymes de biosynthèse de la voie hémique et les enzymes de la chaîne respiratoire [201, 184, 65, 20, 34]. La présence du complexe HAP est nécessaire pour la prolifération en condition non fermentaire [174]. Les cellules dépourvues (délétion) des gènes codant pour les sous-unités du complexe HAP sont incapable de pousser sur des substrats non fermentescibles [61].

L'activation de la transcription des gènes cibles du complexe HAP se fait par la reconnaissance et la fixation sur la séquence consensus ACCAAT(T/C)NA appelée CCAAT box [184]. Les sous-unités Hap2p, Hap3p et Hap5p sont suffisantes pour la fixation à la CCAAT box ; en effet un mélange des trois protéines recombinantes purifiées permet la fixation à la CCAAT box *in-vitro* [162], mais Hap4p est nécessaire pour l'activation du complexe HAP [185].

Le gène HAP4 est le seul gène du complexe HAP dont l'expression est régulée par la source de carbone [89, 30, 68]. La présence d'un site de fixation de Mig1p dans son promoteur (répresseur transcriptionnel impliqué dans la répression par le glucose) suggère que la répression catabolique de HAP4 se fait via Mig1p [65, 13]



## *L'objectif du projet de thèse*

Dans ce travail de thèse je vais donc étudier chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la cinétique de mise en place de l'effet Warburg dans le temps, à partir du signal stimulant la prolifération, jusqu' à l'arrivée à l'état de prolifération rapide. Mon étude sera focalisée principalement sur l'évolution du métabolisme énergétique à partir de l'induction du signal stimulant la prolifération cellulaire (la disponibilité du glucose dans l'environnement).

Grâce à l'étude de la cinétique d'évolution du métabolisme énergétique des cellules lors de l'augmentation de la vitesse de prolifération, je vais être en mesure de :

- ✓ Déterminer dans quelle phase du processus d'augmentation de la vitesse de prolifération, les cellules développent le phénotype de l'effet Warburg ;
- ✓ Déterminer l'évolution de chaque paramètre métabolique au cours du temps (Le flux de l'apport du glucose, la respiration, le flux de fermentation de glucose) ;
- ✓ Établir, les corrélations entre l'évolution des différents paramètres du métabolisme énergétique au cours du temps ;
- ✓ Déterminer l'évolution de l'homéostasie énergétique des cellules avant, pendant et après l'augmentation de la vitesse de prolifération.





# 2

PARTIE

## MATÉRIELS ET MÉTHODES



## *Culture cellulaire et conditions de culture*

### 5.1 Matériels biologiques, conditions de croissance et milieux de cultures

#### 5.1.1 Souches de levures et de bactéries

Pour réaliser notre étude, j'ai utilisé trois souches différentes de levure *Saccharomyces cerevisiae* :

- Une souche **BY4742 (WT)** qui sera la souche sauvage et de référence ;
- Une souche mutante de **BY4742** qui a subi une délétion du gène *HXK2*, qui code pour l'hexokinase II.
- Une souche mutante de **BY4742** qui a subi une délétion du gène *HAP4*, qui code pour la protéine Hap4p, sous-unité régulatrice du complexe HAP impliqué dans la biogénèse mitochondriale.

Les caractéristiques de chaque souche de levure et de bactérie sont résumées dans le **tableau 5.1**.

L'utilisation de la souche **Euroscarf BY4742** de *S. cerevisiae* en particulier est motivée par la disposition de la banque de mutants de délétion dans notre laboratoire, ce qui nous permet de disposer rapidement de mutants d'intérêt nécessaires pour notre étude (délétion, insertion du gène).

J'ai utilisé la souche compétente **C41 (DE3)** d'*Escherichia. coli* comme cellule hôte pour toutes les procédures d'amplification de plasmides.

Tableau 5.1 – Souches de levures et de bactéries utilisées.

Levures			
Nom	Génotype	description	Source
BY4742 (WT)	<i>Mata</i> ; <i>his3</i> Δ1; <i>leu2</i> Δ0; <i>lys2</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0	Souche sauvage	EUROSCARF
Δ <i>hvk2</i>	<i>Mata</i> ; <i>his3</i> Δ1; <i>leu2</i> Δ0; <i>lys2</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0; <i>ygl253w</i> : : <i>kanMX4</i>	Délétion du gène codant pour l'hexokinase II	EUROSCARF
Δ <i>hap4</i>	<i>Mata</i> ; <i>his3</i> Δ1; <i>leu2</i> Δ0; <i>lys2</i> Δ0; <i>ura3</i> Δ0; <i>ykl109w</i> : : <i>kanMX4</i>	Délétion du gène codant pour la sous-unité Hap4p	EUROSCARF
Bactéries			
Nom	Génotype		
BL21 C41 (DE3)	F <sup>-</sup> <i>ompT</i> hsdS <sub>B</sub> r <sub>B</sub> <sup>-</sup> , m <sub>B</sub> <sup>-</sup> <i>gal dcm</i> (DE3)		

## 5.1.2 Vecteurs d'expression utilisés (plasmides)

### 5.1.2.1 Plasmide pCM189-Hap4p

Le plasmide exprimant le gène *HAP4* que j'ai utilisé est un plasmide centromérique dont l'expression est régulée par le système tet-Off (Inhibition par la tétracycline).

Ce plasmide a été construit par Chevtzoff *et al.*, 2010 [46] en insérant dans le plasmide pCM189 linéarisé par BamHI/PstI un fragment BamHI/PstI amplifié du locus *HAP4* avec les oligonucléotides CCCGGATCCATCATGACCGCAAAGACT et CGCCTGCAAGCTATTTCAAATACTTGTACC. Dans ce plasmide l'expression du gène *HAP4* est sous le contrôle du promoteur tetO-CYC1. Le plasmide pCM189 contient également les marqueurs de sélection Ampicilline et *URA3*.

### 5.1.2.2 Plasmide pCM189 vide

Le plasmide vide pCM189 ne comporte aucun gène sous contrôle du promoteur tetO-CYC1. Il porte seulement les marqueurs de sélection Ampicilline et *URA3*.

### 5.1.3 Milieux de culture et conditions de croissance

#### 5.1.3.1 Milieux de culture

Les compositions des différents milieux de culture utilisés dans ce travail sont décrites dans le **tableau 5.2**.

**Tableau 5.2 – Composition des milieux de culture utilisés.** Les pourcentage indiquent des rapport (w/v) à raison de X g/100 ml du volume du milieu de culture.

<i>Nom</i>	<i>Nature de milieu de culture</i>	<i>Compositions</i>
<b>Levures</b>		
Milieu riche glucose (YPD)	Solide	Glucose 2 %; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,12 %; Yeast extract 1 %; Agar 2,5 %
Milieu riche glucose (YPD)	Liquide	Glucose 2 %; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,12 %; Yeast extract 1 %;
Milieu minimum glucose (SC glc)	Solide	Glucose 2 %; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 %; hydrolysate de caséine 0,2 %; Yeast Nitrogen Base(YNB) 0,175 % sans acides aminés ni sulfate d'ammonium; Agar 2,5 %
Milieu minimum lactate (SC lac)	Liquide	Lactate 2 %; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 %; hydrolysate de caséine 0,2 %; Yeast Nitrogen Base(YNB) 0,175 %; <i>pH 5,5 avec le NaOH</i>
Milieu minimum galactose (SC Gal)	Liquide	Galactose 2 %; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 0,1 % (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,5 %; hydrolysate de caséine 0,2 %; Yeast Nitrogen Base(YNB) 0,175 %
<b>Bactéries</b>		
Bouillon lysogénique (LB)	Solide	LB-Lennox : Tryptone 1 %; Yeast extract 0,5 %; NaCl 1 %; Agar 2,5 %
Bouillon lysogénique (LB)	liquide	LB-Lennox : Tryptone 1 %; Yeast extract 0,5 %; NaCl 1 %

La stérilisation des milieux est réalisée par autoclave à une température de 120 °C et une pression de 0,5 bar pendant trente minutes.

Pour l'ensemble des cultures cellulaires avec milieux minimums, les acides aminés (adénine et tryptophane) sont ajoutés aux milieux de culture après autoclavage à raison de 40 µg/ml.

En ce qui concerne les cultures bactériennes, j'ai utilisé l'ampicilline comme marqueur de sélection. Ce dernier est ajouté à raison de 120 µg/ml dans le milieu de culture LB.

### 5.1.3.2 Conditions de culture

Les cultures cellulaires liquides sont réalisées dans un incubateur agitateur à 200 rotation/minute et à 28 °C pour la levure et 37 °C pour les bactéries. Pour assurer une oxygénation optimale et uniforme du milieu (par agitation) lors de la culture, les cellules (levures ou bactéries) sont cultivées dans des erlens stériles, de contenance dix (10) fois le volume de milieu de culture introduit.

Pour la levure et avant la mise en culture, j'ai toujours réalisé une préculture de levures 24 heures avant. À partir des souches conservées sur boîtes de Pétri à 4 °C, un amas cellulaire est prélevé et ensemencé dans un volume compris entre 12 et 100 ml de milieu de culture. Ces précultures servent ensuite à l'ensemencement et la mise en culture des différentes souches utilisées dans nos expériences. La prolifération des levures est suivie par mesure de la turbidité de milieu de culture à 600 nm ( $DO_{600}$ ) à l'aide d'un spectrophotomètre (Safas, Monaco).

Pour les souches de levures étudiées, une relation entre l'évolution de la biomasse et la turbidité du milieu de culture a été établie.

Le **tableau 5.3** résume l'évolution du poids sec (mg) d'une unité  $DO_{600}$  en fonction du temps et les conditions de culture.

**Tableau 5.3 – Évolution du poids sec en mg par unité DO en fonction du temps et les conditions de culture (avant/après l'ajout du glucose).** Le poids sec des cellules est déterminé par la pesée d'une quantité équivalente à 50 UDO, séchée sur 5 jours dans un incubateur à 37 °C. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM),  $n=5$ . Sans glucose : milieu de culture SC lactate 2 %

Temps (h)	Poids sec (mg/UDO)
<b>BY4742 (WT)</b>	
Sans glucose	0,36 $\pm$ 0,01
4	0,380 $\pm$ 0,007
8	0,39 $\pm$ 0,02
<b><math>\Delta h x k 2</math></b>	
Sans glucose	0,36 $\pm$ 0,02
4	0,38 $\pm$ 0,02
8	0,38 $\pm$ 0,01
<b><math>\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow</math></b>	
Sans glucose	0,393 $\pm$ 0,008
4	0,40 $\pm$ 0,02
8	0,402 $\pm$ 0,009
<b><math>\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow</math></b>	
Sans glucose	0,392 $\pm$ 0,003
4	0,39 $\pm$ 0,02
8	0,378 $\pm$ 0,009

#### 5.1.4 Volume cellulaire et détermination du nombre de cellules

La mesure du volume cellulaire est réalisée à l'aide d'un analyseur Multisizer™ 4 (Beckman Coulter®). Cet appareil utilise le principe de « Electrical Sensing Zone Method » qui est basé sur le changement de la résistance électrique produite par des particules suspendues dans une solution d'électrolytes.

Pour effectuer les mesures, 100  $\mu$ l de culture cellulaire sont mélangés à 10 ml d'une solution d'électrolytes (NaCl 0,9 %) [Isoton® II diluent]. Puis 100  $\mu$ l du mélange sont



aspirés par l'appareil et traversent un orifice séparant deux électrodes. Lorsqu'une cellule traverse l'orifice, les électrodes mesurent une différence de résistance électrique qui est proportionnelle au volume de la cellule. À la sortie, l'analyseur donne le nombre de cellules contenues dans 100  $\mu\text{l}$  et un graphique représentant la dispersion de leur volume. Le volume médian cellulaire est ainsi déterminé.

L'appareil est couplé à un ordinateur et les données sont analysés et traités à partir du logiciel « Multisizer software 4 ».

Le **tableau 5.4** résume l'évolution du volume cellulaire et le nombre de cellules en fonction du temps et les conditions de culture.

**Tableau 5.4 – Évolution du volume cellulaire et le nombre de cellules en fonction du temps et les conditions de culture (avant/après l'ajout du glucose).** Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM),  $n=6$ . Sans glucose : milieu de culture SC lactate 2 %.

<i>Temps (h)</i>	<i>Volume Cellulaire (litre/cell.10<sup>-15</sup>)</i>	<i>nombre de cellules (10<sup>7</sup>)</i>
<b>BY4742 (WT)</b>		
Sans glucose	37,3 $\pm$ 0,2	1,88 $\pm$ 0,02
2	47,2 $\pm$ 0,3	1,71 $\pm$ 0,06
4	50,5 $\pm$ 0,4	1,58 $\pm$ 0,02
6	50,5 $\pm$ 0,7	1,57 $\pm$ 0,08
8	51,4 $\pm$ 0,9	1,50 $\pm$ 0,01
<b><math>\Delta</math>hvk2</b>		
Sans glucose	38 $\pm$ 1	1,67 $\pm$ 0,09
2	52,0 $\pm$ 0,3	1,85 $\pm$ 0,15
4	51,0 $\pm$ 1,4	1,55 $\pm$ 0,02
6	47,8 $\pm$ 1,4	1,53 $\pm$ 0,08
8	45,4 $\pm$ 0,2	1,66 $\pm$ 0,04
<b><math>\Delta</math>hap4hap4<math>\uparrow</math></b>		
Sans glucose	64,1 $\pm$ 0,5	1,24 $\pm$ 0,01
2	70,3 $\pm$ 1,4	1,33 $\pm$ 0,05
4	73,2 $\pm$ 0,3	1,26 $\pm$ 0,05
6	64 $\pm$ 1	1,37 $\pm$ 0,05
8	66,17 $\pm$ 0,53	1,38 $\pm$ 0,03
<b><math>\Delta</math>hvk2hap4<math>\uparrow</math></b>		
Sans glucose	61,7 $\pm$ 0,5	1,35 $\pm$ 0,01
2	68,5 $\pm$ 1,1	1,35 $\pm$ 0,07
4	63,8 $\pm$ 0,6	1,40 $\pm$ 0,06
6	56 $\pm$ 2	1,55 $\pm$ 0,05
8	54,2 $\pm$ 0,3	1,61 $\pm$ 0,01



## *Techniques de biologie moléculaire*

### 6.1 Récupération de l'ADN plasmidique

Les plasmides utilisés pour la transformation des levures sont récupérés après la mise en culture d'une colonie bactérienne déjà transformée avec le plasmide d'intérêt, issue d'un stock conservé à  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pour la récupération du plasmide bactérien, j'ai utilisé le kit GeneJET Plasmid Mini-prep.

Environ 5 ml de bactéries contenant le plasmide d'intérêt sont cultivés sur la nuit dans un milieu LB supplémenté de l'antibiotique approprié (ampicilline). Après centrifugation (10 min à 5000 g), le culot est traité avec une solution appelée « P1 » [50mM Tris-HCl, pH 8; 10 mM EDTA; 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  RNase A] dont la principale caractéristique est de contenir de la RNase qui servira à dégrader les molécules d'ARN libérées après la lyse des bactéries. La lyse alcaline s'effectue avec une solution dite « P2 » [200 mM NaOH; 1 % SDS] qui dénaturera l'ADN (par séparation des deux brins) et les protéines. L'ajout d'une solution « N3 » [Chlorure de Guanidium (GuHCl) 4,2 M; Acétate de potassium (KAc) 0,9 M, pH 4.8] sert à précipiter l'ADN génomique bactérien et les protéines. Dans la méthode « d'origine » décrite en 1975 [17] cette précipitation sélective de l'ADN génomique au profit de l'ADN plasmidique se fait par l'utilisation d'une solution acide d'acétate de sodium. L'ajout de cette solution va entraîner une neutralisation de la solution alcaline,

qui entraînera une renaturation des molécules d'ADN.

Cependant, l'ADN génomique étant de très grande taille en comparaison avec celle du plasmide, sa renaturation est plus difficile conduisant à des problèmes de solubilisation et donc son agrégation [230, 215]. Les protéines et les ARN de haut poids moléculaire sont quant à eux précipités par la forte concentration en sels [155, 55]. Après centrifugation (10 min à 16000 g) pour éliminer les débris et l'ADN génomique bactérien précipité, le surnageant est passé sur une colonne faite de silice qui retient l'ADN en présence de sels notamment par des liaisons hydrogène [26, 164]. Après des lavages effectués avec une solution à base d'éthanol (centrifugation 1 min à 16000 g), l'élution de l'ADN s'effectue par ajout de 20 à 50 µl d'eau stérile et dépourvue de nucléases.

## 6.2 Transformation de levures *S. cerevisiae* par la méthode à l'acétate de lithium

La transformation des cellules de *S. cerevisiae* nécessite une propriété qu'on appelle compétence, c'est à dire une capacité à « capturer » l'ADN présent dans l'environnement. La première étape de transformation est donc rendre les cellules compétentes « artificiellement » en les rendant perméables à l'entrée de l'ADN.

La technique que j'ai utilisé dérive de la méthode décrite par [217]. Une préculture faite sur la nuit des levures à transformer est inoculée dans le milieu approprié (YPD). Lorsque la DO atteint une valeur comprise entre 0,8 et 1,2, les cellules sont récoltées par centrifugation (5min à 1000 g). On effectue ensuite au moins 2 lavages avec de l'eau stérile toujours par centrifugation (au moins un des lavages doit être effectué dans un volume au moins 2 fois supérieur à celui de la culture). Pour une transformation, la procédure suivante est effectuée :

- ☞ Resuspendre le culot de cellules dans 100 µl d'une solution de transformation [Acétate de lithium 0,2 M; PEG 3350 40 % (p/w) ; Dithiothreitol (DTT) 0,1 M; 10 µg d'ADN simple brin de sperme de saumon (« ADN carrier »)]. Le DTT et l'« ADN carrier » sont rajoutés au dernier moment au mélange. Le DTT est préparé

extemporanément et l'« ADN carrier » est préalablement dénaturé en le chauffant à 90 °C.

- ☞ Ajouter 1 µg de l'ADN plasmidique qui va servir à la transformation.
- ☞ Vortexer et effectuer un choc thermique en incubant pendant 30 min à 45 °C
- ☞ Étaler sur le milieu sélectif approprié.



## Techniques de biochimie

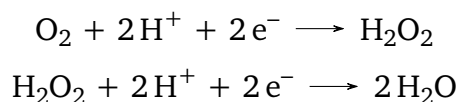
### 7.1 Mesure du flux de consommation d'oxygène

#### 7.1.1 Principe

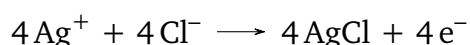
La concentration en dioxygène ( $O_2$ ) d'un milieu liquide peut être déterminé par une mesure électrochimique utilisant une sonde à oxygène (électrode de Clark).

L'électrode de Clark est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent baignant dans un électrolyte (KCl 3 M). L'ensemble électrodes-électrolyte est isolé du milieu par une membrane perméable au  $O_2$  mais imperméable à l'eau et aux ions. L'application d'une différence de potentiel de 850 mV entre la cathode et l'anode induit une ionisation de l' $O_2$  dissous dans l'électrolyte selon les réactions chimiques suivantes :

Au contact de la cathode (+)



Au contact de l'anode (-)



Au niveau de la cathode l' $O_2$  diffusant à travers la membrane vers l'électrolyte est réduit d'abord en  $H_2O_2$  puis en  $H_2O$  en acceptant  $4e^-$  libérés à l'anode. À la suite de ces



réactions d'oxydoréduction, un courant de très faible intensité est établi entre les deux électrodes. L'intensité de ce courant est proportionnelle à la concentration en O<sub>2</sub> dissous dans l'électrolyte et donc dans le milieu à étudier.

Cependant, dans ce système, la concentration en O<sub>2</sub> dans l'électrolyte dépend non seulement de la disponibilité de l'O<sub>2</sub> dans le milieu, mais aussi de sa vitesse de diffusion à travers la membrane. Pour garder une vitesse de diffusion d'O<sub>2</sub> stable, plusieurs facteurs expérimentaux et environnementaux doivent être contrôlés tels que :

- ☞ la température (la cuve d'oxygraphie, le milieu et l'électrolyte doivent être thermostatés) ;
- ☞ la pression ( la cuve d'oxygraphie est soumise à la pression atmosphérique) ;
- ☞ l'homogénéité de la concentration en oxygène du milieu ( agitation suffisante dans la cuve).

## 7.1.2 Mesure de la respiration sur cellules entières (levures)

### 7.1.2.1 Respiration endogène

La respiration endogène des cellules entières est mesurée par l'utilisation de système de l'électrode de Clark (présenté ci-dessus). Un volume de 1 ml prélevé directement de la culture cellulaire est mis dans la cuve de mesure. Après environ 5 minutes d'enregistrement de l'appareil, on obtient un tracé déterminant la concentration de l'O<sub>2</sub> consommé exprimé en pourcentage par unité de temps.

Étant donné que dans nos conditions expérimentales 1 % correspond à 4,2 nanomoles d'oxygène par ml, le calcul de la vitesse de respiration se fait par l'application des formules suivantes :

$$JO_2 \text{ (natO/min/UDO)} = \frac{n \times 4,2}{UDO}$$

$$JO_2 \text{ (natO/min/mg pds)} = \frac{JO_2 \text{ (natO/min/UDO)}}{\text{poids sec}}$$

ou :

- ✧  $n$  : le pourcentage de la consommation de l'O<sub>2</sub> par minute ;

- ✧ 4,2 : la quantité d'oxygène correspondante à une variation de 1 % sur l'enregistreur ;
- ✧ UDO : unité arbitraire de la densité optique mesurée à 600 nm par ml d'échantillon ;
- ✧ Poids sec : le poids sec d'une UDO de cellules.

### 7.1.2.2 La respiration non phosphorylante

La mesure de la respiration non phosphorylante est effectuée directement après la mesure de la respiration endogène par l'addition dans la cuve de mesure de 0,2 mM du triéthylétain (TET).

Tout comme l'oligomycine, le triéthylétain est un inhibiteur de l'ATP synthase, il agit sur le domaine  $F_0$  de l'ATP synthase où il se fixe de façon non covalente sur son site de liaison en inhibant ainsi le passage des protons vers la matrice mitochondriale [35, 36].

### 7.1.2.3 La respiration découplée

La mesure de la respiration découplée est effectuée après détermination de la respiration endogène. Le découplage de la chaîne respiratoire est réalisé par l'utilisation du carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone (CCCP). Le CCCP est un découplant des oxydations phosphorylantes [113], il agit au niveau de la membrane mitochondriale interne en augmentant sa perméabilité aux protons  $H^+$ , ce qui entraîne une dissipation de la différence du potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale [208].

2,5  $\mu$ M de CCCP ainsi que 100 mM d'éthanol sont ajoutés aux cellules dans la cuve de mesure. L'intérêt de rajouter l'éthanol dans la cuve est d'éviter tout contrôle cinétique par le potentiel redox en amont de la chaîne respiratoire.

## 7.1.3 Mesure de la respiration sur sphéroplastes perméabilisés

1 mg protéines par ml de sphéroplastes sont mises en suspension dans un tampon que nous appellerons tampon de sphéroplaste [Sorbitol désionisé 1 M; EGTA 0,5 mM;  $MgSO_4$  2mM;  $NH_4Cl$  10 mM;  $KH_2PO_4$  10mM; NaCl 10 mM; BSA 0,1 %]. Le 100 % d'oxygène dissout est calibré sur l'enregistreur lorsque le tampon seul est ajouté dans la cuve d'oxygraphie thermostatée à 28 °C.

La perméabilisation des sphéroplastes est effectuée par l'ajout au mélange tampon-sphéroplastes de 20 µg/ml de nystatine. Après incubation pendant dix minutes, les différents substrats respiratoires et métabolites (G6P, F1,6bP) sont ajoutés. Puis, les pentes nécessaires au calcul du flux de consommation d'oxygène ( $JO_2$ ) sont déterminées à partir d'états stationnaires de respiration d'une durée supérieure à deux minutes.

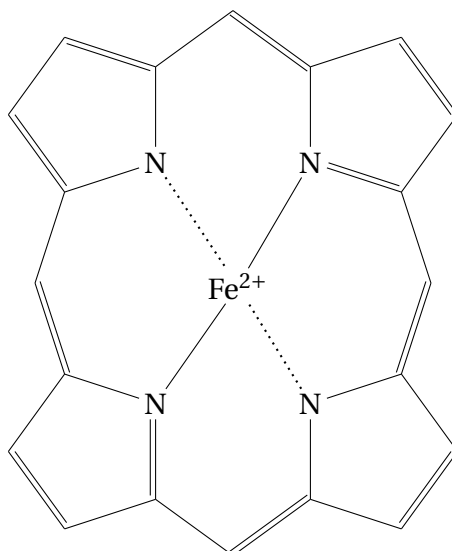
## 7.2 Quantification des cytochromes sur cellules entières

### 7.2.1 Principe

Les cytochromes sont des protéines hémiques qui constituent une partie de la chaîne respiratoire mitochondriale, Grâce à leurs propriétés redox ce sont eux qui participent à l'acheminement des électrons au long de la chaîne respiratoire vers l'oxygène, l'accepteur final d'électron.

Un cytochrome est constitué d'une fraction protéique (apoprotéine) à l'intérieur de laquelle est accroché de façon covalente un hème (cofacteur).

Le cofacteur ou l'hème est une porphyrine, au centre duquel on trouve un atome de fer (**Figure 7.1**). C'est grâce aux propriétés redox du fer qui peut passer de façon réversible d'un état ferrique à un état ferreux, que la fonction transporteur d'électrons du cytochrome est assurée. La partie apoprotéine détermine et confère des potentiels redox différents entre chaque classe de cytochrome rendant ainsi le transfert des électrons possible entre cytochromes.



**Figure 7.1 – Structure de l'hème.** Une molécule d'hème formée après la fixation d'un atome de fer par un noyau de porphyrine

Dans la chaîne respiratoire mitochondriale des cellules eucaryotes, selon le type d'hème associé, on distingue trois classes de cytochromes :

- Cytochromes c et  $c_1$
- Cytochromes b<sub>l</sub> et b<sub>h</sub>
- Cytochromes a et a<sub>3</sub>

En fonction de l'environnement protéique et le type d'hème associé, ces 3 classes de cytochromes présentent des propriétés d'absorptions différentes et dépendantes de l'état redox de l'hème associé [42, 43]. Grâce à leurs propriétés d'absorption, il est possible de les quantifier à l'aide d'un spectrophotomètre double faisceaux, double longueur d'onde. La différence entre le spectre d'absorption du cytochrome à l'état réduit et celui de l'état oxydé permet la quantification de ce composé. L'avantage majeur de l'utilisation de cette technique est de pouvoir s'affranchir des variations de turbidité des solutions en effectuant des spectres différentiels.

- ♦ **Les cytochromes c et  $c_1$**  présentent un pic d'absorption à environ 550 nm et un point isobestique à 540 nm. Le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) est de 18 000 L.mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>.

- ◆ **Les cytochromes bl et bh** ont leur pic d'absorption à environ 561 nm et le point isobestique à 575 nm. Le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) est de 18 000  $L.mol^{-1}cm^{-1}$ .
- ◆ **Les cytochromes a et a<sub>3</sub>** ont leur pic d'absorption à environ 603 nm et le point isobestique à 630 nm. Le coefficient d'extinction molaire ( $\epsilon$ ) est de 14 000  $L.mol^{-1}cm^{-1}$ .

### 7.2.2 Protocole

Environ 30 mg de biomasse sèche sont prélevées de la culture cellulaire et lavées à l'eau, puis resuspendues dans 2 ml d'eau. Par la suite, les cellules sont réparties dans deux cuves en quartz à raison de 1 ml dans chaque cuve et placée dans un spectrophotomètre à double faisceaux et on réalise un spectre de ligne de base entre 500 et 650 nm.

En seconde étape, le contenu de la cuve de référence est oxydé avec du peroxyde d'hydrogène (8,8 mM), tandis que le contenu de l'autre cuve est réduit avec quelques grains de dithionite. On réalise le deuxième spectre d'absorbance entre 500 et 650 nm en effectuant la différence entre les valeurs de la cuve réduite et de la cuve oxydée.

La formule suivante est appliquée pour déterminer la quantité de cytochromes :

$$\text{Cytochromes (pmole/UDO)} = \frac{(DO_{(absp)} - DO_{(iso)}) \times V}{(\epsilon \times UDO)}$$

$$\text{Cytochromes (pmole/mg pds)} = \frac{\text{Cytochromes (pmole/UDO)}}{\text{poids sec}}$$

- ◆  $DO_{(absp)}$  : La DO du pic d'absorption ;
- ◆  $DO_{(iso)}$  : L'absorbance du point isobestique ;
- ◆ V : Volume de l'échantillon de mesure ( $L.10^{-3}$ ) ;
- ◆ UDO : Unité arbitraire de la densité optique mesuré à 600 nm par ml d'échantillon ;
- ◆  $\epsilon$  : Le coefficient d'absorption molaire correspondant au cytochrome exprimé en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  ;
- ◆ Poids sec : Le poids sec d'une UDO de cellules.

## 7.3 Dosage des hexoses phosphates

### 7.3.1 Principe

La méthode de dosage des métabolites que j'ai utilisée fait appel aux principes de stœchiométrie de réaction et aux caractéristiques spectroscopiques de produits de réaction selon l'exemple suivant :



La détermination de  $n$  se fait par l'utilisation des caractéristiques d'absorption du produit D par l'application de la loi de Beer-Lambert.

$$\text{Absorbance} = \epsilon l C$$

Avec :

- ✧  $\epsilon$  : le coefficient d'absorption molaire en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  ;
- ✧  $l$  : le trajet optique en  $cm$  ;
- ✧  $C$  : la concentration de la solution en  $mol/L$ .

### 7.3.2 Arrêt du métabolisme et extraction des métabolites

Des extraits cellulaires sont d'abord préparés par une extraction à l'éthanol adaptée d'une méthode d'extraction de [149]. Environ 7,5 mg de biomasse sèche sont prélevés et récupérés par filtration sur un filtre de nitrocellulose (0,4  $\mu m$ ), suivi d'un rinçage à l'eau froide (milli-RO). Le filtre contenant les cellules est immédiatement plongé dans un tube de centrifugation contenant 5 ml du tampon d'extraction éthanol/Hepes [10 mM, pH 7,2 (75/25 v/v)] préalablement placé dans la glace puis mélangé au vortex. La lyse complète des cellules se fait par la suite par une incubation dans un bain marie à 80 °C, pendant trois minutes. L'élimination de l'éthanol est réalisée par distillation simple

sous vide grâce à un évaporateur rotatif. En dernière étape, l'extrait cellulaire obtenu est suspendu dans 800 ml d'eau (milli-Q) froide pour éviter toute activité enzymatique.

### 7.3.3 Dosage du glucose-6-phosphate (G6P)

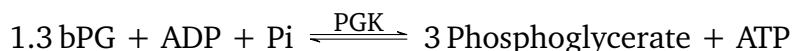
Le dosage du G6P fait intervenir la réaction enzymatique suivante :



Dans une cuve U.V, 200  $\mu\text{l}$  d'échantillon correspondant à environ 2,7 mg de biomasse sèche sont ajoutés à 800  $\mu\text{l}$  de la solution suivante : [ETRAM (Triéthanolamine 50 mM;  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM; EDTA 3,75 mM; pH 7,4);  $\text{NAD}^+$  0,1 mM]. Le dosage du glucose-6-phosphate (G6P) est effectué par l'addition de l'enzyme glucose-6-phosphate déshydrogénase bactérienne (G6PDH) (0,3 unités/ml). La quantité de  $\text{NAD}^+$  réduit en NADH est proportionnelle à la quantité de G6P consommé. L'apparition de NADH est suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm pendant 15 min. La réaction étant stœchiométrique (1 :1) la quantité de G6P présent est déterminée par la quantification du NADH par l'utilisation de la loi de Beer-Lambert, sachant que  $\epsilon_{\text{NADH}} = 6\,220 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

### 7.3.4 Dosage du fructose-1,6-bisphosphate (F1,6BP)

Le dosage de fructose-1,6-bisphosphate (F1,6bP) fait appel à trois (3) réactions enzymatiques de la glycolyse suivantes :



L'aldolase catalyse la scission du F1,6bP en deux trioses phosphates : le glycéraldéhyde-3-phosphate (Gly3P) et la dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Pour cette réaction enzymatique les trois molécules : le F1,6bP, le Gly3P et le DHAP sont proportionnellement

stœchiométriques. La quantification du F1,6bP se fait donc par la quantification du NAD réduit en NADH lors de l'oxydation de Gly3P en 1,3-biphosphoglycérate (1,3bPG) par la glycéraldéhyde -3- phosphate déshydrogénase (GAPDH) (réaction 2). La réaction de l'oxydation de Gly3P en 1,3bPG par la GAPDH est réversible. Il est donc nécessaire de tirer cette réaction et transformer le 1,3bPG. La phosphoglycérate kinase (PGK) catalyse le transfert du phosphate lié au carbone 1 sur un ADP pour produire le 3-phosphoglycérate et une molécule d'ATP (réaction 3). La réaction 3 est favorisée dans le sens de la formation d'ATP par l'addition d'une concentration importante d'ADP (1mM) dans le mélange réactionnel.

Dans une cuve U.V, 200  $\mu$ l d'échantillon correspondant à environ 2,7 mg de biomasse sèche sont ajoutés à 800  $\mu$ l de la solution suivante : [ETRAM (Triéthanolamine 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM; EDTA 3,75 mM; pH 7,4); NAD 1 mM; Pi 1 mM; ADP 1mM; PGK 0,6 unités/ml; aldolase 0,3 unités/ml]. Après réalisation d'une ligne de base, l'enzyme GAPDH (0,6 unités/ml) est ajoutée dans la cuve de mesure. L'apparition de NADH est suivie par mesure de l'absorbance à 340 nm pendant 15 min. Les réactions 1 et 2 étant stœchiométrique (1 :1) la quantité de F1,6bP présent est déterminée par la quantification du NADH par l'utilisation de la loi de beer-Lambert.

## 7.4 Dosage des nucléotides phosphates (ATP, ADP)

Une quantité équivalente de 1,5mg de biomasse sèche est prélevée et récupérée par filtration sur un filtre de nitrocellulose (0,4  $\mu$ m), suivi d'un rinçage à l'eau froide (milli-RO). Le filtre contenant les cellules est immédiatement plongé dans un tube de centrifugation contenant 5 ml du tampon d'extraction éthanol/Hepes [10 mM, pH 7,2 (75/25 v/v)] préalablement placé dans la glace puis mélangé au vortex. La lyse complète des cellules et la dénaturation des protéines se fait par la suite par une incubation dans un bain marie à 80 °C, pendant trois (3) minutes. L'élimination de l'éthanol est réalisée par distillation simple sous vide grâce à un évaporateur rotatif.



Les échantillons sont ensuite ressuspendus dans l'eau de manière à avoir 1 µl de volume cellulaire dans 100 µl d'eau et les particules insolubles sont éliminées par centrifugation. La séparation des métabolites est réalisée par une colonne CarboPac PA1 couplée à une station de chromatographie ICS3000 (Dionex), en utilisant un gradient NaOH/Na acétate. Les nucléotides phosphates (ATP, ADP) sont détectés par ampérométrie (IntAmp, carbohydrates standard quad potential ED50; Dionex) et par des détecteurs UV en rang de diode (Ultimate 3000; Dionex). Des gammes étalons sont réalisées pour déterminer les concentrations des nucléotides (ATP, ADP).

## 7.5 Dosage des nucléotides phosphates (Méthode N°02)

Cette méthode a été utilisée pour doser les concentrations cellulaires des nucléotides (ATP, ADP) dans le chapitre 13.

Les extraits cellulaires sont préparés de la même manière que pour le dosage des hexoses phosphates. Le dosage est effectué grâce au kit « ATPlite 1 step de PerkinElmer ». Ce kit est basé sur la production de lumière due à la réaction de l'ATP avec la luciférase et la D-luciférine ajoutées. La luciférase catalyse l'oxydation de la D-luciférine en présence d'ATP et d'oxygène et va donner l'oxyluciférine, de l'AMP, du P<sub>Pi</sub>, du CO<sub>2</sub> et de la lumière. Si les concentrations en luciférine-luciférase et en oxygène sont constantes, alors l'intensité lumineuse émise est proportionnelle à la quantité d'ATP dans l'échantillon. La quantité d'ATP est déterminée à l'aide d'une gamme étalon obtenue avec ce kit et de l'ATP standard de concentration connue. Le dosage de l'ADP est effectué à l'aide de ce même kit, les échantillons sont préalablement incubés pendant 30 minutes à 28 °C avec un tampon [KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 75mM; MgSO<sub>4</sub> 15 mM; phosphoenolpyruvate (PEP); pyruvate kinase (PK)]. Ce tampon permet de transformer la quasi-totalité de l'ADP en ATP grâce à l'action de la PK qui va transformer le PEP et l'ADP en pyruvate et ATP. Après trente minutes d'incubation, la quantité d'ATP + ADP est mesurée comme précédemment. Une gamme étalon est également effectuée en utilisant un échantillon et l'ATP standard. La quantité d'ADP est déterminée en soustrayant le signal de l'ATP mesuré précédemment au signal déterminé lors de ce dosage (ATP + ADP).

## 7.6 Dosage du phosphate inorganique (Pi)

Le dosage du Pi est réalisé par une méthode colorimétrique développée par [178]. Le principe de ce dosage repose sur le fait que les phosphates en présence de molybdate d'ammonium vont donner un complexe phosphomolybrique ( $\text{H}_3\text{PO}_4 - \text{MoO}_3$ ). Ce complexe va être ensuite réduit et devenir bleu. Il sera alors stable et soluble dans l'eau et présentera un maximum d'absorbance à 610 nm. L'intensité de coloration est proportionnelle à la concentration en phosphate.

500  $\mu\text{l}$  d'une solution [ $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,75 M ; molybdate d'ammonium 0,66 % ;  $\text{FeSO}_4$  0,8 %] sont ajoutés à 100  $\mu\text{l}$  d'échantillons. Les d'échantillons sont préparés de la même façon que pour le dosage des hexoses phosphates (arrêt du métabolisme et extraction des métabolites). Après trente minutes, on effectue une lecture de la densité optique à 610 nm, et à l'aide d'une gamme étalon réalisée dans les mêmes conditions, la quantité de Pi contenue dans l'échantillon est calculée.

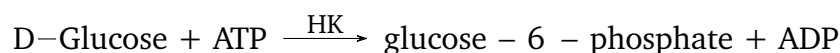
## 7.7 Dosage du glucose

### 7.7.1 Principe

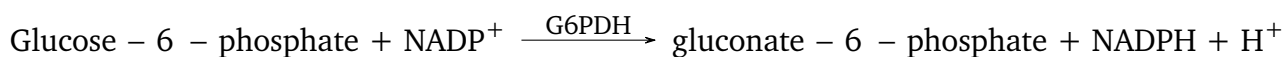
Le dosage du glucose est effectué par l'utilisation du Kit « *D-Glucose HK Assay Kit* » de Megazyme.

Le principe de dosage repose sur le couplage entre deux réactions enzymatiques.

La première réaction catalysée par l'hexokinase (HK) consiste à la transformation du glucose en glucose 6-phosphate (G6P), selon la réaction suivante :



La deuxième réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) consiste à la transformation du produit de la première réaction (G6P) en gluconate-6-phosphate, selon la réaction suivant :



La réduction d'un NADP<sup>+</sup> en NADPH étant stœchiométrique avec la quantité de glucose (1 : 1), la quantification du glucose est possible par le suivi de l'apparition de NADPH par mesure de l'absorbance à 340 nm et l'application de la loi de Beer-Lambert.

### 7.7.2 Protocole

200 µl du milieu de culture sont prélevés et centrifugés à froid pendant deux (2) minutes à 13000 g. Puis, 100 µl du surnageant sont repris dans un nouveau tube Eppendorf et chauffés à 90 °C pendant 2 min. Cette dernière étape consiste à dénaturer les protéines libérées des cellules mortes/éclatées, afin de stopper toute réaction enzymatique.

Pour le dosage, une préparation du blanc et des échantillons est réalisée selon le **tableau 7.1**.

**Tableau 7.1 – Composition du mélange réactionnel pour le dosage de glucose.** Tampon ETRAM [Triéthanolamine 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 7,5 mM; EDTA 3,75 mM; pH 7,4]; S1 [Tampon pH 7,6, Azoture de sodium (0.02 % w/v)]; S2 [NADP<sup>+</sup>; ATP].

<i>Volume</i>	<i>Blanc</i>	<i>Échantillon</i>
Tampon ETRAM	890 µl	840 µl
S1 (buffer)	50 µl	50 µl
S2 (NADP <sup>+</sup> /ATP)	50 µl	50 µl
Échantillon	–	50 µl

Les mélanges sont agités, puis une première lecture de la DO est effectuée à 340 nm. Ensuite, 10 µl de la solution enzymatique (HK/G6PDH) sont ajoutés aux mélanges. Après une heure d'incubation à température ambiante, un suivi de l'évolution de la DO à 340 nm est effectué jusqu'à stabilisation de la valeur de cette dernière.

La concentration finale en glucose de chaque échantillon est déterminée par l'application de la loi de Beer-Lambert [ $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ ], par l'utilisation de la formule suivante :

$$\text{Glucose (mM)} = \frac{(DO_2 - DO_1)}{(\varepsilon \times l)} \times F$$

$$F = \text{dilution}_{(cuve)} \times \text{dilution}_{(\text{échantillon})} \times V_{(total)} \times 10^3$$

- ✧  $DO_1$  : densité optique de la ligne de base ;
- ✧  $DO_2$  : densité optique de plateau ;
- ✧  $l$  : le trajet optique en  $cm$  ;
- ✧  $\varepsilon$  : le coefficient d'absorption molaire de NADPH en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  ;
- ✧  $\text{dilution}_{(cuve)}$  : facteur de dilution relatif au volume de l'échantillon introduit dans la cuve ;
- ✧  $\text{dilution}_{(chantillon)}$  : facteur de dilution de l'échantillon ;
- ✧  $V$  : volume total du mélange (réactifs et échantillon) ;
- ✧  $10^3$  : facteur de conversion (mM).

## 7.8 Dosage de l'éthanol

### 7.8.1 Principe

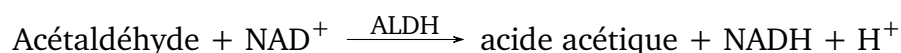
Le dosage de l'éthanol est effectué par l'utilisation du Kit « *ETHANOL Assay Kit* » de Megazyme. Le principe de dosage repose sur le couplage entre deux réactions enzymatiques.

La première réaction catalysée par l'alcool déshydrogénase (ADH) consiste en la transformation de l'éthanol en acétaldéhyde, selon la réaction suivante :



Dans la mesure où la réaction catalysée par l'ADH est réversible, la transformation complète de l'éthanol nécessite la transformation de l'acétaldéhyde. La deuxième réaction

catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase (ALDH) consiste donc à la transformation du produit de la première réaction en acide acétique, selon la réaction suivant :



Les deux réactions sont couplées à la réduction de deux  $\text{NAD}^+$  par molécule d'éthanol (stœchiométrie : 1 EtOH : 2 NADH), la quantification de l'éthanol est possible par le suivi de l'apparition du NADH par mesure de l'absorbance à 340 nm et l'application de la loi de Beer-Lambert.

### 7.8.2 Protocole

900  $\mu\text{l}$  du milieu de culture sont prélevés et mis dans un tube eppendorf contenant 45  $\mu\text{l}$  d'acide perchlorique 70 % puis mélangés au vortex afin d'assurer une lyse complète des cellules et l'arrêt de toute activité enzymatique. Après la lyse, 300  $\mu\text{l}$  de KOMO [KOH 2 M; MOPS 0,5 M] sont ajoutés au mélange afin de neutraliser l'échantillon.

Pour le dosage, une préparation de blanc et échantillons est réalisé selon le **tableau 7.2**.

**Tableau 7.2 – Composition du mélange réactionnel pour le dosage de l'éthanol.** *Tampon ETRAM [Triéthanolamine 50 mM;  $\text{MgCl}_2$  7,5 mM; EDTA 3,75 mM; pH 7,4]; S1 [Tampon pH 9,0, Azoture de sodium (0.02 % w/v)]; S2 [ $\text{NAD}^+$ ]; S3 [Aldéhyde déshydrogénase].*

<i>Volume</i>	<i>Blanc</i>	<i>Échantillon</i>
<b>Tampon ETRAM</b>	890 $\mu\text{l}$	840 $\mu\text{l}$
<b>S1 (buffer)</b>	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
<b>S2 (<math>\text{NAD}^+</math>)</b>	100 $\mu\text{l}$	100 $\mu\text{l}$
<b>S3 (ALDH)</b>	25 $\mu\text{l}$	25 $\mu\text{l}$
<b>Échantillon</b>	–	50 $\mu\text{l}$

Les mélanges sont agités, puis une première lecture de la DO est effectuée à 340 nm. En seconde étape, 10  $\mu\text{l}$  de la solution enzymatique (ADH) sont ajoutés au mélange

et laissés réagir à température ambiante. Après une heure d'incubation à température ambiante, un suivi de l'évolution de la DO à 340 nm est effectué jusqu'à stabilisation de la valeur de cette dernière.

La concentration finale en éthanol de chaque échantillon est déterminée en appliquant la loi de Beer-Lambert [ $A = \varepsilon \cdot l \cdot C$ ], par l'utilisation de la formule suivante :

$$EtOH (mM) = \frac{\frac{(DO_2 - DO_1)}{(\varepsilon \times l)} \times F}{2}$$

$$F = dilution_{(cuve)} \times dilution_{(échantillon)} \times V_{(total)} \times 10^3$$

- ✧  $DO_1$  : densité optique de la ligne de base ;
- ✧  $DO_2$  : densité optique de plateau ;
- ✧  $l$  : le trajet optique en  $cm$  ;
- ✧  $\varepsilon$  : le coefficient d'absorption molaire de NADH en  $L.mol^{-1}.cm^{-1}$  ;
- ✧  $dilution_{(cuve)}$  : facteur de dilution relatif au volume de l'échantillon introduit dans la cuve ;
- ✧  $dilution_{(échantillon)}$  : facteur de dilution de l'échantillon ;
- ✧  $V$  : volume total du mélange (réactifs et échantillon) ;
- ✧  $10^3$  : facteur de conversion (mM).

### 7.8.3 Note sur le calcul des flux : consommation de glucose et production d'éthanol

Dans nos conditions de culture, la quantité de cellules dans le milieu de culture évolue au cours du temps. Entre  $T_h$  et  $T_{(h1)}$ , la quantité de cellules augmente et passe de  $Q_h$  à  $Q_{h1}$ .

Pour estimer l'évolution du flux de consommation de glucose des cellules, après son ajout au milieu de culture, nous avons calculé le flux moyen de consommation du glucose toutes les 2 heures, par l'application de la formule suivante :

$$Flux_{(Glc)} (\mu\text{mol/h/mgdw}) = \frac{([Glc]_h - [Glc]_{(h+2)})}{\Delta h \cdot \bar{x}(Q_h, Q_{(h+2)})}$$

- ✧  $[Glc]_h$  : quantité du glucose dans un ml de milieu de culture à  $T_h$  ( $\mu\text{mole/ml}$ ) ;
- ✧  $[Glc]_{(h2)}$  : quantité du glucose dans un ml de milieu de culture à  $T_{(h2)}$  ( $\mu\text{mole/ml}$ ) ;
- ✧  $\Delta h$  : différence du temps  $T_{(h2)} - T_h$  (heure) ;
- ✧  $Q_h$  : quantité de cellules (mg poids sec/ml) à  $T_h$  ;
- ✧  $Q_{(h2)}$  : quantité de cellules (mg poids sec/ml) à  $T_{(h2)}$ .

De même pour l'éthanol, pour estimer l'évolution du flux de production de ce dernier après l'ajout de glucose, nous avons utilisé la formule suivante :

$$Flux_{(EtOH)} (\mu\text{mol/h/mgdw}) = \frac{([EtOH]_{(h+2)} - [EtOH]_h)}{\Delta h \cdot \bar{x}(Q_h, Q_{(h+2)})}$$

- ✧  $[EtOH]_h$  : quantité d'éthanol dans un ml de milieu de culture à  $T_h$  ( $\mu\text{mole/ml}$ ) ;
- ✧  $[EtOH]_{(h2)}$  : quantité d'éthanol dans un ml de milieu de culture à  $T_{(h2)}$  ( $\mu\text{mole/ml}$ ) ;
- ✧  $\Delta h$  : différence du temps  $T_{(h2)} - T_h$  (heure) ;
- ✧  $Q_h$  : quantité de cellules (mg poids sec/ml) à  $T_h$  ;
- ✧  $Q_{(h2)}$  : quantité de cellules (mg poids sec/ml) à  $T_{(h2)}$ .

## 7.9 Préparation de sphéropastes de la levure *S. cerevisiae*

Les sphéropastes sont des cellules de levures dépourvues de leurs paroi. Ces cellules qui peuvent être perméabilisées à l'aide notamment d'un antibiotique polyèdre tel que la nystatine représentent un bon modèle d'étude des mitochondries dans un environnement «*in-situ*» [9].

Une quantité équivalente à 150 mg de biomasse sèche de cellules est récoltée par centrifugation à 4000 g pendant 5 min. Après trois (3) lavages successifs à l'eau (milli-Q) froide, le culot cellulaire est resuspendu dans le tampon-SH [Tris-HCl 0,1 M pH 9,3 ;  $\beta$ -mercaptoéthanol 0,5 M] à raison de 20 ml de tampon par gramme de poids sec, puis

laissé incubé sous agitation (180 rpm) pendant 15 min à 32 °C. L'agent réducteur qu'est le  $\beta$ -mercaptoéthanol va favoriser la digestion ultérieure de la paroi en rompant les ponts disulfures de cette dernière.

Les cellules sont ensuite lavées (3 fois) avec un tampon [Tris-HCl 10 mM pH 7; KCl 0,5 M], puis la paroi est digérée par la cytohélicase (à raison de 0,17 g/ g poids sec) dans le tampon de digestion [sorbitol déionisé 1,35 M; EGTA 1 mM; citrate phosphate 10 mM; pH 5,8]. La digestion est suivie au spectrophotomètre. En effet, lorsque la paroi est digérée, les cellules éclatent lorsqu'elles sont placées dans de l'eau. Á 600 nm, nous pouvons donc voir diminuer la turbidité de la solution au cours de la digestion. Lorsque 90 % de cellules ont leur paroi digéré, la digestion est arrêtée au froid (4 °C).

Les sphéroplastés ainsi obtenus, sont récoltés par une centrifugation à 2500 g, puis lavés (2 fois) avec le tampon sphéroplastés [sorbitol déionisé 1 M; NaCl 1,7 mM; MgSO<sub>4</sub> 2 mM; EGTA 0,5 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM, pH 6,8; BSA 0,1 %]. Á la fin de dernier lavage, les sphéroplastés sont conservé au froid (4 °C) dans le tampon sphéroplastés à raison de 6 ml de tampon par gramme de poids sec de cellules.





## *Techniques d'analyse des protéines*

### 8.1 Extraction des protéines de levure

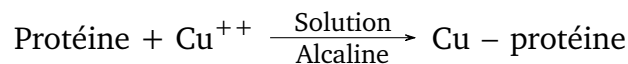
La technique utilisée est basée sur celle décrite par [76]. Il s'agit d'une lyse en conditions alcaline et réductrice.

0,2 mg de biomasse sèche de levure sont prélevés par centrifugation à froid (2 min à 13000 g à 4 °C). Le culot est repris dans 50 µl d'un mélange [NaOH 1,85 M;  $\beta$ -mercaptoéthanol 7,5 % (v/v)]. Après incubation 10 min dans la glace, on effectue une précipitation acide des protéines par agrégation de ces dernières après l'ajout de 50 µl de TCA 50 % (w/v) et une incubation de dix minutes supplémentaires dans la glace. Après centrifugation (10 min à 16000 g à 4 °C), le surnageant est éliminé et le culot protéique est repris dans 10 µl de tampon dit « de charge » à 5x [Tris-HCl 60 mM, pH 6,8; SDS 2 %; glycérol 10 % (w/v);  $\beta$ -mercaptoéthanol 2 % (v/v)], bleu de bromophenol 0,02 %] et 40 µl de Dodécyl-Sulfate de Sodium (SDS) à 5 %. Ce processus a pour objectif la dénaturation des protéines, notamment par l'action du SDS qui est un détergent anionique, qui va profondément détruire les structures secondaires, tertiaires et éventuellement quaternaires des protéines. Cette action de dénaturation est renforcée par le  $\beta$ -mercaptoéthanol qui est un agent réducteur qui va donc réduire les éventuels ponts disulfures présents dans la structure des protéines.

## 8.2 Dosage des protéines totales par la méthode du Biuret

### 8.2.1 Principe

La méthode du Biuret permet d'obtenir un dosage rapide des protéines. En milieu alcalin, les ions de cuivre ( $\text{Cu}^{++}$ ) réagissent avec les liaisons peptidiques des protéines et forment un complexe pourpre avec coloration violette photométrique comme expliqué schématiquement ci-dessous.



L'intensité de coloration du complexe Cu-protéine est proportionnelle à la concentration en protéine.

Cette technique développée par Gornall et al en 1949 [100] est très adaptée au dosage protéique des échantillons biologiques. Contrairement aux autres techniques de dosage protéique, cette méthode présente l'avantage principal d'utiliser les liaisons peptidiques et donc n'est pas dépendante de la composition en acides aminés des protéines.

### 8.2.2 Protocole

Toutes les mesures effectuées sur sphéroplastés sont rapportées au mg de protéines.

25  $\mu\text{l}$  de sphéroplastés sont solubilisés dans 200  $\mu\text{l}$  de cholate de sodium 4 % (p/v). Après avoir vortexé le mélange, on incube dix minutes à température ambiante. Une fois passée cette étape de solubilisation des protéines, 2,75 ml de NaOH à 10 % (p/v) et 300  $\mu\text{l}$  de sulfate de cuivre à 1 % (m/v) sont ajoutés. Dans cette solution alcaline, les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) vont réagir avec les liaisons peptidiques des protéines pour former un complexe violet absorbant à 540 nm. Après 15 min d'incubation, l'absorbance est lue à cette longueur d'onde. Nous pouvons déterminer la concentration protéique de notre échantillon, grâce à une courbe d'étalonnage réalisée dans les mêmes conditions avec des quantités connues d'albumine de sérum de boeuf.

## 8.3 Electrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

### 8.3.1 Principe

Cette méthode a pour but de séparer les différentes fractions protéiques présentes dans l'échantillon en fonction de leurs charges électriques et leurs volumes, sous l'influence d'un courant électrique en milieu tamponné et sur un support déterminé.

Dans nos conditions, les extraits protéiques sont en présence de SDS. Ce dernier va conférer une charge globale négative à toutes les protéines. Ainsi donc, les protéines vont être principalement séparées sur la base de leurs poids moléculaire suite au tamisage moléculaire imposé par le système réticulé du gel d'acrylamide.

Le support est un gel constitué d'un copolymère d'acrylamide et bisacrylamide. Cette polymérisation repose sur une réaction radicalaire initialisée par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par le N,N,N',N'-tétraméthylène diamine (TEMED). Ce dernier décompose l'APS en un radical libre qui va provoquer une « réaction en chaîne » conduisant en la copolymérisation de l'acrylamide avec le bisacrylamide qui sera un agent de réticulation.

### 8.3.2 Protocole

Les gels utilisés dans mon travail de thèse sont dits de type « discontinu » car présentant deux parties :

- Un gel dit de « concentration » [acrylamide : bisacrylamide 30/0,8 (p/p) 5 % ; Tris-HCl, 125 mM pH 6,8 ; SDS 0,1 %] ;
- Un gel de « séparation » [acrylamide : bisacrylamide 30/0,8 (p/p) 10 % ; Tris-HCl 390 mM, pH 8,8 ; SDS 0,1 %].

Le gel de concentration sert à concentrer les protéines en une bande fine afin que ces dernières arrivent au même moment dans la partie de séparation où le pourcentage d'acrylamide est plus élevé. En jouant sur le pourcentage en acrylamide de ce gel de «

séparation », on influence le degré de réticulation du gel et par conséquent le tamisage et donc la séparation des protéines. Le tampon de migration est basé sur celui décrit par le système de Laemmli [141] [Tris-HCl 25 mM, pH 8,3 ; Glycine 190 mM ; SDS 0,1 % (p/v)]. La migration s'effectue à voltage constant de 160 Volts. Des marqueurs de poids moléculaire colorés (Thermo scientific Fermentas, PageRuler™) sont mis à migrer simultanément afin de suivre la migration et définir le poids moléculaire des différentes protéines dans les échantillons que l'on veut analyser.

## 8.4 Transfert des protéines et méthode de western-blot

Cette technique consiste en la révélation de protéines en faisant appel à des anticorps dirigés contre la protéine que l'on souhaite révéler. Pour cela, on effectue au préalable un transfert de type électrophorétique sur une membrane de nitrocellulose des protéines qui ont été séparées par SDS-PAGE. L'interaction entre les protéines et la membrane est due en partie aux interactions entre les régions hydrophobes de la protéine et le polymère qui est lui même de nature hydrophobe.

Le type de transfert utilisé est dit de type « liquide ». Pour cela, nous plaçons dans une cassette un « sandwich » autour du gel composé d'un papier filtre, la membrane, le gel puis un autre papier filtre. Le tout préalablement incubé dans le tampon de transfert [Tris 25 mM, pH 8,8 ; Glycine 190 mM ; SDS 0.1 % (p/v) ; méthanol 20 % (p/v)] pendant 15 min. Ce sandwich est ensuite placé dans un module et dans un réservoir contenant de la glace et du tampon de transfert. L'appareil de transfert est ensuite refermé et une intensité de 350 mA/cm<sup>2</sup> est appliquée pendant une heure.

À la suite de cela, l'efficacité du transfert peut être contrôlée en faisant réagir pendant au moins cinq minutes la membrane avec une solution de rouge ponceau [Ponceau S 0,2 % (p/v) ; TCA 3 % (p/v) ; acide sulfosalicylique 3 % (p/v)] qui est un colorant qui interagit avec les résidus amines et les régions non-polaires des protéines. Le rinçage de la membrane à l'eau distillée permet la visualisation de bandes distinctes. Cette coloration dont la sensibilité est d'environ 250 ng de protéines peut être facilement éliminée et ne gêne donc en rien la suite de la technique de Western-blot.

Après vérification, la membrane est incubée avec une solution de saturation protéique composée de 5 % (p/v) de lait demi-écrémé dilué dans du PBS-tween [Phosphate Buffer Salin ; NaCl 137 mM ; KCl 2,7 mM ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM ; Tween 0,05 % (v/v) ; pH 7,4] pendant une heure afin de bloquer tous les sites aspécifiques. Ensuite, la membrane est incubée toute la nuit à 4 °C avec un mélange d'anticorps primaires de lapin : Hap4p (1/100.000<sup>ème</sup>) et Ade4p (1/100.000<sup>ème</sup>) dans la solution de saturation protéique. La membrane est ensuite lavée (3 fois pendant 10 min) au PBS-tween. Enfin, la membrane est incubée une heure dans l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire (1/5000<sup>ème</sup>) correspondant couplé à la HRP (Horse Radish Peroxydase) dans la solution de saturation protéique. La membrane est ensuite lavée (3 fois pendant 10 min) au PBS-tween. Les protéines sont immunodécorées avec les anticorps primaires et secondaires. Il faut alors révéler l'activité peroxydase de l'anticorps secondaire pour localiser la protéine d'intérêt. Cette révélation est effectuée avec le kit « ECL Plus western blotting detection system » de GR Healthcare. Son principe général repose sur la chimioluminescence, c'est-à-dire la libération de lumière par un ester d'acridium après que ce dernier ait été oxydé par du peroxyde. Cette réaction est catalysée par la peroxydase couplée à l'anticorps secondaire et la lumière est détectée en utilisant un film radiographique ( High performance autoradiography film Amersham Hyperfilm TM MP).

## 8.5 Microscopie électronique

Pour étudier l'ultrastructure des organites cellulaires (mitochondries), nous avons utilisé la technique de microscopie électronique à transmission (MET) sur des coupes de cellules. La préparation des échantillons a été réalisée par Bénédicte COULARY-SALIN (service de microscopie de l'IBGC) selon un protocole de congélation et substitution à froid. Les étapes principales sont les suivantes :

- Récolte des levures, à la fin de la cinétique de prolifération sur glucose (8h).
- Dépôt d'une partie du culot cellulaire sur une grille de microscopie électronique (grille de cuivre, 400 mesh, recouverte d'un film plastique en formvar)

- Congélation ultra-rapide dans du propane liquide, refroidi à -180 °C par de l'azote liquide.
- Transfert des grilles dans une solution de tétr oxyde d'osmium (4 % dans l'acétone pur), à -82 °C pendant 72h. Cette étape permet de substituer au milieu aqueux cellulaire le solvant (acétone) et le fixateur.
- Les échantillons sont ensuite progressivement amenés à température ambiante, permettant au tétr oxyde d'osmium de réagir, en tant qu'agent fixateur et contrastant. Cette étape est suivie de 3 lavages par l'acétone. On post-fixe les échantillons par l'acétate d'uryle (1 % dans l'acétone, 1h à 4 °C au noir), suivi de 3 lavages par l'acétone.
- Les échantillons sont progressivement imprégnés jusqu'à inclusion totale par l'araldite pure (résine epoxy, Fluka)
- Des coupes de 80 nm sont contrastées par du citrate de plomb avant d'être observées au SERCOMI (Université Bordeaux 2) avec un microscope Tecnai 12 Biotwin (120kV) (Philips).

# 3

PARTIE

## RÉSULTATS ET DISCUSSIONS





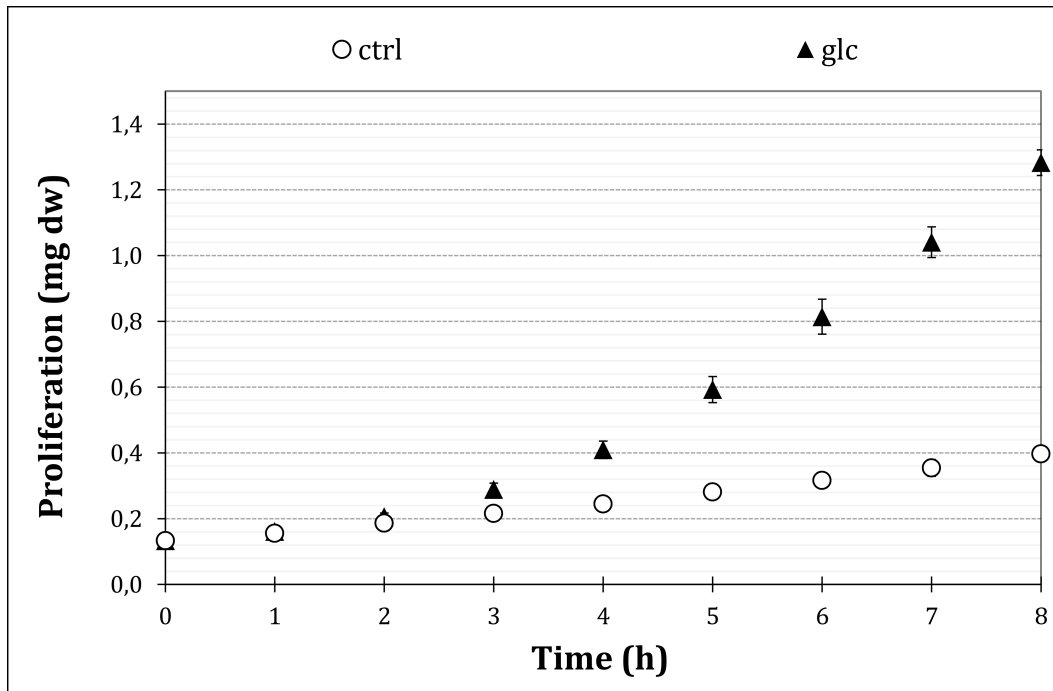
# Cinétique d'induction de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae* (WT)

## 9.1 Caractérisation de l'effet Warburg dans le modèle d'étude (Euroscarf BY4742)

### 9.1.1 L'influence de l'ajout de glucose sur la prolifération cellulaire de *S. cerevisiae*

Pour mettre en évidence l'effet de l'ajout de glucose sur la vitesse de prolifération de *S. cerevisiae* (BY4742), nous avons suivi pendant huit heures, l'évolution de la quantité de biomasse après l'ajout du glucose dans le milieu de culture (**Figure 9.1**).

Dans la **figure 9.1**, les (○) représentent l'évolution de la quantité de biomasse de *S. cerevisiae*, dans un milieu de culture avec le lactate (2 %) comme seul substrat carboné. Dans ces conditions de culture, nous observons que sur huit (8) heures d'incubation, la quantité de biomasse passe d'environ 0,13 mg poids sec à environ 0,4 mg poids sec, soit une augmentation de 208 %.

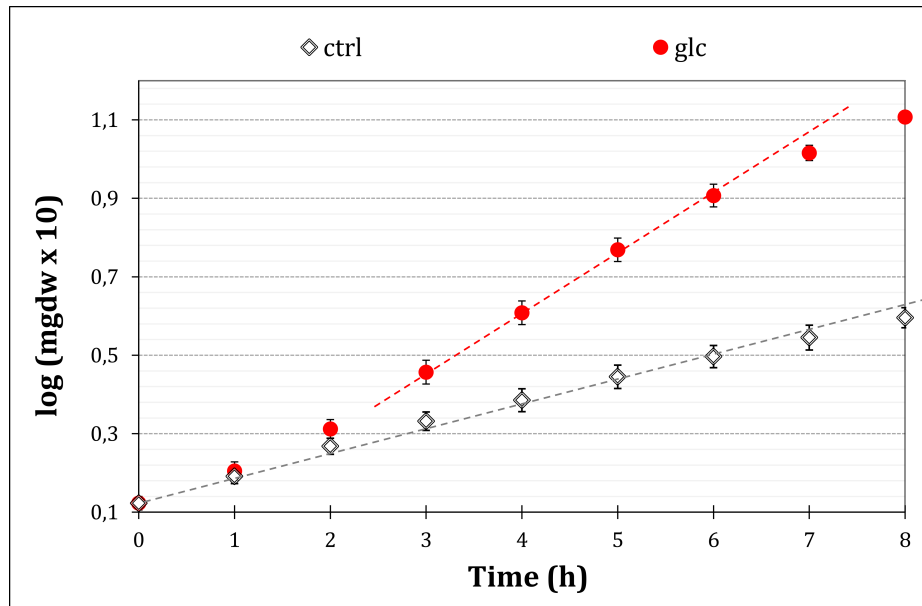


**Figure 9.1 – Effet du glucose sur la prolifération de *S. cerevisiae*.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (▲) ou non (○) au milieu de culture. Un suivi de croissance est réalisé sur huit (8) heures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

Après l'ajout de glucose au milieu de culture (▲), nous observons que sur la même période (8h), la quantité de biomasse en présence de glucose passe d'environ 0,13 mg poids sec à environ 1,28 mg poids sec, soit une augmentation de 880 %.

La croissance des cellules de *S. cerevisiae* est de type exponentielle. Pour distinguer les différentes phases d'évolution de la vitesse de prolifération, après l'ajout du glucose, nous avons déterminé la courbe de croissance de *S. cerevisiae* ( $\log(\text{mg pds}) = f(t)$ ) (**Figure 9.2**).

Les (◇) de la **figure 9.2**, présentent l'évolution de la courbe de croissance des cellules de *S. cerevisiae* en absence de glucose (lactate 2 %). La linéarité de la courbe de croissance de *S. cerevisiae* en présence du lactate comme seule substrat, reflète le fait, que la vitesse de prolifération des cellules de *S. cerevisiae* est constante durant toute la cinétique.



**Figure 9.2 – Cinétique d'évolution de la vitesse de prolifération de *S. cerevisiae*, après l'ajout du glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (●) ou non (◇) au milieu de culture. Un suivi de croissance (poids sec) est réalisé sur huit (8) heures. Puis un calcul de la valeur du log (courbe de croissance) de la quantité de cellules produites après chaque heure est réalisé pendant la cinétique (8h) (voir Matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

Or, après l'ajout de glucose au milieu de culture, nous observons une modification de la courbe de croissance (●) par rapport au contrôle (◇). Le calcul de la vitesse spécifique de croissance ( $\mu$ ) à partir de cette courbe (pente de la fonction  $\log(mgpd_s) = f(t)$ ) met en évidence une augmentation significative de la vitesse de prolifération des cellules après l'ajout du glucose (**Tableau 9.1**).

Tableau 9.1 – Évolution de la vitesse spécifique de croissance de *S. cerevisiae* (WT) après l'ajout du glucose.

<i>Temps (h)</i>	$\mu \text{ h}^{-1}$
(sans glucose)	0,14 ± 0,01
1	0,19 ± 0,03
2	0,25 ± 0,02
3	0,33 ± 0,02
4	0,35 ± 0,03
5	0,37 ± 0,03
6	0,32 ± 0,01
7	0,25 ± 0,03
8	0,21 ± 0,02

L'analyse de la courbe de croissance des cellules sauvages, après l'ajout du glucose, montre que la vitesse de production de biomasse passe par trois phases différentes :

- La première phase entre l'ajout du glucose et jusqu'à trois heures après. Durant cette phase, la vitesse de production de biomasse augmente progressivement (phase d'accélération). Il s'agit de la phase d'adaptation, durant laquelle les cellules réalisent probablement les réaménagements métaboliques et moléculaires nécessaires au métabolisme du glucose.
- La deuxième phase entre trois heures et jusqu'à six heures après l'ajout du glucose. Durant cette phase, la vitesse de production de biomasse est très rapide, c'est la phase exponentielle.
- La troisième phase à partir de six heures après l'ajout du glucose. Durant cette phase, la vitesse de prolifération diminue légèrement. Dans une culture cellulaire avec un milieu de culture non renouvelé, une diminution de la vitesse de prolifération cellulaire est généralement constatée après la phase exponentielle. Ceci est dû à plusieurs facteurs, tel que l'épuisement du milieu de culture, l'accumulation des toxines et le vieillissement des cellules.

## 9.1.2 Consommation de glucose

### 9.1.2.1 Mise en évidence de la consommation de glucose

Dans nos conditions expérimentales, deux substrats carbonés sont disponibles pour les cellules : le glucose (70 mM) et le lactate (2 %). Chez *S. cerevisiae*, comme pour le glucose, le passage du lactate à travers la membrane plasmique est réalisé exclusivement, à travers des perméases transmembranaires de mono-carboxylates (lactate, pyruvate, etc), nommés Jen1p [41].

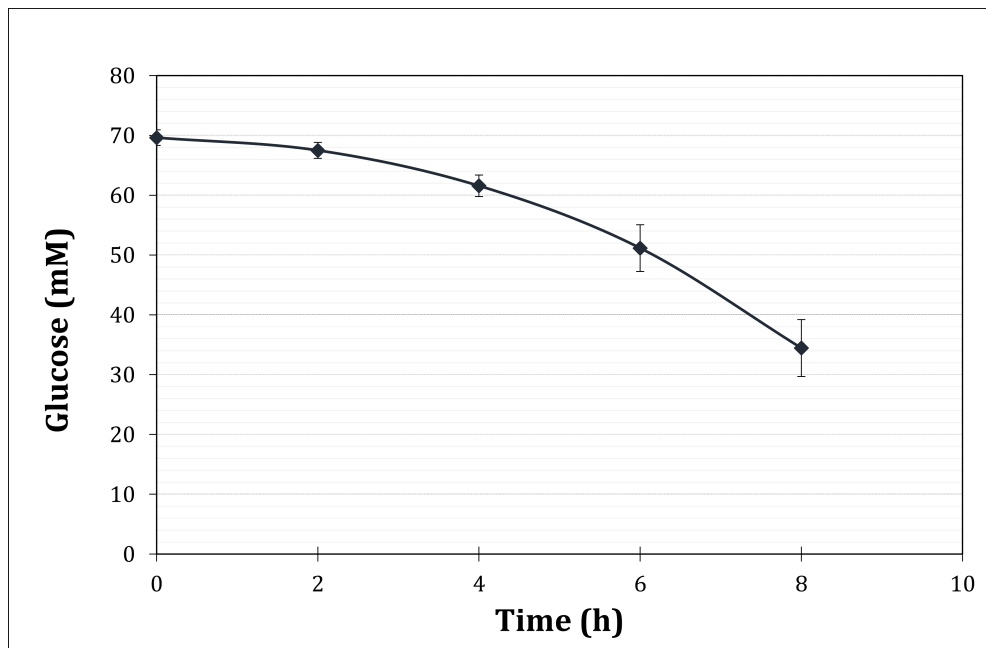
Dans la littérature, il a été montré que l'ajout du glucose au milieu de culture induit chez *S. cerevisiae* :

- ✓ La répression catabolique des gènes qui codent pour les enzymes du métabolisme du lactate (*CYB2*, *DLD1*, *CYC1*) ainsi que le gène *JEN1* qui code pour Jen1p [148] ;
- ✓ La dégradation de l'ARNm du *JEN1* [7, 6] ;
- ✓ L'endocytose des transporteurs Jen1p [191].

Ceci se traduit très rapidement par une répression du métabolisme du lactate. Dans nos conditions de culture, les cellules devraient donc utiliser préférentiellement le glucose comme substrat carboné, après son ajout au milieu de culture.

Cependant, malgré la disponibilité du glucose à une concentration importante, le métabolisme du lactate n'est pas complètement réprimé. Les cellules de *S. cerevisiae* continuent à métaboliser partiellement le lactate. En effet, des résultats préliminaires de notre laboratoire, ont montré que dans ces conditions de culture, l'inhibition du complexe III de la chaîne respiratoire par l'antimycine n'induit pas un arrêt complet du flux de transfert des électrons vers l'oxygène, les cellules conservent environ 25 % du flux respiratoire initial. Ce flux respiratoire en aval du complexe III, est dû à l'oxydation du lactate par les L/D lactate déshydrogénases mitochondriales (**voir chapitre 4**).

La quantification du glucose dans le milieu de culture, (**Figure 9.3**) montre une diminution de la quantité de ce dernier au cours du temps. Huit heures après l'ajout de glucose, les cellules ont consommé environ la moitié du glucose ajouté.

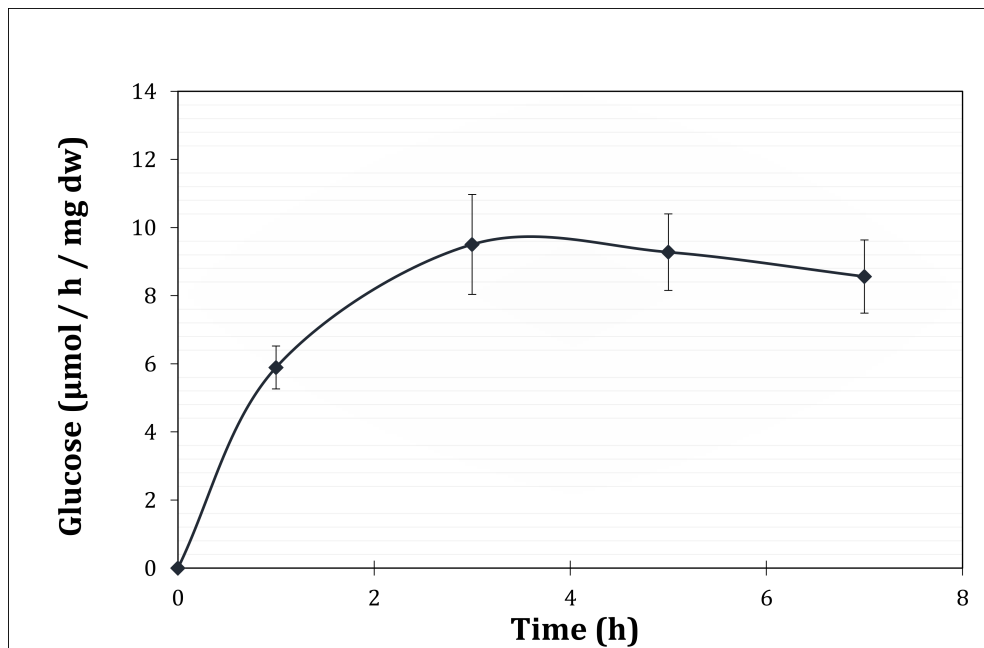


**Figure 9.3 – Dosage du glucose dans le milieu extra-cellulaire.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée au milieu de culture. Un dosage de la concentration de glucose restant dans le milieu de culture est réalisé par méthode enzymatique chaque deux (2) heures, pendant la cinétique (8h) (voir Matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=4$ .

### 9.1.2.2 Flux de consommation de glucose

Dans la figure 9.4 nous constatons une augmentation progressive du flux de consommation de glucose, avec une valeur maximale environ quatre heures après l'ajout du glucose. Au-delà, le flux de consommation de glucose reste constant et très comparable à celui du point 4h.

La glycolyse est la voie de recrutement du glucose dans le métabolisme énergétique et intermédiaire, la plupart des intermédiaires de cette voie métabolique sont substrats des voies de biosynthèse (voir chapitre 1). L'augmentation du flux de consommation du glucose observée suggère une augmentation du flux de ce dernier à travers la glycolyse.



**Figure 9.4** – Évolution du flux de consommation de glucose chez *S. cerevisiae*, après l'ajout du glucose. Chaque point représente la moyenne de quantité de glucose consommé exprimée en micromole par heure par milligramme poids sec de cellules, sur un intervalle de deux (2) heures (voir matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

### 9.1.3 Mise en évidence du métabolisme fermentaire en aérobiose, après l'ajout du glucose

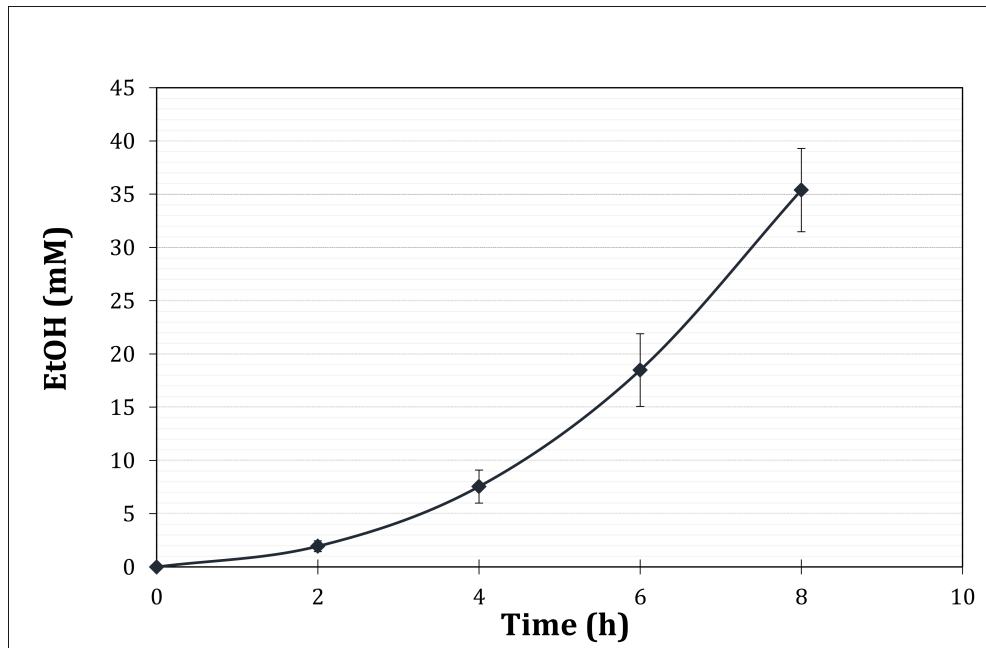
Afin de mettre en évidence un éventuel déclenchement du métabolisme fermentaire, nous avons déterminé la concentration en éthanol du milieu de culture.

Le dosage de l'éthanol dans le milieu de culture (**Figure 9.5**) montre que la diminution de la concentration de glucose est accompagnée d'une augmentation de la concentration de l'éthanol.

Dans nos conditions, l'apparition de l'éthanol dans le milieu de culture ne peut provenir que de la fermentation de glucose. Car le lactate est un substrat non fermentescible.

Nos résultats montrent donc que l'ajout du glucose au milieu de culture induit le déclenchement d'un métabolisme fermentaire en aérobiose. Ceci est couplé à une augmentation significative de la vitesse de production de biomasse.

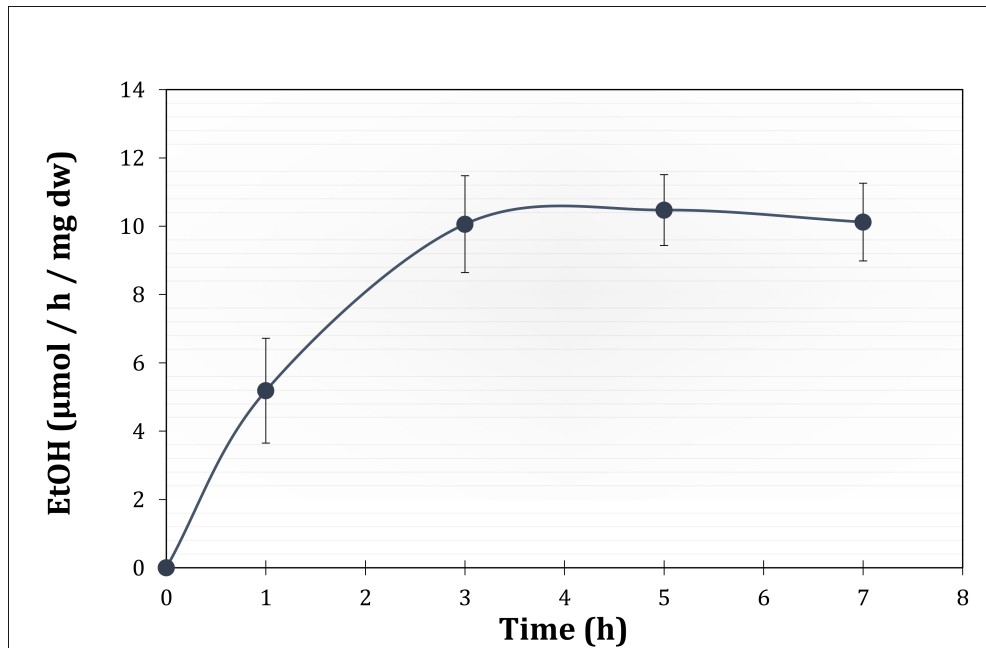




**Figure 9.5 – Dosage de l'éthanol dans le milieu extra-cellulaire.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée au milieu de culture. Un dosage de la concentration de l'éthanol dans le milieu de culture est réalisé par méthode enzymatique chaque deux (2) heures, pendant la cinétique (8h) (voir Matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=4$ .

Chez notre modèle d'étude (BY4742), la mesure du flux de production d'éthanol en fonction du temps (**Figure 9.6**) montre que ce dernier suit la même tendance que le flux de consommation de glucose.

Dans la **figure 9.6**, nous observons que le flux de production d'éthanol augmente progressivement au cours du temps, jusqu'à atteindre une valeur maximale à environ quatre heures après l'ajout du glucose. Au-delà, durant le reste de la cinétique, le flux de production d'éthanol reste relativement constant et très comparable au flux du point 4h.



**Figure 9.6** – Évolution du flux de production d'éthanol chez *S. cerevisiae*, après l'ajout du glucose. Chaque point représente la moyenne de quantité d'éthanol produit exprimée en micromole par heure par milligramme poids sec de cellules, sur un intervalle de deux (2) heures (voir matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

La comparaison des résultats du flux de consommation de glucose et de production d'éthanol (**Tableau 9.2**), montre que ces deux derniers sont presque égaux. En effet, le calcul du rapport entre les deux flux montre que celui-ci est proche de 1, quel que soit le flux de consommation de glucose ou la phase de croissance cellulaire.

Au niveau de la fermentation, la stœchiométrie de l'oxydation du glucose en éthanol est une molécule de glucose pour deux molécules d'éthanol. Les résultats du **tableau 9.2**, montrent que durant toute la cinétique, environ 50 % du flux total de la glycolyse est dirigé vers la production de l'éthanol (métabolisme fermentaire). Le reste du flux est donc utilisé pour alimenter en substrat les voies de biosynthèse et/ou la respiration mitochondriale.

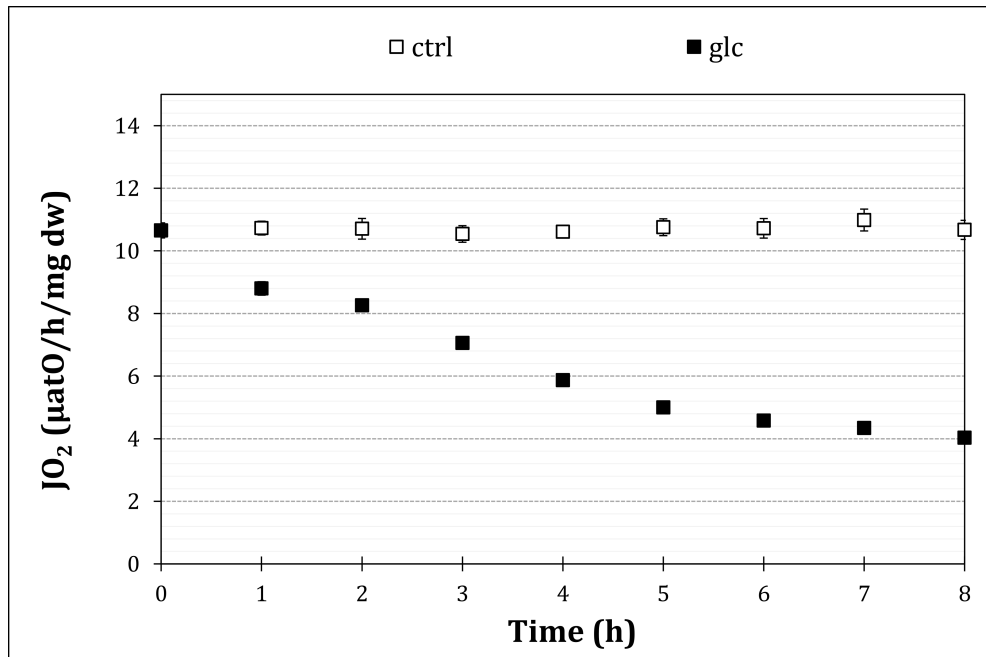
**Tableau 9.2 – Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez *S. cerevisiae* après l'ajout du glucose.** Le rapport flux éthanol/flux glucose est obtenu par la division des valeurs du flux de production d'éthanol par celles du flux de consommation de glucose correspondants. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Temps (h)	EtOH ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Glc ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Rapport
0h – 2h	5,18 $\pm$ 1,54	5,89 $\pm$ 0,63	0,82 $\pm$ 0,16
2h – 4h	10,06 $\pm$ 1,42	9,50 $\pm$ 1,47	1,12 $\pm$ 0,14
4h – 6h	10,47 $\pm$ 1,04	9,28 $\pm$ 1,12	1,18 $\pm$ 0,15
6h – 8h	10,12 $\pm$ 1,14	8,56 $\pm$ 1,07	1,26 $\pm$ 0,25

#### 9.1.4 Évolution du flux de la respiration mitochondriale de *S. cerevisiae*

Si la fermentation du glucose en condition aérobie est universelle pour toutes les cellules présentant un effet Warburg, les recherches scientifiques récentes sur les différents types de cellules tumorales n'ont pas permis de caractériser une anomalie commune du métabolisme respiratoire [83, 171, 264]. Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, les atteintes du métabolisme respiratoire dans les cellules tumorales sont hétérogènes. Toutefois, un flux respiratoire diminué par rapport à la normale est souvent mis en évidence dans les cellules présentant un effet Warburg [264].

Les (□) dans la **figure 9.7** montrent le flux de respiration endogène de *S. cerevisiae* en présence du lactate (2 %) comme seul substrat carboné. Dans ces conditions de culture, la levure *S. cerevisiae* utilise la voie des oxydations phosphorylantes (OXPHOS) comme seule voie de production d'énergie. Les cellules présentent un flux de consommation d'oxygène constant, d'environ 11  $\mu\text{atO/h/mg pds sec}$ .



**Figure 9.7 – Effet du glucose sur la respiration de *S. cerevisiae*.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (■) ou non (□) au milieu de culture. Un suivi de la respiration par oxygraphie est réalisé sur huit (8) heures. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Après de l'ajout du glucose au milieu de culture, nous observons une diminution progressive du flux respiratoire endogène (■), et cela durant toute la cinétique. L'analyse de la courbe de tendance de la respiration après l'ajout du glucose montre que la diminution de la respiration au cours du temps n'est pas linéaire : entre l'ajout de glucose et jusqu'à cinq heures après, la diminution de la respiration est nettement plus importante par rapport à celle observée après le point 5h.

## ☛ *Le glucose induit la mise en place de l'effet Warburg chez la levure S. cerevisiae*

Après l'ajout du glucose dans le milieu de culture, nous avons pu caractériser dans notre modèle d'étude BY4742 :

- ➔ Une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire ;
- ➔ Une consommation importante de glucose ;
- ➔ La fermentation du glucose en éthanol en aérobiose ;
- ➔ Une diminution de la vitesse de respiration mitochondriale.

Comme présenté dans l'introduction, ces quatre caractéristiques sont typiques de la glycolyse aérobie [249]. Le phénotype que notre modèle BY4742 développe après l'ajout du glucose correspond donc bien à la glycolyse aérobie (i.e. effet Warburg).

*L'ajout de glucose au milieu de culture (70 mM) induit chez S. cerevisiae (modèle BY4742) la mise en place de la glycolyse aérobie (effet Warburg).*

## 9.2 Étude du métabolisme énergétique de *S. cerevisiae* après l'ajout du glucose

Chez les cellules cancéreuses qui présentent un effet Warburg, le métabolisme énergétique (glycolyse et respiration mitochondriale) est au centre des adaptations métaboliques et moléculaires permettant de promouvoir la prolifération cellulaire.

Le système d'oxydation du glucose est formé de trois voies métaboliques principales : la glycolyse, la respiration mitochondriale et la fermentation lactique/alcoolique. Ces trois voies métaboliques sont étroitement liées d'un point de vue régulation thermodynamique de flux. Quelles que soient les modulations enzymatiques, qualitative (expression d'autres isoformes) ou quantitative, le système d'oxydation du glucose reste toujours soumis aux contraintes du potentiel redox cytosolique ( $\Delta G'_{ox-red}$ ), déterminé par le rapport NADH/NAD<sup>+</sup> et du potentiel phosphate ( $\Delta G'_{p}$ ), déterminé par le rapport ATP/ADP, Pi.

En règle générale, la production de l'éthanol/lactate en aérobiose dans les cellules pourvues de mitochondries fonctionnelles, n'a lieu que si les mitochondries n'arrivent pas à réoxyder tout le NADH produit au niveau de la glycolyse. La fermentation a pour première fonction le maintien de l'état redox (NADH/NAD<sup>+</sup>) cytosolique en faveur du flux de la glycolyse et cela par la réduction du pyruvate issu de la glycolyse en éthanol/lactate.

Dans nos conditions de prolifération sur glucose, en raison de l'augmentation de flux de la glycolyse, le NADH cytosolique issu de l'oxydation du glucose en pyruvate augmente.

Chez *S. cerevisiae*, la réoxydation du NADH cytosolique par le système des OXPHOS est assurée par deux déshydrogénases (Nde1p/2p) liées à la face externe de la membrane interne mitochondriale. Contrairement aux cellules pourvues de complexe I, ou l'oxydation du NADH cytosolique se fait par le biais du système de navette malate/aspartate et glycérol-3-phosphate, chez *S. cerevisiae*, l'oxydation du NADH cytosolique se fait directement dans l'espace intermembranaire mitochondrial par Nde1p/2p [8]. Sur des mitochondries isolées, il a été montré que dans les conditions d'abondance de plusieurs substrats respiratoires, que ce soit à l'état phosphorylant ou à l'état non-phosphorylant, Nde1p/2p sont prioritaires pour transférer leurs électrons aux quinones, par rapport aux autres déshydrogénases de la chaîne respiratoire (Ndip, Gut2p) [205, 32]. Cette propriété cinétique des Nde1p/2p permet aux cellules de *S. cerevisiae* de réoxyder prioritairement le NADH cytosolique issue de la glycolyse par rapport aux autres substrats respiratoires (éthanol, glycérol, NADH matriciel, etc.).

La réoxydation du NADH cytosolique par le processus de la fermentation alcoolique est catalysé par l'alcool déshydrogénase (ADH). Par rapport à la respiration mitochondriale, la particularité du processus de fermentation alcoolique, est que ce dernier est non couplé à une synthèse d'ATP.

Cependant, bien que le système des OXPHOS de *S. cerevisiae* joue un rôle pour le maintien de l'état redox cytosolique et présente l'avantage de coupler la réoxydation du NADH et synthèse d'ATP, l'activité du système des OXPHOS semble diminuer, et les cellules de *S. cerevisiae* fermentent le glucose en éthanol.

D'un point de vue de l'homéostasie métabolique, la tendance des cellules à fermenter le glucose en aérobiose répond à une diminution des capacités respiratoires. Les cellules fermentent le glucose en éthanol afin de maintenir l'homéostasie de l'état redox cytosolique et permettre ainsi la poursuite de la glycolyse. Cette explication "simpliste" de la fermentation de glucose en aérobiose chez les cellules en proliférations a été proposée il y a plus de 60 ans par Otto Warburg [249].

Toutefois, la complexité du processus de la répression glucose chez *S. cerevisiae*, nous amène à penser qu'il y a un intérêt physiologique derrière cette tendance métabolique des cellules de *S. cerevisiae*, surtout que les gènes responsables de la biogenèse mitochondriale (*HAP4*) font partie des gènes soumis à la répression par le glucose [39, 128].

Le couplage entre l'augmentation de la vitesse de prolifération et la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae* nous amène à poser la même question relative au phénomène de l'effet Warburg chez les cellules tumorales :

*Quelles est la relation entre la glycolyse aérobie (effet Warburg) et la vitesse de prolifération rapide ?*

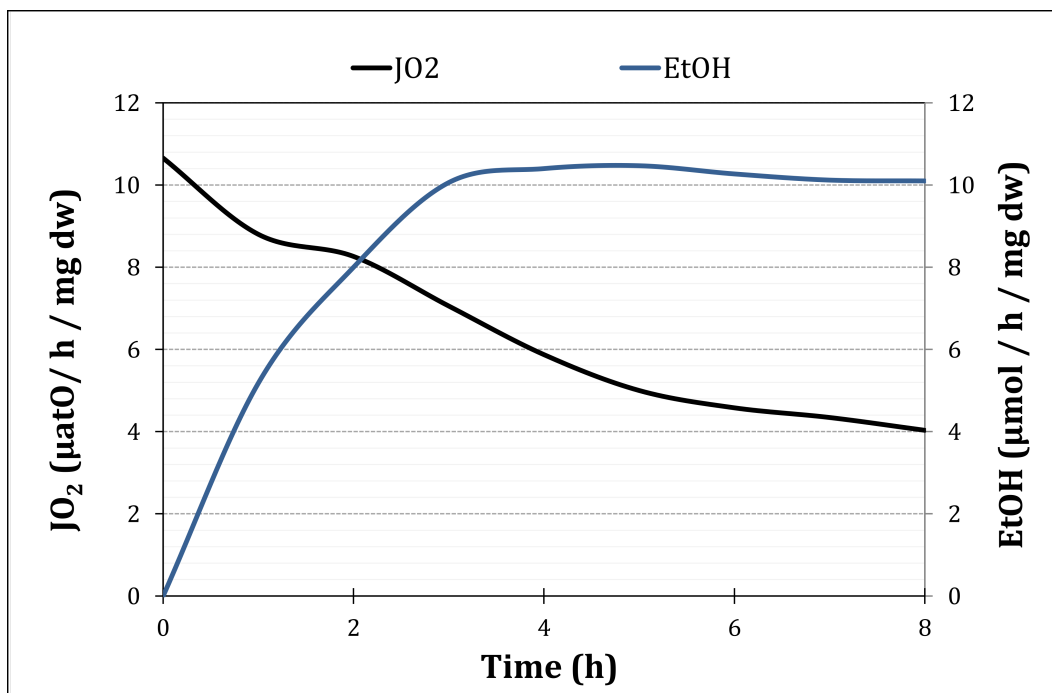
Pour adapter ce questionnement à notre modèle d'étude, nous avons posé la question relative au phénomène de l'effet Warburg de la façon suivante :

*Quel intérêt pour les cellules de *S. cerevisiae* de réduire le flux respiratoire et favoriser le processus de la fermentation alcoolique, lors de la prolifération sur glucose ?*

**Remarque :** *la régulation de l'apport de substrat respiratoire et l'échange à travers les porines (fermeture/ouverture) entre la mitochondrie et le cytosol est un sujet de discussion. Dans nos conditions de prolifération sur glucose, dans la mesure où la fermeture des porines peut non seulement réduire le passage du NADH cytosolique, mais aussi les autres intermédiaires métaboliques nécessaires à la synthèse de biomasse notamment l'acétyl-CoA et le citrate, ce qui peut créer un nombre de contraintes pour un métabolisme prolifératif, nous supposons pour la suite de notre discussion qu'il n'y a pas de restriction de passage de substrats à travers les porines.*

### 9.2.1 La réoxydation du NADH cytosolique : respiration mitochondriale Vs fermentation alcoolique

La comparaison entre les valeurs de respiration et celles du flux de production d'éthanol enregistrées au cours de la cinétique (voir **figure 9.8**) met en évidence une relation inverse entre les deux flux. Nous constatons que la diminution de flux de consommation de l'oxygène après l'ajout du glucose est accompagné d'une augmentation de flux de production de l'éthanol.

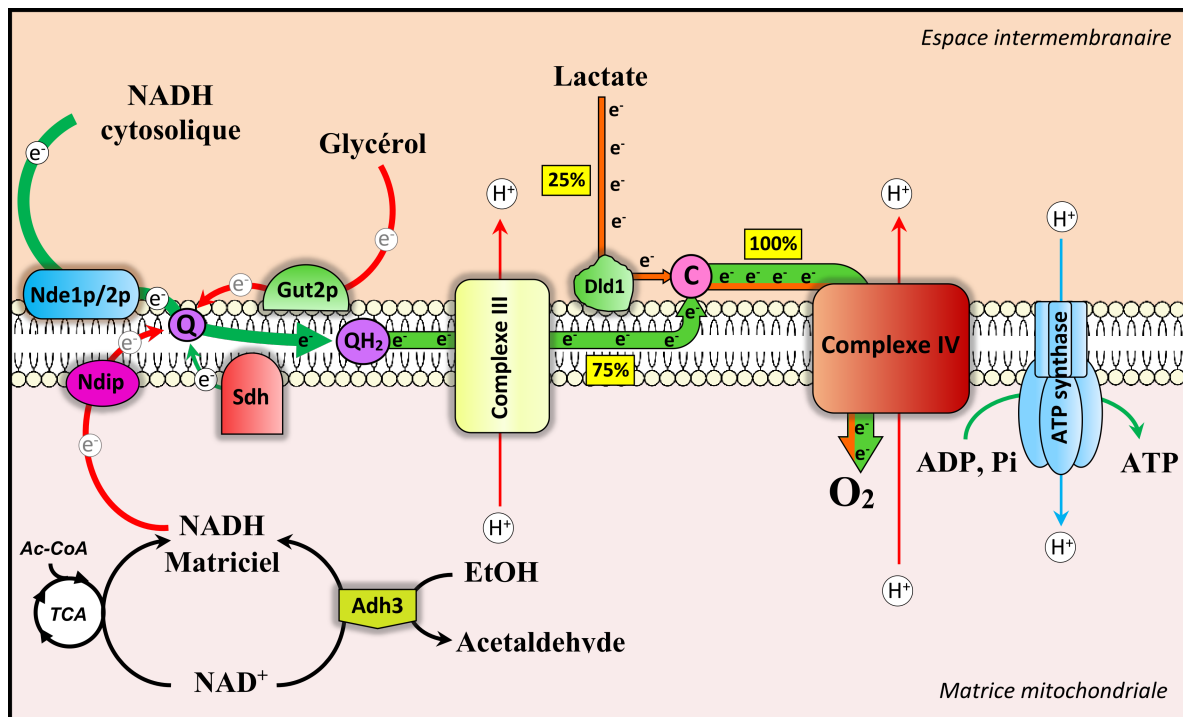


**Figure 9.8 – Tendence d'évolution du flux du métabolisme oxydatif et fermentaire chez *S. cerevisiae*, après l'ajout du glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée au milieu de culture. Un suivi de la respiration par oxygraphie est réalisé sur huit (8) heures (—). La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Le flux de production d'éthanol (—) est présenté sous forme de la moyenne de quantité de glucose consommé par mg poids sec de cellules par heures sur un intervalle de deux (2) heures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM); Respiration :  $n=5$ ; Fermentation :  $n=4$ .

Dans nos conditions de prolifération sur glucose, plusieurs substrats respiratoires sont disponibles pour la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* : le NADH cytosolique, le NADH matriciel issu de l'oxydation du pyruvate au niveau du cycle de Krebs, l'éthanol produit de la fermentation du glucose, le glycérol et le lactate. La **figure 9.9** illustre l'origine et la



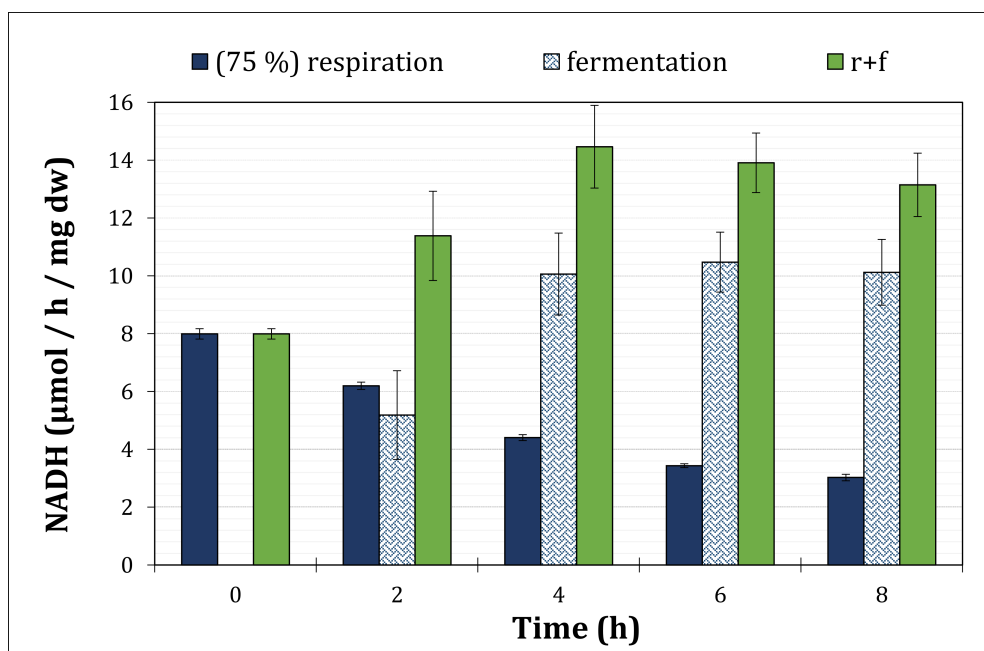
répartition du flux des électrons à travers la chaîne respiratoire vers l'oxygène (accepteur final), dans nos conditions de culture. Le flux total de la respiration mitochondriale (consommation d'oxygène) est formé à partir de deux flux de transfert d'électrons : un flux qui provient de l'oxydation du lactate (environ 25 % du flux total) et un flux qui provient principalement de l'oxydation du NADH cytosolique (environ 75 % du flux total).



**Figure 9.9 – Origine de flux des électrons à travers la chaîne respiratoire dans les conditions de disponibilité de plusieurs substrats.** Plusieurs substrats respiratoires sont disponibles pour les déshydrogénases de la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae*. En amont du complexe III, *Nde1p/2p* et la succinate déshydrogénase (*Sdh*) sont prioritaires pour transférer leurs électrons aux quinones par rapport au *Ndpip* et *Gut2p* [32, 205]. Bien que la *Sdh* peut participer au flux des électrons à travers la chaîne respiratoire (absence de compétition dans le transfert des électrons avec *Nde1p/2p*), son fonctionnement est dépendant de l'état redox de la matrice mitochondriale, qui elle-même dépend de la capacité de *Ndpip* à réoxyder le NADH. De ce fait, dans des conditions d'abondance de NADH cytosolique, le flux des électrons vers le complexe III provient principalement de l'oxydation de ce dernier par *Nde1p/2p*. En aval du complexe III, la L et D lactate déshydrogénase (*Dld1*) couplent la conversion du lactate en pyruvate au transfert d'électrons vers le cytochrome c [173]. Ce dernier se charge du transport des électrons provenant à la fois du complexe III et à la fois des *Dld1* vers le complexe IV puis vers l'oxygène l'accepteur final d'électrons. Des travaux dans le laboratoire ont montré dans ces conditions (après l'ajout du glucose), qu'environ 25 % du flux total des électrons vers l'oxygène provient en aval du complexe III à partir de l'oxydation du lactate. Tandis que le reste (75 %) provient en amont du complexe III.

Dans ces conditions, 1) le NADH cytosolique est abondant, 2) l'oxydation de ce dernier est prioritaire au niveau de la chaîne respiratoire et 3) le flux respiratoire des cellules est principalement dû à l'oxydation du NADH cytosolique. La diminution du flux respiratoire dans les cellules sauvages implique donc que le flux de réoxydation du NADH cytosolique par le système des OXPHOS est diminué.

La stœchiométrie de l'oxydation du NADH cytosolique est une molécule de NADH pour une molécule d'éthanol produit pour la fermentation alcoolique et une molécule de NADH pour un atome d'oxygène consommé pour la respiration mitochondriale. À partir des résultats du flux de production d'éthanol et de consommation d'oxygène, nous avons calculé le flux de réoxydation du NADH assuré par ces deux mécanismes au cours de la mise en place de l'effet Warburg (**Figure 9.10**).



**Figure 9.10** – Flux d'oxydation de NADH assuré par les deux systèmes : OXPHOS et fermentation. Le flux d'oxydation de NADH de chaque voie métabolique est calculé à partir des flux respiratoire et de production d'éthanol, selon le bilan de stœchiométrie suivant : 1 NADH oxydé  $\frac{1}{2}$  O<sub>2</sub> consommé pour la respiration et 1 NADH oxydé : 1 EtOH produit pour la fermentation. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ; n=5.

Les cellules sauvages de *S. cerevisiae* semblent favoriser l'oxydation du NADH cytosolique par un processus non couplé à la synthèse d'ATP (la fermentation alcoolique).

En effet, d'après la figure ci-dessus, le processus de la fermentation alcoolique (flux maximum) peut assurer un flux de réoxydation du NADH cytosolique comparable à la capacité du système des OXPHOS au point T0 (sans glucose).

Chez *S. cerevisiae*, la production du glycérol à partir des intermédiaires de la glycolyse (DHAP), est aussi un mécanisme permettant aux cellules de réoxyder le NADH cytosolique. Cette réaction catalysée par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase, consiste à la conversion du DHAP en glycérol-3-phosphate, avec oxydation concomitante d'un NADH cytosolique en NAD<sup>+</sup> [56]. La quantification du glycérol pourrait nous permettre d'évaluer plus précisément la capacité globale cellulaire de réoxydation du NADH cytosolique. Toutefois, ce résultat n'aura pas d'influence sur notre raisonnement, concernant la tendance des cellules à favoriser un processus non couplé à la synthèse d'ATP pour l'oxydation du NADH cytosolique.

Cette relation inverse entre le flux respiratoire et le flux de production d'éthanol soulève la question suivante :

- ☞ Quel(s) avantage(s) pour les cellules de *S. cerevisiae* de favoriser la fermentation alcoolique pour réoxyder le NADH cytosolique, au détriment du processus de la respiration mitochondriale ?

### 9.2.2 La fermentation du glucose en aérobiose, pourquoi les cellules recourent à un tel métabolisme ?

Le rapport ATP/ADP est le principal régulateur du flux de la glycolyse. La tendance des cellules de *S. cerevisiae* à favoriser la réoxydation du NADH cytosolique par un processus non couplé à la synthèse d'ATP (la fermentation alcoolique), nous amène à aborder la question du rapport ATP/ADP des cellules.

La quantification de l'ATP et l'ADP cellulaires au cours de la cinétique (**Tableau 9.3**) montre que la concentration d'ATP ne subit aucune modification après l'ajout du glucose. Durant toute la cinétique (8h), la concentration de l'ATP reste constante et comparable au contrôle. Quant à l'ADP, la concentration de ce dernier diminue d'environ 40 % après l'ajout du glucose.

**Tableau 9.3 – Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP au cours de la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*.** Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

<i>Temps (h)</i>	<i>ATP (mM)</i>	<i>ADP (mM)</i>	<i>Ratio (ATP/ADP)</i>
0	4,51 $\pm$ 0,29	0,98 $\pm$ 0,10	4,74 $\pm$ 0,44
2	4,46 $\pm$ 0,36	0,81 $\pm$ 0,12	5,71 $\pm$ 0,46
4	4,22 $\pm$ 0,37	0,62 $\pm$ 0,09	7,06 $\pm$ 0,49
6	4,42 $\pm$ 0,11	0,57 $\pm$ 0,03	7,83 $\pm$ 0,24
8	4,45 $\pm$ 0,23	0,65 $\pm$ 0,03	6,86 $\pm$ 0,16

La diminution de la concentration d'ADP cellulaire provoque une augmentation de rapport ATP/ADP qui passe de 4,7 avant l'ajout de glucose à environ 7 quatre heures après l'ajout du glucose, soit une augmentation de 30 %.

Les résultats du **tableau 9.3** mettent en évidence une augmentation du rapport ATP/ADP des cellules, malgré 1) l'augmentation significative de la vitesses de prolifération (consomment plus d'ATP) et 2) la diminution significative du flux de synthèse d'ATP mitochondrial (respiration).

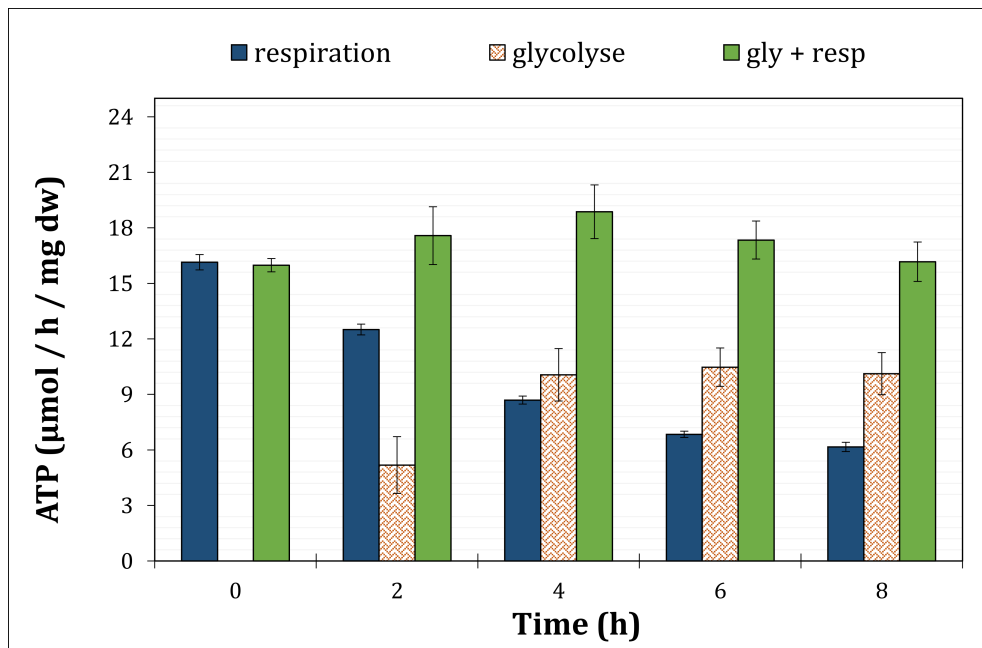
Tous comme le processus de la respiration mitochondriale, la glycolyse est une source d'ATP (**voir figure 1.1**). Après l'ajout du glucose, l'augmentation du flux de la glycolyse a pour conséquence :

- 1) une augmentation de la proportion de l'ATP glycolytique ;
- 2) une augmentation de l'état redox cytosolique (réduction du NAD<sup>+</sup>).

La **figure 9.11** présente le flux théorique de production d'ATP, calculé à partir du flux de la respiration mitochondriale et de production d'éthanol selon le bilan d'oxydation :  $1/2 O_2$  : 1,5 ATP pour la respiration et 1 glc : 2 pyruvate : 2 ATP pour la glycolyse. En effet, bien que la participation de la glycolyse dans la synthèse d'ATP peut être plus importante que notre estimation à partir de flux de production d'éthanol, le calcul du flux d'ATP glycolytique à partir du flux d'éthanol est motivé par :

- ☞ La glycolyse est une source importante d'intermédiaires métaboliques. Une partie du glucose consommé n'est pas complètement métabolisé en pyruvate, mais elle est dirigée vers d'autres voies métaboliques (voie des pentoses phosphates, synthèse des lipides et synthèse d'acides aminés).
- ☞ Le calcul du flux d'ATP glycolytique à partir du flux d'éthanol nous permet, d'avoir le flux minimal assuré par la voie de la glycolyse.

Dans la **figure 9.11**, nous observons que la participation de la glycolyse dans la synthèse d'ATP devient importante après l'ajout du glucose. En effet, la comparaison entre le flux de synthèse d'ATP à partir de la glycolyse ( $V_s$ ) la respiration mitochondriale, montre qu'en présence de glucose, le flux de synthèse d'ATP mitochondrial diminue et le flux d'ATP glycolytique augmente au cours du temps, d'une façon à que ce dernier devient progressivement plus important que le flux d'ATP mitochondrial. Toutefois, les cellules semblent maintenir le même flux de synthèse d'ATP (minimal-total) durant toute la cinétique, seule la balance entre l'ATP mitochondrial et l'ATP glycolytique qui change.

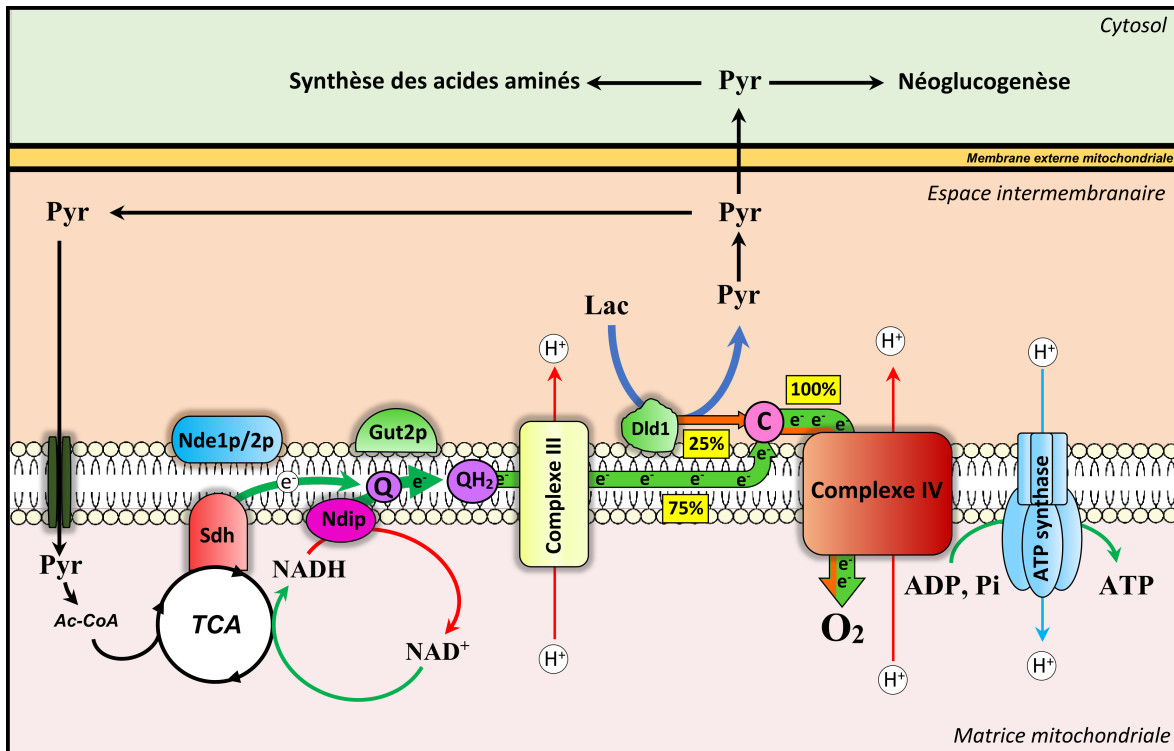


**Figure 9.11** – Flux de synthèse d'ATP assuré par la glycolyse et les OXPHOS dans la souche sauvage de *S. cerevisiae*, après l'ajout de glucose. Le flux de production d'ATP de chaque voie métabolique est calculé à partir des flux respiratoire et de production d'éthanol selon le bilan d'oxydation :  $\frac{1}{2} \text{O}_2$  : 1,5 ATP pour la respiration et 1 glc : 2 pyruvate : 2 ATP pour la glycolyse. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

### 9.3 Le métabolisme énergétique de *S. cerevisiae*, avant et après l'ajout du glucose

Dans nos conditions contrôle (lactate 2 %), les cellules utilisent uniquement le lactate comme source de carbone et d'énergie pour proliférer. Sur lactate, la synthèse d'ATP se fait principalement par le système des OXPHOS (**Figure 9.12**). Le métabolisme de ce dernier est initié dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le pyruvate produit de l'oxydation du lactate est soit complètement oxydé au niveau du cycle krebs pour donner les équivalents réducteurs (NADH, FADH<sub>2</sub>) substrats de la chaîne respiratoire, soit servir de substrat pour les voies de biosynthèse.

Après l'ajout du glucose, les cellules de *S. cerevisiae* métabolisent le glucose et la voie de la glycolyse devient plus active. L'oxydation du glucose au niveau de cette dernière a pour conséquence la synthèse d'ATP et la réduction du NAD<sup>+</sup> cytosolique en NADH. De ce fait, un flux glycolytique important aura forcément une conséquence à la fois sur le



**Figure 9.12 – Mécanisme de synthèse d'ATP chez *S. cerevisiae* lors de la prolifération sur lactate.** La première étape du métabolisme de lactate (Lac) consiste à l'oxydation de ce dernier en pyruvate (Pyr) par la D/L lactate déshydrogénase (Dld1). À l'issue de cette réaction, un flux d'électrons est établi entre Dld1 et le complexe IV via le cytochrome c (c). Le complexe IV couple le transfert des électrons vers l'oxygène à une extrusion de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Le pyruvate produit de l'oxydation du lactate peut subir deux destinés. Une partie diffuse vers le cytosol pour former d'autres métabolites intermédiaires à travers la néoglucogenèse. Tandis qu'une autre partie est oxydée au niveau de la mitochondrie pour participer davantage à la synthèse d'ATP. Dans ces conditions, environ 75 % du flux des électrons provient de l'oxydation du pyruvate.

potentiel redox cytosolique (abondance du NADH) et le potentiel phosphate de la cellule (flux de synthèse d'ATP glycolytique plus important).

D'après nos résultats, malgré la demande importante en énergie qui accompagne l'augmentation de la vitesse de prolifération, les cellules de *S. cerevisiae* après l'ajout du glucose semblent maintenir un flux de synthèse d'ATP suffisant, malgré la diminution du flux de synthèse d'ATP mitochondrial (40 %). Ainsi, si les cellules de *S. cerevisiae* ne diminuent pas le flux de synthèse d'ATP mitochondrial, après l'ajout du glucose, l'augmentation du flux de la glycolyse devrait créer une compétition entre cette dernière

et le système des OXPHOS pour la synthèse d'ATP.

En effet, le maintien d'une capacité plus importante de synthèse d'ATP mitochondrial dans ces conditions (après l'ajout du glucose) devrait augmenter plus le rapport ATP/ADP des cellules. Dans la mesure où l'activité du système des OXPHOS est régulée par le rapport ATP/ADP au niveau de l'ATP synthase, l'augmentation de ce dernier freine indirectement le flux de la glycolyse à travers la diminution du flux d'oxydation du NADH cytosolique au niveau de la chaîne respiratoire. Ainsi, cette situation métabolique aura pour conséquence une diminution du flux de la glycolyse et donc le flux de l'apport du carbone.

Pour maintenir une homéostasie entre le rapport ATP/ADP et le flux glycolytique, les cellules de *S. cerevisiae* semblent favoriser la réoxydation du NADH au niveau du cytosol par le processus de la fermentation alcoolique. Dans nos conditions de culture (aérobie), l'avantage de la fermentation alcoolique par rapport à la respiration est que la réoxydation du NADH par la fermentation n'est pas couplée à une synthèse d'ATP. Le processus de la fermentation alcoolique pourrait représenter un recours pour les cellules en prolifération possédant un rapport ATP/ADP élevé, afin de pouvoir éliminer le NADH issu de la glycolyse sans passer par une synthèse d'ATP.

## 9.4 L'accélération de la vitesse de prolifération et l'induction de l'effet Warburg : une mise en place parallèle

L'étude de l'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire suggère que les cellules de *S. cerevisiae* atteignent une vitesse de prolifération maximale (phase exponentielle) environ trois heures après l'ajout du glucose. Le métabolisme énergétique semble suivre le même schéma d'évolution que la vitesse de prolifération. Que ce soit le flux de consommation de glucose, le flux de production d'éthanol, le rapport ATP/ADP ou le flux de respiration endogène, la majeure partie des variations sont observées dans les trois heures suivant l'ajout du glucose. Au-delà de trois heures, le métabolisme énergétique commence à rentrer dans un état stationnaire métabolique. En effet, d'après nos résultats, toutes les caractéristiques phénotypiques de l'effet Warburg, à savoir :



l'augmentation du flux de la glycolyse, la fermentation du glucose en aérobiose, la répression du métabolisme oxydatif sont développées durant la phase d'accélération de la vitesse de prolifération. Ceci suggère que les modulations du métabolisme énergétique typiques de l'effet Warburg sont nécessaires pour promouvoir la prolifération cellulaire chez la levure *S. cerevisiae*.

## 9.5 Origine de la diminution du flux de la respiration mitochondriale

Dans une cellule, la diminution du flux de la respiration mitochondriale est observée dans quatre situations :

- 1) une restriction de l'apport de l'oxygène (anaérobie) ;
- 2) une limitation en substrat respiratoire (pyruvate, NADH, acétyl-CoA, etc.) ;
- 3) une diminution en quantité d'équipement enzymatique disponible pour réaliser les oxydations phosphorylantes (chaîne respiratoire) ;
- 4) Diminution de l'activité des enzymes impliquées dans le processus de la respiration mitochondriale (inhibition cinétique, régulation thermodynamique).

### 1) La restriction de l'apport d'oxygène

Dans nos conditions de culture, l'oxygène n'est pas un facteur limitant. Le milieu de culture est saturé en oxygène dans ces conditions ( $pO_2$  de l'air).

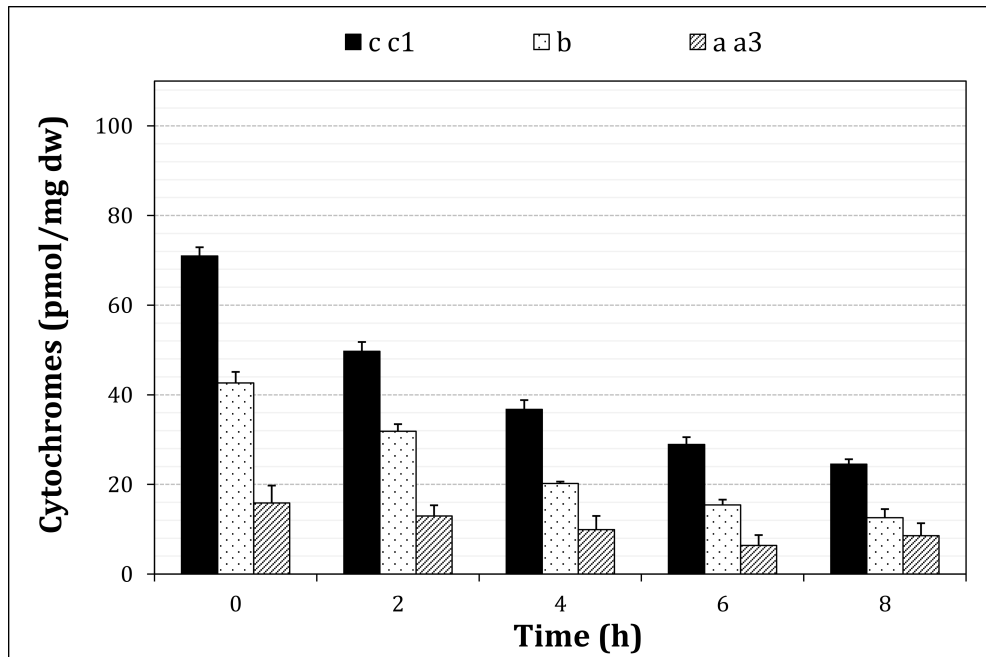
### 2) Limitation en substrat respiratoire

Dans nos conditions de prolifération sur glucose, plusieurs substrats respiratoires sont disponibles pour la chaîne respiratoire, le NADH cytosolique, le NADH matriciel issu de l'oxydation du pyruvate au niveau du cycle de Krebs, l'éthanol produit de la fermentation de glucose, etc. Une limitation de substrat respiratoire ne peut pas expliquer la diminution de la respiration chez *S. cerevisiae*, après l'ajout du glucose.

### 3) Diminution en quantité d'équipement enzymatique (chaîne respiratoire)

Afin de déterminer si la diminution de la respiration après l'ajout du glucose, est due à une diminution quantitative en unités de chaîne respiratoire, nous avons déterminé l'évolution du contenu cellulaire en cytochromes (**Figure 9.13**). Les cytochromes étant les hémoprotéines indispensables à la réalisation des oxydations phosphorylantes, déterminer leur évolution au cours du temps permet d'évaluer la quantité d'équipement enzymatique disponible pour réaliser la respiration au sein du compartiment mitochondrial.

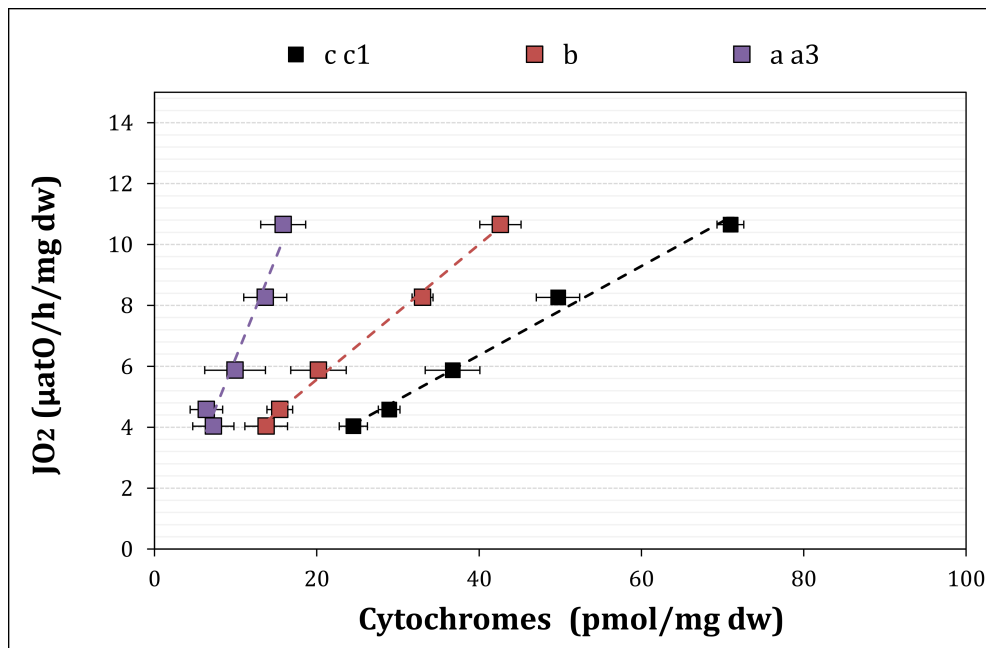
Dans **la figure 9.13** nous observons que l'ajout du glucose induit une diminution importante de la quantité en cytochromes au cours du temps. Cette diminution est progressive et proportionnelle à la diminution de la respiration. Ceci met en évidence une répression du métabolisme oxydatif qui passe par une diminution quantitative en unités de chaîne respiratoire.



**Figure 9.13** – Évolution du contenu en cytochromes dans *S. cerevisiae* après l'ajout du glucose. Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. Une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée à la culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Une mesure quantitative des cytochromes (exprimée en picomoles par milligramme poids sec de levures) est alors réalisée comme décrit dans le matériels et méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=4$ .

Devin *et al.*, 2006 [69] ont montré que dans des conditions de prolifération sur substrat non fermentescible, il y a une relation linéaire entre le flux de consommation d'oxygène et la quantité cellulaire en cytochromes.

Pour tenter de déterminer si cette diminution de la quantité de cytochromes peut expliquer à elle seule la diminution de la respiration, nous avons relié le flux de la respiration endogène à la concentration en cytochromes (**Figure 9.14**). Il existe effectivement une relation linéaire entre la respiration endogène et la concentration en cytochromes.



**Figure 9.14 – Évolution du flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochromes.** Représentation mettant en évidence la relation linéaire entre vitesse de respiration cellulaire et concentration en cytochromes. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=4$ .

La diminution de la respiration observée au cours de la mise en place de l'effet Warburg, est donc due principalement à une diminution quantitative du compartiment mitochondrial (unités de chaîne respiratoire).

Toutefois, bien que la diminution du compartiment mitochondrial puisse expliquer la diminution du flux respiratoire après l'ajout du glucose, le fait que la relation entre flux de la respiration phosphorylante et quantité de cytochromes soit linéaire, ceci n'exclut pas la possibilité que les enzymes du système des OXPHOS subissent des régulations cinétiques (inhibition/stimulation) au cours de la mise en place de l'effet Warburg.

#### 4) L'inhibition des enzymes du système des OXPHOS

Le système des OXPHOS est formé de deux "entités" enzymatiques dont le fonctionnement est différent (chaîne respiratoire, ATP synthase). En raison du couplage chimio-osmotique, la diminution de l'activité d'une entité sera répercutée sur l'autre.

Pour déterminer si les enzymes impliquées dans le processus de la respiration mitochondriale ont subi des régulations cinétiques (inhibition/stimulation) au cours de la mise en place de l'effet Warburg, nous avons évalué la vitesse de fonctionnement minimale et maximale de la chaîne respiratoire des cellules.

La détermination du flux minimal et maximal de la respiration, permet de déterminer l'évolution de l'état stationnaire de la respiration endogène dans l'échelle entre le minimum (respiration non phosphorylante) et le maximum (respiration découplée) à travers le calcul du RSV (Respiratory State Value) [261]. Le RSV est déterminé par la formule suivante :

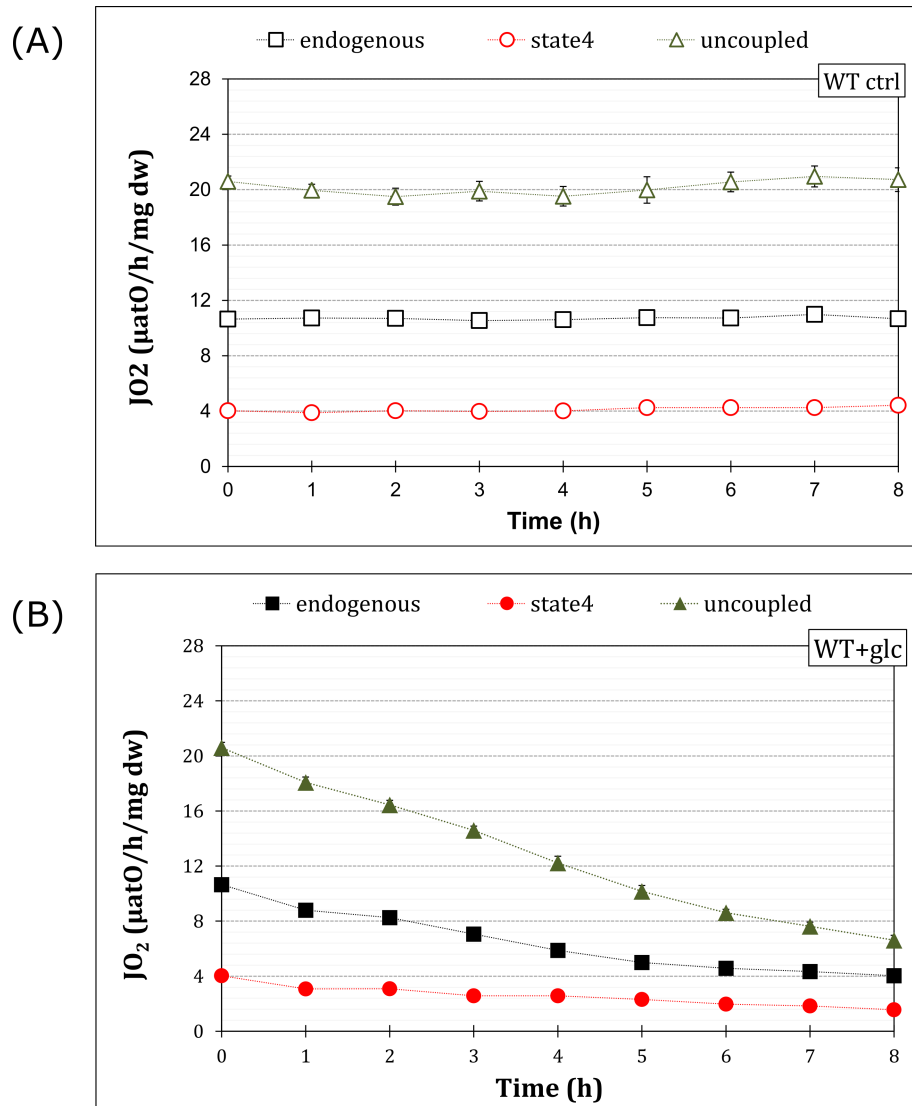
$$RSV = \frac{(JO_{2(P)} - JO_{2(nP)})}{(JO_{2(D)} - JO_{2(nP)})} \times 100$$

- ✧  $JO_{2(P)}$  : respiration phosphorylante (endogène) ;
- ✧  $JO_{2(nP)}$  : respiration non phosphorylante ;
- ✧  $JO_{2(D)}$  : respiration découplée ;
- ✧ 100 : facteur pour avoir le résultat en nombre entier ;

Le flux respiratoire minimal (respiration non phosphorylante) et maximal (respiration découplée) ont été déterminés comme décrit dans le matériels et méthodes.

Comme nous pouvons constater dans la **figure 9.15**, par rapport au contrôle (sans glucose) (**A**), le flux de consommation d'oxygène dans les trois états de respiration (endogène, non phosphorylante et découplée) diminue de façon progressive après l'ajout du glucose (**B**).

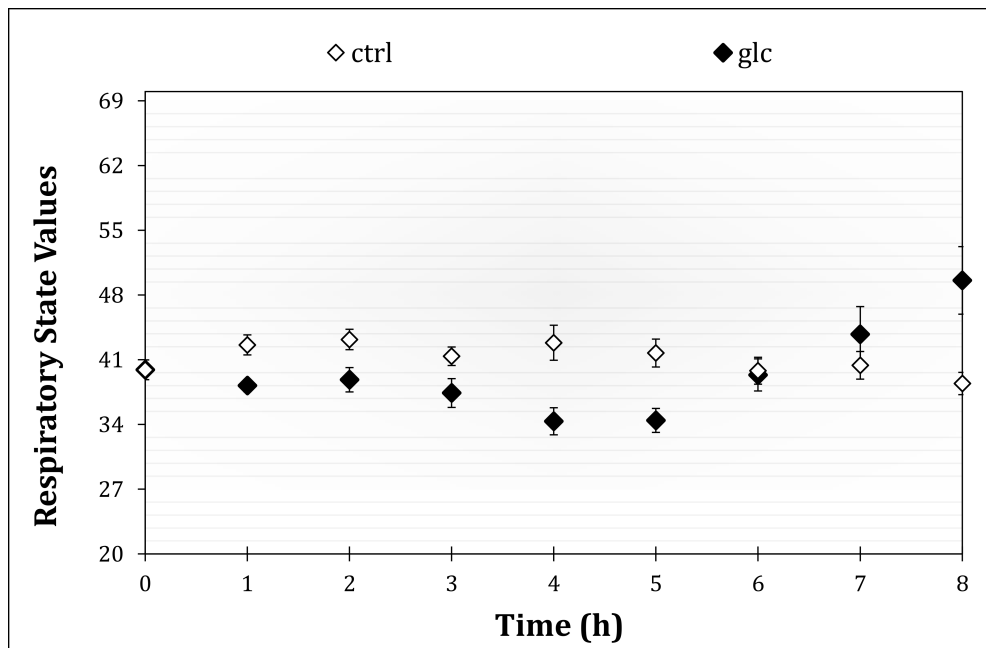
La diminution de la respiration découplée (flux de consommation d'oxygène maximal) au cours du temps confirme notre résultat du dosage des cytochromes qui suggère que la diminution de la respiration mitochondriale après l'ajout du glucose est en grande partie due à une diminution quantitative des unités de chaîne respiratoire.



**Figure 9.15 – Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de *S. cerevisiae*, avant et après l'ajout de glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée (A). À T=0, une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée au milieu de culture (B). Un suivi de la respiration endogène, non phosphorylante (state 4) et découplée est réalisé sur huit (8) heures. Les flux de respiration non phosphorylante et découplée sont obtenus comme décrit dans le matériels et méthodes. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ; n=5.

Par ailleurs, la diminution du flux respiratoire des cellules sauvages de *S. cerevisiae* après l'inhibition de l'ATP synthase par rapport à la respiration endogène montre que la respiration endogène des cellules sauvages est couplée à la synthèse d'ATP durant toute la cinétique.

D'autre part, la détermination du RSV (Respiratory State Value) (**Figures 9.16**) montre que la respiration endogène subit des changements d'état stationnaire. Au début de la cinétique, nous constatons une diminution progressive du RSV par rapport au contrôle, et cela jusqu'à cinq heures après l'ajout du glucose. À partir de cinq heures après l'ajout du glucose, nous constatons le contraire, le RSV augmente progressivement jusqu'à ce qu'il dépasse celui du contrôle (sans glucose) d'environ 35 % au point 8h.



**Figure 9.16** – Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) de *S. cerevisiae*, après l'ajout de glucose. Le RSV est calculé par la détermination du rapport entre [flux de la respiration endogène (-) flux de la respiration non phosphorylante] et [flux de la respiration découplée (-) flux de la respiration non phosphorylante]. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

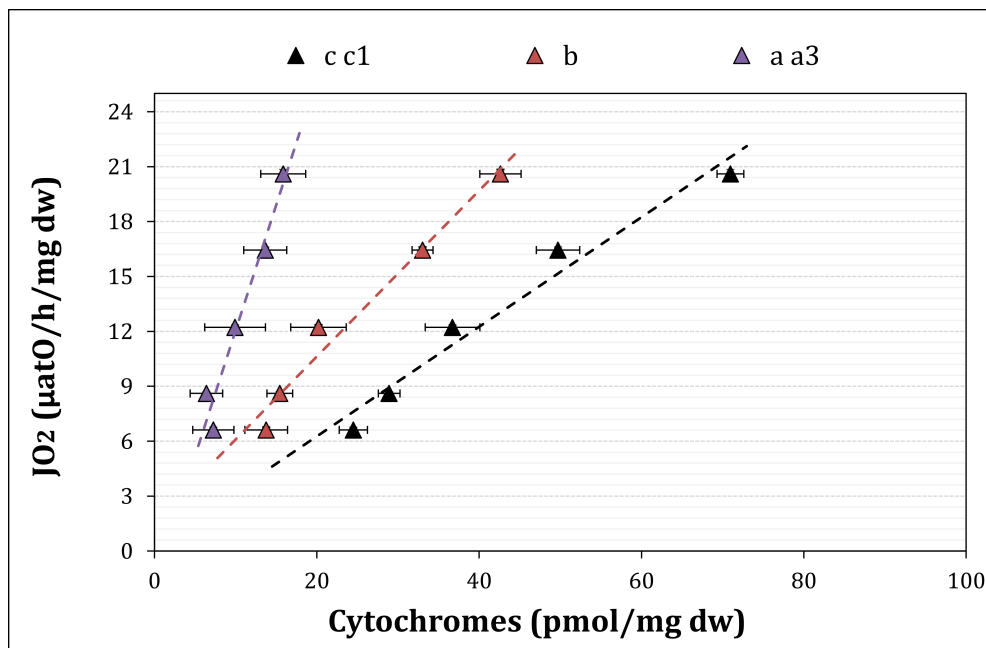
La diminution du RSV entre T0h et T5h montre en effet que l'activité du système des OXPHOS des cellules est diminuée durant cette période.

La diminution de l'activité du système des OXPHOS peut être due à plusieurs facteurs :

a) *Diminution de l'activité des enzymes de la chaîne respiratoire :*

La diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire peut être mise en évidence expérimentalement par une comparaison des flux respiratoires à l'état découplé (respiration maximale) des deux conditions (en présence et en absence de glucose). Toutefois, la diminution du flux ne peut être reliée à une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire que si la quantité de ces derniers reste constante. Or, dans nos conditions de culture, la quantité des cytochromes diminue après l'ajout du glucose. La détermination de l'évolution de l'activité de la chaîne respiratoire ne peut donc se faire par la simple comparaison des flux de la respiration découplée dans les deux conditions (avant/après l'ajout du glucose).

Pour tenter de mettre en évidence une éventuelle diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire après l'ajout du glucose, nous avons relié la respiration à l'état découplé en fonction de la concentration en cytochromes (**Figures 9.17**).



**Figure 9.17 – Évolution du flux de la respiration découplée en fonction de la concentration en cytochromes.** Représentation mettant en évidence la relation linéaire entre vitesse de respiration découplée et concentration en cytochromes. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=4$ .



Dans la **figure 9.17** nous observons que la relation entre la respiration découplée et la quantité des cytochromes est linéaire. Ceci suggère que l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire n'est pas significativement affectée (stimulation, inhibition), au cours du temps.

b) ***Diminution de l'activité de l'ATP synthase :***

Dans les conditions phosphorylantes, l'activité du système des OXPHOS est dépendante du statut énergétique de la cellule (potentiel phosphate), ce dernier qui contrôle en grande partie l'activité de l'ATP synthase (**voir chapitre 1**). Dans la mesure où nous avons mis en évidence une augmentation du rapport ATP/ADP durant toute la cinétique (8h), la diminution de l'activité du système des OXPHOS observée entre T0 et cinq heures après l'ajout du glucose, peut être expliquée par la diminution de l'activité de l'ATP synthase, suite à une augmentation du rapport ATP/ADP (**voir tableau 9.3**).

☛ ***Le découplage des OXPHOS, un autre avantage de la diminution du compartiment mitochondrial ?***

L'augmentation du RSV observé durant la période entre T5h et T8h (**voir figure 9.16**), suggère que l'activité du système des OXPHOS est augmentée. Dans des mitochondries isolées de *S. cerevisiae*, il a été montré qu'une augmentation de l'activité des déshydrogénases externes de la chaîne respiratoire (Nde1p/2p) a pour conséquence la diminution du rendement ATP/O du système des OXPHOS. C'est-à-dire, pour une même quantité d'oxygène consommé, les cellules synthétisent moins de molécules d'ATP. Ceci est dû à une augmentation de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons H<sup>+</sup> [172].

Dans l'espace intermembranaire mitochondrial, le flux de retour des protons n'est pas seulement déterminé par l'activité de l'ATP synthase, mais aussi par le degré d'étanchéité de la membrane interne mitochondriale aux protons H<sup>+</sup>. Dans des conditions d'abondance de coenzymes réduits (potentiel redox élevé), l'augmentation de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale induit une stimulation de la chaîne respiratoire, même

si l'activité de l'ATP synthase ne change pas. En termes de synthèse d'ATP, l'augmentation de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons  $H^+$  induit une diminution du couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Ceci se traduit par une chute dans le rendement ATP produit par NADH oxydé ou oxygène consommé.

Pour expliquer cette diminution du couplage du système des OXPHOS liée à l'activité des déshydrogénases mitochondriales, il a été proposé que lorsque les complexes de la chaîne respiratoire changent de conformation lors du transfert des électrons, ceci crée de petites espaces temporaires entre les protéines (complexes de la chaîne respiratoire) et la bicouche lipidique de la membrane interne mitochondriale, laissant ainsi passer les protons  $H^+$  selon leurs gradients de concentration vers la matrice mitochondriale. Ce phénomène porte le nom du « leak actif » [172]. Ainsi, il a été proposé que le flux de la respiration endogène puisse être un paramètre important dans le contrôle du degré de couplage/découplage entre l'oxydation du substrat respiratoire et la synthèse d'ATP [88].

En effet, dans nos conditions de culture, la diminution de la quantité du compartiment mitochondrial dans un environnement riche en substrat respiratoire, augmente la pression redox exercée sur le système des OXPHOS restant. Il serait possible donc que le système des OXPHOS restant compense cette perte quantitative d'équipement enzymatique mitochondrial par une augmentation de l'activité, afin de rétablir le potentiel redox cytosolique. Or, l'augmentation du flux à travers les complexes de la chaîne respiratoire réduit le couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase pour la conversion d'énergie. Pour synthétiser une même quantité d'ATP les cellules doivent oxyder davantage de molécules de NADH et donc consommer plus d'oxygène. L'augmentation de l'activité du système des OXPHOS observé dans la fin de la cinétique (T5h – T8h), suggère donc une diminution du couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase durant cette période.

**Question :** *Quel avantage peut procurer le découplage du système des OXPHOS aux cellules lors de la prolifération rapide sur glucose ?*

La fermentation alcoolique est un processus réversible. Le sens de la réaction vers la production de l'éthanol dépend principalement des paramètres cinétiques ( $K_m$ ) de l'enzyme (ADH) vis-à-vis de l'éthanol. La vitesse de la réaction dans le sens de la

réoxydation du NADH cytosolique et la production de l'éthanol est au maximum au début de la cinétique, mais au fur et à mesure de l'accumulation de l'éthanol dans le milieu de culture (voir **figure 9.5**), la vitesse de réaction arrive à un état d'équilibre. De ce fait, sur le long terme, en raison de l'accumulation de l'éthanol dans le milieu de culture, non seulement l'environnement de la cellule devient toxique, mais l'efficacité du processus de la fermentation alcoolique dans le maintien de l'état redox cytosolique diminue. Dans ces conditions, l'augmentation de la perméabilité de membrane interne mitochondriale par la mise en place du phénomène du "leak actif" pourrait permettre aux cellules de réoxyder davantage le NADH cytosolique sans avoir pour conséquence une synthèse importante d'ATP.

## 9.6 Origine de la diminution du compartiment mitochondrial après l'ajout du glucose

La quantité de l'équipement enzymatique de la chaîne respiratoire d'une cellule est déterminée par l'équilibre entre la dégradation et la biogenèse.

Afin d'identifier le mécanisme impliqué dans la diminution du compartiment mitochondrial après l'ajout du glucose, nous avons étudié l'effet du glucose sur l'induction de ces deux processus.

### 9.6.1 Effet du glucose sur la dégradation du compartiment mitochondrial

Dans le cadre de son travail de master, A. Mougeolle a étudié dans le laboratoire, l'effet de l'ajout de glucose sur l'induction du processus de la dégradation du compartiment mitochondrial (autophagie, mitophagie).

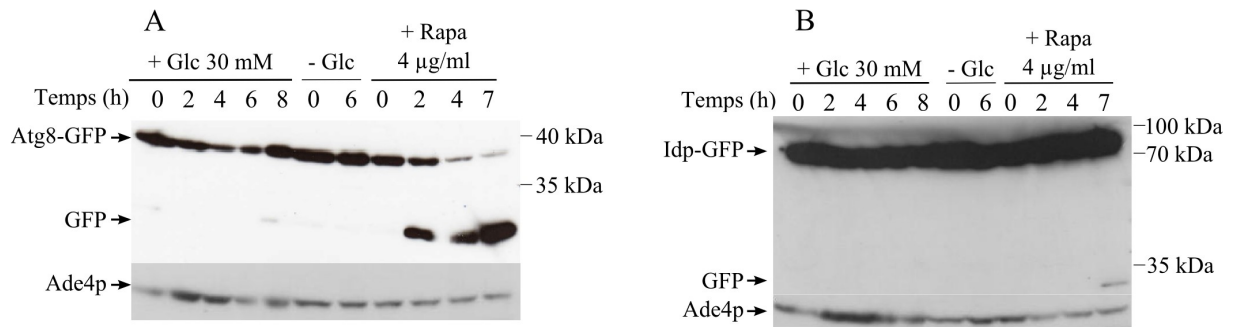
Pour effectuer son étude, A. Mougeolle, a réalisé deux transformations de la souche BY4742 de *S. cerevisiae*.

La première transformation consistait à introduire le plasmide (ATG8-GFP) permettant de relier une protéine GFP (Green Fluorescent Protein) à la protéine Atg8 (AuTophagy related protein) via une protéine de fusion. Lors de l'induction d'un processus d'autopha-

gie, la protéine Atg8 sera clivée au niveau de son arginine 117 ce qui induit la séparation de la protéine Atg8 du GFP. De cette façon il est donc possible de suivre par western blot l'évolution de la taille de la protéine GFP. Si un processus d'autophagie est mis en place, une bande correspondant à la taille de la GFP seule apparaîtra dans le western blot. Tandis que, si aucun processus d'autophagie n'est induit, la protéine GFP reste lié à la protéine Atg8 et aura la taille du complexe Atg8-GFP.

La deuxième transformation consistait à introduire le plasmide (IDP-GFP) permettant de relier une GFP à l'Isocitrate déshydrogénase (Idp) via une protéine de fusion. L'Idp étant localisée dans la matrice mitochondriale, lors de l'induction d'un processus de mitophagie, la mitochondrie et par conséquent l'isocitrate déshydrogénase, se trouvent dégradées au niveau de la vacuole. La GFP étant une protéine particulièrement stable, lorsque la protéine de fusion se retrouve dans la vacuole, seule la protéine Idp est dégradée. De ce fait, de la même manière que pour ATG8-GFP, si un processus de mitophagie est mis en place, une bande correspondant à la taille de la GFP seule apparaîtra dans le western blot. Tandis que, si aucun processus de mitophagie n'est induit, la protéine GFP reste liée à la protéine Idp et aura la taille du complexe Idp-GFP. Pour le contrôle positif, une condition en présence de Rapamycine (Rapa) (un immunosuppresseur qui induit les deux processus) a été réalisée.

Dans la **figure 9.18–A**, nous constatons que par rapport au contrôle (+ Rapa), la majeure partie du GFP reste lié à la protéine Atg8 que ce soit en absence ou en présence de glucose. Sur la **figure 9.18–A** nous pouvons voir un très léger clivage de la protéine tout au long de la croissance et cela dès le temps 0. Suggérant ainsi qu'un processus d'autophagie est présent tout au long de la culture et qu'il n'est pas induit par le glucose.



**Figure 9.18** – Effet du glucose sur l'induction du processus d'autophagie (A) et/ou mitophagie (B), chez *S. cerevisiae*. La dégradation des protéines Atg8-GFP et Idp-GFP est mise en évidence par western-blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la GFP seule (25 kDa) grâce à des anticorps dirigés contre la GFP. La quantité de protéines déposée correspond à celle extraite à partir de  $1,6 \times 10^6$  cellules. La protéine Ade4p est un contrôle de charge. D'après A. Mougeolle.

D'autre part, dans la mesure où l'induction du processus de mitophagie passe obligatoirement par l'induction de l'autophagie, les résultats de la **figure 9.18-B** excluent la possibilité qu'un mécanisme de mitophagie soit induit en réponse à l'ajout de glucose.

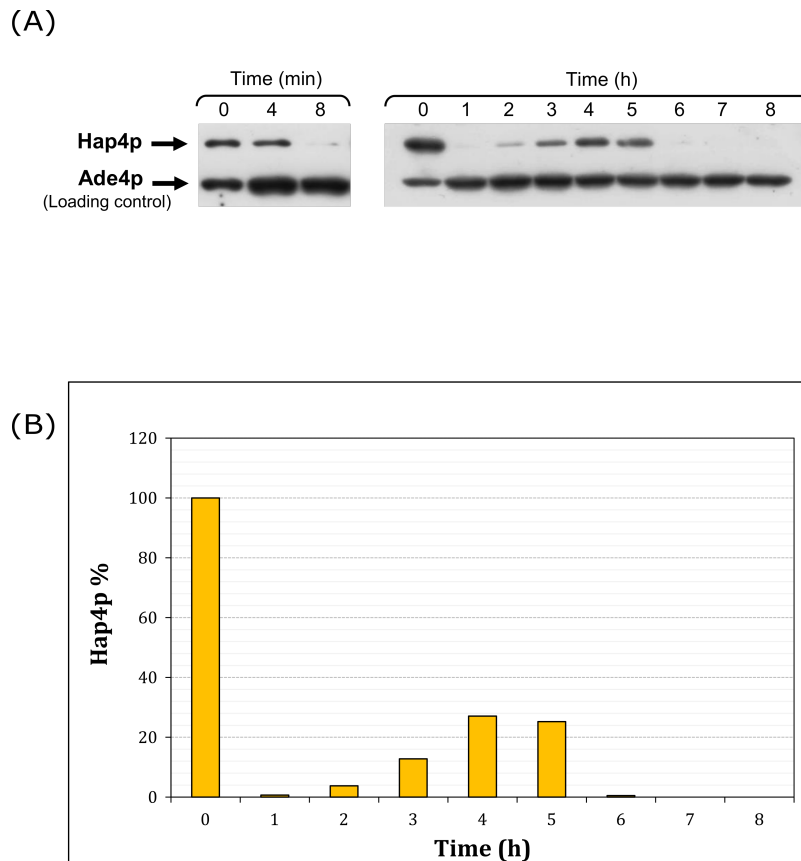
En conclusion, les travaux de Mougeolle ont permis de mettre en évidence que la diminution de la quantité en cytochromes observée au cours de la mise en place de l'effet Warburg, n'est pas due à un processus de dégradation du compartiment mitochondrial.

A l'appui de ces résultats nous avons formulé l'hypothèse que la diminution du compartiment mitochondrial chez *S. cerevisiae* pourrait être due à un défaut dans le processus de biogenèse du compartiment mitochondrial.

### 9.6.2 Effet du glucose sur la biogenèse du compartiment mitochondrial

Dans la littérature, il est rapporté que chez *S. cerevisiae*, la disponibilité du glucose dans le milieu de culture (plus de 30 mM) induit une inhibition de la transcription des gènes qui codent pour la respiration mitochondriale [39, 128]. Cette inhibition est essentiellement due à la répression transcriptionnelle de la sous-unité Hap4p, la sous-unité régulatrice du complexe HAP [89]. Ce dernier joue un rôle clé dans la régulation de l'expression de nombreux gènes codant pour les protéines mitochondriales notamment : les enzymes du cycle de Krebs et la chaîne respiratoire [201, 184, 65, 20, 34].

Pour déterminer l'influence du glucose sur la biogenèse du compartiment mitochondrial, nous avons suivi par western-blot l'évolution de la quantité de la sous-unité Hap4p au cours du temps ainsi que son turn-over, après l'ajout de 70 mM de glucose au milieu de culture (**Figure 9.19**).



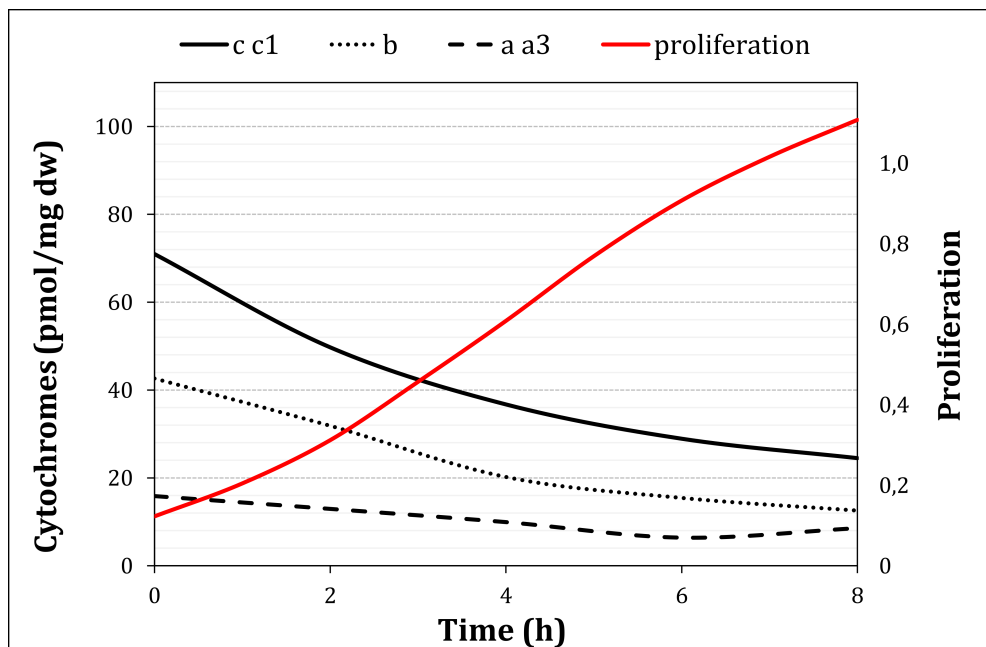
**Figure 9.19** – Effet de l'ajout du glucose sur l'expression de *HAP4* chez *S. cerevisiae*. L'effet de l'ajout du glucose sur l'expression de *HAP4* est mis en évidence par western-blot (A) en suivant la quantité de la protéine Hap4p, grâce à un anticorps dirigé contre la protéine. La quantité de protéines déposée correspond à celle extraite à partir de  $1,6 \times 10^6$  cellules. La protéine Ade4p est un contrôle de charge. La quantification de Hap4p (B) est réalisée par lecture optique de la densité de coloration sur chaque bande à l'aide des outils du logiciel ImageJ. Puis les valeurs sont normalisées par rapport au contrôle de charge (Ade4p).

Nous pouvons observer que la protéine Hap4p disparaît huit minutes après l'ajout du glucose (**Figure 9.19-A**). Cependant, dans nos conditions de culture, la sous-unité Hap4p semble réapparaître entre trois et cinq heures après l'ajout du glucose puis disparaître, alors que la concentration de glucose dans le milieu de culture est toujours élevée (supérieure à 30 mM). Toutefois, cette réapparition est faible par rapport à la

condition sans glucose (T0) (B).

Si nous revenons vers la figure de quantification des cytochromes (**Figure 9.13**), nous constatons que la réapparition de Hap4p corrèle avec une diminution du taux de dilution des cytochromes entre quatre et huit heures après l'ajout du glucose. Or, la vitesse de prolifération est plus importante durant cette phase (phase exponentielle) par rapport à celle entre T0 et T4h (phase d'accélération) (**Tableau 9.1**).

Dans la **figure 9.20**, nous observons que le taux de diminution des cytochromes n'est pas linéaire avec la courbe de croissance ( $\log(mgpds) = f(t)$ ) (—). Ceci suggère que durant la phase exponentielle, la réapparition de Hap4p a permis la réactivation du processus de la biogenèse mitochondriale en présence de glucose.



**Figure 9.20** – Tendence d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes chez *S. cerevisiae*, après l'ajout du glucose.

Cependant, ces résultats sont à l'encontre de ce qu'on trouve dans la littérature, qui stipule que la transcription du gène *HAP4* est réprimée en présence d'une forte concentration de glucose. En effet, dans la littérature, la majeure partie des conclusions sur la répression de *HAP4* par le glucose, sont obtenues à partir de la détermination de la quantité de son ARNm, après l'ajout ou la déplétion du glucose du milieu de culture [89, 30, 68]. Or, nous avons suivi l'évolution de l'expression de la protéine Hap4p au

cours du temps.

Afin de vérifier si la réapparition de Hap4p a permis l'activation du processus de la biogenèse mitochondriale, il est important d'étudier l'activité du complexe HAP dans ces conditions de culture. Cependant, les outils moléculaires que nous possédons pour étudier l'activité des complexes de transcription de gènes ( $\beta$ -gal) ne nous permet pas d'étudier l'activité du complexe HAP dans nos conditions de culture, car la demi-vie de la  $\beta$ -galactosidase est supérieure au temps de génération de nos cellules. Il sera donc nécessaire de générer l'outil moléculaire permettant cette mesure.

Bien que, nous n'ayons pas d'information concernant la liaison de Hap4p au sein du complexe HAP, en présence de glucose et donc son activité, son turn-over de huit minutes suggère que la réapparition de Hap4p est due à une transcription du gène *HAP4* même en présence de glucose. Ceci tend à montrer que la répression de la transcription par le glucose n'est pas stricte mais transitoire. En effet, les études réalisées sur le gène *HAP4* suggèrent que la régulation de la transcription de ce dernier est complexe et fait intervenir plusieurs facteurs de répression qui répondent à un ensemble de signaux intracellulaires. Son promoteur peut lier plusieurs facteurs de régulation de la transcription (répression, activation) [150, 133, 30].

La réapparition de Hap4p dans la souche sauvage pourrait être due au fait que les cellules doivent maintenir une quantité minimum du compartiment mitochondrial, qui leur permet de maintenir à la fois l'équilibre entre la synthèse et la demande en ATP et l'état redox cytosolique des cellules. Un arrêt complet de la biogenèse mitochondriale durant toute la période de présence du glucose, va induire la perte du compartiment mitochondrial au cours du temps par effet de dilution, d'où l'intérêt de réexprimer la sous-unité Hap4p en milieu de la cinétique.

*Nos résultats montrent que la diminution du compartiment mitochondrial de *S. cerevisiae*, au cours de la mise en place de l'effet Warburg est due à une diminution de la biogenèse mitochondriale, suite à une diminution quantitative de la protéine Hap4p (sous-unité régulatrice du complexe HAP).*



## ☛ **Reprogrammation génétique à l'origine de développement de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae***

Chez *S. cerevisiae*, il est bien connu que la disponibilité du glucose à de forte concentration (plus de 30 mM) induit une série de cascades de voies de signalisations (répression glucose), ayant pour objectif la régulation génétique du switch métabolique vers la croissance sur glucose (**voir chapitre 4**).

Parmi, ces modulations génétiques induites par le glucose, trois sont directement liées et en corrélation avec le mécanisme décrit ci-dessus concernant les adaptations du métabolisme énergétique de *S. cerevisiae* lors du switch métabolique vers la croissance sur glucose.

☞ ***L'expression de l'isoformes alcool déshydrogénase 1***

☞ ***L'expression de l'isoformes hexokinase II***

Comme décrit dans l'introduction, l'hexokinase II joue un rôle clé dans les mécanismes moléculaires de la répression glucose. Il s'agit d'une protéine bifonctionnelle [197]. Elle est impliquée dans le métabolisme énergétique des cellules de *S. cerevisiae* en présence de glucose, de par sa fonction kinase [112], et impliqué dans la coordination de la répression/expression de nombreux gènes, lors du processus de la répression catabolique, de par sa fonction de facteur de transcription [197].

Dans la littérature, lors de la répression glucose, il est rapporté que l'hexokinase II est fortement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs de glucose HXT [199]. Lors de la prolifération sur glucose (30mM et plus), il a été montré que la délétion de l'hexokinase II modifie significativement le profil d'expression des différentes isoformes d'HXT. Contrairement aux cellules sauvages, les cellules  $\Delta h x k 2$  présentent un taux d'expression élevé des transporteurs de moyenne affinité (HXT2 et HXT4) et de forte affinité (HXT7), et n'expriment que très faiblement les transporteurs de faible affinité (HXT1 et HXT3) [199]. En effet, dans une étude comparative réalisé sur des cellules de *S. cerevisiae* expriments des profils et des niveaux d'expression différents de transporteurs HXT (entre HXT1 et HXT7), il a été montré que le flux de consommation de glucose est variable entre ces cellules, mettant ainsi

en évidence un rôle important du profil et du niveau d'expression des transporteurs de glucose dans la régulation du flux de consommation de ce dernier [78].

D'autre part l'hexokinase II catalyse la première étape de recrutement du glucose dans les différentes voies métaboliques notamment la glycolyse. Elle est la principale kinase du glucose exprimée au cours de la prolifération sur glucose [206, 169, 112, 177]. De par sa fonction de Kinase, l'hexokinase II semble procurer aux cellules de *S. cerevisiae* une capacité plus importante de phosphorylation des hexoses. En effet, il a été montré « in-vitro », que l'activité de phosphorylation de glucose des cellules *S. cerevisiae* diminue d'environ 50 %, en absence de l'hexokinase II [244].

#### ⇨ **La répression transcriptionnelle de Hap4p**

Comme nous l'avons abordé précédemment, chez *S. cerevisiae*, Hap4p est impliquée dans le processus de biogenèse mitochondriale [66, 30, 89, 143]. L'expression de *HAP4* est fortement régulée par la source de carbone [89]. Dans la littérature, la détection d'une concentration élevée de glucose dans le milieu induit une répression de l'expression de *HAP4* [68, 89]. L'expression de la sous-unité Hap4p est sous le contrôle d'un promoteur complexe, qui contient des sites de liaisons reconnus par un ou plusieurs facteurs de transcription. En ce qui concerne la répression de *HAP4* par le glucose, le mécanisme complet de la répression n'est pas encore connu. Ce qui est connu à ce jour est la présence d'un site de liaison pour le facteur de répression Mig1p situé à environ 350 pb en amont du codon d'initiation de la traduction de *HAP4*. Des études « in-vitro » ont montré que Mig1p est capable de lier cette séquence [150]. Toutefois la délétion de *MIG1* ne permet pas le lever de la répression de l'expression de *HAP4* après l'ajout du glucose « in-vivo » [133], mettant ainsi en évidence la complexité du processus de régulation de la transcription de *HAP4*.

La vérification de la pertinence de notre raisonnement, nécessite une étude de la validité du mécanisme décrit ci-dessus dans des conditions où :

- ⇨ Le flux de l'apport du substrat est diminué (délétion de l'hexokinase II) ;
- ⇨ La biogenèse du compartiment mitochondrial est maintenue, après l'ajout du glucose (surexpression de *HAP4*).



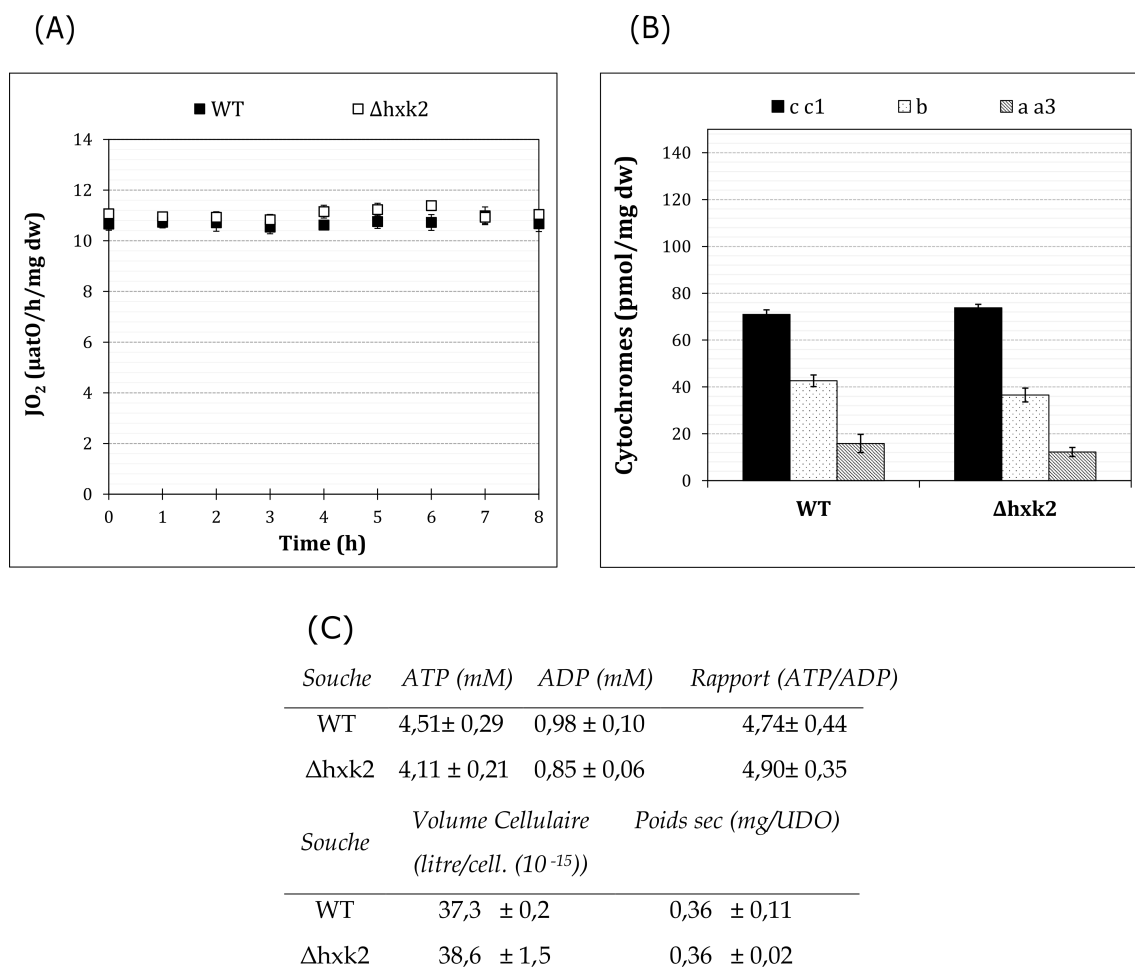
## *Effet de la délétion de l'HXK2 sur l'induction de l'effet Warburg*

Chez *S. cerevisiae*, l'activation et l'engagement des hexoses (glucose, maltose, manose, fructose, etc.) dans les différentes voies métaboliques (glycolyse, voie des pentoses phosphate, glycogénogenèse) est assuré par trois isoformes d'hexokinase : hexokinase I, hexokinase II et glucokinase [112, 93, 169]. Avec des propriétés cinétiques différentes pour le glucose et l'ATP, l'expression de ces isoformes est directement liée à la nature de la source de carbone [112, 177]. Mise à part en présence de galactose, l'hexokinase II est exclusivement exprimée dans les conditions de croissance sur substrat fermentescible. Alors que l'hexokinase I et la glucokinase sont principalement exprimées dans les conditions de croissance sur substrat non-fermentescible (Ethanol, Glycérol, lactate, etc.) ou sur galactose [112, 169]. Dans des conditions de défaut d'expression d'hexokinase II (délétion), la phosphorylation du glucose est principalement assurée par l'hexokinase I [244]. En effet, lors de la prolifération sur glucose, il a été montré que les cellules  $\Delta h x k 2$  présentent un taux de transcription élevé du gène HXK1, qui code pour l'hexokinase I [219].

Dans ce chapitre, nous allons étudier l'effet de la délétion de l'hexokinase II sur la cinétique de mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*, notamment en ce qui concerne la relation entre le flux de consommation du glucose, de production d'éthanol et le flux de la respiration mitochondriale.

## 10.1 Le métabolisme oxydatif de la souche $\Delta h x k 2$ en condition de contrôle (sans glucose)

Dans nos conditions contrôle (sans glucose), avec le lactate (substrat non-fermentescible) comme seule source de carbone, l'hexokinase II est très peu exprimée (expression basale) [112]. Pour se développer, les cellules dans ces conditions convertissent le lactate en pyruvate au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale grâce aux deux lactate déshydrogénases mitochondriales (**voir figure 9.12**). Le pyruvate produit diffuse vers le cytosol à travers la membrane externe mitochondriale, où il pourra être converti, en fonction du besoin de la cellule en différents intermédiaires métaboliques (PEP, Gly-3P, G6P) au niveau de la néoglucogenèse. Le rôle de l'hexokinase II dans le métabolisme énergétique des cellules dans ces conditions de culture est mineur.

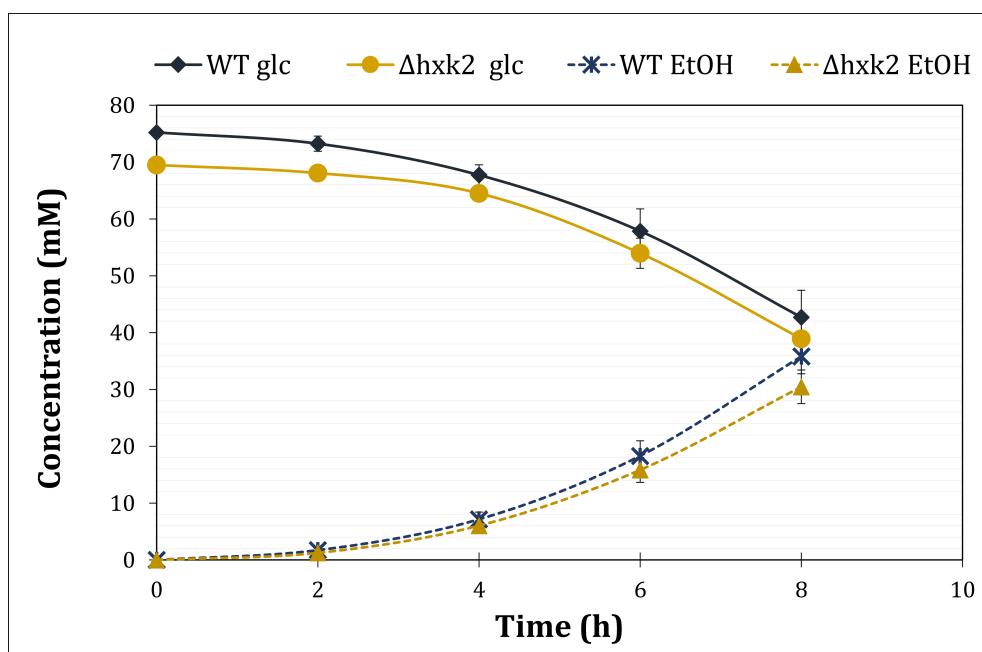


**Figure 10.1 – Effet de la délétion de l'*HXK2* sur la prolifération et le métabolisme oxydatif de *S. cerevisiae* (condition contrôle).** (A) Flux de la respiration endogène. (B) Quantité de cytochromes. (C) Concentration en nucléotides (ATP et ADP), le volume cellulaire et le poids sec d'une unité DO de cellules. Les mesures sont réalisées comme décrit dans le matériels et méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ ) ± erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

Comme le montre la **figure 10.1–A**, les cellules  $\Delta hvk2$  et la souche sauvage de *S. cerevisiae* présentent des flux respiratoire très similaire lors de la prolifération sur lactate (2 %). De même pour l'ensemble des paramètres mesurés : quantité de cytochromes, concentration en ATP et ADP, rapport ATP/ADP, volume cellulaire et poids sec, les deux souches sont comparables (**Figure 10.1–B et C**).

## 10.2 La délétion du gène *HXK2*, influence-t-elle le flux glycolytique ?

La quantification du glucose dans le milieu de culture (**Figure 10.2**) montre que comme la souche sauvage (◆), les cellules  $\Delta hxk2$  consomment le glucose après son ajout dans le milieu de culture (●). Au bout de huit heures, les cellules consomment environ 50 % du glucose ajouté (30 mM).

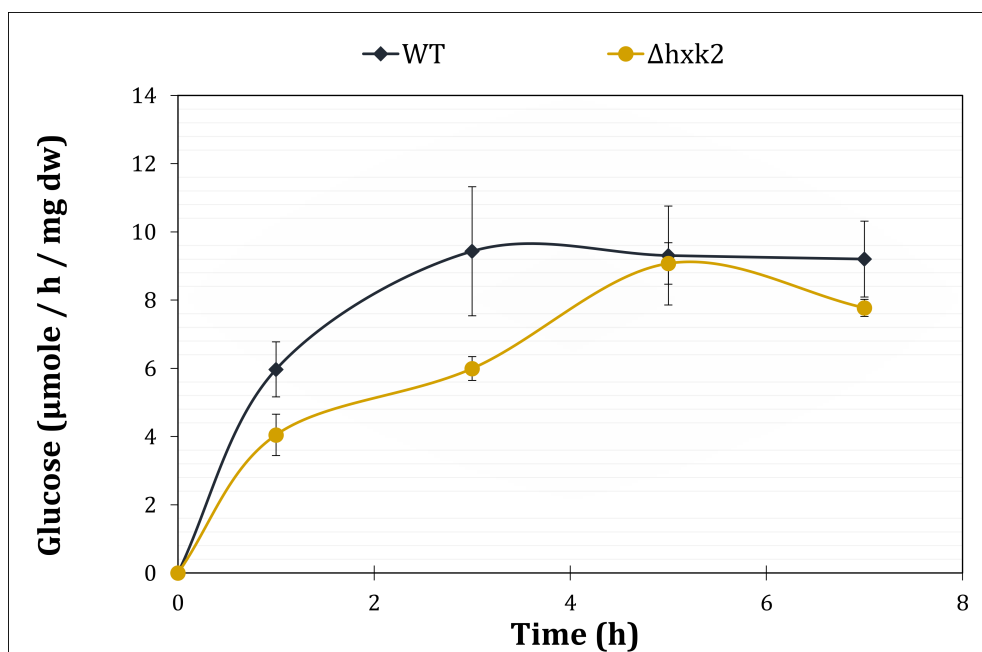


**Figure 10.2 – Dosage du glucose et d'éthanol dans le milieu extra-cellulaire (souche sauvage et  $\Delta hxk2$ ).** Deux cultures de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hxk2$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée au milieu de culture. Un dosage de la concentration de glucose (G) restant et d'éthanol produit dans le milieu de culture est réalisé par méthode enzymatique chaque deux (2) heures, pendant la cinétique (8h) (voir Matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $(\bar{X}) \pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=4$ .

Le dosage de l'éthanol dans le milieu de culture (**Figure 10.2**) met en évidence que la diminution de glucose au cours du temps est accompagnée d'une augmentation progressive de la concentration de l'éthanol dans le milieu de culture (▲).

La délétion de l'*HXK2* n'empêche donc pas le déclenchement du métabolisme fermentaire en aérobiose après l'ajout du glucose dans le milieu de culture.

La détermination du flux de consommation du glucose (**Figure 10.3**) met en évidence que ce dernier est plus faible par rapport à la souche sauvage, mais seulement entre T0 et six heures après l'ajout du glucose. En effet, chez la souche  $\Delta hxk2$ , la phase d'augmentation du flux de consommation de glucose semble durer plus longtemps pour arriver à un niveau comparable avec celui de la souche sauvage. Six heures après l'ajout du glucose, le flux de consommation de ce dernier devient comparable entre la souche sauvage et  $\Delta hxk2$ .



**Figure 10.3** – Évolution du flux de consommation de glucose chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hxk2$ ), après l'ajout du glucose. Chaque point représente la moyenne de quantité de glucose consommé exprimée en micromole par heure par milligramme poids sec de cellules, sur un intervalle de deux (2) heures (voir matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

L'analyse de la courbe d'évolution du flux de consommation de glucose suggère une restriction transitoire du flux glycolytique, suite à la délétion de l'hexokinase II.

Pour expliquer le profil d'évolution de flux de consommation de glucose chez la souche  $\Delta hxk2$ , notamment le faible flux observé entre T0h et T6h, nous avons formulé l'hypothèse que cela pourrait être dû au fait que les cellules  $\Delta hxk2$  ne parviennent pas à augmenter rapidement le flux glycolytique en exprimant seulement les transporteurs de moyenne et forte affinité. Toutefois, sur le long terme, en augmentant la quantité de ces



transporteurs, les cellules semblent parvenir à assurer un flux glycolytique relativement comparable aux cellules sauvages. En effet, il a été montré dans une souche de *S. cerevisiae* exprimant seulement HXT7, que l'augmentation du niveau d'expression de ce dernier permet une augmentation du flux de la glycolyse, suggérant ainsi, un rôle important de l'étape de transport du glucose dans la régulation du flux glycolytique [260]. Par ailleurs, il a été montré que la délétion de l'hexokinase II (Mesures réalisées en phase exponentielle) induit une augmentation significative du niveau de transcription des gènes codant pour les transporteurs de forte affinité (HXT6/HXT7) et de moyenne affinité (HXT4/HXT5). Ainsi, une forte diminution concomitante de l'expression du transporteur de faible affinité HXT1 a été observée [219].

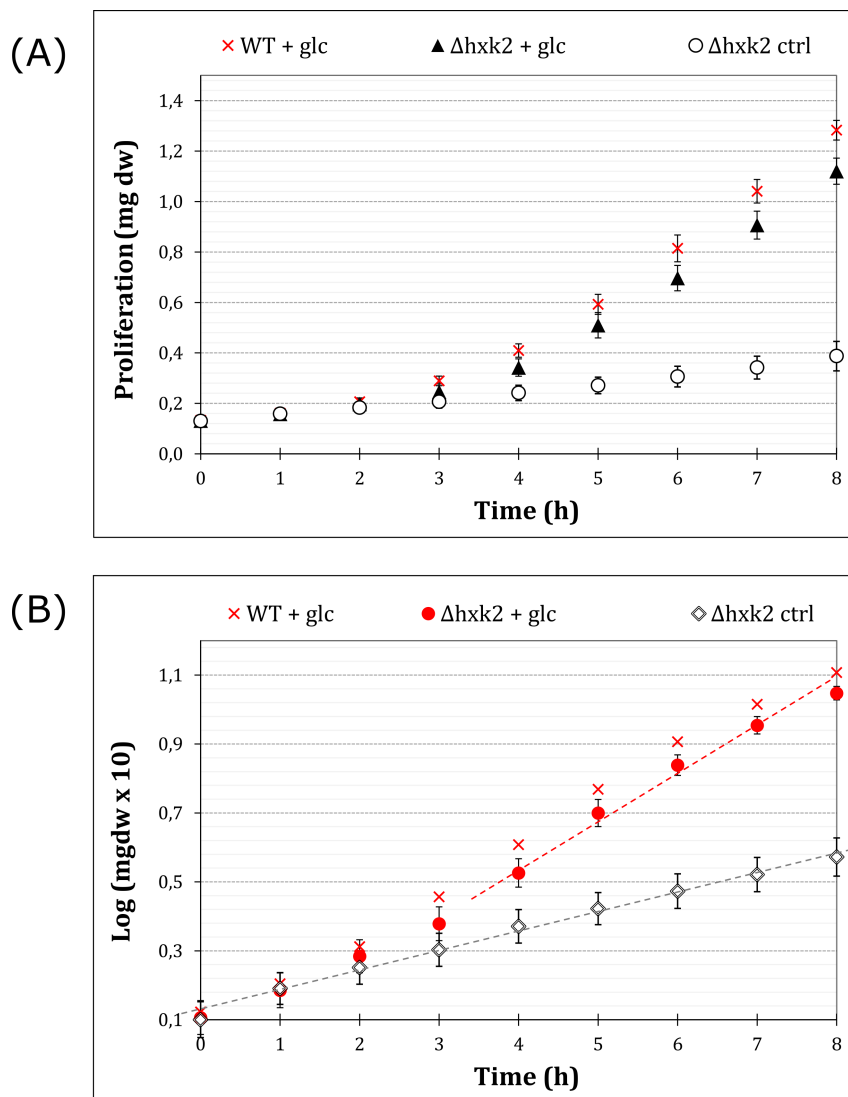
D'autre part, l'activité de phosphorylation des hexokinases alternatives à l'hexokinase II, peut aussi jouer un rôle dans la diminution du flux glycolytique dans le début de la cinétique. En effet, l'hexokinase I et la glucokinase ont une capacité de phosphorylation du glucose plus faible par rapport à l'hexokinase II [244]. Il se pourrait que pour augmenter suffisamment l'activité de phosphorylation du glucose, les cellules  $\Delta h x k 2$  doivent augmenter plus le taux d'expression de l'hexokinase I.

### 10.3 La vitesse de prolifération cellulaire est-elle affectée par la délétion de l'hexokinase II ?

Le processus de production de biomasse est étroitement lié au flux de l'apport du carbone. Afin de vérifier si la diminution du flux glycolytique affecte la vitesse de production de biomasse chez la souche  $\Delta h x k 2$ , nous avons déterminé la cinétique d'évolution de la vitesse de prolifération des cellules  $\Delta h x k 2$  après l'ajout du glucose.

Le suivi de l'évolution de la quantité de cellules (mg poids sec) après l'ajout du glucose, (Figure 10.4–A) montre que même en absence de l'hexokinase II, le glucose induit une augmentation importante et progressive de la vitesse de production de biomasse, par rapport au contrôle (sans glucose).

En comparaison avec la souche sauvage (✕, Figure 10.4–A), aucune différence significative n'est observée dans la souche  $\Delta h x k 2$  (▲), en terme de prolifération.



**Figure 10.4 – Effet du glucose sur la prolifération de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hvk2$ ).** Deux cultures de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hvk2$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ) ou non ( $\circ$ ,  $\diamond$ ) au milieu de culture. Un suivi de croissance (poids sec) est réalisé sur huit (8) heures (A). Puis un calcul de la valeur du log (courbe de croissance) de la quantité de cellules produites après chaque heure est réalisé pendant la cinétique (8h) (B), (voir Matériels et méthodes). Les ( $\times$ ) représentent la quantité de biomasse (A) et la courbe de croissance (B) de la souche sauvage, après l'ajout du glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Cependant, la détermination de la courbe de croissance de la souche  $\Delta hvk2$  après l'ajout du glucose (**Figure 10.4–B**) met en évidence que la délétion de l'hexokinase II induit une prolongation de la première phase de croissance (phase d'accélération).

Jusqu'à trois heures après l'ajout du glucose, la vitesse de production de biomasse ( $\mu^{-1}$ )

chez la souche  $\Delta h x k 2$  n'augmente que de 57 % par rapport au contrôle (sans glucose) (Tableau 10.2). Tandis pour la souche sauvage, au point 3h la vitesse de prolifération a été augmentée de 153 % par rapport au contrôle (sans glucose). Les cellules  $\Delta h x k 2$  entrent donc plus tardivement dans la phase exponentielle.

**Tableau 10.1 – Évolution du taux de croissance spécifique ( $\mu^{-1}$ ) de *S. cerevisiae* après l'ajout du glucose.** Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Temps (h)	sauvage	%		$\Delta h x k 2$	%
0	0,14 $\pm$ 0,01	0		0,14 $\pm$ 0,01	0
1	0,19 $\pm$ 0,03	39		0,18 $\pm$ 0,02	34
2	0,25 $\pm$ 0,02	82		0,23 $\pm$ 0,02	68
3	0,33 $\pm$ 0,02	145		0,22 $\pm$ 0,03	60
4	0,35 $\pm$ 0,03	156		0,34 $\pm$ 0,03	150
5	0,37 $\pm$ 0,03	172		0,40 $\pm$ 0,02	195
6	0,32 $\pm$ 0,01	134		0,32 $\pm$ 0,03	136
7	0,25 $\pm$ 0,03	84		0,27 $\pm$ 0,01	96
8	0,21 $\pm$ 0,02	55		0,21 $\pm$ 0,02	58

Dans la littérature, plusieurs expériences réalisées sur l'effet de la délétion de l'hexokinase II sur le métabolisme et la prolifération de *S. cerevisiae*, dans les conditions de disponibilité de glucose, suggèrent que les cellules  $\Delta h x k 2$  présentent un taux de croissance spécifique ( $\mu^{-1}$ ) plus faible par rapport au sauvage (études réalisées pendant la phase exponentielle) [219, 72]. Cependant, dans nos conditions de culture, la délétion de l'hexokinase II ne semble induire aucun effet notable sur la vitesse de prolifération des cellules de *S. cerevisiae* dans la phase exponentielle (Tableau 10.2).

Dans une étude réalisée sur des différents mutants d'hexokinase de la souche DFY1, de *S. cerevisiae* [244], il a été montré que la diminution du flux de consommation de glucose, n'a pas d'effet notable sur le taux de prolifération des cellules durant la phase exponentielle, en présence du glucose à (110 mM) [244]. Bien que les cellules  $\Delta h x k 2$

**Tableau 10.2 – Évolution du taux de croissance spécifique ( $\mu^{-1}$ ) de *S. cerevisiae* après l'ajout du glucose.** Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

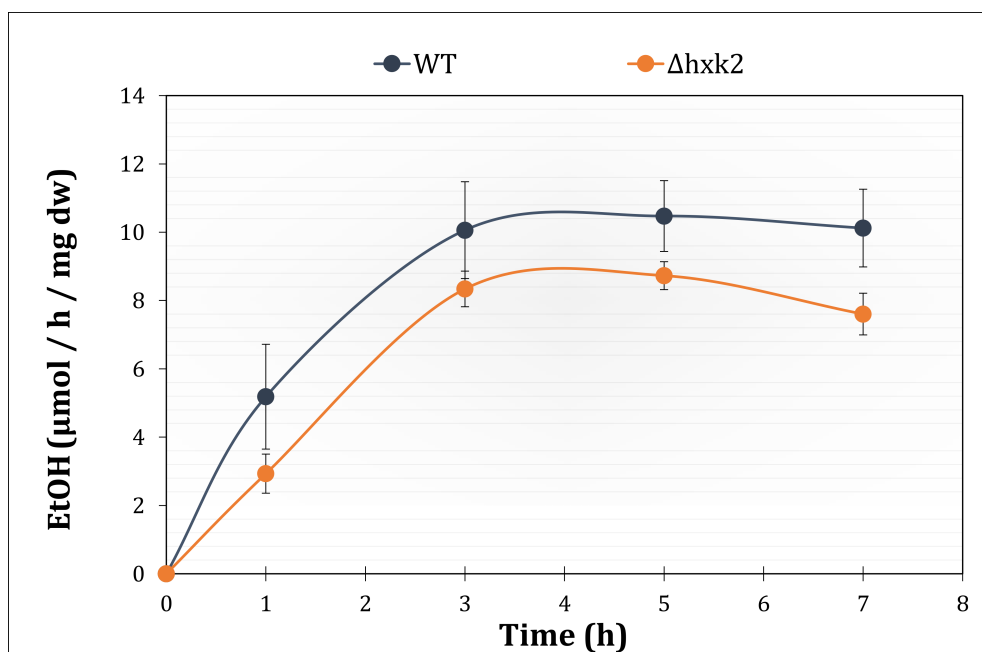
Temps (h)	sauvage	%		$\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$	%
0	0,14 $\pm$ 0,01	0		0,14 $\pm$ 0,01	0
1	0,19 $\pm$ 0,03	39		0,18 $\pm$ 0,02	0
2	0,25 $\pm$ 0,02	82		0,23 $\pm$ 0,02	43
3	0,33 $\pm$ 0,02	145		0,22 $\pm$ 0,03	68
4	0,35 $\pm$ 0,03	156		0,34 $\pm$ 0,03	96
5	0,37 $\pm$ 0,03	172		0,40 $\pm$ 0,02	119
6	0,32 $\pm$ 0,01	134		0,32 $\pm$ 0,03	93
7	0,25 $\pm$ 0,03	84		0,27 $\pm$ 0,01	82
8	0,21 $\pm$ 0,02	55		0,21 $\pm$ 0,02	38

de DFY1 présentait un taux faible de métabolisme du glucose (30 %) par rapport au sauvage, les deux souches présentent des taux de croissance ( $\mu^{-1}$ ) très comparables [244]. Chez cette souche, il a été proposé que la majeure partie de la diminution du flux de consommation de glucose concerne la partie métabolisée en éthanol et non pas la partie qui entre dans la formation de la biomasse. D'où le fait que la souche  $\Delta h x k 2$  présente le même ( $\mu^{-1}$ ) que la souche sauvage. Or, dans nos conditions, nous montrons que les deux souches sauvage et  $\Delta h x k 2$  présentent des flux de consommation de glucose similaires une fois entrées dans la phase exponentielle. Ce qui expliquerait le fait que les cellules sauvages et  $\Delta h x k 2$  présentent le même taux de prolifération durant cette phase.

## 10.4 Délétion d'H XK2, quel effet sur le métabolisme énergétique de *S. cerevisiae* lors du basculement métabolique ?

### 10.4.1 Évolution du flux de production d'éthanol de *S. cerevisiae* ( $\Delta h x k 2$ ) après l'ajout du glucose

Chez *S. cerevisiae*, il a été montré que la délétion de l'hexokinase réduit le flux du glucose vers le métabolisme fermentaire. De même pour notre modèle (BY4742), les cellules  $\Delta hxk2$  ont tendance à produire une quantité plus faible d'éthanol par rapport à la souche sauvage (**Figure 10.5**). L'effet de la délétion de l'hexokinase II sur le flux d'éthanol est plus marquant (40 % plus faible) dans les deux premières heures suivant l'ajout de glucose. Au-delà de deux heures, le flux de production de l'éthanol augmente dans les cellules  $\Delta hxk2$  pour atteindre un niveau maximal constant, légèrement plus faible (15 %) par rapport à la souche sauvage. Cependant, la largeur des barres d'erreur, rend difficile l'interprétation de ces différences de flux d'une façon pertinente.



**Figure 10.5** – Évolution du flux de production d'éthanol chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hxk2$ ), après l'ajout de glucose. Chaque point représente la moyenne de quantité d'éthanol produit exprimée en micromole par heure par milligramme poids sec de cellules, sur un intervalle de deux (2) heures (voir matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

D'autre part, la mise en relation des résultats du flux de consommation de glucose et de production d'éthanol (**Tableau 10.3**) met en évidence que le rapport flux EtOH/Glc est comparable entre les deux souches, sauvage et  $\Delta h x k 2$ .

**Tableau 10.3 – Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta h x k 2$ ), après l'ajout du glucose.** Le rapport flux éthanol/flux glucose est obtenu par la division des valeurs du flux de production d'éthanol par celles du flux de consommation de glucose correspondants. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ; n=5.

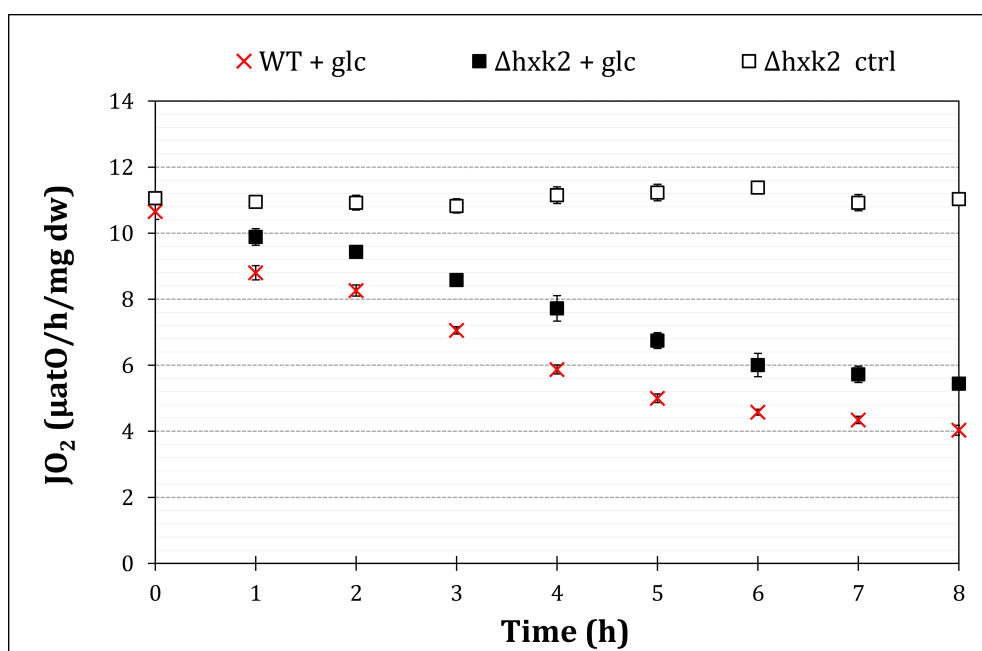
Temps (h)	EtOH ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Glc ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Rapport
<b>sauvage</b>			
0h – 2h	5,18 $\pm$ 1,54	5,89 $\pm$ 0,63	0,82 $\pm$ 0,16
2h – 4h	10,06 $\pm$ 1,42	9,50 $\pm$ 1,47	1,12 $\pm$ 0,14
4h – 6h	10,47 $\pm$ 1,04	9,28 $\pm$ 1,12	1,18 $\pm$ 0,15
6h – 8h	10,12 $\pm$ 1,14	8,56 $\pm$ 1,07	1,26 $\pm$ 0,25
<b><math>\Delta h x k 2</math></b>			
0h – 2h	2,93 $\pm$ 0,57	3,95 $\pm$ 0,48	0,78 $\pm$ 0,18
2h – 4h	8,34 $\pm$ 0,52	6,01 $\pm$ 0,27	1,39 $\pm$ 0,07
4h – 6h	8,73 $\pm$ 0,41	9,19 $\pm$ 0,48	0,96 $\pm$ 0,07
6h – 8h	7,60 $\pm$ 0,61	7,98 $\pm$ 0,29	0,95 $\pm$ 0,06

En effet, en appliquant la règle de stœchiométrie de la glycolyse (1 glc : 2 pyruvate) nous observons que dans les cellules  $\Delta h x k 2$ , 50 % du flux glycolytique est dirigé vers le métabolisme fermentaire.

Dans la période entre T0 et T4h durant laquelle la vitesse de prolifération est faible dans les cellules  $\Delta h x k 2$ , par rapport aux cellules sauvages, le rapport moyen flux EtOH/flux Glc est comparable entre les deux souches, sauvage et  $\Delta h x k 2$ , suggérant un rendement de glucose très comparable entre les deux souches. Ainsi, l'entrée tardive en phase exponentielle observée dans les cellules  $\Delta h x k 2$  pourrait être due à une limitation dans le flux glycolytique durant cette période.

### 10.4.2 Évolution du flux de la respiration mitochondriale de *S. cerevisiae* ( $\Delta hxk2$ ) après l'ajout du glucose

Nous observons dans la **figure 10.6** que comme la souche sauvage (✕), l'ajout du glucose au milieu de culture, induit une diminution progressive du flux de la respiration endogène dans les cellules  $\Delta hxk2$  (■).



**Figure 10.6** – Effet du glucose sur la respiration de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hxk2$ ). Deux cultures de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hxk2$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (■) ou non (□) au milieu de culture. Un suivi de la respiration par oxygraphie est réalisé sur huit (8) heures. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les (✕) représentent le flux de la respiration endogène de la souche sauvage, après l'ajout du glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne (X)  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Dans nos conditions de culture, le NADH cytosolique est le principal substrat pour la fermentation alcoolique et le système des OXPHOS. L'augmentation du flux respiratoire, pourrait avoir pour conséquence, la réduction du flux du métabolisme fermentaire dans la souche  $\Delta hxk2$ .

Chez *S. cerevisiae*, la délétion de l'hexokinase II n'empêche pas la répression du

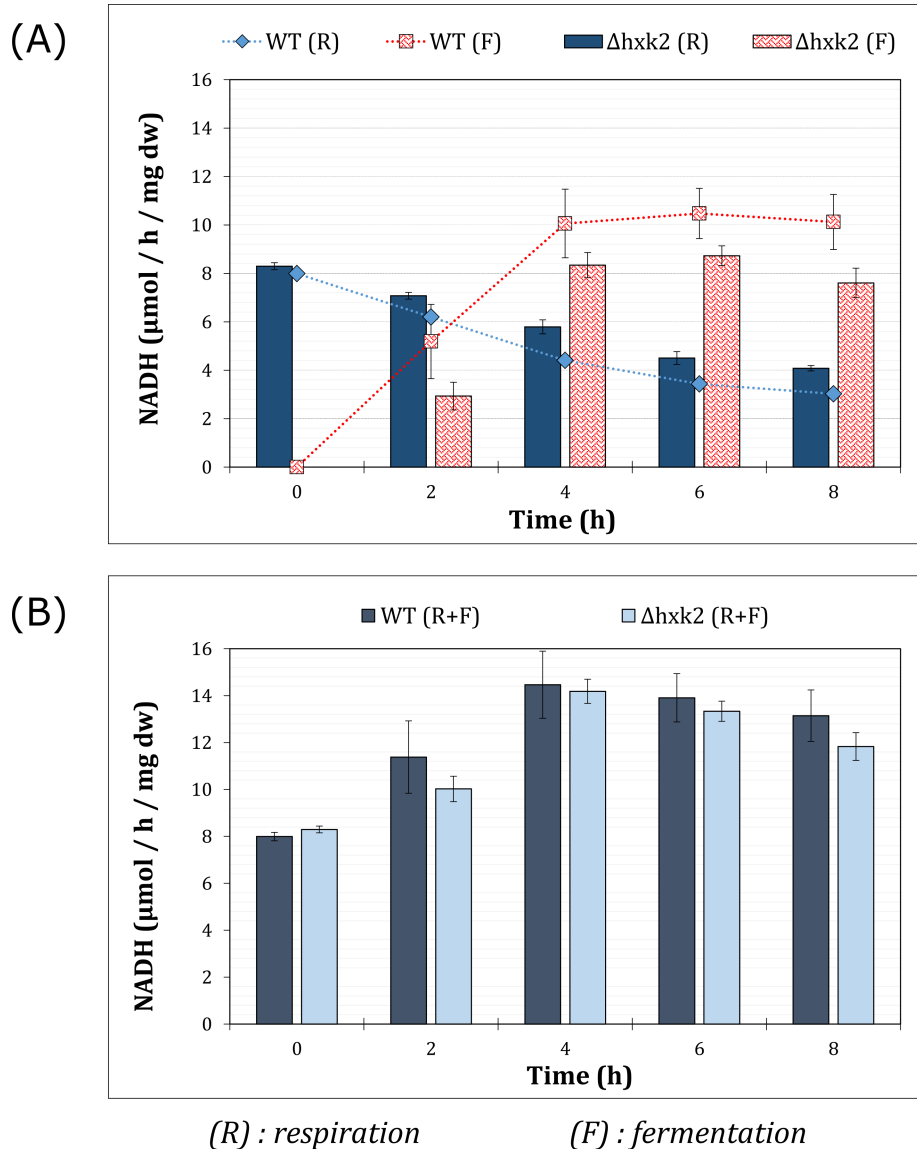
métabolisme oxydatif au cours de la mise en place de l'effet Warburg. Toutefois, les cellules lors de la prolifération sur glucose, semblent garder un métabolisme oxydatif plus important (environ 30 %) en absence de cette enzyme.

#### 10.4.3 La réoxydation du NADH cytosolique après la délétion de l'hexokinase II : respiration mitochondriale Vs fermentation alcoolique

L'évolution du flux du métabolisme oxydatif et fermentaire en présence du glucose reste très similaire à celui du sauvage. La diminution du flux de la respiration endogène après l'ajout du glucose, est accompagné dans le temps d'une augmentation du flux de production de l'éthanol (voir figure 10.5 et 10.6).

En appliquant la règle de stœchiométrie de l'oxydation du NADH par les deux systèmes, respiration et fermentation alcoolique, nous observons que la délétion de l'hexokinase II modifie la balance du flux de NADH entre la respiration mitochondriale et la fermentation alcoolique (**Figure 10.7–A**). Toutefois, le flux total d'oxydation du NADH est sensiblement comparable entre les deux souches durant toute la cinétique (**B**).





**Figure 10.7 – Flux d'oxydation de NADH assuré par les deux systèmes : OXPHOS et fermentation, dans les cellules sauvages et  $\Delta hxx2$ .** Le flux d'oxydation de NADH de chaque voie métabolique est calculé à partir des flux respiratoire (75 % du flux respiratoire, qui est due à l'oxydation du NADH principalement cytosolique, voir chapitre 9) et de production d'éthanol selon le bilan de stœchiométrie : 1 NADH oxydé :  $\frac{1}{2}$  O<sub>2</sub> consommé pour la respiration et 1 NADH oxydé : 1 EtOH produit pour la fermentation. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM); n=5.

#### 10.4.4 La diminution du flux de consommation de glucose, quel effet pour le flux de synthèse d'ATP ?

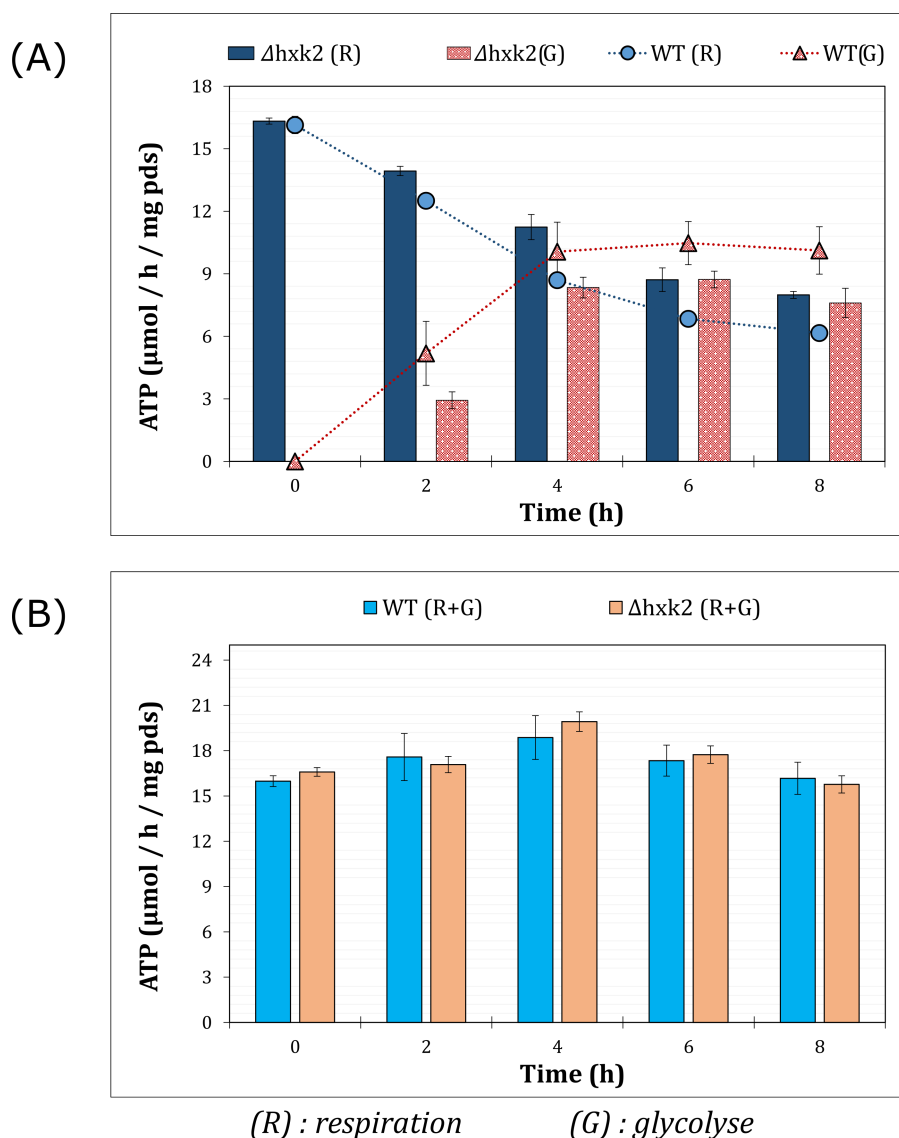
Dans le chapitre précédent, nous avons mis en évidence qu'après l'ajout du glucose la participation de la glycolyse dans la synthèse d'ATP chez *S. cerevisiae* augmente.

Ainsi, les cellules réduisent leurs capacités respiratoires et utilisent le processus de la fermentation alcoolique pour réoxyder le NADH cytosolique. Par rapport à la respiration mitochondriale, la fermentation alcoolique présente la particularité de pouvoir régénérer le NAD<sup>+</sup> cytosolique, sans avoir pour conséquence une synthèse d'ATP.

La **figure 10.8** présente le flux théorique de production d'ATP minimal, calculé à partir du flux respiratoire mitochondrial et de production d'éthanol selon le bilan d'oxydation : un atome d'oxygène : 1,5 ATP pour la respiration et 1 glc : 2 pyruvate : 2 ATP pour la glycolyse. (Choix argumenté dans le **chapitre 9**).

Dans la **figure 10.8–A**, nous observons, que dans les cellules  $\Delta h x k 2$ , la synthèse de l'ATP glycolytique augmente après l'ajout du glucose. Cependant, cette participation reste plus faible d'environ 40 % par rapport au sauvage dans la période entre T0 et quatre heures après l'ajout du glucose. Au-delà de quatre heures, le flux de synthèse de l'ATP glycolytique dans les cellules  $\Delta h x k 2$  est proche de celui des cellules sauvages.

Toutefois, cette diminution de la participation de la glycolyse dans la synthèse d'ATP est compensée par le système des OXPHOS. En effet, les sommes des deux flux de synthèse d'ATP glycolytique minimal et OXPHOS des deux souches : sauvage et  $\Delta h x k 2$  sont comparables (**Figure 10.8–B**). La délétion de l'hexokinase II semble donc modifier la balance entre la glycolyse et le système des OXPHOS dans la synthèse d'ATP.



**Figure 10.8** – Flux de synthèse d'ATP assuré par la glycolyse « G » et les OXPHOS « R » dans la souche sauvages et  $\Delta hvk2$ , après l'ajout de glucose. Le flux de production d'ATP de chaque voie métabolique est calculé à partir des flux respiratoire et de production d'éthanol selon le bilan d'oxydation :  $\frac{1}{2} O_2$  : 1,5 ATP pour la respiration et 1 glc : 2 pyruvate : 2 ATP pour la glycolyse. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

#### 10.4.5 Influence de la délétion de l'hexokinase II sur le rapport ATP/ADP

La tendance des cellules  $\Delta hvk2$  à diminuer leur capacité d'oxydation mitochondriale du NADH cytosolique en faveur du processus de la fermentation alcoolique, nous laisse suggérer que ces dernières possèdent un rapport ATP/ADP élevé durant toute la cinétique après l'ajout du glucose, comme dans la souche sauvage. Les cellules  $\Delta hvk2$  recourait à la fermentation alcoolique afin de découpler la réoxydation du NADH cytosolique de la

synthèse d'ATP, et maintenir ainsi un rapport ATP/ADP favorable à la glycolyse.

Cependant, le dosage de l'ATP et l'ADP dans les cellules  $\Delta h x k 2$ , (**Tableau 10.4**), montre que le statut énergétique des cellules  $\Delta h x k 2$ , après l'ajout du glucose est plus faible par rapport aux cellules sauvages. Alors que dans les cellules sauvages, le rapport ATP/ADP augmente d'environ 45 % après l'ajout du glucose, dans les cellules  $\Delta h x k 2$ , le rapport ATP/ADP reste comparable au contrôle (sans glucose) durant presque toute la cinétique. À l'exception du point 6h, où le rapport ATP/ADP augmente d'environ 20 %. Toutefois, cette augmentation du statut énergétique dans les cellules  $\Delta h x k 2$  reste faible si nous la comparons avec la souche sauvage.

**Tableau 10.4 – Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP au cours de la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta h x k 2$ ).** Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

Temps (h)	ATP (mM)	ADP (mM)	Ratio (ATP/ADP)
<b>sauvage</b>			
0	4,51 $\pm$ 0,29	0,98 $\pm$ 0,10	4,74 $\pm$ 0,44
2	4,46 $\pm$ 0,36	0,81 $\pm$ 0,12	5,71 $\pm$ 0,46
4	4,22 $\pm$ 0,37	0,62 $\pm$ 0,09	7,06 $\pm$ 0,49
6	4,42 $\pm$ 0,11	0,57 $\pm$ 0,03	7,83 $\pm$ 0,24
8	4,45 $\pm$ 0,23	0,65 $\pm$ 0,03	6,86 $\pm$ 0,16
<b><math>\Delta h x k 2</math></b>			
0	4,11 $\pm$ 0,21	0,85 $\pm$ 0,06	4,90 $\pm$ 0,35
2	2,61 $\pm$ 0,44	0,53 $\pm$ 0,04	4,86 $\pm$ 0,46
4	3,00 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,05	4,73 $\pm$ 0,31
6	4,15 $\pm$ 0,19	0,73 $\pm$ 0,08	5,99 $\pm$ 0,75
8	3,38 $\pm$ 0,33	0,85 $\pm$ 0,09	4,14 $\pm$ 0,54

De plus, d'après le **tableau 10.4**, non seulement les cellules  $\Delta h x k 2$  ne modifient pas leur statut énergétique mais aussi, les concentrations intracellulaires de l'ATP et l'ADP diminuent dans ces cellules, après l'ajout du glucose. Cette diminution est plus marquante dans la période entre T0 et quatre heures après l'ajout du glucose. Dans cette période, la diminution de la concentration de l'ATP et l'ADP dépasse les 30 % par rapport au contrôle (sans glucose), contre une diminution de 15 % pour le reste de la cinétique.

Dans le métabolisme prolifératif, la synthèse de la biomasse augmente le besoin des cellules en nucléotides (ATP, ADP, AMP, UTP, etc.) précurseurs des acides nucléiques. La voie des pentoses phosphates occupe une place importante dans la synthèse des nucléotides. Cette dernière est en effet la principale source du ribose-5-phosphate, qui sert de précurseur à la régénération du pool des nucléotides [227].

Dans la littérature, plusieurs études réalisées sur des cellules de mammifères et de levures, suggèrent que dans les conditions de prolifération rapide, une activité élevée de la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH) est nécessaire pour maintenir l'homéostasie redox (NADPH/NADP<sup>+</sup>) et anabolique des cellules (synthèse des lipides et nucléotides) [235, 145, 227]. Dans une lignée cellulaire de fibroblastes (*Balb/c 3T3*), il a été montré que la stimulation de la prolifération cellulaire corrèle avec une augmentation de l'activité à travers la G6PDH d'environ 60 % [235]. La G6PDH catalyse la première réaction de la voie des pentoses phosphates [181], et est caractérisée comme catalysant l'étape contrôlante de la voie des pentoses phosphates [226, 235].

De plus, chez *S. cerevisiae*, il a été montré dans des conditions de prolifération sur glucose (30 mM et plus), que la délétion de l'hexokinase II provoque une diminution importante de niveau de transcription du gène *ZWF1* [219], qui code pour la G6PDH de la levure [181].

Dans les cellules  $\Delta h x k 2$ , la diminution du niveau d'expression de la G6PDH pourrait provoquer une limitation dans le flux de conversion de glucose en ribose-5-phosphate à travers la voie des pentoses phosphates, induisant ainsi une limitation dans le processus de régénération du pool des nucléotides.

Pour expliquer la diminution de la concentration de l'ATP et l'ADP dans les cellules  $\Delta h x k 2$  après l'ajout du glucose, nous avons formulé l'hypothèse que cela pourrait être

dû au piégeage des nucléotides dans les voies de biosynthèse, notamment la synthèse des acides nucléiques (ADN, ARN).

#### 10.4.6 Le couplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP dans la souche $\Delta hxk2$ , après l'ajout du glucose

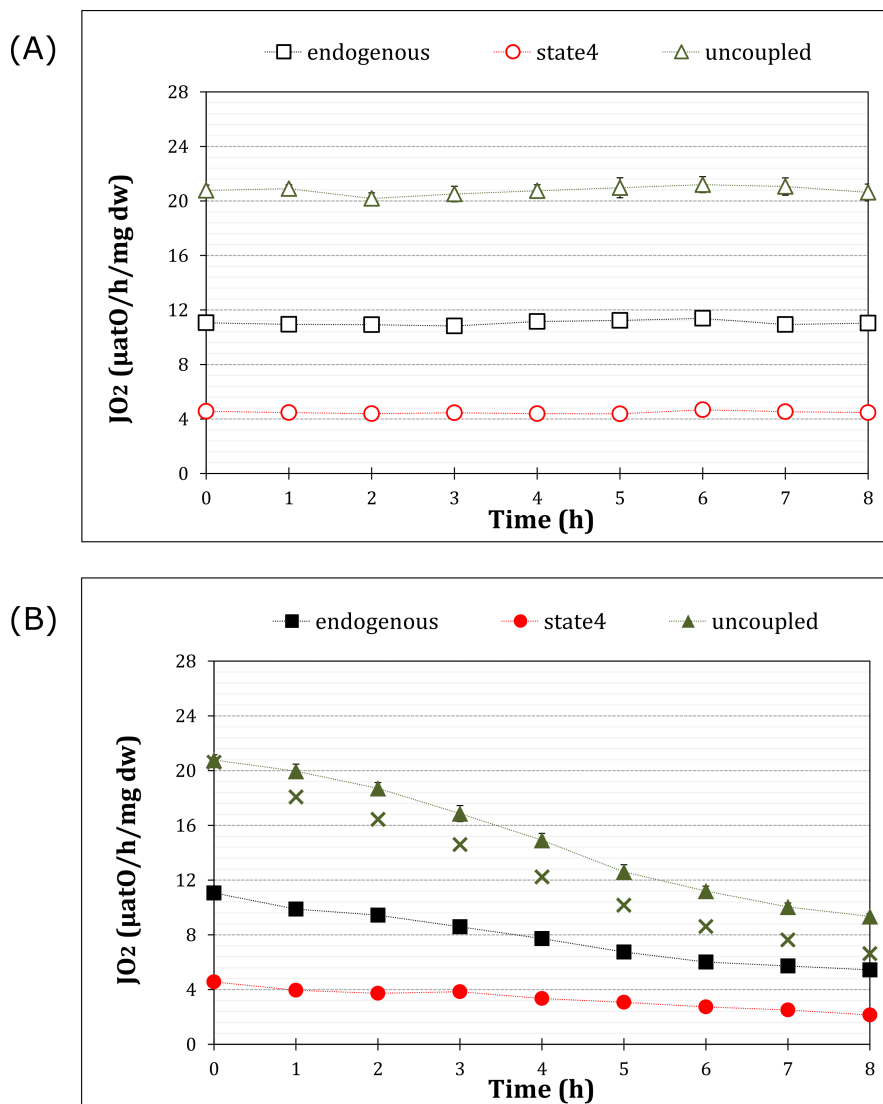
L'incapacité des cellules  $\Delta hxk2$  à augmenter leur statut énergétique après l'ajout du glucose, alors qu'elles possèdent un flux respiratoire endogène plus important, nous amène à aborder la question relative à l'efficacité du système des OXPHOS dans la synthèse d'ATP. En effet, cette dernière ne dépend pas seulement du flux de transfert des électrons à travers la chaîne respiratoire (consommation d'oxygène) mais de plusieurs facteurs dont le degré de couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase [172, 88].

Pour déterminer si le flux élevé de la respiration endogène des cellules  $\Delta hxk2$ , lors de la prolifération sur glucose est accompagnée d'une augmentation du flux de synthèse d'ATP mitochondrial par rapport au sauvage, nous avons évalué la vitesse de fonctionnement minimale et maximale de la chaîne respiratoire des cellules  $\Delta hxk2$ .

Comme nous pouvons constater dans la **figure 10.9**, que ce soit en absence (**A**) ou en présence de glucose (**B**), le flux de la respiration non phosphorylante des cellules  $\Delta hxk2$  est plus faible par rapport au flux de la respiration endogène, montrant le couplage entre la respiration endogène et la synthèse d'ATP.

Ainsi, dans la **figure 10.9-B**, nous observons une diminution du flux de consommation d'oxygène à l'état découplé ( $\blacktriangle$ ) très similaire à celle observée dans la souche sauvage ( $\blacktimes$ ). Dans la mesure où nous avons mis en évidence dans cette dernière une diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial après l'ajout du glucose. Ces résultats de respiration découplée des cellules  $\Delta hxk2$  nous laisse supposer une probable diminution de la quantité de l'équipement enzymatique mitochondrial dans les cellules  $\Delta hxk2$ .

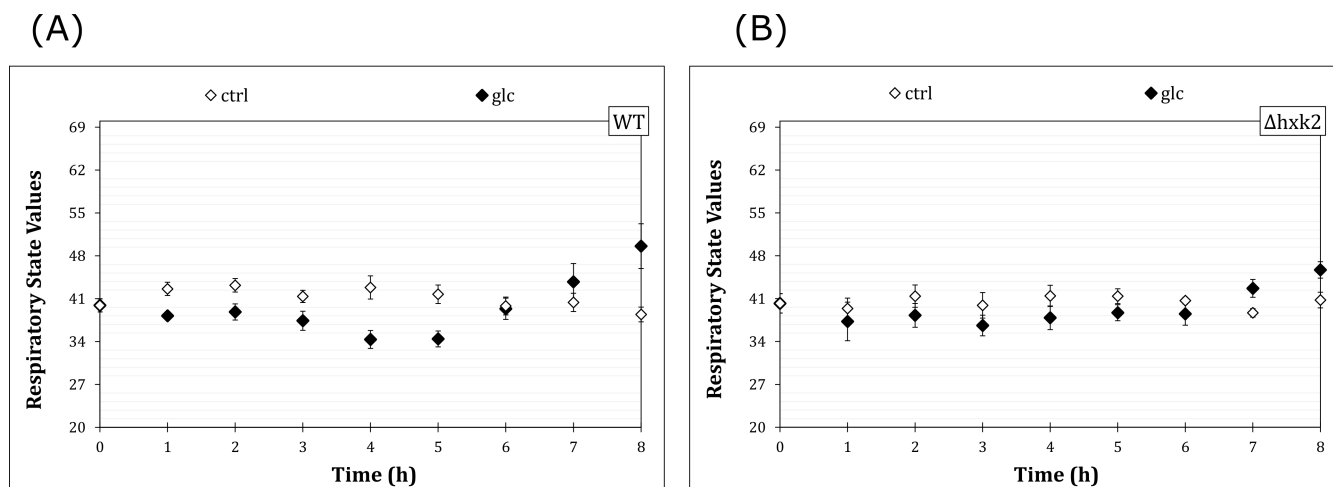
La détermination du RSV (Respiratory State Value) des cellules  $\Delta hxk2$  (**Figure 10.10**), montre que les changements de l'état stationnaire de la respiration endogène par rapport au contrôle (sans glucose), sont moins importants dans la souche  $\Delta hxk2$  (**B**),



**Figure 10.9 – Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de la souche  $\Delta h x k 2$ , avant et après l'ajout de glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée (A). À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (B) au milieu de culture. Un suivi de la respiration endogène, non phosphorylante (state 4) et découplée est réalisé sur huit (8) heures. Les flux de respiration non phosphorylante et découplée sont obtenus comme décrit dans le matériels et méthodes. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les (✱) dans (B) représentent le flux de la respiration découplée de la souche sauvage, après l'ajout du glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne (X)  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

par rapport à la souche sauvage (A). Jusqu'à six heures après l'ajout du glucose, aucune différence significative de l'état stationnaire de respiration n'est observée dans la souche  $\Delta h x k 2$ . Ceci est en accord avec l'évolution du rapport ATP/ADP. Le système des OXPHOS dans les cellules  $\Delta h x k 2$  ne semble pas subir de contrainte thermodynamique exercée

par le potentiel phosphate. L'activité de ce dernier reste comparable au contrôle et est supérieur à celle du sauvage.



**Figure 10.10 – Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hvk2$ ), après l'ajout de glucose.** Le RSV est calculé par la détermination du rapport entre [flux de la respiration endogène (-) flux de la respiration non phosphorylante] et [flux de la respiration découplée (-) flux de la respiration non phosphorylante]. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Au-delà de six heures, l'activité du système des OXPHOS des cellules  $\Delta hvk2$  augmente. Dans la souche sauvage, durant la période entre cinq et huit heures, la simulation de la respiration dans ces conditions a pour conséquence la baisse du rendement ATP/O. Le fait que les cellules  $\Delta hvk2$  possèdent une activité légèrement plus faible par rapport au sauvage dans cette période suggère que le rendement ATP/O est meilleur dans les cellules  $\Delta hvk2$ . Donc dans la mesure où le flux de la respiration endogène est plus élevé dans la souche  $\Delta hvk2$ , il est très probable que la participation des OXPHOS dans la synthèse d'ATP dans les cellules  $\Delta hvk2$  est plus importante par rapport aux cellules sauvages. Cependant, malgré cela, les cellules ne parviennent pas à augmenter leur statut énergétique. En effet, ces résultats soutiennent notre hypothèse relative au piégeage de l'ATP dans la constitution des macromolécules (voir ci-dessus).



#### 10.4.7 Origine de la diminution de la respiration mitochondriale dans les cellules $\Delta h x k 2$ , après l'ajout du glucose

##### ✧ Limitation en oxygène et/ou substrat ?

Dans nos conditions de culture après l'ajout du glucose, l'oxygène et le substrat respiratoire (lactate, NADH, EtOH) sont disponibles pour permettre un flux respiratoire normal. Une limitation au niveau de l'oxygène ou du substrat ne peut expliquer la diminution du flux respiratoire dans les cellules  $\Delta h x k 2$  après l'ajout du glucose.

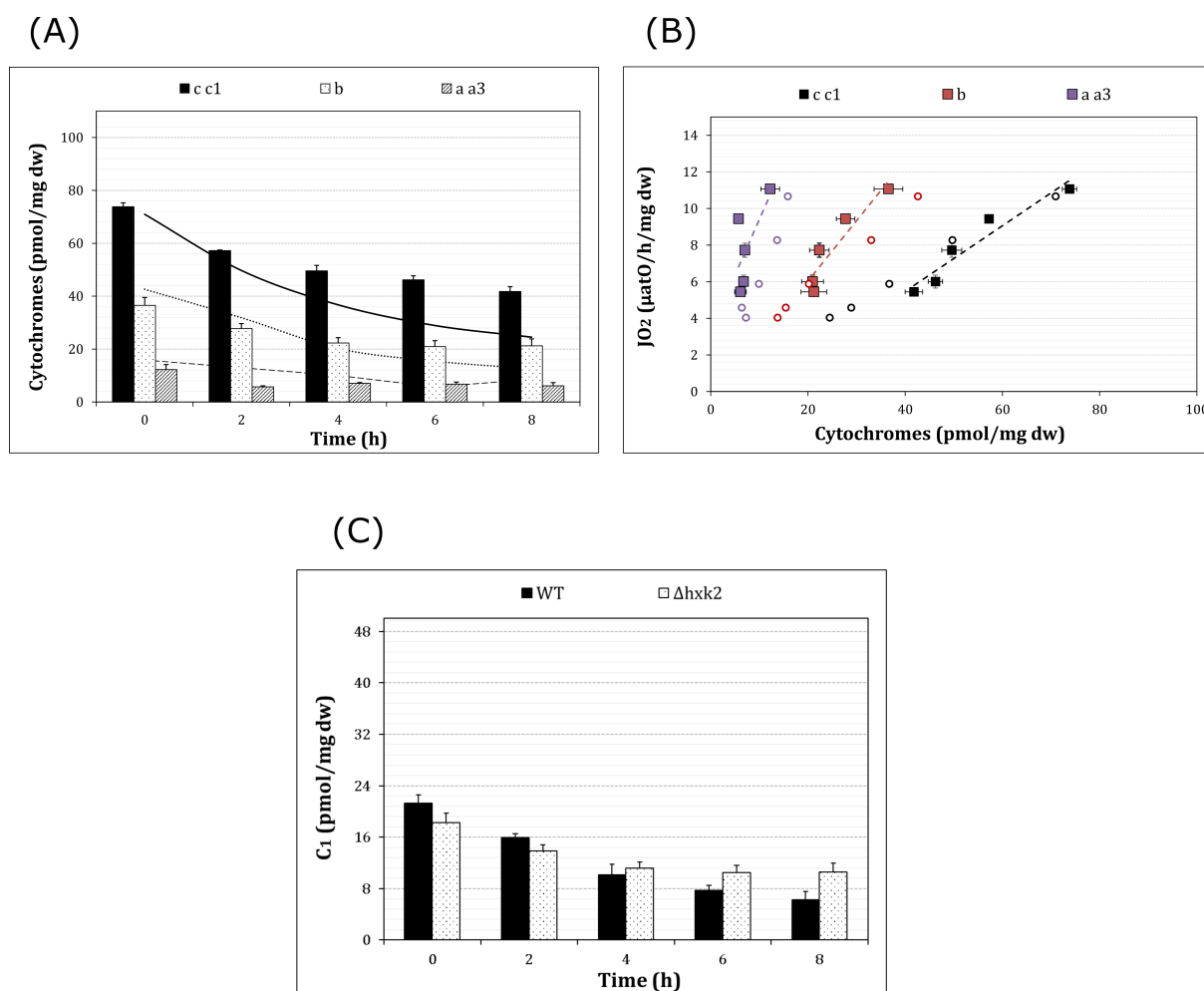
##### ✧ Diminution en quantité d'équipement enzymatique (chaîne respiratoire) ?

Pour vérifier si la diminution du flux respiratoire dans les cellules  $\Delta h x k 2$  est due à une diminution quantitative en unités de chaîne respiratoire, nous avons déterminé l'évolution du contenu en cytochromes des cellules.

Dans la souche  $\Delta h x k 2$ , l'ajout du glucose induit une diminution progressive de quantité de cytochromes au cours du temps (**Figure 10.11-A**). Cette diminution en cytochromes est proportionnelle à la respiration et suit une relation linéaire avec la diminution de la respiration (**B**).

Dans la souche  $\Delta h x k 2$ , la diminution du flux respiratoire après l'ajout du glucose est donc due à une diminution quantitative des unités de chaîne respiratoire.

Toutefois, les cellules  $\Delta h x k 2$  ont plus d'unités de chaîne respiratoire (cytochromes) au cours du temps par rapport à la souche sauvage (**A**). Six heures après l'ajout du glucose, les cellules  $\Delta h x k 2$  possèdent environ 60 % plus de cytochrome  $c_1$  par rapport aux cellules sauvages. Ceci est en accord avec nos résultats de respiration de la souche  $\Delta h x k 2$  qui présente un flux respiratoire plus élevé que les cellules sauvages.



**Figure 10.11 – Évolution du contenu en cytochromes dans la souche  $\Delta hpk2$ , après l'ajout du glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. Une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée à la culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. (A) Une mesure quantitative de cytochromes (exprimée en picomoles par milligramme poids sec de levures) est alors réalisée comme décrit dans le matériels et méthodes. Les (—), (...) et (- -) représentent la coconcentration des cytochromes c, c<sub>1</sub>, b, a et a<sub>3</sub> de la souche sauvage, après l'ajout du glucose, respectivement. (B) Relation linéaire entre vitesse de respiration cellulaire et concentration en cytochromes; forme ○ : sauvage; forme ■ :  $\Delta hpk2$ . (C) Quantité du cytochrome c<sub>1</sub> dans la souche sauvage et  $\Delta hpk2$ , après l'ajout du glucose, calculée à partir de la formule de stœchiométrie 1 c<sub>1</sub> : 2b. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM); n=5.

Comme décrit précédemment, l'hexokinase II est un facteur de transcription impliqué dans le processus de signalisation cellulaire induite par le glucose. Au cours du processus de la répression glucose, il a été montré que la délétion de ce dernier induit un défaut de répression d'un certain nombre de gènes. Parmi ces gènes on trouve les gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif [79], notamment *CYC1* [153] (gène codant pour l'isoforme

1 du cytochrome c [91]). Dans les conditions de croissance sur glucose, Il a été montré que les cellules  $\Delta h x k 2$  présentent une quantité en cytochrome  $c_1$  élevée par rapport aux cellules sauvages. Ceci, est en effet dû à une levée partielle de la répression de la transcription du gène *CYC1* [153]. Le mécanisme complet par lequel l'hexokinase II est impliquée dans la répression de *CYC1* n'est pas encore connu.

Nous observons dans la **figure 10.11–C** que les cellules  $\Delta h x k 2$  présentent une quantité plus importante de cytochrome  $c_1$ , par rapport aux cellules sauvages, durant la période entre quatre et huit heures après l'ajout du glucose.

Cependant, pour les cytochromes a et  $a_3$  (voir **A**), les résultats, ne montrent aucune différence entre les deux souches. La délétion de l'hexokinase II ne semble pas avoir un effet sur l'évolution de la quantité de cytochrome a et  $a_3$  en présence de glucose. Toutefois, il faut signaler qu'en raison de la concentration plus faible de a et  $a_3$  par rapport aux autres cytochromes (c,  $c_1$ , et b), la quantification du cytochrome a et  $a_3$  par la méthode spectroscopique (voir matériels et méthodes) est moins évidente. En effet, sur le spectre d'absorption, le pic d'absorption de a et  $a_3$  est large et peu défini, le point isobestique est difficile à caractériser dans la courbe d'absorption. Une sur/sous-estimation de a et  $a_3$  est donc possible.

L'analyse de l'ensemble des résultats de la respiration soulève la question suivante : quelles sont les mécanismes impliqués dans cette régulation différentielle de la quantité du compartiment mitochondrial ?

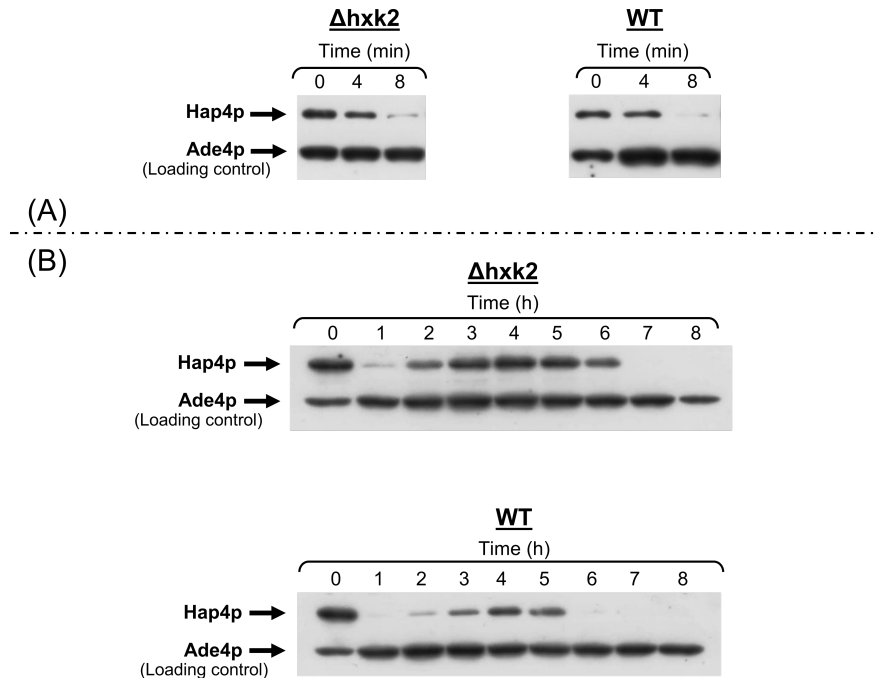
## 10.5 Origine de la diminution du compartiment mitochondrial après l'ajout du glucose

Dans la souche sauvage, nous avons mis en évidence que la diminution du compartiment mitochondrial après l'ajout du glucose, est associée à une diminution quantitative de la sous-unité Hap4p (sous-unité régulatrice du complexe HAP).

Pour déterminer l'origine de la diminution du compartiment mitochondrial chez les cellules  $\Delta h x k 2$ , nous avons suivi par western-blot, l'évolution de la quantité de Hap4p,

après l'ajout du glucose.

L'ajout du glucose induit dans les cellules  $\Delta hxk2$  la disparition de la protéine Hap4p (Figure 10.12-A).



**Figure 10.12** – Effet de l'ajout du glucose sur l'expression de *HAP4* chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hxk2$ ). L'effet de l'ajout du glucose sur l'expression de *HAP4* est mis en évidence par western-blot en suivant la quantité de la protéine Hap4p grâce à un anticorps dirigé contre la protéine. La quantité de protéines déposée correspond à celle extraite à partir de  $1,6 \times 10^6$  cellules. La protéine Ade4p est un contrôle de charge.

Cependant, la cinétique long-terme (B), montre que la sous-unité Hap4 réapparaît au milieu de la cinétique. La comparaison avec les résultats du sauvage, montre que l'intensité de cette réapparition est plus importante dans les cellules  $\Delta hxk2$ . En effet, dans les conditions de prolifération sur glucose, il a été montré que la délétion de l'hexokinase II induit une augmentation de la transcription du gène *HAP4* [219].

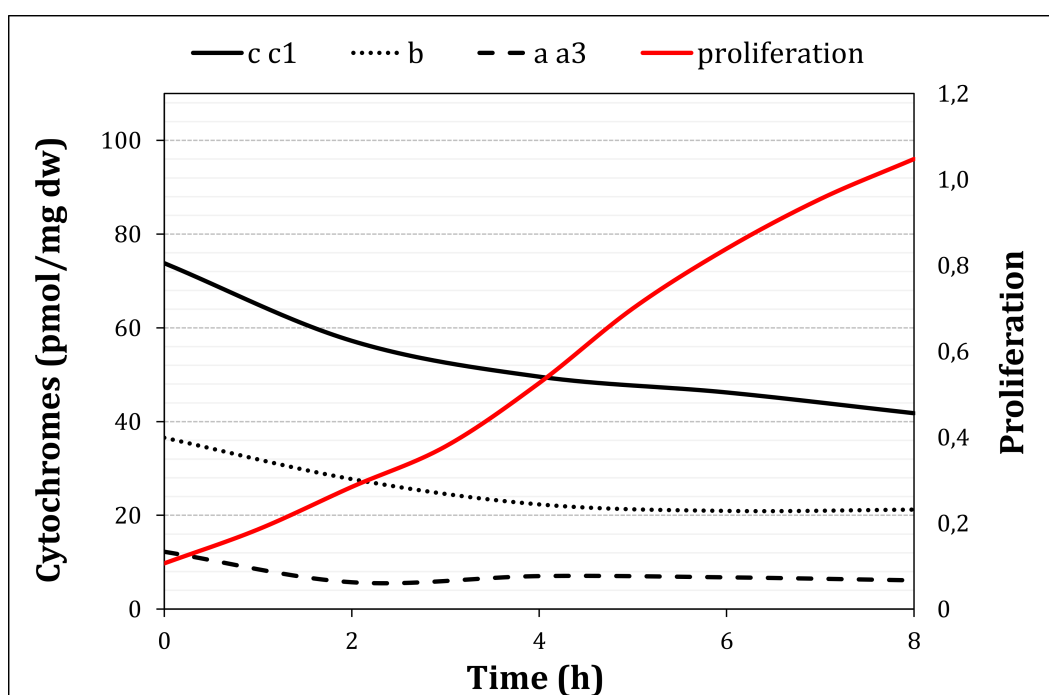
Comme dans le sauvage, cette tendance de réapparition progressive de Hap4p, dans les cellules  $\Delta hxk2$  est reproductible. Ceci bien que la concentration du glucose dans le milieu de culture soit toujours importante (supérieur à 30 mM).

Ces résultats semblent confirmer nos observations pour la souche sauvage qui suggèrent que la sous-unité Hap4p peut être exprimée même en présence d'une concen-

tration importante du glucose. De même dans la souche  $\Delta h x k 2$ , cette réapparition de Hap4p au milieu de la cinétique entre 2h et 8h semble avoir un effet sur le taux de diminution de la quantité de cytochromes (voir figure 10.11-A).

En effet, la comparaison de la cinétique d'évolution des cytochromes (Figure 10.13) avec la vitesse de prolifération (—) montre que le taux de dilution des cytochromes est plus élevé durant la première période entre T0 et trois heures suivant l'ajout du glucose. Or durant cette même période, la vitesse de prolifération est plus faible par rapport à la période entre trois et six heures, suggérant ainsi, une réactivation du processus de la biogenèse mitochondriale en présence du glucose.

La réapparition de la sous-unité Hap4p semble donc induire une activation de la biogenèse mitochondriale dans les cellules  $\Delta h x k 2$ .



**Figure 10.13** – Tendence d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes dans la souche  $\Delta h x k 2$ , après l'ajout du glucose.

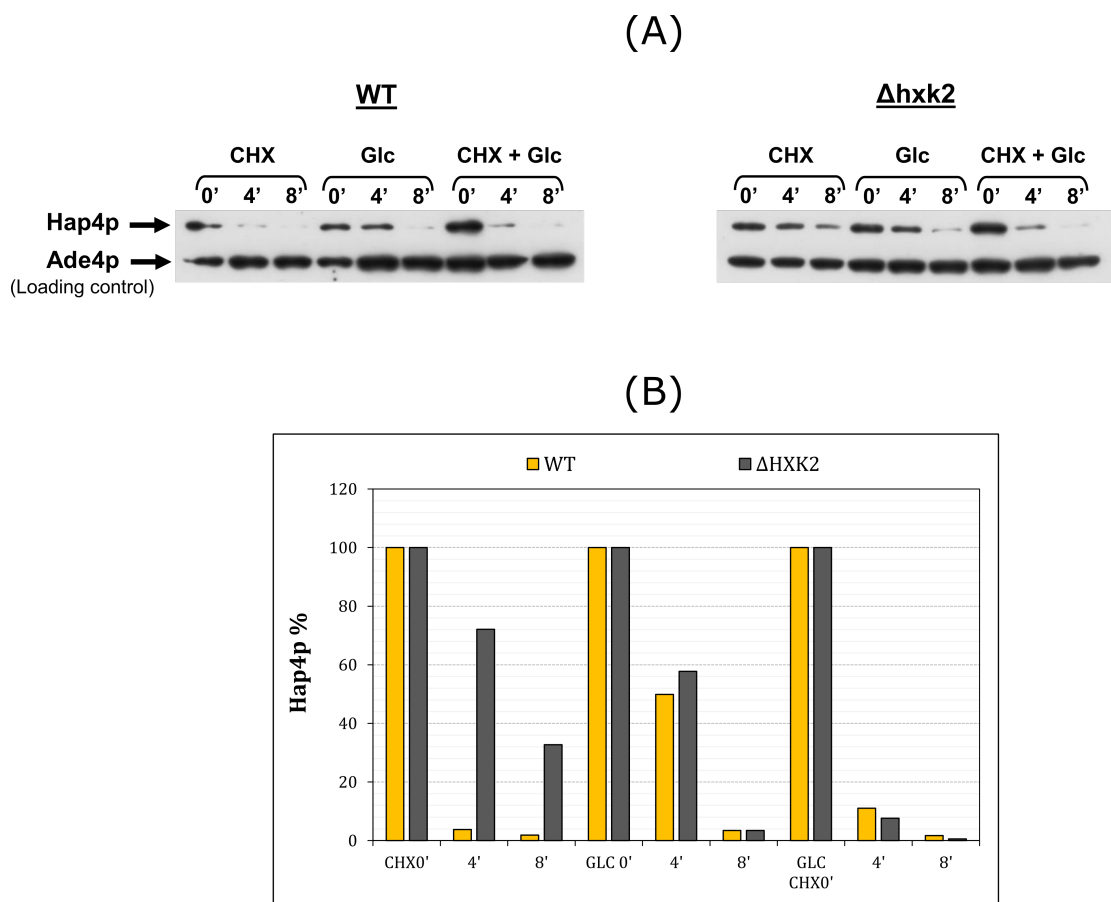
## 10.6 Effet de la délétion de l'Hexokinase II sur le turn-over de Hap4p

La quantité d'une protéine est déterminée par l'équilibre entre la synthèse et la dégradation de la protéine (turn-over). Chez *S. cerevisiae*, Yoboue *et al.*, [261], ont montré que le turn-over de Hap4p est très court, sa durée de demi-vie est moins de huit minutes. Ceci est indépendant de la présence du glucose.

Dans les cellules sauvages, puisque le glucose via le facteur de répression Mig1 induit un arrêt de la transcription du gène *HAP4* [68], la disparition de Hap4p suite à l'ajout du glucose est en grande partie justifiée par l'arrêt de sa transcription.

Pour déterminer l'effet de la délétion de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p, nous avons suivi la cinétique de disparition de Hap4p dans trois conditions :

- 1) En présence du cycloheximide seul (0,4 mg/ml). Ce dernier est un inhibiteur de la transcription protéique, qui agit sur la sous-unité 60S des ribosomes [10]. L'intérêt de cette condition est de vérifier si la délétion de l'hexokinase II affecte le temps nécessaire à la dégradation de Hap4p, indépendamment du glucose.
- 2) En présence du glucose à 70 mM (condition contrôle).
- 3) En présence du cycloheximide (0,4 mg/ml) et du glucose (70 mM). L'intérêt de cette condition est de vérifier s'il y a un effet synergique du cycloheximide et du glucose sur le temps nécessaire à la dégradation de Hap4p.



**Figure 10.14 – Effet de la délétion de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p.** L'effet de la délétion de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p est mis en évidence par western-blot (A) en suivant sa quantité après l'ajout de 0,4 mg/ml du cycloheximide, grâce à un anticorps dirigé contre la protéine. La quantité de protéines déposée correspond à celle extraite à partir de  $1,6 \times 10^6$  cellules. La protéine Ade4p est un contrôle de charge. La quantification de Hap4p (B) est réalisée par lecture optique de la densité de coloration sur chaque bande à l'aide des outils du logiciel ImageJ. Puis les valeurs sont normalisées par rapport au contrôle de charge (Ade4p).

Comme nous pouvons le constater dans la **figure 10.14**, la dégradation de Hap4p est moins rapide dans la souche  $\Delta hvk2$  et cela indépendamment de la présence du glucose. La délétion de l'hexokinase II semble donc agir sur le mécanisme de dégradation de Hap4p en augmentant la stabilité de la protéine.

Cependant, après l'ajout du glucose, nous observons que la stabilité de la protéine Hap4p diminue largement par rapport à la condition avec cycloheximide seul. Ceci, suggère en effet, que le glucose joue aussi un rôle dans la stabilité de la protéine Hap4p.

# *Effet de la surexpression de HAP4 sur l'induction de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae**

Dans le **chapitre 9**, nous avons mis en évidence que lors de la prolifération sur glucose, les cellules sauvages de *S. cerevisiae*, diminuent la biogenèse du compartiment mitochondrial (répression transcriptionnelle de *HAP4*). Ceci à terme conduit à une diminution quantitative de l'équipement enzymatique mitochondrial cellulaire par effet de dilution.

Cependant, malgré cette diminution drastique dans la capacité de synthèse d'ATP mitochondrial, les cellules maintiennent un statut énergétique élevée (rapport ATP/ADP élevé). Dans ces conditions, la glycolyse est une source importante d'ATP. D'après nos résultats chez la souche sauvage (voir **chapitre 9**), cette diminution de la capacité de synthèse d'ATP mitochondrial semble permettre aux cellules de maintenir l'homéostasie entre le flux de l'apport du carbone et la synthèse d'ATP.

Si nos conclusions vis-à-vis de la diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial sont pertinentes, le maintien d'une quantité plus importante d'unités de chaîne respiratoire, lors de la prolifération sur glucose (un flux de synthèse d'ATP mitochondrial plus important), devrait créer une contrainte thermodynamique (via le potentiel phos-



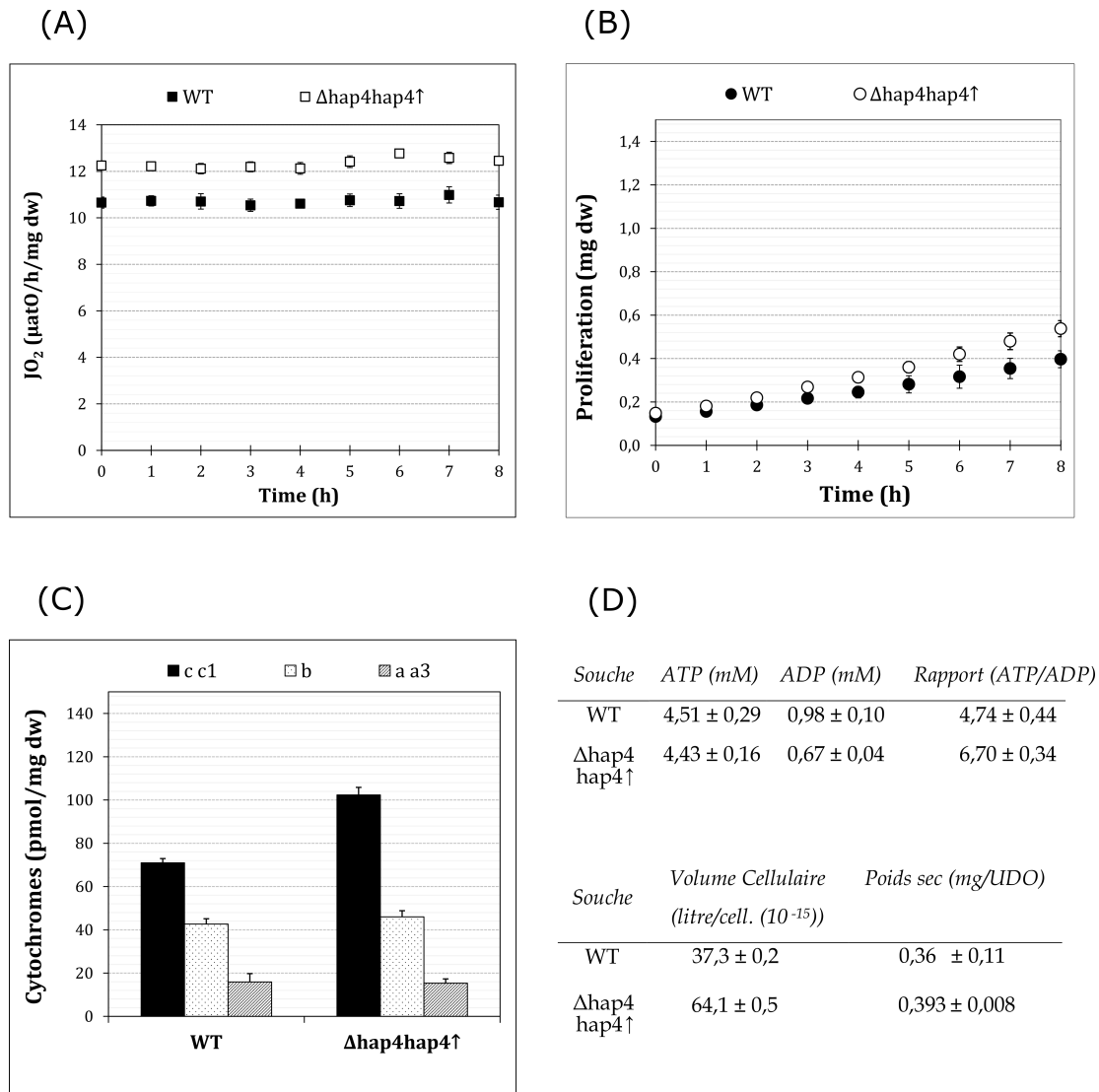
phate) sur le flux de la glycolyse (**voir chapitre 1**). Ainsi, pour maintenir l'homéostasie énergétique, les cellules réduiraient le flux à travers la glycolyse et donc le flux de carbone.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié l'effet du maintien de l'équipement enzymatique mitochondrial (par une surexpression ectopique du gène *HAP4*, codant pour la sous unité Hap4p, sous-unité régulatrice du complexe HAP), sur l'évolution de l'homéostasie énergétique et métabolique de *S. cerevisiae*, lors de l'induction de l'effet Warburg.

### 11.1 Effet de la surexpression de *HAP4* sur le métabolisme de *S. cerevisiae* (condition de contrôle, sans glucose)

Contrairement à la délétion de l'hexokinase II, la surexpression de *HAP4* provoque des modulations physiologiques et métaboliques importantes lors de la prolifération sur lactate 2 % (condition contrôle).

Dans la **figure 11.1–A**, nous observons que les cellules surexprimant *HAP4* présentent un flux respiratoire plus élevé et prolifèrent plus rapidement (**B**) par rapport à la souche sauvage. La quantification des cytochromes (**C**) met en évidence que la surexpression de *HAP4* provoque une modification quantitative de l'équipement enzymatique mitochondrial. Les cellules surexprimant *HAP4* possèdent environ 30 % plus de cytochromes c et  $c_1$  par rapport à la souche sauvage. Cependant, en ce qui concerne le cytochromes b, a et  $a_3$ , nous ne constatons qu'une légère augmentation par rapport à la souche sauvage. La surexpression de *HAP4* semble donc affecter la quantité de cytochromes de façon spécifique. Dans la mesure où le cytochrome  $c_1$  est stœchiométrique avec le cytochrome b (2 b : 1  $c_1$ ), le cytochrome c semble le plus affecté par la surexpression de *HAP4*. La quantification de l'ATP et l'ADP cellulaire de la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , montre que ces dernières présentent un rapport ATP/ADP environ 40 % plus élevé en comparaison avec le sauvage (**D**).



**Figure 11.1 – Effet de la surexpression de HAP4 sur la prolifération et le métabolisme oxydatif de *S. cerevisiae* (condition contrôle).** (A) : Flux de la respiration endogène. (B) : Prolifération cellulaire. (C) : Quantité de cytochromes. (D) : Concentration en nucléotides (ATP, ADP), volume cellulaire et poids sec. Les mesures sont réalisées comme décrit dans le matériels et méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ ) ± erreur standard de la moyenne (ESM).  $n=5$ .

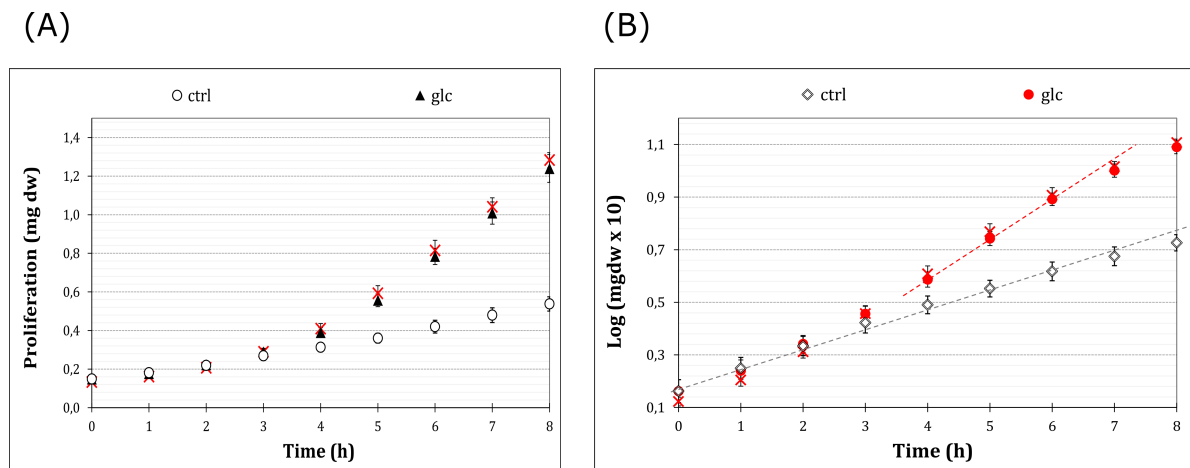
Chez *S. cerevisiae*, le lactate est initialement métabolisé dans les mitochondries. Dans les conditions expérimentales où le lactate (2 %) est la seule source de carbone, il a été montré qu'il existe une relation linéaire entre la quantité de cytochromes, la vitesse de respiration et efficacité constante de production de biomasse [69]. Ainsi, plus les cellules possèdent de cytochromes, plus elles consomment d'oxygène et plus elles convertissent l'énergie potentielle du substrat en ATP par unité de temps. Les cellules dépensent cette

énergie dans la production de biomasse et les processus de maintenance (croissance et prolifération).

## 11.2 Effet de la surexpression de *HAP4* sur la cinétique d'induction de l'effet Warburg

### 11.2.1 Évolution de la vitesse de prolifération cellulaire après l'ajout du glucose

L'ajout du glucose au milieu de culture, induit chez la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , une augmentation importante et progressive de la production de biomasse (mg poids sec) (Figure 11.2–A).



**Figure 11.2 – Effet du glucose sur la prolifération de la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ .** Deux cultures de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (▲) ou non (○) au milieu de culture. Un suivi de croissance (poids sec) est réalisé sur huit (8) heures (A). Puis un calcul de la valeur du log (courbe de croissance) de la quantité de cellules produites après chaque heure est réalisé pendant la cinétique 8h (B) (voir Matériels et méthodes). Les (×) représentent la quantité de biomasse (A) et la courbe de croissance (B) de la souche sauvage, après l'ajout du glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne (X)  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Quant à la vitesse de prolifération sur glucose (Figure 11.2–B), nous n'observons aucune différence entre la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  et la souche sauvage. Cependant, ce résultat est relativement trompeur, la surexpression de *HAP4* provoque bien un retard dans la cinétique d'augmentation de la vitesse de prolifération. En effet les deux souches

sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$  ne possédaient pas la même vitesse de prolifération dans la condition de départ (sans glucose). Pour la souche sauvage, elle est de 0,14 ( $\mu^{-1}$ ), alors que pour la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , elle est de 0,16 ( $\mu^{-1}$ ). La différence de la cinétique d'évolution de la vitesse de prolifération entre les deux souches devient plus marquante lorsqu'on exprime les résultats en pourcentage (**Tableau 11.1**). Jusqu'à trois heures après l'ajout de glucose, la vitesse de prolifération des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (●) n'est que faiblement augmentée (60 %) par rapport à son contrôle (sans glucose) (◇). Or, dans la souche sauvage, l'augmentation de la vitesse de prolifération était de 135 % au point 3h. Les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  ne rentrent en phase exponentielle qu'à partir de quatre heures après l'ajout de glucose (**Tableau 11.1**).

**Tableau 11.1 – Évolution du taux de croissance spécifique ( $\mu^{-1}$ ) de *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose.** Le pourcentage à droite de chaque valeurs de  $\mu^{-1}$  correspond au taux d'augmentation de ce dernier par rapport au contrôle (sans glucose). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

Temps (h)	sauvage	%		$\Delta hap4hap4\uparrow$	%
sans glc	$0,14 \pm 0,52 \cdot 10^{-2}$	0		$0,16 \pm 0,75 \cdot 10^{-2}$	0
1	$0,19 \pm 2,28 \cdot 10^{-2}$	39		$0,18 \pm 2,57 \cdot 10^{-2}$	10
2	$0,25 \pm 1,66 \cdot 10^{-2}$	82		$0,24 \pm 3,06 \cdot 10^{-2}$	45
3	$0,33 \pm 2,17 \cdot 10^{-2}$	145		$0,26 \pm 1,91 \cdot 10^{-2}$	62
4	$0,35 \pm 2,97 \cdot 10^{-2}$	156		$0,30 \pm 0,89 \cdot 10^{-2}$	85
5	$0,37 \pm 3,03 \cdot 10^{-2}$	172		$0,36 \pm 1,94 \cdot 10^{-2}$	121
6	$0,32 \pm 1,32 \cdot 10^{-2}$	134		$0,34 \pm 1,54 \cdot 10^{-2}$	112
7	$0,25 \pm 3,10 \cdot 10^{-2}$	84		$0,25 \pm 0,71 \cdot 10^{-2}$	55
8	$0,21 \pm 1,65 \cdot 10^{-2}$	55		$0,21 \pm 1,01 \cdot 10^{-2}$	27

En conclusion, la surexpression de *HAP4* ne semble pas changer significativement le phénotype de *S. cerevisiae*. Toutefois, le retard observé dans la cinétique d'augmentation de la vitesse de prolifération des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , soulève les questions suivantes :

- ☛ Chez *S. cerevisiae*, la surexpression de *HAP4* a-t-elle retardé le basculement métabolique après l'ajout de glucose ?
- ☛ Si l'hypothèse concernant les avantages métaboliques que procure la diminution du flux de synthèse d'ATP mitochondrial, lors de la prolifération sur glucose est valide, le maintien d'une capacité plus importante de synthèse d'ATP mitochondrial, lors de la prolifération sur glucose, crée-il des contraintes (cinétique/thermodynamique) pour le flux glycolytique ?

### 11.2.2 Influence de la surexpression de *HAP4* sur le basculement métabolique chez *S. cerevisiae*, après l'ajout de glucose

Comme nous l'avons décrit dans le **chapitre 9**, le métabolisme du lactate dans la souche sauvage est partiellement (75 %) réprimé après l'ajout de glucose. Dans cette dernière, la répression des gènes *CYB2*, *DLD1*, *CYC1* passe en grande partie par la répression de la sous-unité Hap4p, tandis que la régulation de l'expression du gène *JEN1* fait intervenir plusieurs facteurs, Mig1p et Mig2p répriment la transcription de *JEN1*, tandis que le complexe HAP l'active [148].

Dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , la sous-unité Hap4p est continuellement exprimée, même après l'ajout de glucose. Les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  sont censées toujours capable d'exprimer les enzymes nécessaires au métabolisme du lactate. Cependant, la présence du glucose dans le milieu de culture peut affecter le métabolisme du lactate dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  au niveau du transport. Malgré la surexpression de *HAP4*, au moins une partie de la répression du gène *JEN1* peut être maintenue par les deux facteurs de répression Mig1p et Mig2p.

Toutefois, malgré cette répression génétique du métabolisme du lactate, induite par le glucose, dans nos conditions expérimentales (après ajout de glucose), le métabolisme du lactate n'est pas complètement réprimé. Les cellules de *S. cerevisiae* continuent à métaboliser partiellement le lactate. En effet, des résultats préliminaires de notre

laboratoire, ont montré que dans ces conditions de culture, environ 25 % de flux respiratoire des cellules est due à l'oxydation du lactate au niveau des mitochondries.

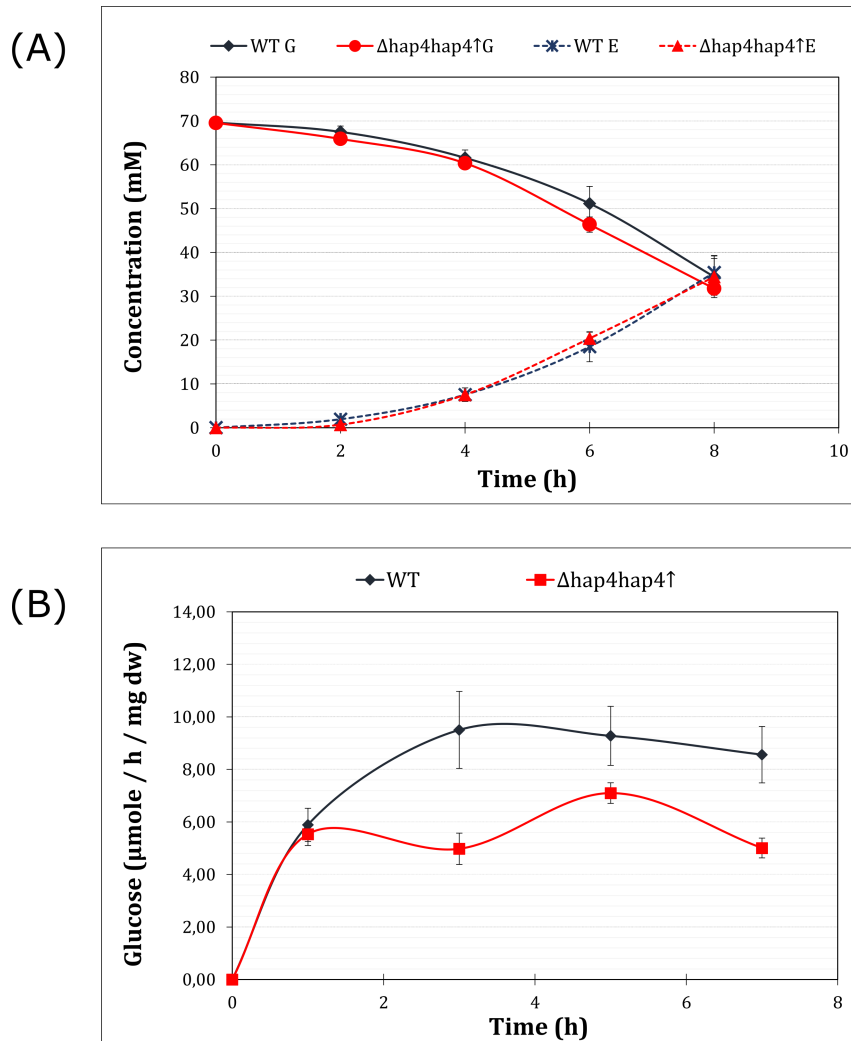
« Dans la suite de ce chapitre, notre raisonnement, sera basé sur le fait que les cellules utilisent préférentiellement et principalement le glucose comme source de carbone et que seulement 25 % du flux respiratoire provient du lactate. »

#### **11.2.2.1 Évolution du flux de consommation de glucose dans la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$**

La quantification du glucose dans le milieu de culture, (**Figure 11.3–A**) montre que les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  consomment le glucose ajouté. Cette consommation est accompagnée d'une apparition progressive d'éthanol dans le milieu de culture.

*Chez S. cerevisiae, la surexpression de HAP4 n'empêche donc pas le déclenchement du métabolisme fermentaire en aérobiose, après l'ajout de glucose.*

Sur le court terme, la surexpression de *HAP4* chez *S. cerevisiae*, ne semble pas affecter le flux de consommation de glucose. Les deux souches : sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$  présentent le même flux de consommation de glucose durant les deux premières heures suivant l'ajout du glucose (**B**).

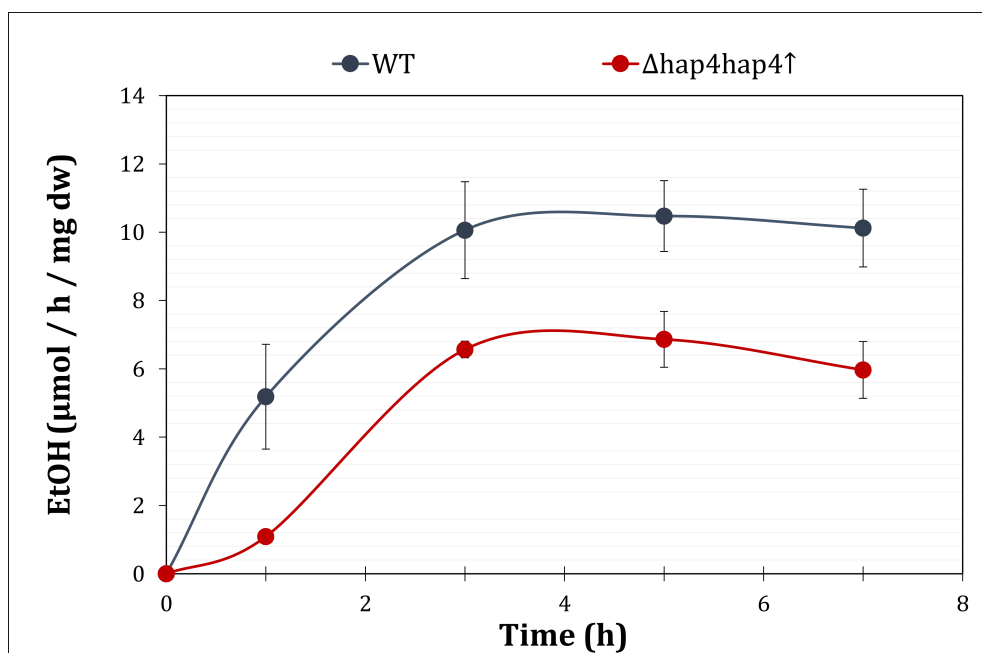


**Figure 11.3 – Évolution du flux de consommation de glucose chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose.** Deux cultures de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée au milieu de culture. (A) Un dosage de la concentration de glucose restant « G » et d'éthanol produit « E » dans le milieu de culture est réalisé par méthode enzymatique chaque deux (2) heures, pendant la cinétique (8h) (voir Matériels et méthodes). (B) Chaque point représente la moyenne de quantité de glucose consommé exprimée en micromole par heure par milligramme poids sec de cellules, sur un intervalle de deux (2) heures (voir matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=4$ , sauf (B) WT :  $n=5$ .

Cependant, sur le long terme, la surexpression de *HAP4*, affecte significativement le flux glycolytique. Après deux heures, alors que le flux du glucose dans les cellules sauvages augmente pour atteindre un état stationnaire à environ quatre heures après l'ajout de glucose, dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , le flux de consommation de glucose n'augmente pas et reste environ 25 % à 50 % plus faible par rapport au sauvage (B).

### 11.2.2.2 Évolution du flux de production d'éthanol dans la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$

La détermination de l'évolution du flux de production d'éthanol, après l'ajout de glucose (**Figure 11.4**) montre que les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  produisent moins d'éthanol par unité de temps par rapport à la souche sauvage. Cette diminution de flux est plus importante (80 % plus faible) dans le début de la cinétique, entre T0 et deux heures après l'ajout du glucose. Au-delà, le flux de transformation du glucose en éthanol augmente dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  et arrive à un niveau maximal constant, 40 % plus faible par rapport à la souche sauvage.



**Figure 11.4** – Évolution du flux de production d'éthanol chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose. Chaque point représente la moyenne de quantité d'éthanol produit exprimée en micromole par heure par milligramme poids sec de cellules, sur un intervalle de deux (2) heures (voir matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM); WT :  $n=5$ ;  $\Delta hap4hap4\uparrow$  :  $n=4$ .

La surexpression de *HAP4* semble réduire la proportion du flux de glucose dirigé vers le métabolisme fermentaire seulement dans les deux premières heures suivant l'ajout du glucose (**Tableau 11.2**).



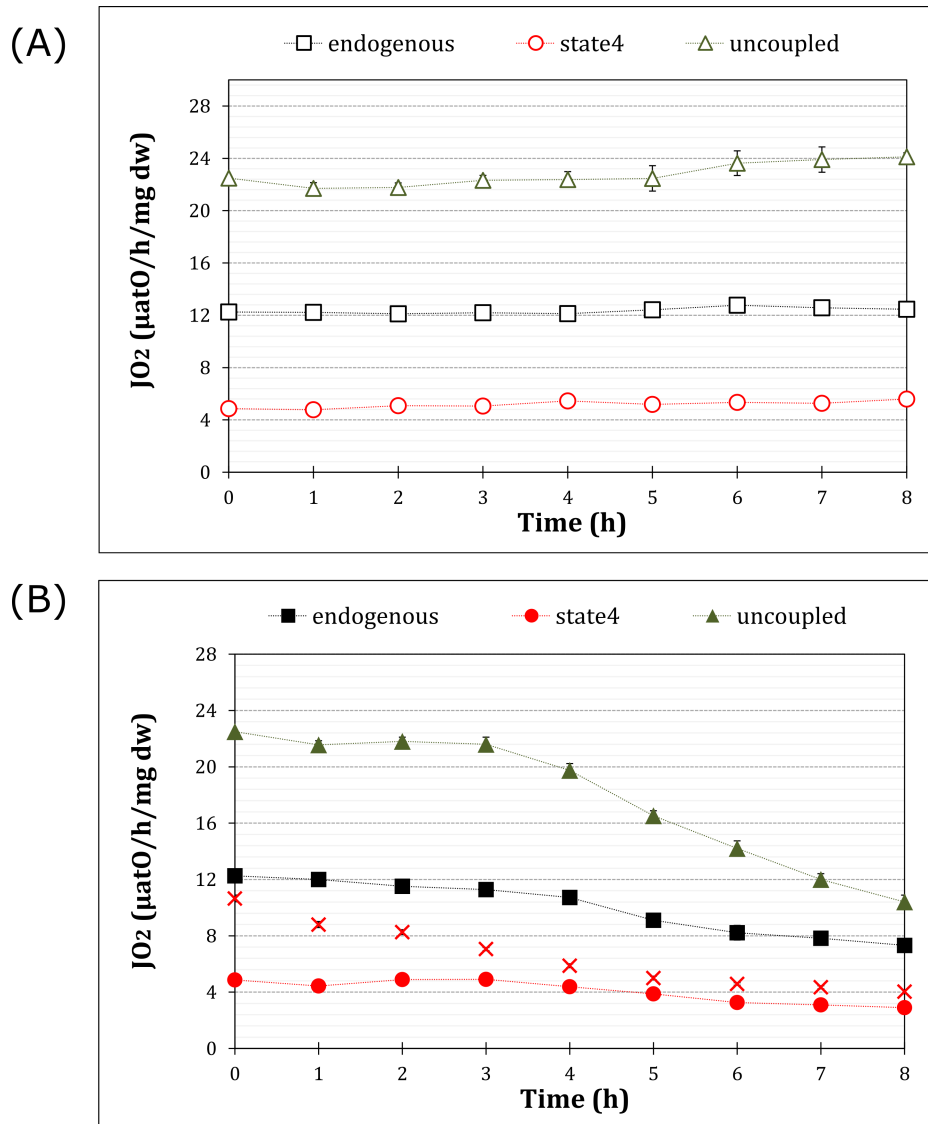
**Tableau 11.2 – Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose. Le rapport flux éthanol/flux glucose est obtenu par la division des valeurs du flux de production d'éthanol par celles du flux de consommation du glucose correspondants. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM); WT : n=5;  $\Delta hap4hap4\uparrow$  : n=4.**

Temps (h)	EtOH ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Glc ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Rapport
<b>sauvage</b>			
0h – 2h	5,18 $\pm$ 1,54	5,89 $\pm$ 0,63	0,82 $\pm$ 0,16
2h – 4h	10,06 $\pm$ 1,42	9,50 $\pm$ 1,47	1,12 $\pm$ 0,14
4h – 6h	10,47 $\pm$ 1,04	9,28 $\pm$ 1,12	1,18 $\pm$ 0,15
6h – 8h	10,12 $\pm$ 1,14	8,56 $\pm$ 1,07	1,26 $\pm$ 0,25
<b><math>\Delta hap4hap4\uparrow</math></b>			
0h – 2h	1,09 $\pm$ 0,15	5,54 $\pm$ 0,43	0,21 $\pm$ 0,05
2h – 4h	6,57 $\pm$ 0,24	4,98 $\pm$ 0,60	1,38 $\pm$ 0,18
4h – 6h	6,86 $\pm$ 0,82	7,10 $\pm$ 0,39	0,96 $\pm$ 0,06
6h – 8h	5,97 $\pm$ 0,83	5,01 $\pm$ 0,38	1,19 $\pm$ 0,12

En effet, dans le début de la cinétique, seulement 10 % du flux total du glucose est transformée en éthanol dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , contre environ 50 % dans la souche sauvage. Après deux heures, la proportion du glucose transformé en éthanol est comparable entre les deux souches : sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ .

### 11.2.2.3 Évolution du flux respiratoire dans la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$

Dans la **figure 11.5**, nous observons qu'au cours des trois premières heures après l'ajout du glucose, contrairement aux cellules sauvages, les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (■) possèdent un flux respiratoire comparable au contrôle (□) (sans glucose).



**Figure 11.5 – Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , avant après l'ajout de glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* ( $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (A) ou non (B) au milieu de culture. Un suivi de la respiration endogène, non phosphorylante (state 4) et découplée est réalisé sur huit (8) heures. Les flux de respiration non phosphorylante et découplée sont obtenus comme décrit dans le matériels et méthodes. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les (x) dans (B) représentent le flux de la respiration endogène de la souche sauvage, après l'ajout du glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne (X)  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM).  $n=5$ .

Chez *S. cerevisiae*, sur le court terme, la surexpression de HAP4, semble prévenir la répression du métabolisme oxydatif, après l'ajout de glucose.

Cependant, trois heures après l'ajout de glucose, nous constatons une diminution progressive de la respiration.

Chez *S. cerevisiae*, sur le long terme, la surexpression de *HAP4*, n'empêche pas la répression du métabolisme oxydatif, après l'ajout de glucose.

En effet, la diminution du flux de la respiration endogène trois heures après l'ajout de glucose, corrèle avec une diminution du flux respiratoire à l'état découplé (▲). Ceci suggère que la chaîne respiratoire des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  est affectée quantitativement (diminution) et/ou qualitativement (inhibition), après l'ajout de glucose.

Quoi qu'il en soit, malgré cette diminution de la respiration endogène, les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  conservent un flux respiratoire endogène plus important par rapport à la souche sauvage (✕).

La détermination du flux respiratoire après inhibition de l'ATP synthase par le triéthylétain (TET) (●) met en évidence, un flux respiratoire à l'état non phosphorylant largement plus faible par rapport au flux respiratoire endogène (■). Ceci montre que la respiration endogène est couplée à la synthèse d'ATP.

### ☛ La surexpression de *HAP4* retarde la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*

Après l'ajout de glucose (70 mM) dans le milieu de culture, nous avons pu caractériser chez la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  :

- Une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire (production de biomasse) ;
- Une consommation importante de glucose ;
- La fermentation du glucose en éthanol en aérobiose ;
- Une diminution de la vitesse de respiration mitochondriale.

Toutefois, la cinétique de mise en place de ces caractéristiques phénotypique de l'effet Warburg [249] est largement modifiée par la surexpression de *HAP4*. Jusqu'à

trois heures après l'ajout de glucose, aucune répression du métabolisme oxydatif n'est constatée et une très faible quantité de glucose est transformée en éthanol. Ceci montre en effet, que la surexpression de *HAP4* a empêché la mise en place de l'effet Warburg durant les trois premières heures suivant l'ajout de glucose. Cependant, cette situation ne perdure pas, les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  développent par la suite toutes les caractéristiques du phénotype de l'effet Warburg.

### 11.3 Origine de la diminution du flux de consommation de glucose dans les cellules $\Delta hap4hap4\uparrow$

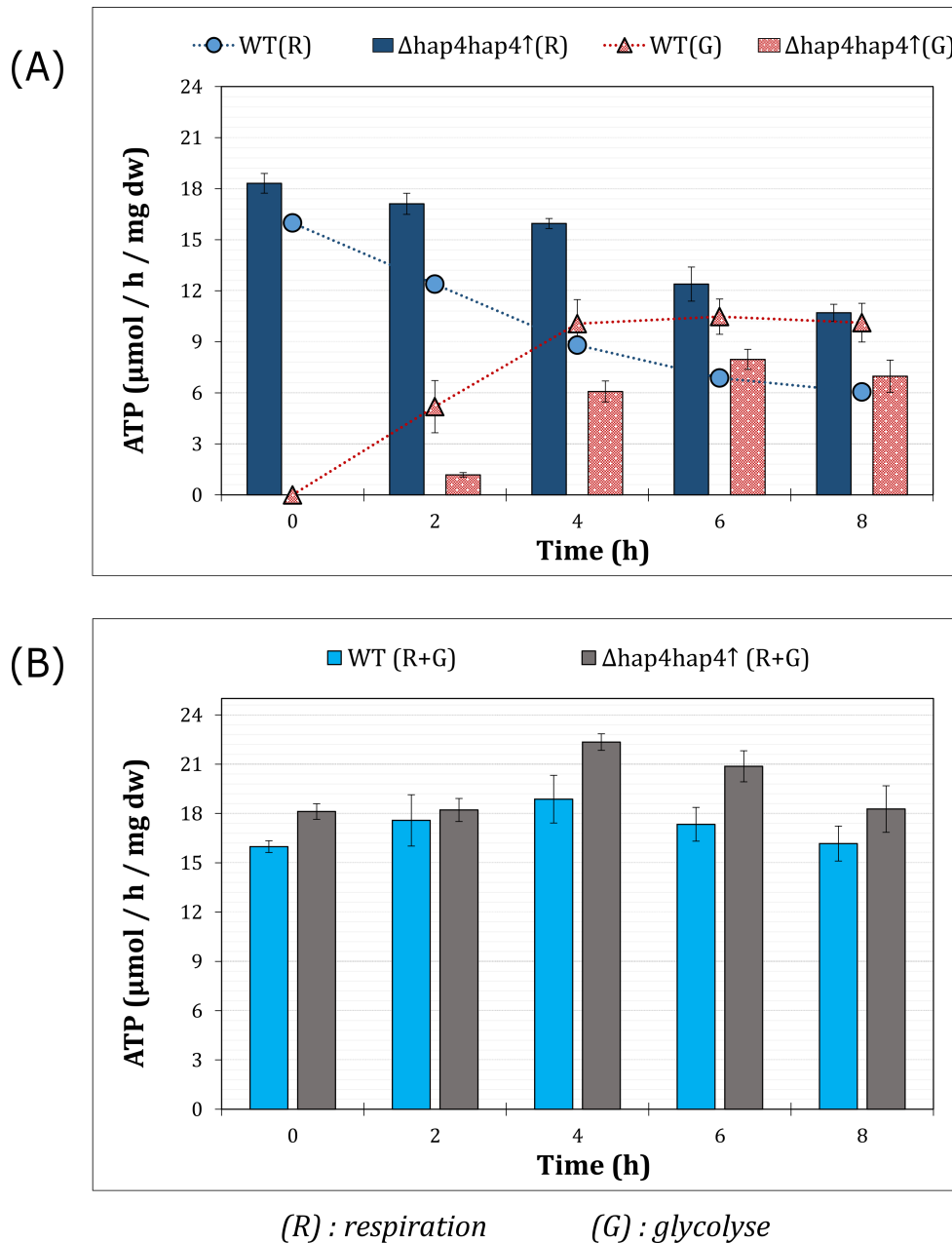
Dans le début de ce chapitre, nous avons mis en évidence que par rapport à la souche sauvage, les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  possèdent un rapport ATP/ADP plus élevé, ainsi qu'un flux respiratoire endogène couplé à une synthèse d'ATP plus importante. Ceci suggère que le flux de synthèse d'ATP mitochondrial dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  est plus important, lors de la prolifération sur lactate (condition contrôle).

Chez les eucaryotes, l'activité du système d'oxydation du glucose (glycolyse et OXPHOS) est régulée entre autres (stimulation/ inhibition) par les variations du potentiel phosphate (principalement le rapport ATP/ADP) [142].

Dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose, les deux systèmes de synthèse d'ATP (glycolyse et OXPHOS) fonctionnent dans un environnement riche en substrats (glucose, pyruvate, lactate, éthanol, NADH cytosolique). L'augmentation du flux de la glycolyse lors de la prolifération sur glucose, augmente à la fois la portion de l'ATP glycolytique et la concentration du NADH cytosolique. Dans cet état de figure et dans la mesure où le NADH cytosolique est un substrat prioritaire pour le système des OXPHOS (voir **chapitre 9**), le maintien d'un équipement enzymatique mitochondrial bien différencié dans ces conditions aura pour conséquence l'augmentation de la portion d'ATP issue de la respiration mitochondriale.

Dans la **figure 11.6–A**, nous observons que la balance entre flux de synthèse d'ATP glycolytique et mitochondrial est largement modifiée dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ . En effet, l'augmentation du flux de synthèse d'ATP mitochondrial dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$

est accompagnée d'une diminution du flux de synthèse d'ATP glycolytique. Le flux total de synthèse d'ATP reste comparable entre les deux souches : sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (B).



**Figure 11.6** – Flux de synthèse d'ATP assuré par la glycolyse « G » et les OXPHOS « R », dans la souche sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose. Le flux de production d'ATP de chaque voie métabolique est calculé à partir des flux respiratoire et de production d'éthanol selon le bilan d'oxydation :  $\frac{1}{2} O_2$  : 1,5 ATP pour la respiration et 1 glc : 2 pyruvate : 2 ATP pour la glycolyse. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM). WT :  $n=5$ ,  $\Delta hap4hap4\uparrow$  :  $n=4$ .

Comme la délétion de l'hexokinase II, la surexpression de HAP4 modifie la balance entre la glycolyse et le système des OXPHOS en termes de flux de synthèse d'ATP.

D'après ces résultats, il semble que dans les conditions de prolifération sur glucose, une relation inverse existe entre le flux de la glycolyse et le flux de la respiration mitochondriale.

Dans une cellule vivante, le potentiel phosphate est déterminé entre le flux de synthèse et d'hydrolyse d'ATP. Dans les conditions où le potentiel phosphate cellulaire est élevée, l'homéostasie énergétique impose un équilibre dynamique entre la glycolyse et la respiration mitochondriale en termes de flux de synthèse d'ATP. Pour s'ajuster à l'augmentation de la portion de l'ATP mitochondrial, la régulation par le potentiel phosphate impose la diminution du flux de synthèse d'ATP glycolytique et donc le flux de la glycolyse. Toutefois, ceci n'est valide que dans des conditions où le potentiel phosphate des cellules est élevé.

D'autre part, dans la mesure où le NADH cytosolique est un substrat partagé entre le système des OXPHOS et la fermentation alcoolique et son oxydation se fait prioritairement par le système des OXPHOS. Le maintien d'un rapport flux glycolytique/flux de production d'éthanol comparable au sauvage, malgré la possession d'une capacité respiratoire plus importante, montre que la possession d'un équipement enzymatique mitochondrial important ne permet pas de réduire de façon sélective le métabolisme fermentaire, sans avoir une conséquence sur le flux de substrat.

### 11.3.1 Évolution du rapport ATP/ADP dans la souche $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose

Pour vérifier s'il y a une compétition entre la glycolyse et la respiration mitochondriale en terme du flux de synthèse d'ATP dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , nous avons déterminé l'évolution du rapport ATP/ADP dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose.

Le dosage de l'ATP et l'ADP (**Tableau 11.3**) montre que durant la période entre T0 et quatre heures après l'ajout de glucose, le rapport ATP/ADP dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  est plus élevé par rapport aux cellules sauvages.

**Tableau 11.3 – Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP au cours de la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ; n=5.**

Temps (h)	ATP (mM)	ADP (mM)	Ratio (ATP/ADP)
<b>sauvage</b>			
0	4,51 $\pm$ 0,29	0,98 $\pm$ 0,10	4,74 $\pm$ 0,44
2	4,46 $\pm$ 0,36	0,81 $\pm$ 0,12	5,71 $\pm$ 0,46
4	4,22 $\pm$ 0,37	0,62 $\pm$ 0,09	7,06 $\pm$ 0,49
6	4,42 $\pm$ 0,11	0,57 $\pm$ 0,03	7,83 $\pm$ 0,24
8	4,45 $\pm$ 0,23	0,65 $\pm$ 0,03	6,86 $\pm$ 0,16
<b><math>\Delta hap4hap4\uparrow</math></b>			
0	4,43 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,04	6,70 $\pm$ 0,34
2	3,60 $\pm$ 0,19	0,52 $\pm$ 0,03	6,95 $\pm$ 0,13
4	3,38 $\pm$ 0,17	0,48 $\pm$ 0,04	7,10 $\pm$ 0,34
6	3,68 $\pm$ 0,27	0,49 $\pm$ 0,03	7,49 $\pm$ 0,47
8	3,11 $\pm$ 0,46	0,61 $\pm$ 0,08	5,46 $\pm$ 0,93

Ceci confirme que les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  possèdent un statut énergétique plus élevé par rapport aux cellules sauvages et corrèle avec l'hypothèse que la diminution du flux glycolytique observée dans souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  est due à la compétition entre la glycolyse et le système des OXPHOS en termes de flux de synthèse d'ATP.

Cependant, bien que le rapport ATP/ADP soit plus important dans la période entre T0 et 4h, les concentrations intracellulaires de l'ATP et l'ADP diminuent d'environ 20 %, après l'ajout de glucose.

*Chez S. cerevisiae, la surexpression de HAP4, induit une diminution du pool des nucléotides (ATP, ADP) lors de la mise en place de l'effet Warburg.*

Pour la souche  $\Delta hxk2$ , nous avons formulé l'hypothèse que la diminution de la concentration de l'ATP et l'ADP, lors de la prolifération sur glucose, pourrait être due au piégeage des nucléotides dans les biomolécules suite à la diminution du flux de glucose vers la voie des pentoses phosphates.

En ce qui concerne la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , nous n'avons aucune information concernant une éventuelle régulation des enzymes impliquées dans la voie des pentoses phosphates, suite à la surexpression de *HAP4*. Toutefois, une inhibition cinétique des enzymes de la glycolyse peut provoquer une limitation dans l'apport de substrat vers les voies de biosynthèse (source de carbone). Une telle limitation dans l'apport de substrat dans les conditions de prolifération pourrait avoir un effet sur la concentration cytosolique des nucléotides notamment l'ATP et l'ADP.

## 11.4 Origine de la diminution du flux respiratoire dans les cellules $\Delta hap4hap4\uparrow$

L'analyse des résultats du flux respiratoire après l'ajout de glucose chez la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  soulève la question suivante : Comment les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  ne parviennent pas à maintenir le flux respiratoire sur le long terme, après l'ajout de glucose ? Alors que, la biogenèse mitochondriale est sensée être maintenue grâce à la surexpression ectopique de la sous-unité Hap4p.

### 1) Limitation en oxygène et/ou en substrat

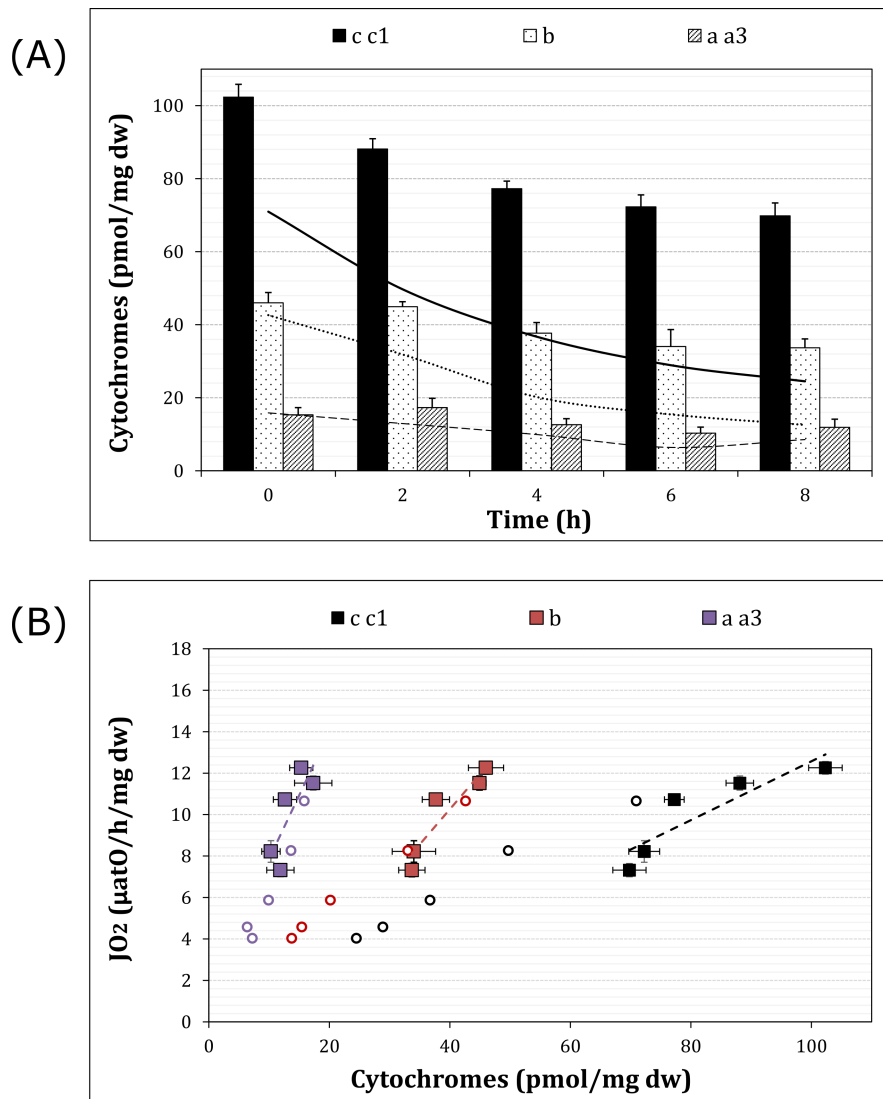
Dans nos conditions expérimentales, le substrat respiratoire (Pyruvate, NADH, etc.) est abondant. Une limitation au niveau du substrat ne peut pas expliquer la diminution du flux respiratoire dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , observée après trois heures l'ajout de glucose.

### 2) Diminution en quantité d'équipement enzymatique (chaîne respiratoire)

La quantification des cytochromes (**Figure 11.7**), montre que malgré la surexpression de *HAP4*, la quantité de l'équipement enzymatique mitochondrial diminue dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose. Au bout de huit, la quantité des cytochromes a été diminuée d'environ 30 % par rapport au contrôle (sans glucose). La mise en relation du flux respiratoire endogène et concentration en cytochromes (**B**) montre qu'au moins une partie de la diminution du flux respiratoire des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  observée à partir de 3h après l'ajout de glucose, pourrait être expliquée



par la diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial.



**Figure 11.7 – Évolution du contenu en cytochromes de la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout du glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. Une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée à la culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Une mesure quantitative des cytochromes (exprimée en picomoles par milligramme poids sec de levures) est alors réalisée comme décrit dans le matériels et méthodes. Les (—), (...) et (---) représentent la concentration des cytochromes c<sub>1</sub>, b et a<sub>3</sub> de la souche sauvage, après l'ajout du glucose respectivement. (B) Relation entre vitesse de respiration cellulaire et concentration en cytochromes; forme ○ : sauvage; forme ■ :  $\Delta hap4hap4\uparrow$ . Les données sont présentées sous forme de moyenne (X) ± erreur standard de la moyenne (ESM); n=5.

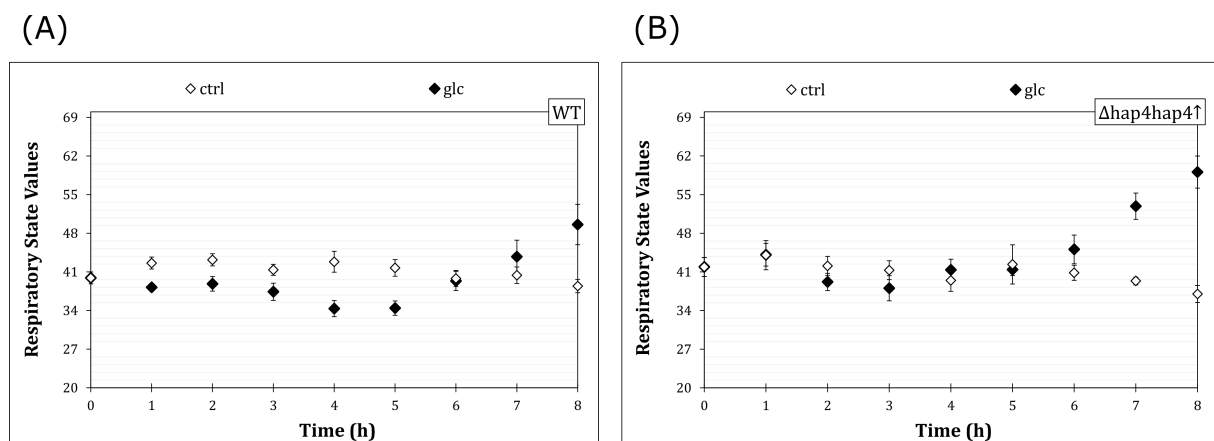
En comparaison avec la souche sauvage, les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  possèdent plus d'unités de chaîne respiratoire (cytochromes). Ceci est en effet en accord avec le fait que les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  possèdent un flux respiratoire plus élevé par rapport aux

cellules sauvages.

## 11.5 Les mitochondries des cellules $\Delta hap4hap4\uparrow$ sont-elles toutes fonctionnelles ?

Si nous revenons vers la figure du flux respiratoire des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  en présence de glucose (voir **figure 11.5**), nous constatons que ces dernières possèdent un flux respiratoire très proche du contrôle (sans glucose) dans la période entre T0 et 3h. Or dans la **figure 11.7** ci-dessus, la concentration des cytochromes diminue dans les cellules durant cette période. Dans cet état de figure, ces résultats suggèrent que le système des OXPHOS des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  fonctionne à une vitesse plus élevée dans cette période afin de compenser la diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial.

Pour mettre en évidence l'éventuelle augmentation de l'activité du système des OXPHOS durant cette période (T0 - 3h), nous avons déterminé l'évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  après l'ajout de glucose (**Figure 11.8**).



**Figure 11.8** – Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose. Le RSV est calculé par la détermination du rapport entre [flux de la respiration endogène (-) flux de la respiration non phosphorylante] et [flux de la respiration découplée (-) flux de la respiration non phosphorylante]. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM).  $n=5$ .

Contrairement aux cellules sauvages (**Figure 11.8–A**), l'évolution du RSV des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (**B**) ne met en évidence aucune stimulation de l'activité du système des OXPHOS jusqu'à cinq heures après l'ajout de glucose.

De ce fait, le maintien du flux respiratoire comparable au contrôle (sans glucose) dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  dans la période (T0 - 3h), avec une quantité d'équipement enzymatique mitochondrial plus faible, ne peut être justifié par une stimulation de l'activité de chaîne respiratoire.

Alors, comment les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  maintiennent une respiration endogène comparable au contrôle avec une quantité d'équipement enzymatique diminué et sans avoir à stimuler l'activité du système des OXPHOS ?

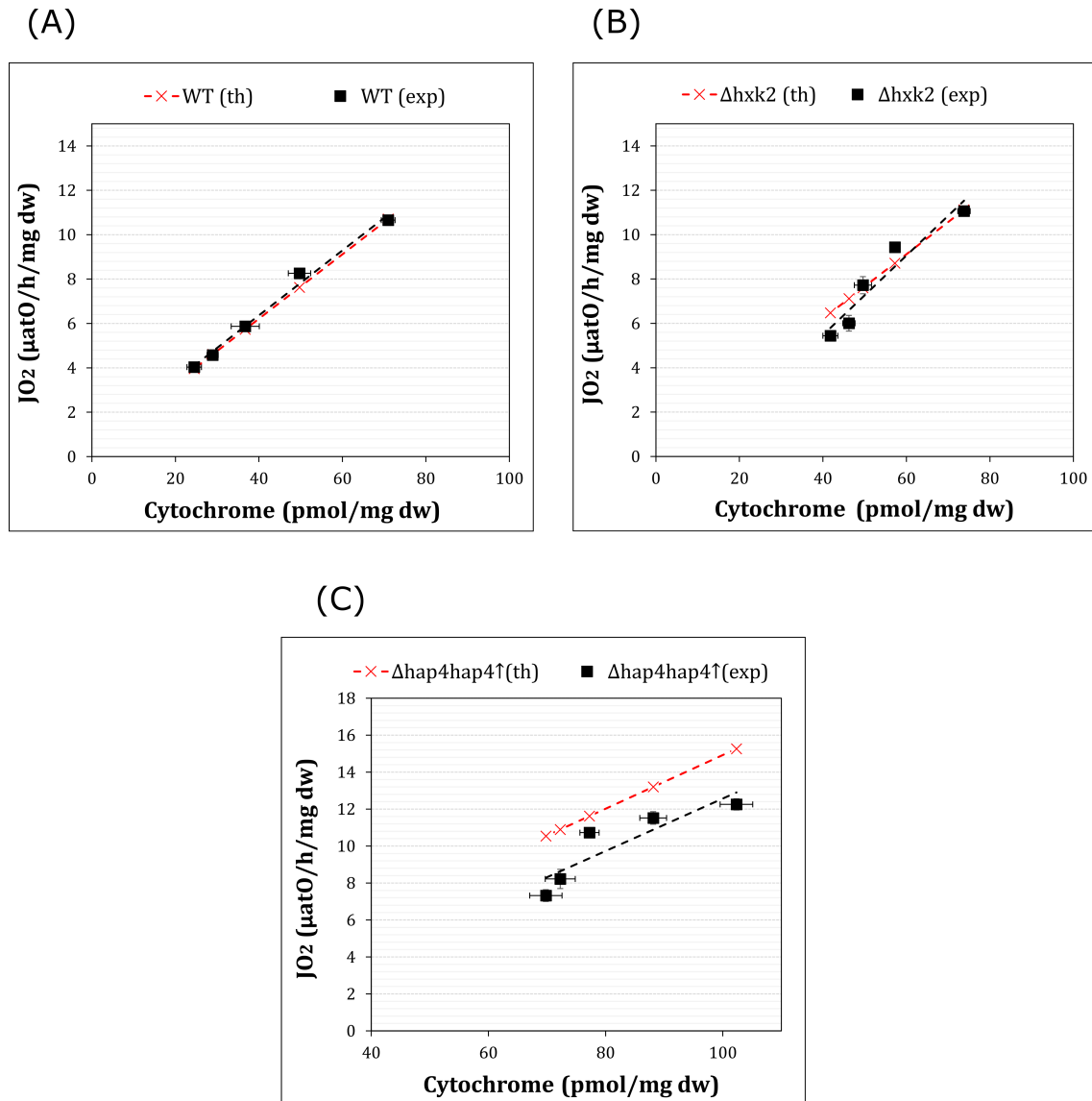
La réponse à cette question, implique une vérification, si toutes les unités de chaîne respiratoire sont capables d'assurer la fonction de transfert d'électron.

Pour déterminer la quantité de cytochromes qui participent réellement au transfert des électrons vers l'oxygène, nous avons essayé de quantifier les cytochromes qui peuvent être réduit par un substrat respiratoire (éthanol). C'est-à-dire, dans la cuve de mesure au lieu de réduire chimiquement les cytochromes par l'ajout du dithionite, on ajoute 100 mM d'éthanol (substrat respiratoire) et le KCN afin de réduire les cytochromes et inhiber le complexe IV respectivement (voir matériels et méthodes). De cette façon et en raison des conditions hypoxiques de la cuve (carence en oxygène), seuls les cytochromes qui ont accepté des électrons à partir de l'oxydation de l'éthanol seront réduit.

Cependant, en utilisant cette méthode nous n'avons pas pu obtenir des résultats reproductibles et fiables. En effet, après l'ajout de l'éthanol nous avons réussi à obtenir un signal de réduction des cytochromes, cependant le signal disparaît complètement lors de l'ajout de dithionite.

Chez *S. cerevisiae* nous avons montré que dans nos conditions de prolifération sur glucose, la relation linéaire entre quantité de cytochromes et flux respiratoire établie par [69] est conservée dans la souche sauvage et  $\Delta hck2$  (**Figure 12.13–A , B**). En effet, en appliquant l'équation de la relation  $JO_2 = f([\text{cytochromes } cc_1])$  (ligne rouge) établie par [69] nous obtiendrons exactement les mêmes valeurs que les résultats expérimentaux

(ligne noire). Cependant dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , la relation entre quantité de cytochromes  $cc_1$  et le flux de respiration endogène (phosphorylante) n'est pas conservée (C). Ceci est indépendamment de l'ajout de glucose. Les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  présentent un flux respiratoire réel (ligne noire) plus faible que le flux respiratoire théorique (ligne rouge).



**Figure 11.9 – Évolution du flux respiratoire endogène en fonction de la concentration du cytochrome c et  $c_1$ , après l'ajout de glucose.** Représentation mettant en évidence la relation entre vitesse de respiration cellulaire et concentration en cytochrome c et  $c_1$  dans les cellules sauvages (A),  $\Delta hvk2$  (B) et  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (C). Les (✕) représentent le flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochrome c et  $c_1$  calculé à partir de l'équation  $JO_2 = f([cytochromes\ cc1])$  selon [69], après l'ajout de glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne (X)  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

Toutefois, la relation linéaire entre le flux de la respiration et la quantité de cytochromes semble se rétablir, après l'ajout de glucose, au fur et à mesure avec la diminution des cytochromes, durant la période entre T0 et quatre heures après l'ajout de glucose. Cependant après quatre heures, nous constatons une deuxième chute significative de la capacité respiratoire des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  par rapport à la quantité en cytochromes. Or, l'évolution du RSV (voir **figure 11.8**) montre que l'activité du système des OXPHOS est plus élevée durant cette période par rapport à la période précédente (T0 et 4h).

À la lumière de ces résultats, l'explication de la diminution du flux respiratoire dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  par une simple diminution quantitative de l'équipement enzymatique mitochondrial, n'est pas suffisante. En effet, la quantité de cytochromes que possèdent les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  durant la période entre quatre et huit heures après l'ajout de glucose est très comparable aux cellules sauvages avant l'ajout de glucose. Or, nos résultats montrent que durant cette période : **1**) Le flux respiratoire endogène des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  est plus faible par rapport à celui de la souche sauvage, cultivée sur lactate (avant l'ajout du glucose) (voir **figure 11.5**) et **2**) L'activité du système des OXPHOS est augmentée. En effet, l'évolution du RSV (voir **figure 11.8**), met en évidence une augmentation progressive du RSV, à partir de cinq heures après l'ajout du glucose, suggérant ainsi une augmentation de l'activité du système des OXPHOS. Cette augmentation de l'activité est plus importante par rapport aux cellules sauvages.

Nos résultats suggèrent qu'une partie du compartiment mitochondrial des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  ne participe pas au processus de la respiration mitochondriale.

Toutefois, pour valider cette hypothèse, il serait intéressant de développer une méthode qui permet la quantification du compartiment mitochondrial qui participe réellement au processus de la respiration mitochondriale, lors de la prolifération sur glucose.

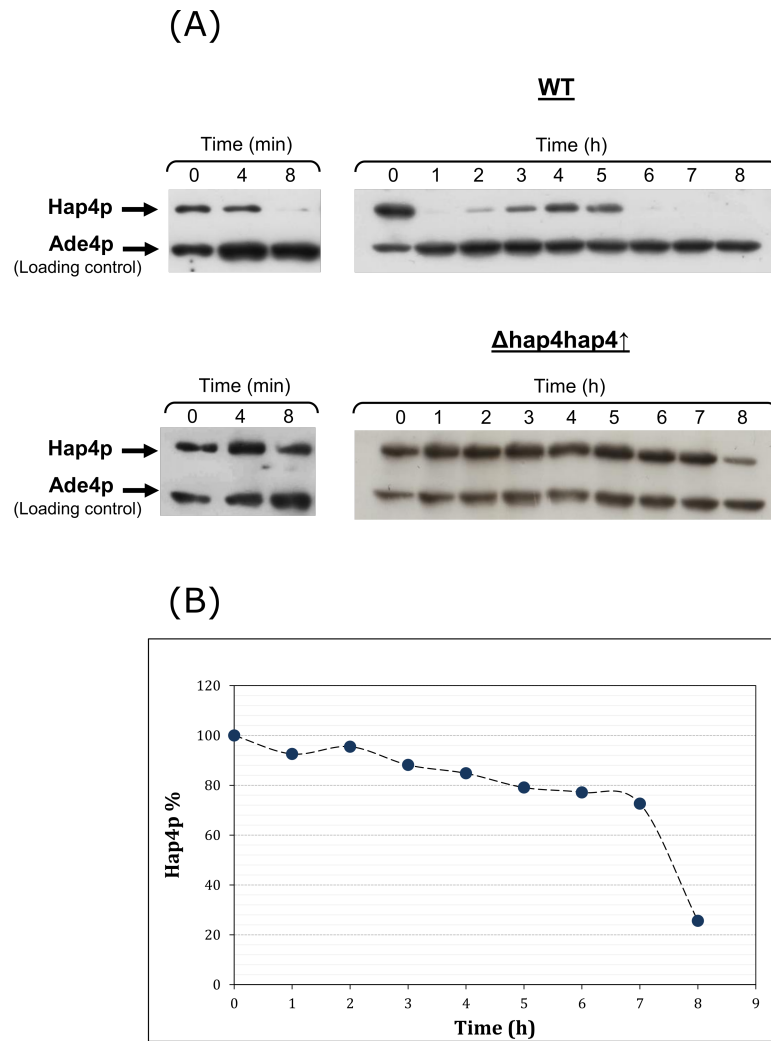
### ☛ *Le maintien d'un compartiment mitochondrial élevé en présence du glucose augmente le phénomène du « leak actif »*

Dans la souche sauvage, nous avons conclu que l'augmentation de l'activité du système des OXPHOS observée en fin de cinétique est due à la diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial dans un environnement riche en substrats respiratoires. Cette augmentation d'activité aurait pour conséquence l'induction d'un « leak actif » [172, 88]. Ce dernier a pour conséquence une diminution du rendement du système des OXPHOS en termes de conversion de l'énergie redox en potentiel phosphate (rendement NADH oxydé/ATP produit). Dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , le maintien d'une quantité plus importante d'unités de chaîne respiratoire en présence de glucose, semble accentuer l'induction du « leak actif ».

## 11.6 Origine de la diminution du compartiment mitochondriale en présence de glucose malgré la surexpression de *HAP4*

La diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , malgré l'expression ectopique de *HAP4*, soulève la question relative à l'évolution de la quantité de la sous-unité Hap4p, après l'ajout de glucose. Nous avons donc suivi l'évolution de la quantité de cette protéine par western-blot (**Figure 11.10**).

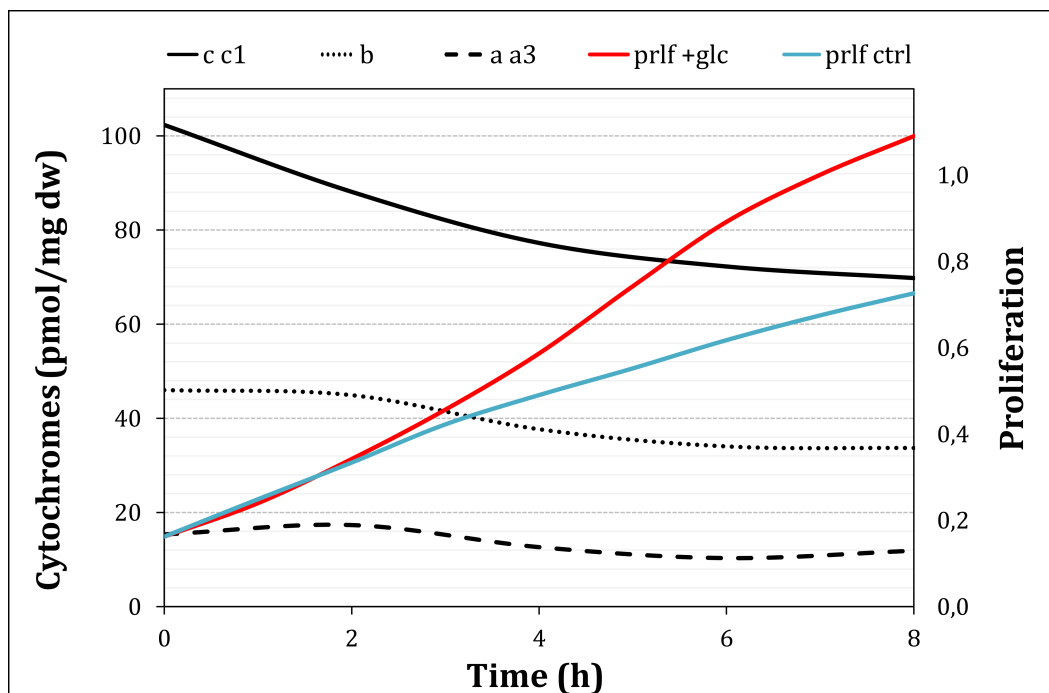
Contrairement à la souche sauvage, l'expression de *HAP4* est maintenue malgré la présence de glucose (**A**). Cela est dû au fait que le promoteur tetO-CYC1 de *HAP4* exogène est insensible à la répression glucose. Cependant, la normalisation avec le contrôle de charge *ade4p* (**B**) révèle que la quantité de Hap4p a tendance de diminuer au cours du temps, surtout dans les dernières heures de la cinétique (entre 5h et 8h).



**Figure 11.10 – Effet de l’ajout du glucose sur l’expression de *HAP4* chez *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ).** L’effet de l’ajout de glucose sur l’expression de *HAP4* est mis en évidence par western-blot (A) en suivant la quantité de la protéine *Hap4p* grâce à un anticorps dirigé contre la protéine. La quantité de protéines déposée correspond à celle extraite à partir de  $1,6 \times 10^6$  cellules. La protéine *Ade4p* est un contrôle de charge. La quantification de *Hap4p* (B) est réalisée par lecture optique de la densité de coloration sur chaque bande à l’aide des outils du logiciel ImageJ. Puis les valeurs sont normalisées par rapport au contrôle de charge (*Ade4p*).

Si nous regardons la tendance d’évolution de la quantité de cytochromes au cours du temps (**Figure 11.11**), nous constatons que malgré l’expression de *HAP4*, les cytochromes ont tendance de diminuer dès le début de la cinétique. Deux heures après l’ajout de glucose, alors que la vitesse de prolifération cellulaire (—) n’est que légèrement différente par rapport au contrôle (—), la quantité de cytochromes dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  diminue d’environ 14 %. Ceci suggère probablement un arrêt/diminution de la biogenèse du compartiment mitochondrial. Or, cette dernière est sensée être active en raison de

l'expression ectopique de *HAP4*.



**Figure 11.11** – Tendence d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout du glucose.

À partir de ces résultats nous avons soulevé la question relative à l'activité du complexe HAP. L'activité du complexe HAP dans ces conditions (présence de glucose) est-elle comparable aux conditions de prolifération sur substrat non fermentescible (lactate) ?

Pour répondre à cette question, une mesure de l'activité du complexe HAP serait donc nécessaire. Cependant, comme nous l'avons évoqué dans le **chapitre 9**, l'utilisation du système  $\beta$ -galactosidase ne permet pas de répondre à cette question. Ceci est dû en effet, à la demi-vie de la  $\beta$ -galactosidase qui dépasse le temps de génération de notre souche d'intérêt. Pour le moment, nous n'avons pas d'autres outils moléculaires pour pouvoir réaliser une telle étude de l'activité du complexe HAP.

Par ailleurs, à partir de nos résultats, l'ajout du glucose semble affecter l'activité du complexe HAP. Malgré la présence de la sous-unité Hap4p, le complexe HAP semble perdre une partie de son activité d'activation de l'expression des gènes mitochondriaux. Ce qui peut expliquer la diminution du compartiment mitochondrial dans les cellules



$\Delta hap4hap4\uparrow$ . Cet effet du glucose sur l'activité du complexe HAP semble périodique et pas permanent. En effet, quatre heures après l'ajout de glucose, alors que la vitesse de prolifération est plus élevée (**Figure 11.11**), le taux de dilution des cytochromes est plus faible durant cette période par rapport à la période précédente (T0 - 4h), suggérant ainsi une réactivation du processus de la biogenèse mitochondriale.

Cette tendance d'arrêt/diminution puis réactivation du processus de la biogenèse mitochondriale après l'ajout du glucose est reproductible dans les trois souches (sauvage,  $\Delta hck2$  et  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ). L'ensemble des résultats suggèrent que non seulement le glucose régule (répression) la transcription de *HAP4*, mais exerce aussi un rôle sur l'activité de la sous-unité Hap4p. De plus, la diminution de la quantité de Hap4p observée en fin de la cinétique, suggère probablement la mise en place d'un processus de dégradation de la protéine Hap4p.

En outre, un autre phénomène peut aussi jouer un rôle dans la diminution de la quantité du compartiment mitochondrial dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ . Il s'agit de la dilution du compartiment mitochondrial en raison de l'augmentation de la vitesse de prolifération. Quand on ajoute le glucose au milieu de culture, les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , augmentent leurs vitesses de prolifération. Un maintien de la même quantité du compartiment mitochondrial entre cellule mère et cellule filles nécessiterait que la vitesse de la biogenèse mitochondriale augmente en parallèle avec la vitesse de prolifération.

## *L'induction de l'effet Warburg chez S. cerevisiae, souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$*

D'après notre étude dans le **chapitre 11**, la surexpression de *HAP4* seul n'est pas suffisante pour permettre aux cellules de *S. cerevisiae* de prévenir la répression du métabolisme oxydatif, lors de la prolifération sur glucose. Le(s) mécanisme(s) de cette dernière semble(ent) plus complexe(s) qu'une simple régulation du niveau de transcription de *HAP4*. En effet, malgré l'expression ectopique de *HAP4*, nous avons mis en évidence, après l'ajout de glucose, une diminution à la fois du flux respiratoire endogène et quantité de cytochromes, associé à une légère diminution de la quantité de Hap4p.

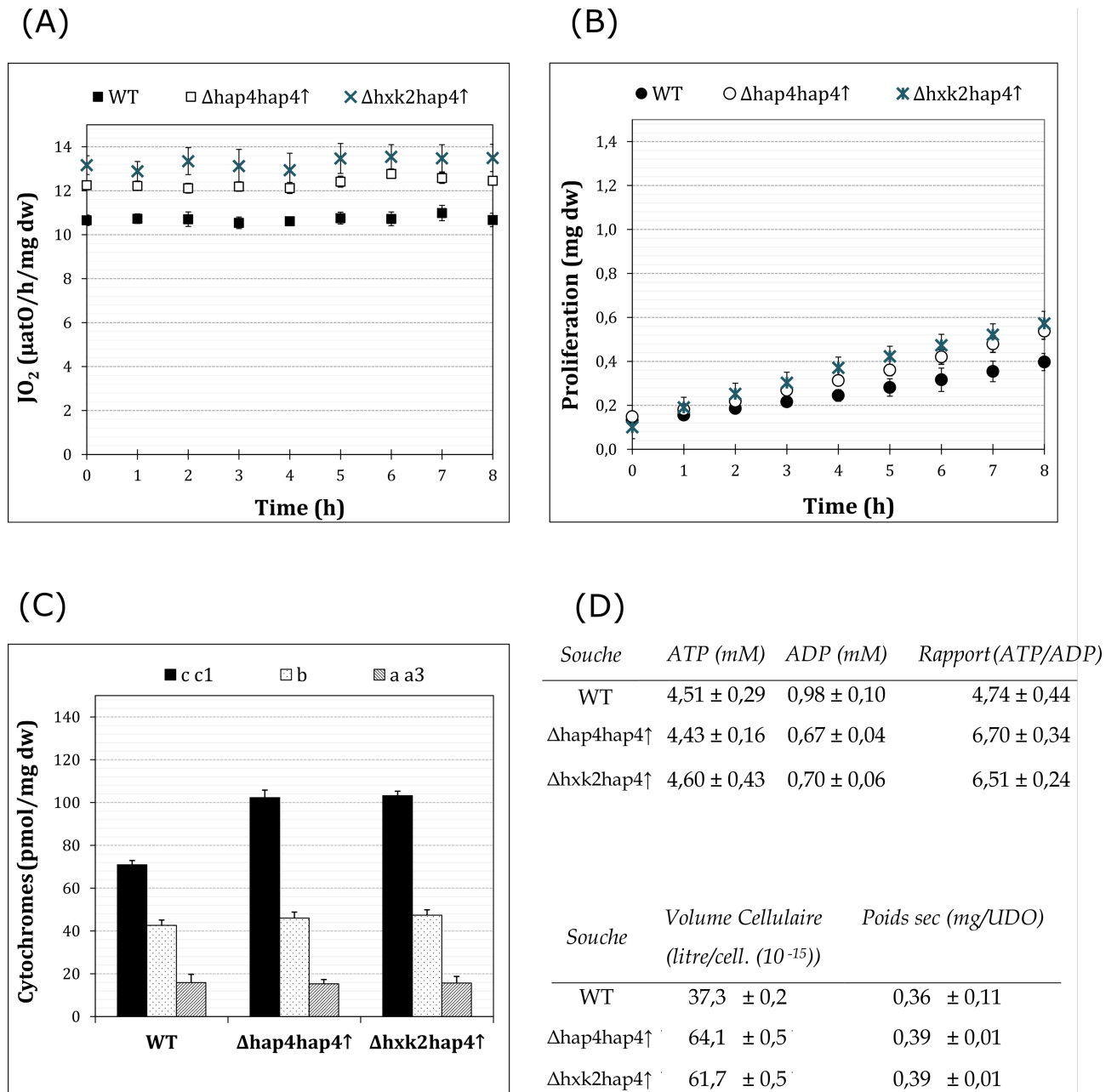
Dans la mesure où la délétion de l'*HXK2*, semble permettre plus de stabilité de la protéine Hap4p (voir **figure 10.14**), nous avons étudié dans ce chapitre, l'effet de la combinaison de la délétion de l'*HXK2* avec la surexpression de *HAP4* sur l'évolution de la balance entre flux de la glycolyse, flux du métabolisme fermentaire et flux de la respiration mitochondriale. Le raisonnement derrière ceci est que, si un processus de dégradation de la sous-unité Hap4p est mis en place après l'ajout de glucose et si l'hexokinase II joue un rôle dans ce processus, la délétion de l'*HXK2* devrait permettre une augmentation de la quantité de Hap4p. Ainsi, les cellules surexprimant *HAP4*

pourraient conserver plus d'unités d'équipement enzymatique mitochondrial et donc un métabolisme oxydatif plus important, lors de la prolifération sur glucose. Si notre hypothèse concernant la compétition entre la glycolyse et le système des OXPHOS en termes du flux de synthèse d'ATP est bonne (voir **chapitre 9**), un métabolisme oxydatif plus élevé devrait inhiber davantage le flux glycolytique.

La souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , a été obtenue par l'insertion du plasmide centromérique pCM189 (voir **matériels et méthodes**) contenant la séquence du gène *HAP4* dans la souche  $\Delta h x k 2$ , que nous avons utilisé dans le **chapitre 10**.

## 12.1 Le métabolisme de la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ en condition contrôle (sans glucose)

Lors de la prolifération sur lactate 2 % (condition contrôle), seule la surexpression de *HAP4* semble avoir un effet sur la physiologie et le métabolisme de *S. cerevisiae* (**Figure 12.1**). En comparaison avec la souche sauvage, les deux souches,  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  présentent les mêmes modulations au niveau de la respiration (**A**), la prolifération (**B**), la quantité de cytochromes (**C**), le volume cellulaire, le poids sec et le rapport ATP/ADP (**D**).



**Figure 12.1** – Effet de la délétion de l'*HXK2* et la surexpression de *HAP4* sur le métabolisme oxydatif de *S. cerevisiae* (condition contrôle). (A) : Flux de la respiration endogène. (B) : Prolifération cellulaire. (C) : Quantité de cytochromes. (D) : Concentration en ATP, ADP, volume cellulaire et poids sec. Les mesures sont réalisées comme décrit dans le matériels et méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne (X) ± erreur standard de la moyenne (ESM) ; n=5.

## 12.2 Effet de la délétion de l'*HXK2* sur le turn-over de Hap4p exogène

Afin de déterminer si la délétion de l'*HXK2*, affecte la stabilité de la sous-unité Hap4p issue de l'expression du gène *HAP4* exogène, nous avons suivi par Western-bot, l'évolution de la quantité de la protéine Hap4p, après l'ajout de glucose.

La **figure 12.2–A** présente la cinétique de dégradation de Hap4p dans trois conditions :

- 1) En présence du cycloheximide seul (0,4 mg/ml).
- 2) En présence du glucose à 70 mM (condition contrôle).
- 3) En présence du cycloheximide et du glucose. Si un effet du glucose sur le mécanisme de dégradation est mis en place, la cinétique de dégradation de Hap4p devrait être différente par rapport à la condition cycloheximide seul.

par rapport à aux souches exprimants *HXK2*

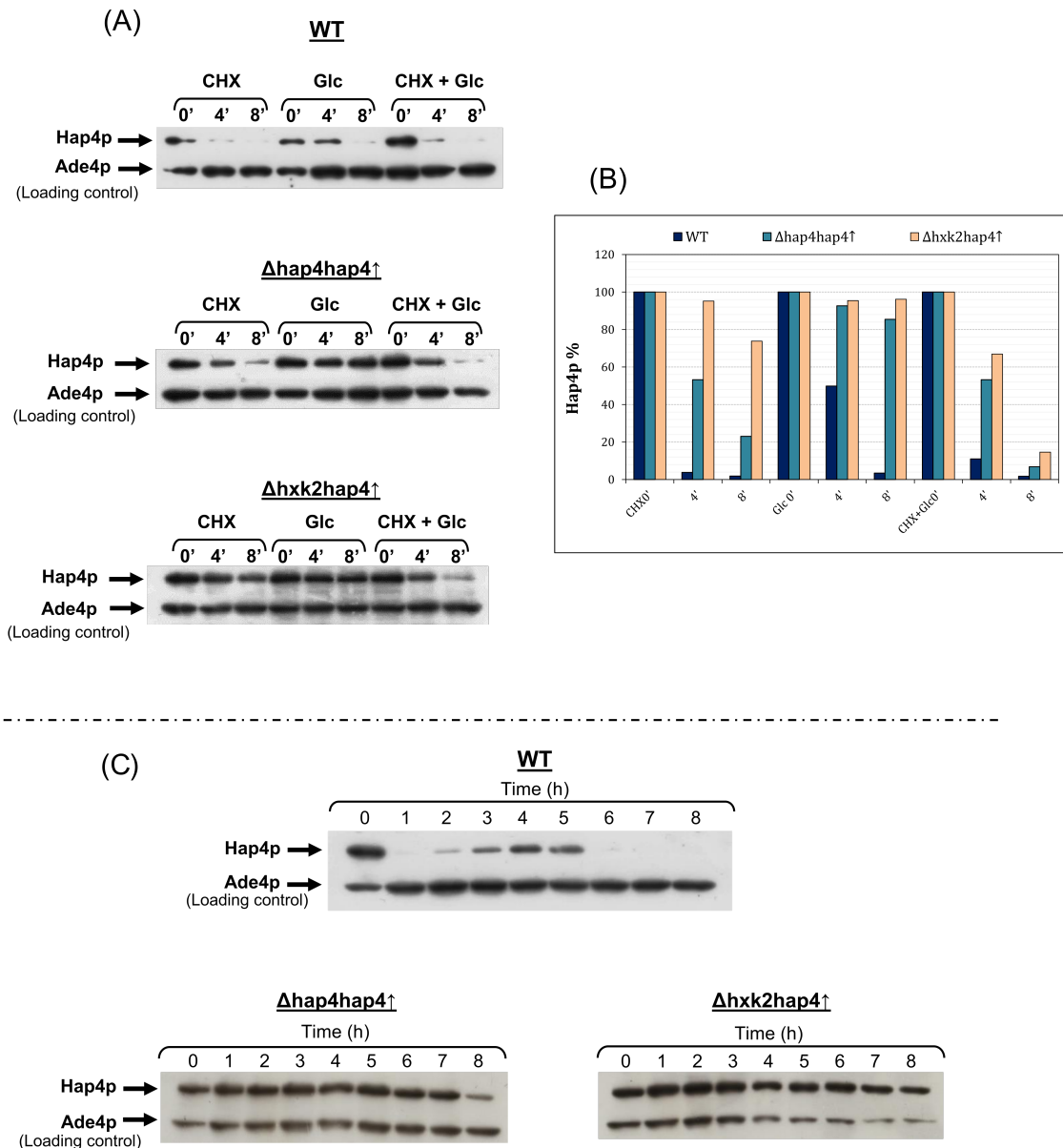
En présence du cycloheximide seul (**Figure 12.2–A**), nous observons que la dégradation de Hap4p est plus lente dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , par rapport aux souches qui expriment *HXK2*.

L'effet de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p semble indépendant de la présence ou non du glucose. Par ailleurs, la présence de glucose semble accélérer la vitesse de dégradation de Hap4p par rapport à la condition cycloheximide seul, mettant ainsi en évidence un effet du glucose sur le processus de dégradation de Hap4p.

D'autre part, la cinétique long terme (**Figure 12.2–B**) montre bien que contrairement aux cellules  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , aucune diminution de la quantité de Hap4p n'est observée dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose.

*La délétion de l' HXK2 permet donc aux cellules qui surexpriment HAP4 de maintenir une quantité plus importante de Hap4p, lors de la prolifération sur glucose.*

Dans la littérature, la régulation de la quantité de Hap4p par la source de carbone (glucose), a été longtemps considérée comme étant une régulation au niveau transcriptionnel [163]. Cependant, il a été décrit des conditions dans lesquelles la quantité de Hap4p pouvait être modifiée d'un facteur deux (2) sans qu'il y ait de changement de son



**Figure 12.2 – Effet de la délétion de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p exogène.** L'effet de la délétion de l'hexokinase II sur le turn-over de Hap4p est mis en évidence par western-blot (A) en suivant sa quantité après l'ajout de 0,4 mg/ml du cycloheximide, grâce à un anticorps dirigé contre la protéine. La quantité de protéines déposée correspond à celle extraite à partir de  $1,6 \times 10^6$  cellules. La protéine Ade4p est un contrôle de charge. La quantification de Hap4p (B) est réalisée par la lecture optique de la densité de coloration sur chaque bande à l'aide des outils de logiciel ImageJ. Puis les valeurs sont normalisées par rapport au contrôle de charge (Ade4p). (C) : Effet de l'ajout de glucose sur l'expression de HAP4.

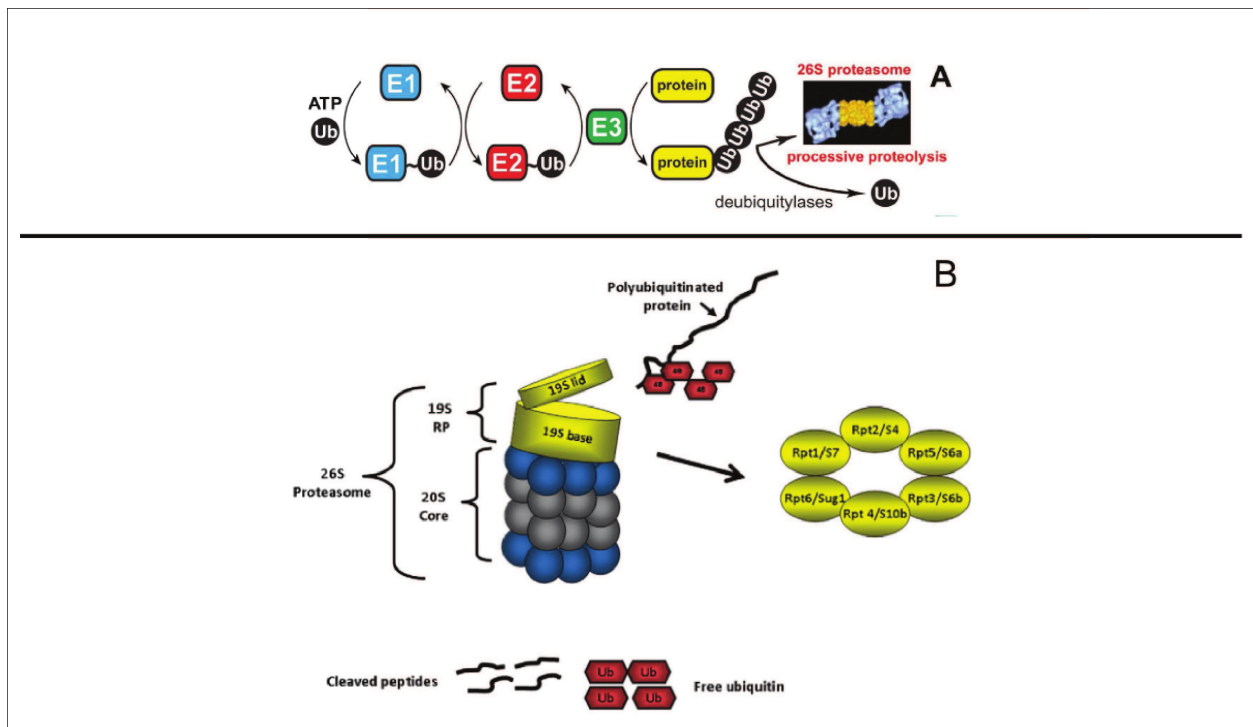
niveau d'ARNm [25], suggérant ainsi un autre niveau de régulation de Hap4p.

D'après nos résultats, outre la régulation transcriptionnelle, le glucose semble jouer

un rôle dans la régulation du turn-over de Hap4p, par l'induction/accélération de sa dégradation. Quant à l'hexokinase II, cette dernière semble aussi intervenir dans le processus de dégradation de Hap4p, d'une sorte que la délétion de son gène augmente la stabilité de Hap4p.

Chez *S. cerevisiae*, plus son rôle d'enzyme de la glycolyse, l'hexokinase II est aussi un facteur de transcription impliqué dans le processus de la répression génique induite par le glucose. Dans nos conditions de culture, le gène exogène *HAP4* est sous le contrôle du promoteur tetO-CYC1, qui est insensible au(x) mécanisme(s) de répression endogène de la cellule. L'augmentation de la stabilité de Hap4p suite à la délétion de l'*HXK2*, est très probablement due à une régulation au niveau du processus de dégradation.

Chez la levure, les protéases vacuolaires (lysosomales chez les mammifères) et le système Ubiquitine/protéasome forme les deux principales voies de dégradation des protéines. Dans une cellule, les fonctions de dégradation de protéines sont d'une grande importance. Plus leurs rôles dans le maintien de l'homéostasie protéique cellulaire et l'exercice du contrôle qualité, en dégradant les protéines mal conformées ou endommagées, ces deux systèmes sont aussi importants dans la régulation de la réponse cellulaire aux stimuli, par la dégradation régulée des facteurs de transcription et divers acteurs de transduction du signal (voir [240, 176, 52, 108, 86]). La dégradation de la majeure partie des facteurs de transcription est assurée par le système ubiquitine/protéasome [176, 16]. Ce dernier est décrit sur la **figure 12.3**. Il implique la liaison aux protéines cibles de plusieurs exemplaires d'une petite protéine appelée ubiquitine. La protéine polyubiquitinée va être dégradée par un large complexe protéique : le 26S protéasome.

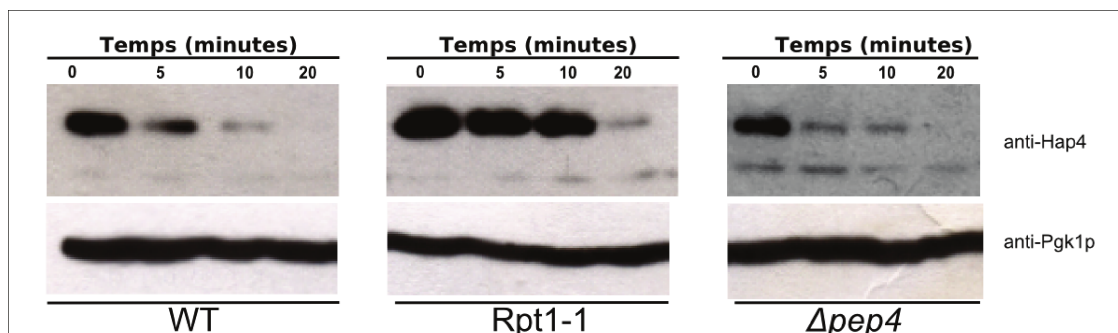


**Figure 12.3 – Le système Ubiquitine/protéasome.** (A) Mécanisme général de fonctionnement du système Ubiquitine/protéasome. L'ubiquitine (Ub) qui est une protéine de 8 kDA va être fixée par l'enzyme d'activation de l'ubiquitine (E1). E1 transfère l'ubiquitine à l'enzyme de conjugaison de l'ubiquitine (E2). L'ubiquitine ligase (E3) assure la fixation de l'ubiquitine sur la protéine cible. Après plusieurs ajouts d'ubiquitine, la protéine cible va être dégradée par le 26S protéasome. (B) Le 26S protéasome comprend le cœur protéolytique (20S) et la partie régulatrice (19S). Dans la partie régulatrice on distingue le « couvercle » (lid) et la base. La base est constituée d'ATPases qui vont déplier la protéine cible et la faire pénétrer dans le cœur protéolytique où elle sera dégradée. D'après [16].

Dans le laboratoire, E.YOBOUE dans son travail de thèse [262] a montré que la dégradation de la sous-unité Hap4p fait intervenir le système Ubiquitine/protéasome. La **figure 12.4**, montre la cinétique de dégradation de la protéine Hap4p dans trois souches de *S. cerevisiae*. De gauche à droite : la souche sauvage, la souche *Rpt1-1* qui contient une mutation dans une des sous-unités de la partie régulatrice du 26S protéasome (mutation qui diminue l'activité protéolytique du 26S protéasome) et la souche  $\Delta pep4$  délétée pour le gène PEP4 qui code pour une protéinase vacuolaire majeure [157].

La figure **figure 12.4** montre bien que la protéine Hap4p s'accumule dans les cellules mutées *Rpt1-1* et sa cinétique de dégradation est ralentie. Alors qu'aucun effet n'est observé dans les cellules  $\Delta pep4$ . D'après ces résultats, il a été conclu que la dégradation





**Figure 12.4 – Processus de dégradation de Hap4p chez *S. cerevisiae*.** Les cellules ont été cultivées en milieu minimum avec du galactose 2 % (p/v) comme source de carbone. Lorsque les cellules arrivent en phase exponentielle, de la cycloheximide (600  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) est ajoutée aux milieux de cultures et des prélèvements sont effectués aux temps indiqués et analysés par western-blot après séparation sur SDS-PAGE 10 %. Les cultures ont été faites en galactose, car le mutant *Rpt1-1* ne croît pas sur lactate. D'après [262].

de la protéine Hap4p fait intervenir le système ubiquitine/protéasome.

Pour vérifier le rôle du glucose dans l'induction de dégradation de Hap4p, il serait intéressant d'effectuer cette étude dans des conditions de prolifération sur glucose. Cependant, le mutant *Rpt1-1* ne croît pas sur lactate, il est donc impossible d'effectuer cette étude dans des conditions comparable à nos conditions de culture.

D'autre part, pour déterminer le rôle de l'hexokinase II dans le mécanisme de dégradation de Hap4p, nous avons cherché si l'hexokinase II peut interagir avec la sous-unité Hap4p et former ainsi un complexe protéique. Nous avons donc effectué des tests d'immunoprécipitation de la protéine Hap4p à partir des prélèvements de cellules  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , réalisés en fin de la cinétique (8h) de prolifération sur glucose. Cependant, nous ne sommes jamais parvenus à obtenir des résultats permettant de distinguer les bandes protéiques sur le film de révélation. Le background de l'anticorps primaire de Hap4p était trop important (**Figure 12.5**).

Malheureusement, par manque de temps, nous n'avons pas pu mettre au point les conditions expérimentales idéales pour cette manipulation, afin d'éliminer le background de l'anticorps primaire.



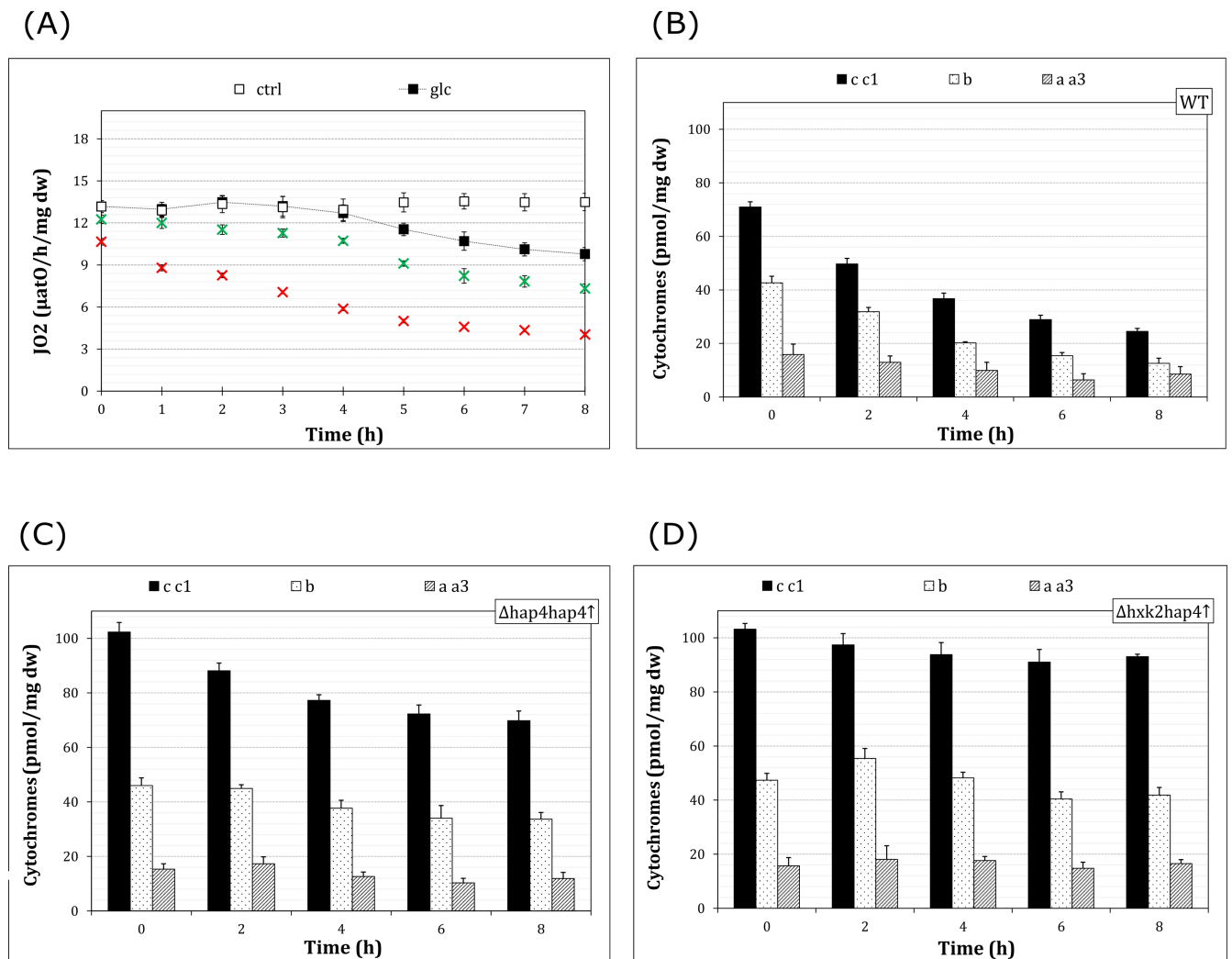
**Figure 12.5** – Tests d'immunoprécipitation de la protéine Hap4p, issus de l'expression du gène *HAP4* exogène, lors de la prolifération sur glucose (souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ ). Ce résultat illustre l'impossibilité que nous avons eu à visualiser la protéine Hap4p. Le crochet indique la zone de migration Hap4p.

## 12.3 Cinétique d'induction de l'effet Warburg dans la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$

### 12.3.1 Flux de la respiration mitochondriale de la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose

Nous avons vérifié si l'augmentation de la stabilité de Hap4p exogène a permis aux cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  de maintenir un métabolisme oxydatif comparable au contrôle (sans glucose), lors de la prolifération sur glucose (**Figure 12.6**).

Durant toute la cinétique après l'ajout de glucose, les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  (■ -A) maintiennent un flux respiratoire plus important par rapport aux cellules  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  (✕). Ceci est dû en effet, au fait que la délétion de l'*HXK2* a permis aux cellules qui surexpriment *HAP4* de conserver plus d'unités de chaîne respiratoire en présence de glucose (D), par rapport aux cellules qui surexpriment seulement *HAP4* (C).



**Figure 12.6 – Effet de la diminution du turn-over de Hap4p sur le métabolisme oxydatif de la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , en présence de glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* ( $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (■) au milieu de culture. (A) Un suivi de la respiration par oxygraphie est réalisé sur huit (8) heures. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les (✕) et (✕) représentent le flux de la respiration endogène de la souche sauvage et  $\Delta h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose respectivement. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ . (B, C, D) Une mesure quantitative des cytochromes (exprimée en picomoles par milligramme poids sec de levures) est réalisée comme décrit dans le matériels et méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ , sauf (B) :  $n=4$ .

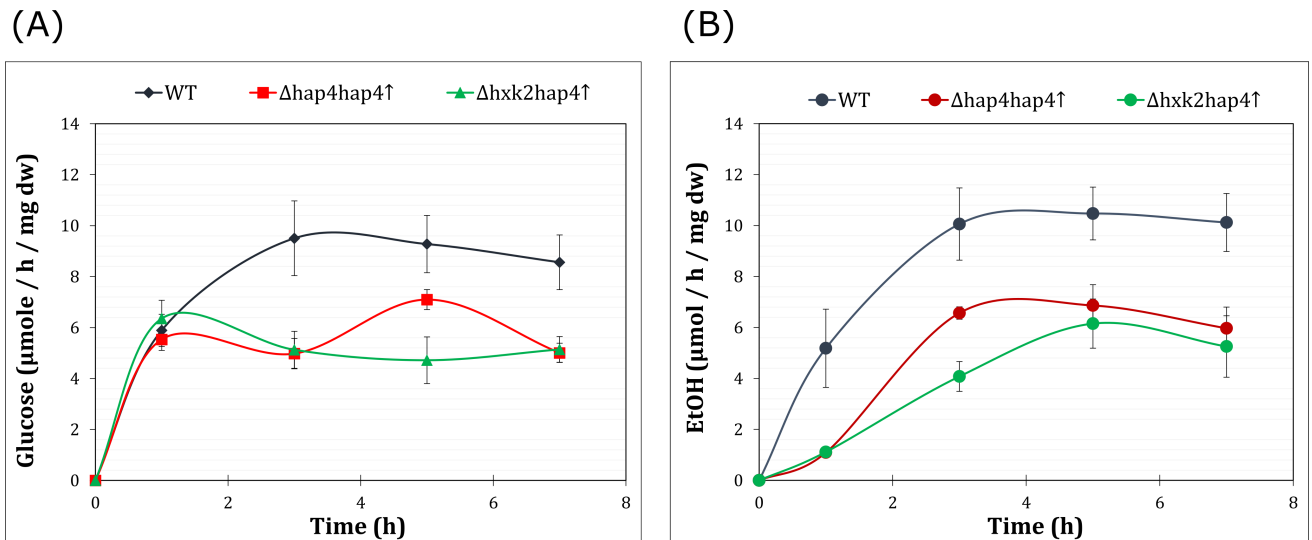
Cependant, en comparaison avec le contrôle, sans glucose (T0 –D), la quantité de l'équipement enzymatique mitochondrial (cytochromes) diminue légèrement dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose (D).

Cette diminution en cytochromes corrèle avec une diminution progressive du flux de la respiration (■-A), à partir de quatre heures de l'ajout de glucose, par rapport au contrôle (sans glucose) (□).

### 12.3.2 Flux glycolytique et flux de production d'éthanol dans les cellules $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout du glucose

Dans les chapitres précédents, nous avons mis en évidence l'existence d'une probable balance entre flux de la glycolyse et flux du métabolisme oxydatif, dans les conditions de prolifération sur glucose, d'une sorte que plus les cellules maintiennent un flux respiratoire important, plus le flux glycolytique est faible. Nous avons donc étudié si le maintien d'un flux respiratoire plus important dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  pourrait être associé à une diminution du flux glycolytique. En effet, il a été montré chez *S. cerevisiae*, que la combinaison de la délétion de l'*HXK2* avec la surexpression de *HAP4*, provoque une diminution du niveau de transcription de nombreux gènes qui codent pour les enzymes de la glycolyse (*PFK1*, *PFK2*, *TDH1* et *ENO1*) et du transport de glucose (*HXT1*) [219].

Cependant, la détermination du flux de consommation de glucose dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  (**Figure 12.7-A**) montre que ce dernier est comparable à celui de la souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ . De même pour le flux de production de l'éthanol (**B**), aucune différence significative n'est observée entre la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ .



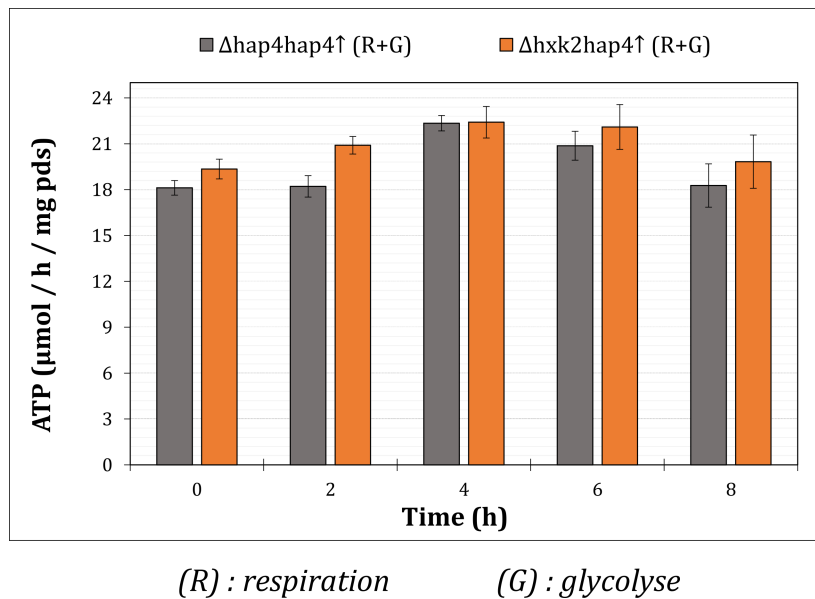
**Figure 12.7 – Évolution du flux de consommation de glucose et de production d'éthanol chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hap4 hap4 \uparrow$  et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose.** Chaque point représente la moyenne de quantité de glucose consommé (A) et d'éthanol produit (B) exprimée en micromole par heure par mg poids sec de cellules sur un intervalle de deux (2) heures (voir matériels et méthodes). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=4$ , sauf WT :  $n=5$ .

D'autre part, de même pour les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , malgré la possession d'une capacité respiratoire plus importante, nous observons dans le **tableau 12.1** que toujours 50 % environ du flux glycolytique est dirigé vers le métabolisme fermentaire. Ceci renforce en effet nos résultats pour la souche  $\Delta hap4 hap4 \uparrow$  qui suggèrent que la possession d'un équipement enzymatique mitochondrial important ne permet pas de réduire de façon sélective le métabolisme fermentaire, sans avoir une conséquence sur le flux glycolytique.

**Tableau 12.1 – Relation entre flux de consommation de glucose et flux de production d'éthanol chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose. Le rapport flux éthanol/flux glucose est obtenu par la division des valeurs du flux de production d'éthanol par celles du flux de consommation du glucose correspondants. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ , sauf WT :  $n=4$ .**

Temps (h)	EtOH ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Glc ( $\mu\text{mol/h/mg pds}$ )	Rapport
<b>sauvage</b>			
0h – 2h	5,18 $\pm$ 1,54	5,89 $\pm$ 0,63	0,82 $\pm$ 0,16
2h – 4h	10,06 $\pm$ 1,42	9,50 $\pm$ 1,47	1,12 $\pm$ 0,14
4h – 6h	10,47 $\pm$ 1,04	9,28 $\pm$ 1,12	1,18 $\pm$ 0,15
6h – 8h	10,12 $\pm$ 1,14	8,56 $\pm$ 1,07	1,26 $\pm$ 0,25
<b><math>\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow</math></b>			
0h – 2h	1,09 $\pm$ 0,15	5,54 $\pm$ 0,43	0,21 $\pm$ 0,05
2h – 4h	6,57 $\pm$ 0,24	4,98 $\pm$ 0,60	1,38 $\pm$ 0,18
4h – 6h	6,86 $\pm$ 0,82	7,10 $\pm$ 0,39	0,96 $\pm$ 0,06
6h – 8h	5,97 $\pm$ 0,83	5,01 $\pm$ 0,38	1,19 $\pm$ 0,12
<b><math>\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow</math></b>			
0h – 2h	1,11 $\pm$ 0,15	6,36 $\pm$ 0,72	0,18 $\pm$ 0,03
2h – 4h	4,08 $\pm$ 0,58	5,13 $\pm$ 0,73	0,88 $\pm$ 0,22
4h – 6h	6,15 $\pm$ 0,96	4,72 $\pm$ 0,92	1,43 $\pm$ 0,36
6h – 8h	5,25 $\pm$ 1,21	5,14 $\pm$ 0,51	1,04 $\pm$ 0,22

Par ailleurs, bien que les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  possèdent un flux respiratoire plus important par rapport au cellules  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , le calcul du flux total de synthèse d'ATP, à partir du flux respiratoire et le flux de métabolisme fermentaire (**Figure 12.8**) ne montre pas de différence significative entre les cellules  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  en termes de flux total de synthèse d'ATP.

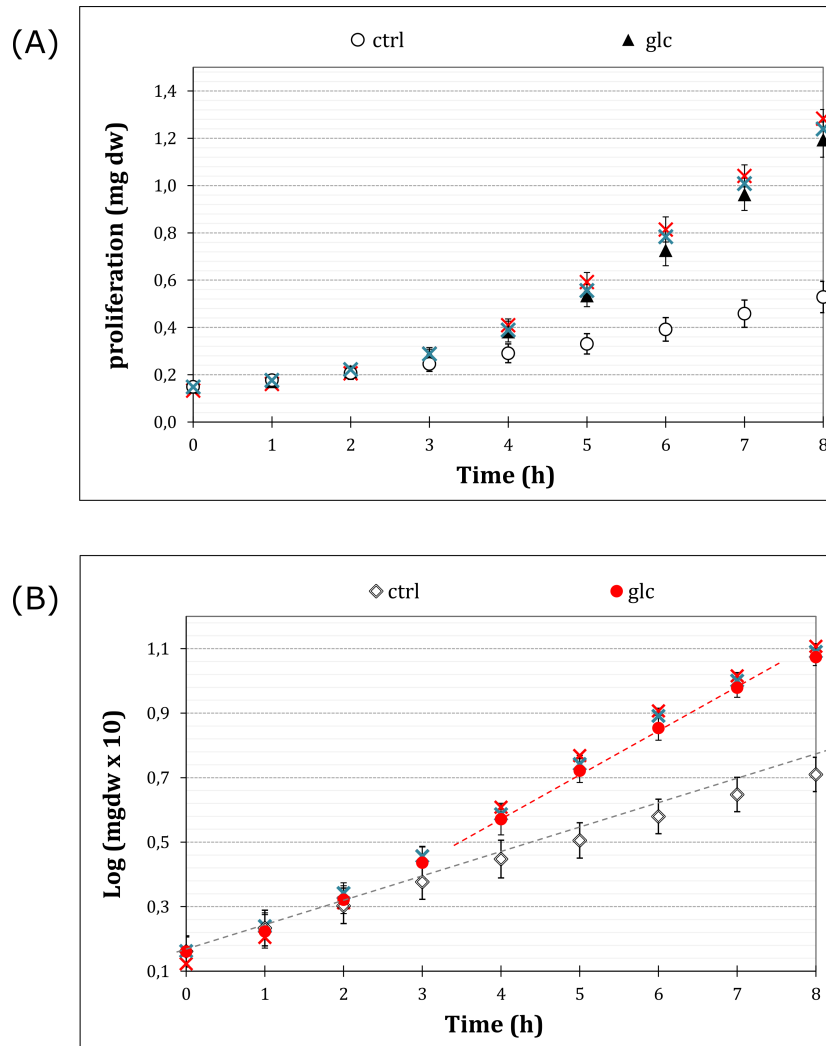


**Figure 12.8** – Flux de synthèse d'ATP totale assuré par les deux systèmes : la glycolyse « G » et les OXPHOS « R », dans les cellules  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout du glucose. Le flux de production d'ATP de chaque voie métabolique est calculé à partir des flux respiratoire et production d'éthanol selon le bilan d'oxydation :  $\frac{1}{2} O_2$  : 1,5 ATP pour la respiration et 1 glucose : 2 pyruvate : 2 ATP pour la glycolyse. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM). WT :  $n=5$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  :  $n=4$ .

### 12.3.3 Évolution de la vitesse de prolifération cellulaire après l'ajout du glucose

L'ajout du glucose au milieu de culture induit une augmentation importante de la quantité de cellules (mg poids sec), au cours du temps (**Figure 12.9–A**). Cette augmentation de biomasse est en effet due à une augmentation de la vitesse de prolifération par rapport au contrôle (sans glucose) (**B**).

En termes de vitesse de prolifération sur glucose (**B**), aucune différence n'est observée entre la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  et la souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ . La délétion de l'*HXK2* ne semble pas changer la cinétique de la vitesse de prolifération de la souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  par rapport au sauvage (voir chapitre 11).



**Figure 12.9 – Effet du glucose sur la prolifération de la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ .** Une culture de *S. cerevisiae* ( $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée ( $\blacktriangle$ ) au milieu de culture. (A) Un suivi de croissance (poids sec) est réalisé sur huit (8) heures. (B) Puis un calcul de la valeur du log de la quantité de cellules produites après chaque heure est réalisé pendant la cinétique 8h (voir Matériels et méthodes). Les ( $\times$ ) et ( $\otimes$ ) représentent la quantité de biomasse (A) et la courbe de croissance (B) de la souche sauvage et  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose, respectivement. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

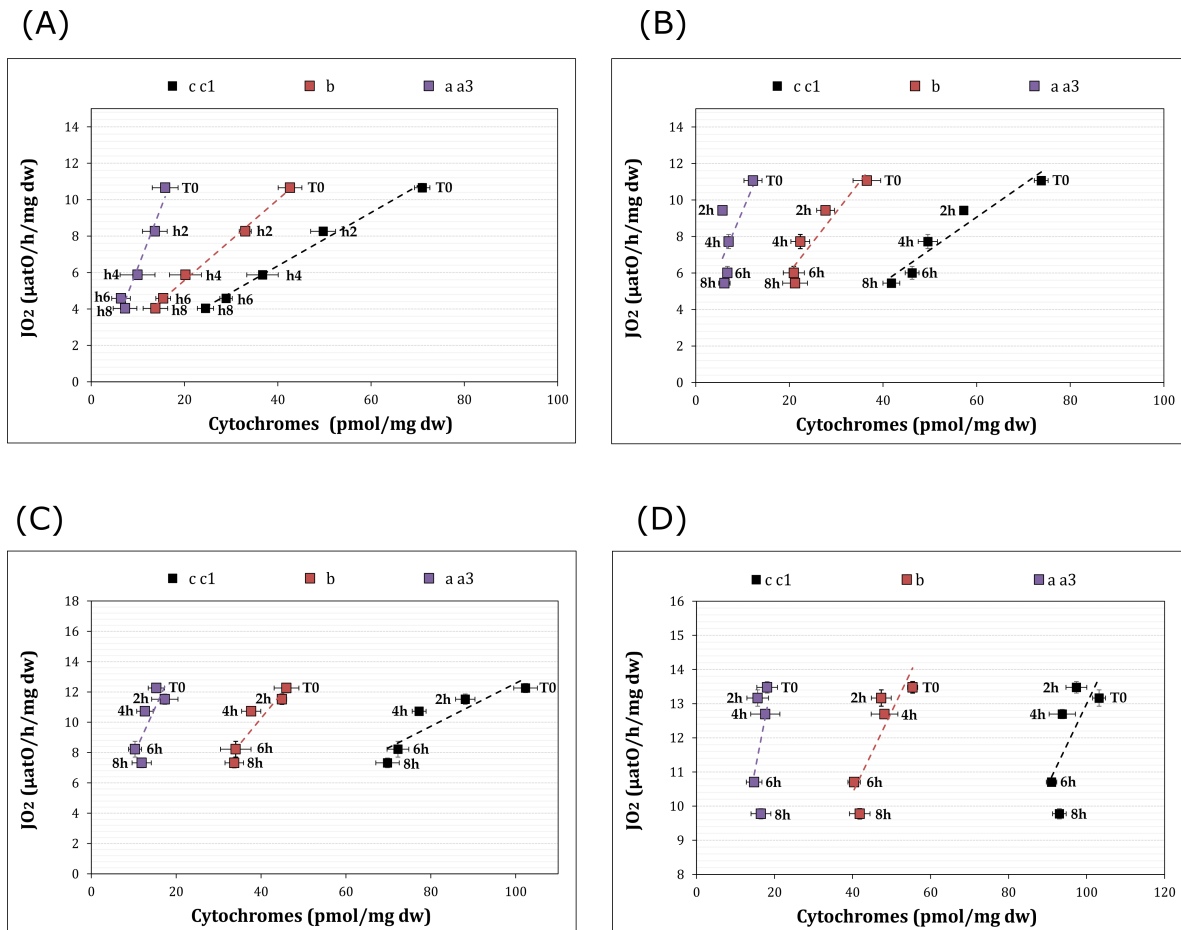
## 12.4 Origine de la diminution du flux du métabolisme oxydatif dans la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout du glucose

Pour déterminer si la diminution en cytochromes peut expliquer à elle seule la diminution de la respiration, nous avons relié le flux de la respiration endogène à la



concentration en cytochromes (Figure 12.10).

Nous observons que la relation entre flux de la respiration et quantité de cytochromes est largement différente entre les souches qui ne surexpriment pas *HAP4* (sauvage (A),  $\Delta h x k 2$  (B)) et les souches qui surexpriment *HAP4* ( $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  (C),  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  (D)).



**Figure 12.10** – Évolution du flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochromes chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h x k 2$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ ,  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose. Représentation mettant en relation la vitesse de respiration cellulaire et concentration en cytochromes dans la souche sauvage (A),  $\Delta h x k 2$  (B),  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  (C) et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  (D). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ , sauf (A) :  $n=4$ .

Le **Tableau 12.2**, résume le taux de diminution (en %) du flux de la respiration endogène et les concentrations des cytochromes ( $c c_1$ ,  $b$  et  $a a_3$ ), après l'ajout de glucose, des quatre souches que nous avons utilisées pour notre étude.

**Tableau 12.2 – Taux de diminution du flux de la respiration endogène et concentration en cytochromes ( $c c_1$  et  $b$ ) chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h x k 2$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ ,  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose.** Les valeurs dans le tableau expriment la diminution en pourcentage du flux respiratoire et concentration en cytochromes, par rapport à la condition contrôle, sans glucose ( $T0$ ). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ , sauf WT :  $n=4$ .

<i>Temps</i>	<i>respiration (%)</i>	<i>cc<sub>1</sub> (%)</i>	<i>b (%)</i>
<b>sauvage</b>			
<b>4h</b>	45 $\pm$ 2	48 $\pm$ 4	51 $\pm$ 2
<b>8h</b>	62 $\pm$ 1	66 $\pm$ 2	71 $\pm$ 5
<b><math>\Delta h x k 2</math></b>			
<b>4h</b>	30 $\pm$ 3	33 $\pm$ 3	38 $\pm$ 4
<b>8h</b>	51 $\pm$ 1	43 $\pm$ 2	41 $\pm$ 8
<b><math>\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow</math></b>			
<b>4h</b>	12 $\pm$ 2	24 $\pm$ 2	17 $\pm$ 5
<b>8h</b>	40 $\pm$ 4	32 $\pm$ 2	27 $\pm$ 3
<b><math>\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow</math></b>			
<b>4h</b>	4 $\pm$ 2	9 $\pm$ 6	0 $\pm$ 4
<b>8h</b>	26 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1	11 $\pm$ 6

Nous observons dans les cellules qui ne surexpriment pas *HAP4* (sauvage et  $\Delta h x k 2$ ) que le taux de diminution du flux respiratoire après l'ajout du glucose est très similaire à celui des cytochromes. Or, dans les souches qui surexpriment *HAP4*, cette relation proportionnelle entre flux de la respiration et quantité de cytochromes est complètement perdue. En effet, durant la période entre quatre heures et huit heures après l'ajout de glucose, nous observons dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , que pour une diminution très légère en cytochromes, le flux de la respiration diminue significativement par rapport à ce qu'on observe dans la souche sauvage. Par exemple, huit heures après l'ajout du glucose, le flux de la respiration endogène diminue d'environ 26 % dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , alors que la diminution en cytochromes est de l'ordre de 10 % seulement.

Dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , la diminution du flux de la respiration endogène observée à partir de quatre heures de l'ajout de glucose, ne peut être donc expliquée par une simple diminution en quantité d'unités de chaîne respiratoire.

À la lumière de ces résultats, nous nous sommes demandé si le système des OXPHOS dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  subit des contraintes thermodynamiques induites par le rapport ATP/ADP. Nous avons donc déterminé l'évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP des cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose.

#### 12.4.1 Évolution du rapport ATP/ADP dans les cellules $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose

Le dosage de l'ATP et l'ADP (**Tableau 12.3**) montre que le rapport ATP/ADP diminue dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose. En comparaison, avec la souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , nos résultats montrent en effet que les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  ont un statut énergétique plus faible, alors qu'elles possèdent le flux respiratoire le plus élevé en présence de glucose.

La diminution du flux respiratoire observée dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , quatre heures après l'ajout du glucose, ne peut être donc expliquée par une régulation thermodynamique du système des OXPHOS par le rapport ATP/ADP.

D'autre part, nous remarquons dans le **tableau 12.3** que, par rapport aux autres souches exprimant *HXK2*, les deux souches délétées pour l'*HXK2*, possèdent toutes les deux un rapport ATP/ADP faible en présence de glucose. En effet, dans les deux souches délétées pour l'*HXK2*, la concentration intracellulaire d'ATP diminue d'environ 25 %, après l'ajout de glucose.

Pour la souche  $\Delta h x k 2$ , nous avons émis l'hypothèse que cette diminution de la concentration en ATP était due au fait que dans cette souche, le niveau de transcription du gène *ZWF1* qui code pour la G6PDH [181] est faible [219]. Cette dernière étant l'enzyme qui catalyse l'étape limitante de la voie des pentoses phosphates, une limitation du flux au niveau de cette voie pourrait provoquer une limitation dans le flux de conversion du glucose en ribose-5-phosphates. Ainsi, cette situation pourrait induire une

**Tableau 12.3 – Évolution des concentrations intracellulaires en ATP et ADP dans *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h x k 2$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ ,  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .**

Temps (h)	ATP (mM)	ADP (mM)	Ratio (ATP/ADP)
<b>sauvage</b>			
0	4,51 $\pm$ 0,29	0,98 $\pm$ 0,10	4,74 $\pm$ 0,44
2	4,46 $\pm$ 0,36	0,81 $\pm$ 0,12	5,71 $\pm$ 0,46
4	4,22 $\pm$ 0,37	0,62 $\pm$ 0,09	7,06 $\pm$ 0,49
6	4,42 $\pm$ 0,11	0,57 $\pm$ 0,03	7,83 $\pm$ 0,24
8	4,45 $\pm$ 0,23	0,65 $\pm$ 0,03	6,86 $\pm$ 0,16
<b><math>\Delta h x k 2</math></b>			
0	4,11 $\pm$ 0,21	0,85 $\pm$ 0,06	4,90 $\pm$ 0,35
2	2,61 $\pm$ 0,44	0,53 $\pm$ 0,04	4,86 $\pm$ 0,46
4	3,00 $\pm$ 0,31	0,63 $\pm$ 0,05	4,73 $\pm$ 0,31
6	4,15 $\pm$ 0,19	0,73 $\pm$ 0,08	5,99 $\pm$ 0,75
8	3,38 $\pm$ 0,33	0,85 $\pm$ 0,09	4,14 $\pm$ 0,54
<b><math>\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow</math></b>			
0	4,43 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,04	6,70 $\pm$ 0,34
2	3,60 $\pm$ 0,19	0,52 $\pm$ 0,03	6,95 $\pm$ 0,13
4	3,38 $\pm$ 0,17	0,48 $\pm$ 0,04	7,10 $\pm$ 0,34
6	3,68 $\pm$ 0,27	0,49 $\pm$ 0,03	7,49 $\pm$ 0,47
8	3,11 $\pm$ 0,46	0,61 $\pm$ 0,08	5,46 $\pm$ 0,93
<b><math>\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow</math></b>			
0	4,60 $\pm$ 0,43	0,70 $\pm$ 0,06	6,51 $\pm$ 0,24
2	3,07 $\pm$ 0,15	0,63 $\pm$ 0,01	4,86 $\pm$ 0,24
4	3,87 $\pm$ 0,33	0,69 $\pm$ 0,04	5,66 $\pm$ 0,40
6	3,56 $\pm$ 0,19	0,67 $\pm$ 0,08	5,50 $\pm$ 0,46
8	3,06 $\pm$ 0,16	0,67 $\pm$ 0,02	4,56 $\pm$ 0,20

limitation dans le processus de régénération du pool des nucléotides (**voir chapitre 10**).

Cependant, dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , aucune modulation du niveau de transcription du gène ZWF1, n'a été mise en évidence lors de la prolifération sur glucose [219]. Un défaut d'expression de la G6PDH ne peut donc expliquer la diminution de la concentration de l'ATP dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ .

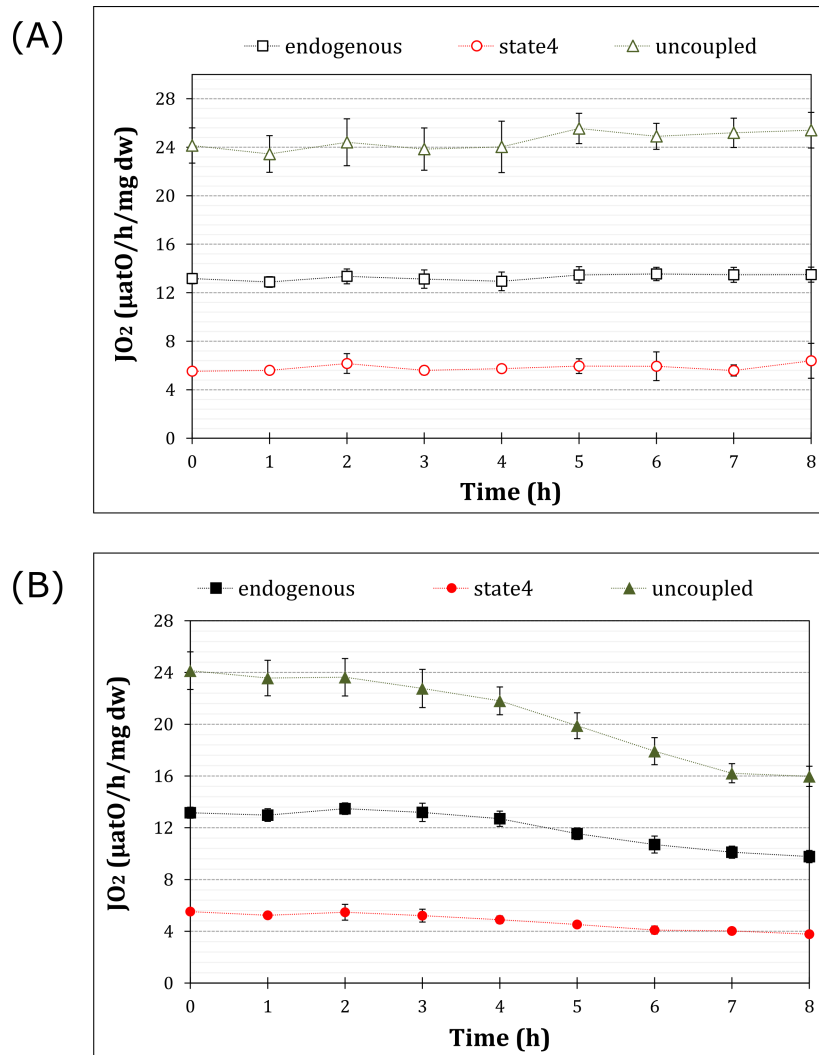
**Question** : Comment les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  ne parviennent pas à augmenter leur statut énergétique, alors qu'elles présentent un flux d'oxydation du substrat respiratoire (respiration) plus important par rapport à toutes les autres souches que nous avons utilisées ?

Dans ce cas de figure, ces résultats nous amènent à aborder la question relative au couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. En effet, le flux de synthèse d'ATP n'est pas proportionnel au flux de la respiration, mais dépend du niveau de couplage entre l'extrusion des protons  $H^+$  par la chaîne respiratoire et l'intrusion de ces dernier par l'ATP synthase (**voir chapitre 1**).

#### 12.4.2 Le couplage entre la respiration mitochondriale et la synthèse d'ATP dans les cellules $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose

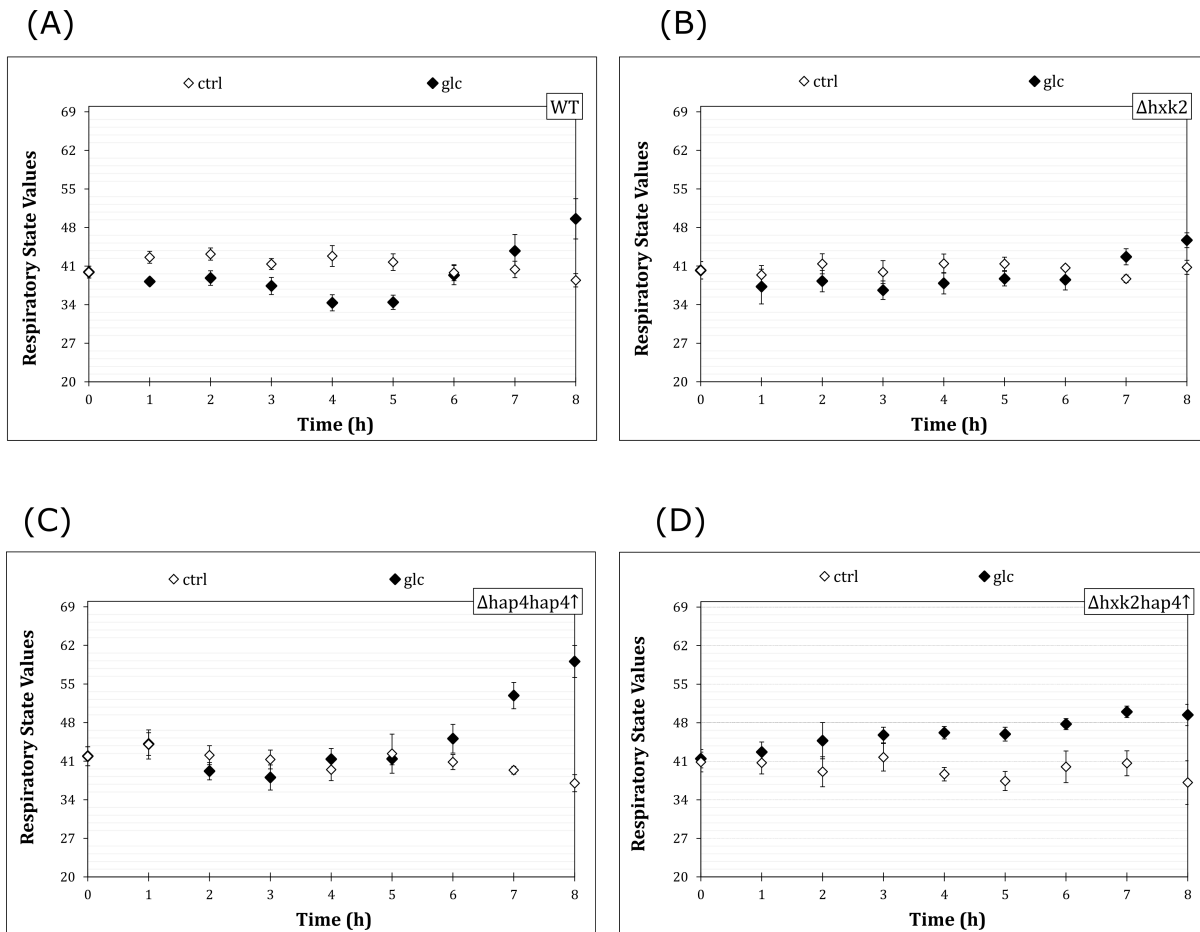
Pour évaluer le degré du couplage entre le flux de la respiration et la synthèse d'ATP, nous avons déterminé la vitesse du fonctionnement minimale et maximale de la chaîne respiratoire. Puis nous avons déterminé l'évolution de l'état stationnaire de respiration (respiratory state value) des cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose.

Nous observons dans la **figure 12.11** que le flux de la respiration dans des conditions d'inhibition d'ATP synthase (●) est largement plus faible par rapport au flux de la respiration endogène (■). Ceci montre que la respiration endogène est couplée à la synthèse d'ATP dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , lors de la prolifération sur glucose.



**Figure 12.11 – Évolution du flux de la respiration endogène, non phosphorylante et découplée de la souche  $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , avant et après l'ajout de glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* ( $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée (B) au milieu de culture. Un suivi de la respiration endogène, non phosphorylante (state 4) et découplée est réalisé sur huit (8) heures. Les flux de respiration non phosphorylante et découplée sont obtenus comme décrit dans le matériels et méthodes. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Cependant, les résultats du RSV (**Figure 12.12**), mettent en évidence une évolution très différente de l'état stationnaire de respiration dans les cellules  $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , par rapport à ce que nous avons observé dans les autres souches. Dans les cellules  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  (D), l'activité du système des OXPHOS a tendance à augmenter rapidement après l'ajout de glucose. Cette augmentation évolue jusqu'à environ quatre heures où le RSV arrive à un niveau stationnaire comparable à celui des cellules sauvages au point 8h (A).



**Figure 12.12** – Évolution de l'état stationnaire de respiration (RSV) chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h x k 2$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose. Le RSV est calculé par la détermination du rapport entre [flux de la respiration endogène (-) flux de la respiration non phosphorylante] et [flux de la respiration découplée (-) flux de la respiration non phosphorylante]. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM) ;  $n=5$ .

Ces résultats suggèrent une évolution différente du niveau de couplage du système des OXPHOS dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , par rapport aux autres souches.

En terme de régulation thermodynamique des oxydations phosphorylantes (OXPHOS) par le rapport ATP/ADP, ces résultats sont en accord avec le dosage de l'ATP et l'ADP (voir tableau 12.3). L'augmentation de l'activité du système des OXPHOS pourrait être expliquée par le fait que les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  possèdent un statut énergétique (rapport ATP/ADP) faible.

Toutefois, l'incapacité des cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  à maintenir un rapport ATP/ADP élevé est étonnante. Bien que l'évolution du RSV suggère un niveau du couplage différent dans

les cellules  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  par rapport aux cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , les cellules  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  possèdent un flux respiratoire qui devrait leur permettre d'assurer un flux de synthèse d'ATP mitochondrial suffisant et avoir ainsi un rapport ATP/ADP élevé.

Toute au long de notre étude, nous avons discuté le rôle de niveau du couplage du système des OXPHOS dans la régulation de l'homéostasie énergétique et redox des cellules en prolifération. En effet, nous avons mis en évidence dans la souche sauvage, que la diminution du couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase pourrait être une option pour les cellules pour rétablir le potentiel redox dans des conditions où le potentiel phosphate est élevé, afin de maintenir le flux de substrat à travers la glycolyse.

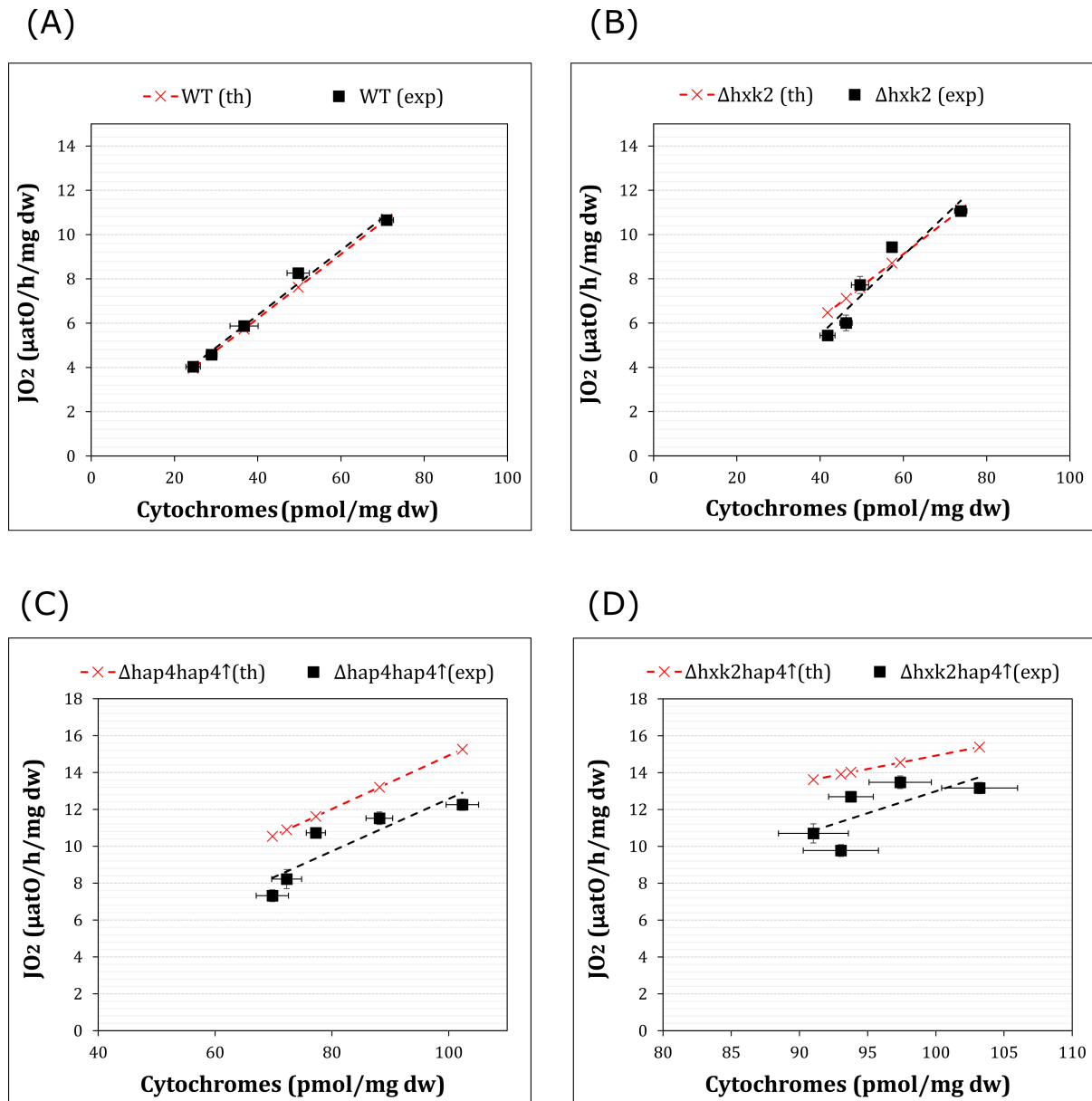
Nous avons donc une réserve concernant l'explication de l'augmentation de l'activité du système des OXPHOS observée dans les cellules  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  comme une conséquence d'un statut énergétique faible. Pour conclure, il serait donc intéressant d'effectuer une étude plus poussée sur l'évolution des concentrations des nucléotides pour s'assurer que les cellules ne présentent pas de défaut dans la biogenèse de nucléotides ou précurseurs de nucléotides.

## 12.5 Les mitochondries des cellules $\Delta hxk2hap4\uparrow$ sont-elles toutes fonctionnelles ?

Dans le **chapitre 11**, nous avons mis en évidence que contrairement aux cellules sauvage (**Figure 12.13–A**) et  $\Delta hxk2$  (**B**), la relation entre la quantité de cytochromes ( $cc_1$ ) et le flux de la respiration endogène (phosphorylante) n'est pas conservée dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (**C**). En effet dans cette dernière, le flux respiratoire mesuré (ligne noire) est plus faible par rapport au flux respiratoire théorique (ligne rouge) calculé à partir de l'équation  $JO_2 = f([\text{cytochromes } cc_1])$  établie par [69].

De même pour la souche  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  (**D**), les cellules présentent un flux respiratoire mesuré (ligne noire) plus faible par rapport au flux respiratoire théorique (ligne rouge) (**Figure 12.13**).





**Figure 12.13 – Évolution du flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochromes  $cc_1$ .** Représentation mettant en évidence la relation entre vitesse de respiration cellulaire et concentration en cytochromes  $cc_1$  dans la souche sauvage (A),  $\Delta hxk2$  (B),  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (C) et  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  (D). Les (x) représentent le flux de la respiration endogène en fonction de la concentration en cytochromes  $cc_1$  calculé à partir de l'équation  $JO_2 = f([cytochromes\ cc_1])$  selon [69], après l'ajout de glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=5$ .

Dans ce cas de figure, nos résultats suggèrent donc que même pour les cellules  $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , une partie du compartiment mitochondrial ne participe pas au processus de la respiration mitochondriale (mitochondrie non fonctionnelle). Bien que ceci pour-

rait expliquer le fait que les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , ne parviennent pas à maintenir un rapport ATP/ADP élevé lors de la prolifération sur glucose, le fait d'avoir une partie du compartiment mitochondrial non fonctionnelle ne semble pas avoir un effet sur le maintien d'un rapport ATP/ADP élevé, dans la souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ .

Pour avoir une réponse plus précise, il est absolument nécessaire de quantifier les unités de chaîne respiratoire fonctionnelles qui participent réellement dans le processus des OXPHOS dans chaque souche. Cependant, pour le moment nous ne disposons pas d'outils et moyens expérimentaux qui nous permettent de quantifier précisément dans une cellule entière, les unités de chaîne respiratoire qui participent au flux de transfert des électrons.

Toutefois, les observations que nous avons faites dans notre étude des souches qui surexpriment *HAP4*, nous permettent tout de même de conclure que la surexpression seule de *HAP4* n'est pas suffisante pour permettre de prévenir la répression du métabolisme oxydatif chez *S. cerevisiae*, après l'ajout de glucose.

## 12.6 Origine de la diminution du compartiment mitochondrial dans la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout de glucose

Dans le **chapitre 11**, nous avons formulé l'hypothèse que la diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial observée dans les cellules  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  après l'ajout de glucose, pourrait être en partie justifiée par le fait que la vitesse de la biogenèse mitochondriale ne suit pas l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire, après l'ajout de glucose.

La cinétique d'évolution de la vitesse de prolifération et la quantité de cytochromes dans les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout du glucose découle cette hypothèse. Après l'ajout de glucose, nous constatons dans la **figure 12.14**) que la quantité de cytochromes a tendance à diminuer légèrement, au fur et à mesure avec l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire (—). La diminution des cytochromes dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  pourrait être donc due en grande partie à un défaut de coordination entre vitesse de biogenèse mitochondriale et vitesse de prolifération cellulaire.

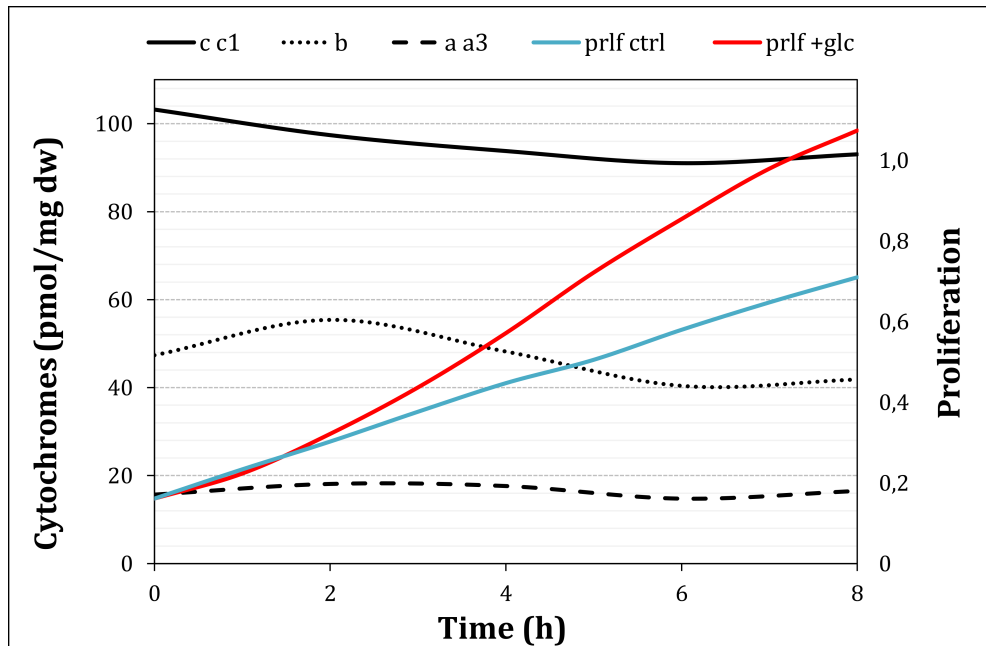


Figure 12.14 – Tendence d'évolution de la vitesse de prolifération cellulaire et le taux de diminution des cytochromes dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , après l'ajout du glucose.

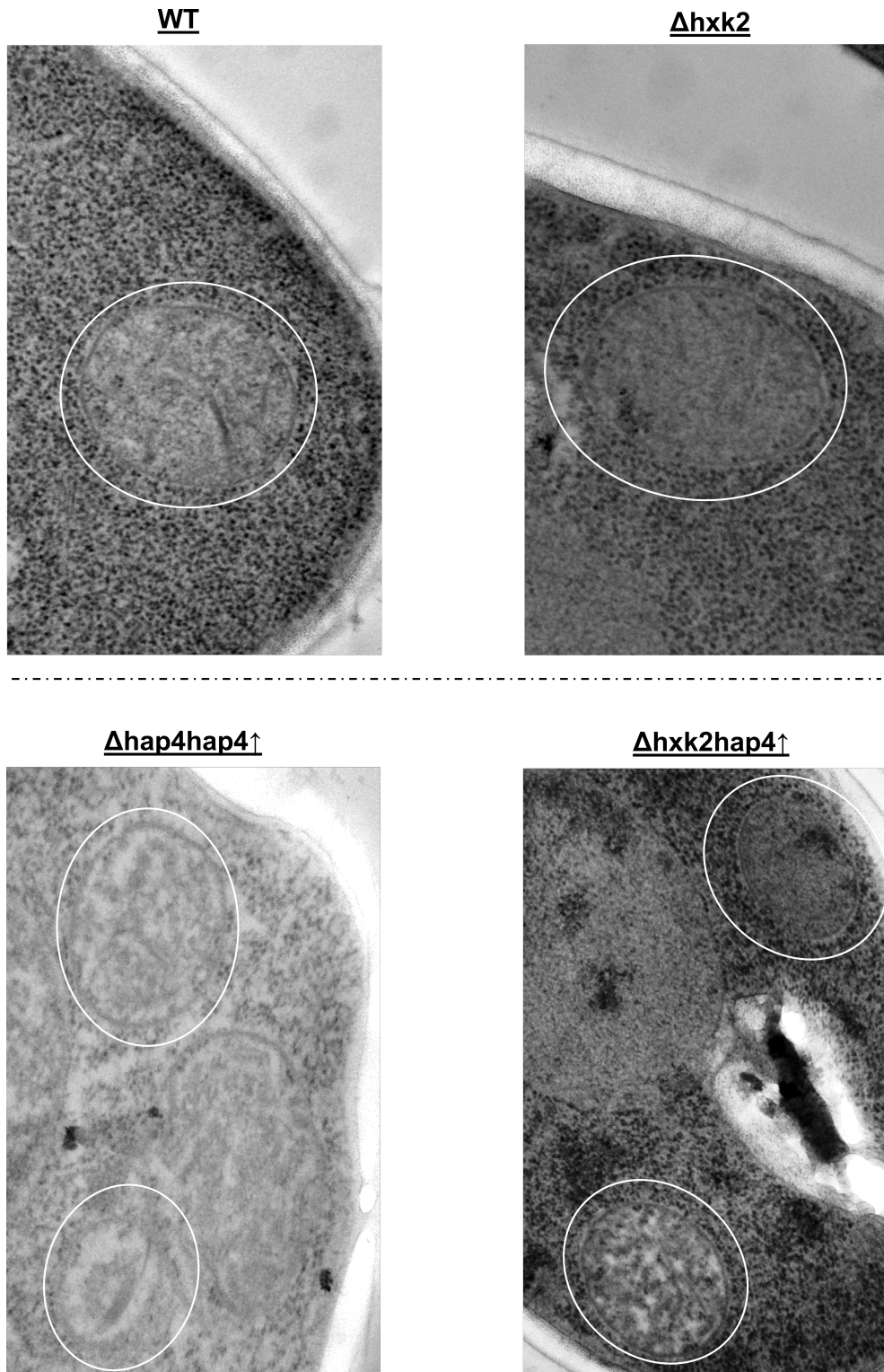
### *La combinaison de la délétion de l'H X K 2 avec la surexpression de H A P 4, n'empêche pas la mise en place de l'effet Warburg chez S. cerevisiae*

Après l'ajout du glucose (70 mM) dans le milieu de culture, nous avons pu caractériser chez la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  :

- Une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire (production de biomasse) ;
- Une consommation élevée de glucose ;
- La fermentation du glucose en éthanol en aérobiose ;
- Une diminution de la vitesse de respiration mitochondriale.

Bien que les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , maintiennent un flux respiratoire plus important par rapport à la souche sauvage, la combinaison de la délétion de l'H X K 2 avec la surexpression de H A P 4 ne permet pas d'empêcher la répression du métabolisme oxydatif et le déclenchement du métabolisme fermentaire. Bien que les conditions de disponibilité de substrat et statut énergétique faible favorisent la respiration mitochondriale, la

respiration est malgré tout réprimée. En effet, lors de la prolifération sur glucose, la répression du métabolisme oxydatif, est plus complexe qu'une régulation de la quantité de Hap4p ou le maintien du processus de la biogenèse mitochondriale. Il pourrait y avoir d'autres processus intervenant dans le processus de maturation des mitochondries pour obtenir des mitochondries fonctionnelles. Des images de microscopie ont mis en évidence des différences morphologiques au niveau des mitochondries des souches surexprimant *HAP4*. (voir **figure 12.15**).



**Figure 12.15** – Images de microscopie électronique de cellules de *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h x k 2$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ), après l'ajout de glucose. Des cultures de *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h x k 2$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 70 mM de glucose est ajoutée aux milieux de culture. Les coupes histologiques ont été réalisées après huit (8) heures d'incubation sur glucose (voir matériels et méthodes).

# *L'effet Crabtree est induit par les hexoses phosphates dérivés de la glycolyse [212]*

À la lumière des travaux d'Otto Warburg sur le métabolisme tumoral, Herbert G Crabtree, montra en 1929 que l'induction de l'effet Warburg est associée à un autre phénomène métabolique. Contrairement aux cellules non cancéreuses, l'ajout du glucose au milieu de culture, provoque dans les cellules tumorales une diminution immédiate de la respiration endogène de l'ordre de 10 % à 20 % [54]. Cet effet du glucose sur la respiration est en effet pas spécifique aux cellules tumorales, de nombreuses autres lignées de levure sont positives à l'inhibition par le glucose. Elles sont définies comme étant levures Crabtree (+) positives [53, 63, 84]. Chez une levure Crabtree (-) négative, l'ajout du glucose ne provoque aucun effet sur la respiration et ne provoque aucune déviation du métabolisme énergétique [62].

Le(s) mécanisme(s) de la répression du flux respiratoire cellulaire induit(s) suite à l'ajout de glucose a (ont) été largement étudié(s) et même si un certain nombre d'hypothèses ont été formulées, son (ses) mécanisme(s) moléculaire(s) précis est (sont) encore inconnu(s).

Toutes les études menées sur l'effet Crabtree convergent sur le fait que, que ce soit cellules tumorales ou levures, le glucose induit dans les cellules Crabtree (+), plusieurs modulations de concentrations intracellulaires de métabolites qui sont en étroite relation

avec la régulation du flux respiratoire (ADP, Pi, G6P, F1,6bP) [136, 207].

Dans ce chapitre nous avons étudié le rôle des métabolites (ADP, Pi, G6P, F1,6bP) dans l'induction de l'effet Crabtree, chez la levure Crabtree (+), *S. cerevisiae*.

### 13.1 Variations de la concentration d'ADP et du phosphate inorganique libre (Pi)

Dans une étude sur une lignée de cellules tumorales, il a été mis en évidence, très rapidement après l'ajout du glucose au milieu de culture, une diminution drastique du phosphate inorganique cellulaire libre (Pi) [136, 207]. En effet, dans ces cellules, la glycolyse est hyperactive, son mécanisme de régulation est très différent par rapport aux cellules différenciées (voir **chapitre 2**). Après l'ajout du glucose, il a été mis en évidence dans ces cellules une augmentation de la concentration des intermédiaires phosphorylés (G6P, F6P, F1,6bP) de la glycolyse [207]. Ainsi, une diminution de l'activité de l'ATP synthase suite au piégeage du Pi dans les intermédiaires phosphorylés a été proposée comme mécanisme d'induction de l'effet Crabtree. En effet, le Pi est substrat de l'ATP synthase et sa concentration joue un rôle dans le potentiel phosphate ( $\Delta G'_{\text{p}} = \Delta G'^{\circ}_{\text{p}} + RT \ln [\text{ATP}]/[\text{ADP}][\text{Pi}]$ ). La variation de concentration du Pi pourrait avoir donc une conséquence sur l'activité de l'ATP synthase (voir **chapitre 1**).

D'autre part, une autre conséquence d'une glycolyse hyperactive est l'augmentation du flux de phosphorylation d'ADP cytosolique. Il a été proposé que l'induction de l'effet Crabtree passerait par une compétition entre les enzymes de la glycolyse (phosphoglycérate kinase, pyruvate kinase) et l'ATP synthase, vis-à-vis l'ADP, d'une sorte à que l'augmentation du flux de la glycolyse réduisait la disponibilité de l'ADP pour l'ATP synthase [207, 252]. Cependant, cette hypothèse pourrait ne pas être vraie «*in-vivo*» puisque le  $k_{\text{m}}$  de la translocase (ANT) mitochondriale est presque 100 fois plus bas que celui des enzymes de la glycolyse [242]. Par conséquent, il est possible que les mitochondries importent encore l'ADP cytosolique après l'activation de la glycolyse.

L'ADP et le Pi sont substrats de l'ATP synthase, si dans nos conditions de culture, l'inhibition immédiate de la respiration de *S. cerevisiae* (effet Crabtree) passe par une

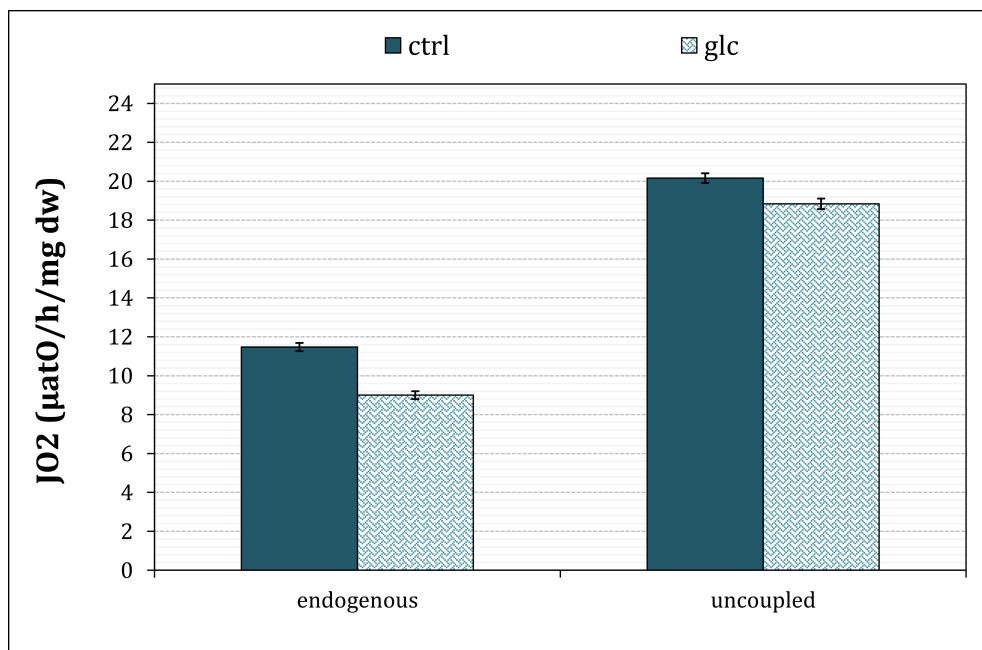
diminution de l'activité de la partie phosphorylante du système des OXPHOS, ceci peut être mis en évidence par la détermination du flux de la respiration endogène et découplée.

En effet, l'ajout de découplant (CCCP), supprime toute régulation exercée par l'ATP synthase sur l'activité des complexes de la chaîne respiratoire. Par exemple, dans une condition expérimentale où on constate une diminution immédiate du flux de la respiration endogène, nous pouvons utiliser les résultats de la respiration découplée pour déterminer quelle entité du système OXPHOS est responsable de cette diminution. L'interprétation des résultats de la respiration découplée se fait de la façon suivante :

- ☞ Si le flux de la respiration découplée du contrôle et échantillon sont comparables, cela veut dire que l'activité maximal des complexes de la chaîne respiratoire est comparable dans les deux conditions. L'inhibition de la respiration endogène observée est donc au niveau du système phosphorylant (ATP synthase, ANT/Pi).
- ☞ Si le flux respiratoire à l'état découplé de l'échantillon est faible par rapport au contrôle, cela veut dire que le découplage n'a pas permis la suppression de l'inhibition. Dans ce cas, l'inhibition de la respiration endogène observée est au niveau du système oxydant (chaîne respiratoire).

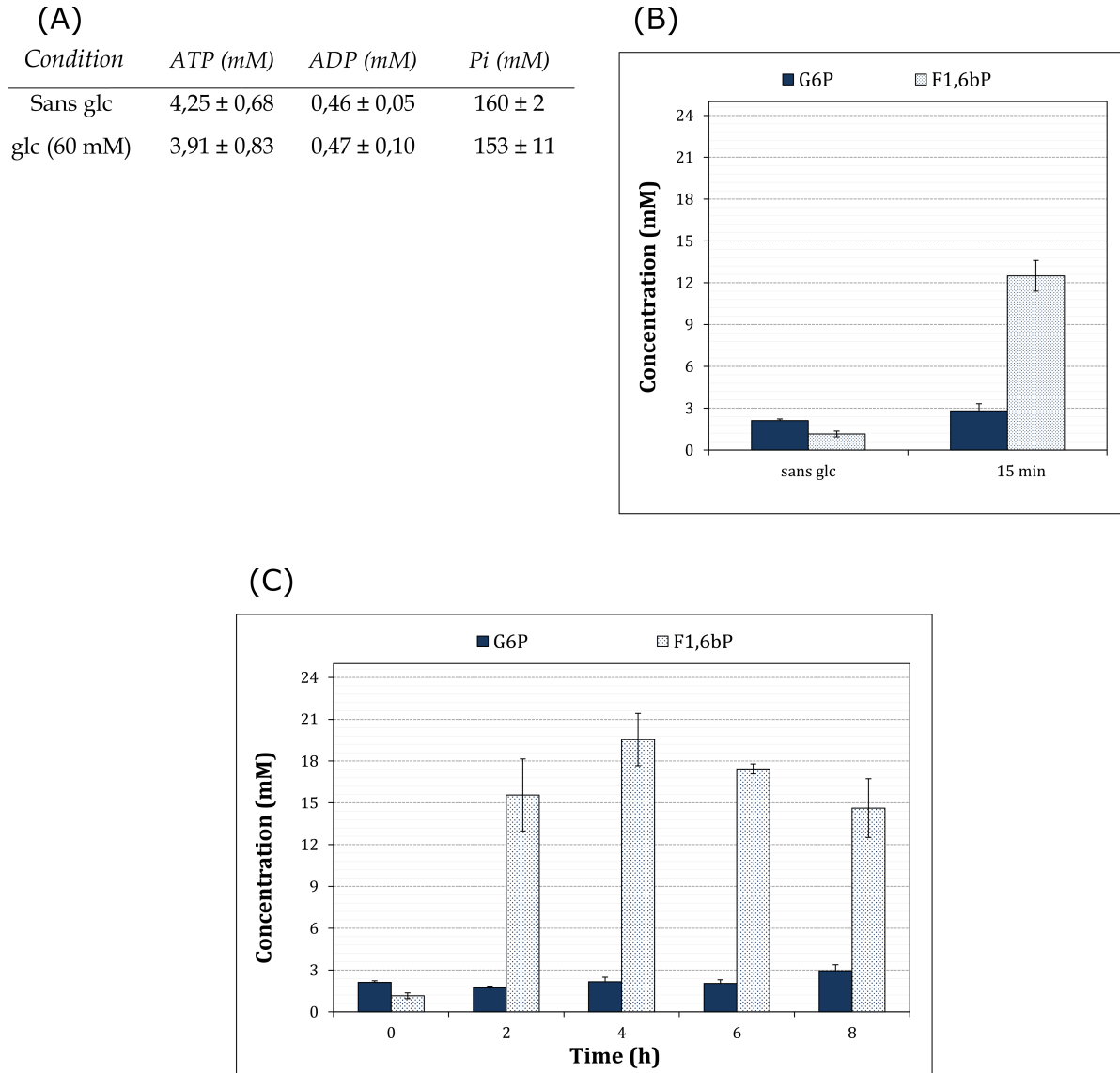


La **figure 13.1**, présente l'évolution du flux respiratoire de *S. cerevisiae* (souche sauvage) avant et après l'ajout de glucose. Nous observons que le glucose induit une diminution immédiate de la respiration endogène d'environ 20 %. Cette diminution de la respiration est conservée dans les conditions de découplage (voir matériels et méthodes). Ceci montre que la diminution de la respiration constatée dans notre modèle d'étude, est due à une diminution de l'activité au niveau de la chaîne respiratoire et non pas au niveau de l'ATP synthase.



**Figure 13.1 – Flux de la respiration endogène et découplée de *S. cerevisiae*, avant et après l'ajout de glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 60 mM de glucose est ajoutée à la culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Un suivi de la respiration endogène et découplée est réalisé avant et 15 min après l'ajout de glucose. Les mesures de la respiration endogène et découplée ont été réalisées comme décrit dans le matériels et méthodes. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM). Respiration endogène :  $n=4$  ; respiration découplée :  $n=3$ .

Dans nos conditions de culture, nous avons pu montrer que la concentration du Pi et d'ADP reste constante dans *S. cerevisiae* (souche sauvage) après l'ajout de glucose (15 min) ((Figure 13.2–A), alors que la concentration du F1,6bP augmente très rapidement après l'ajout de glucose (B).



**Figure 13.2 – Concentrations intracellulaires en métabolites (G6P, F1,6bP, ATP, ADP et Pi) chez *S. cerevisiae* (sauvage), avant et après l'ajout de glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 60 mM de glucose est ajoutée à la culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Des dosages d'ATP, ADP, Pi (A), G6P et F1,6bP (B, C) sont réalisés comme décrit dans le matériels et méthodes. (A) Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ ) ± écart-type;  $n=3$ . (B, C) Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ ) ± erreur standard de la moyenne (ESM);  $n=4$ .

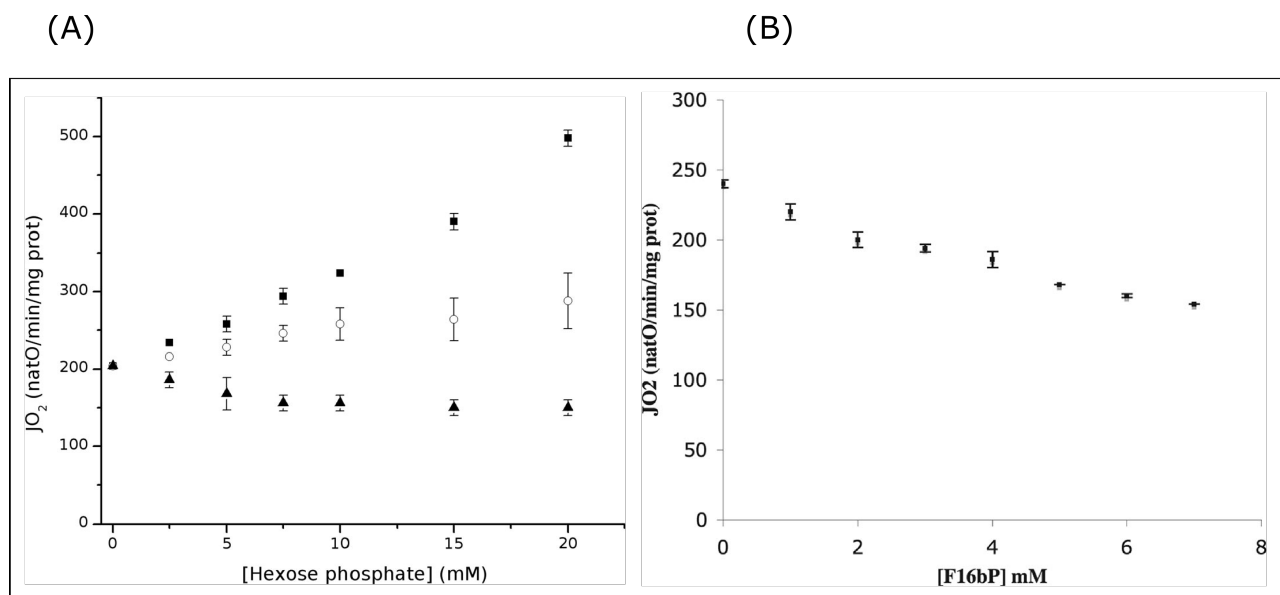
En effet, cette accumulation du F1,6bP suite à l'ajout de glucose est un évènement non transitoire. Durant toute la période de présence du glucose, la concentration du F1,6bP reste très importante par rapport au contrôle (sans glucose) (**C**). Quand au G6P, la concentration de ce dernier ne semble pas être affectée significativement par l'ajout de glucose. L'accumulation du F1,6bP semble en relation avec le flux de la glycolyse. En effet, elle suit la même tendance du flux de l'apport de glucose (voir **chapitre 9**).

*Chez *S. cerevisiae*, la diminution du  $P_i$  et/ou le piégeage de l'ADP ne peuvent expliquer la mise en place de l'effet Crabtree.*

## 13.2 Inhibition de la chaîne respiratoire par le F1,6bP

Des travaux réalisés dans notre laboratoire sur des mitochondries isolées de cellules hépatiques de rat (mitochondries de mammifère) et de levure (*S. cerevisiae*), ont mis en évidence que les hexoses phosphates intermédiaires de la glycolyse (G6P, F1,6bP) sont capables de moduler l'activité de la chaîne respiratoire (**Figure 13.3**). Alors que le G6P stimule, le F1,6bP inhibe la respiration mitochondriale (**A**). Cette inhibition est exercée sur le complexe III et IV de la chaîne respiratoire [62]. Cependant, aucun effet du G6P ou F1,6bP n'a été observé sur le flux respiratoire dans les mitochondries de levures Crabtree négatives (-). D'autre part, les auteurs ont également montré que lorsque le G6P et le F1,6bP sont ajoutés à des concentrations stœchiométriques, le flux respiratoire est très comparable au contrôle (**B**).

À ce jour, le seul mécanisme moléculaire connu proposé pour l'inhibition de la chaîne respiratoire induite par le glucose est son inhibition par le F1,6bP [62]. Dans la mesure où chez *S. cerevisiae*, contrairement au G6P, le F1,6bP s'accumule dans le cytosol après l'ajout du glucose (Ce qui modifie significativement la stœchiométrie entre ces deux métabolites), ces résultats nous amènent à formuler l'hypothèse que la variation de la stœchiométrie de concentration entre le G6P et le F1,6bP pourrait jouer un rôle dans l'induction de l'effet Crabtree.



**Figure 13.3 – Effet du G6P et F1,6bP sur le flux de la respiration non phosphorylante de mitochondries isolées de *S. cerevisiae*.** Des mitochondries de levure *S. cerevisiae* (0,3 mg de protéine / ml) ont été mises en suspension dans un tampon composé de mannitol 0,6 M, MES 5 mM, KCl 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1mM, pH 6,8, puis une quantité équivalente à 1 mM de NADH (substrat respiratoire) est ajoutée au mélange. Un suivi du flux de consommation d'oxygène est réalisé en présence des concentrations différentes du G6P et/ou F1,6bP. La consommation d'oxygène est mesurée en nano-atomes d'oxygène par minute et par milligramme de protéines. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  écart-type ; n=3. D'après [62].

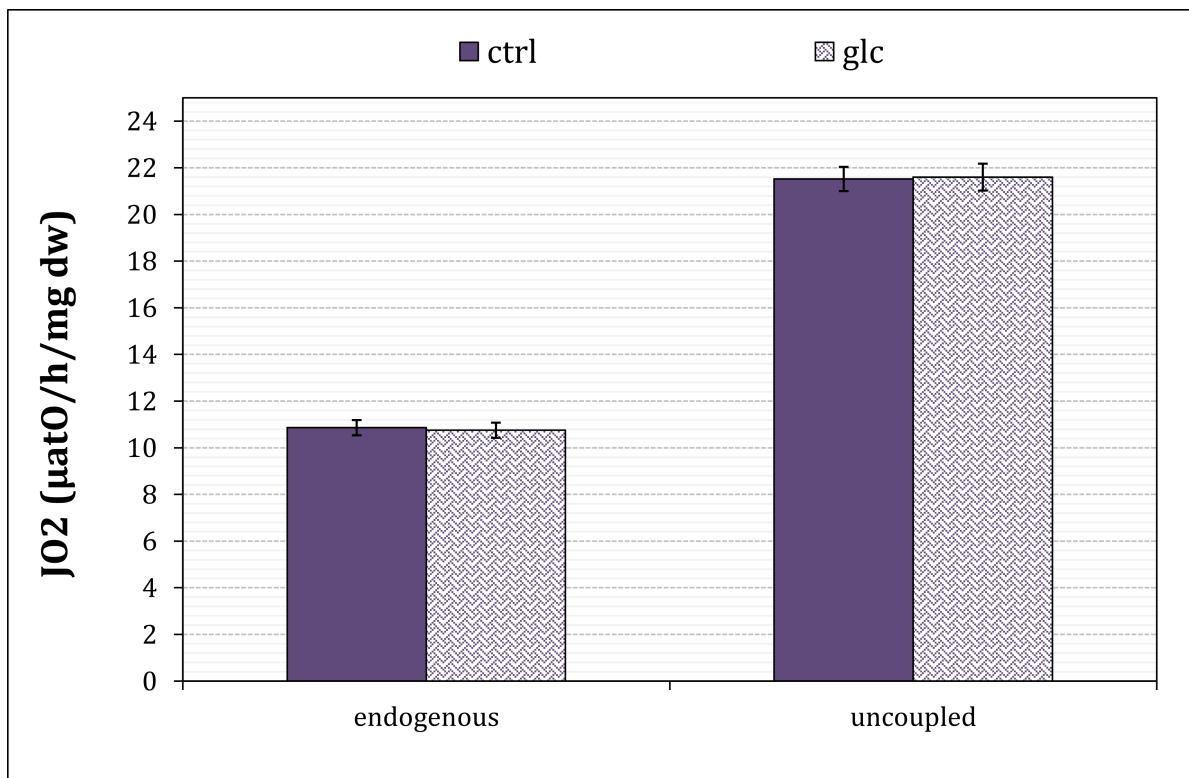
Pour étudier le rôle de la stœchiométrie de concentration entre le G6P et le F1,6bP dans l'induction de l'effet Crabtree, nous avons exploré les moyens d'altérer l'accumulation des métabolites glycolytiques après l'ajout du glucose.

### 13.3 La délétion de l'hexokinase II empêche la mise en place de l'effet Crabtree

Comme nous l'avons expliqué dans les chapitres précédents, l'hexokinase II est l'isoforme prédominante pendant la croissance sur glucose. Cette dernière est en effet l'homologue de la glucokinase (surexprimée dans les cellules tumorales), la seule hexokinase de mammifère qui n'est pas rétroinhibée par son produit, le G6P [112, 177, 2]. Dans notre étude précédente sur la cinétique d'induction de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*, nous avons montré que la délétion de l'hexokinase II induit une diminution du flux

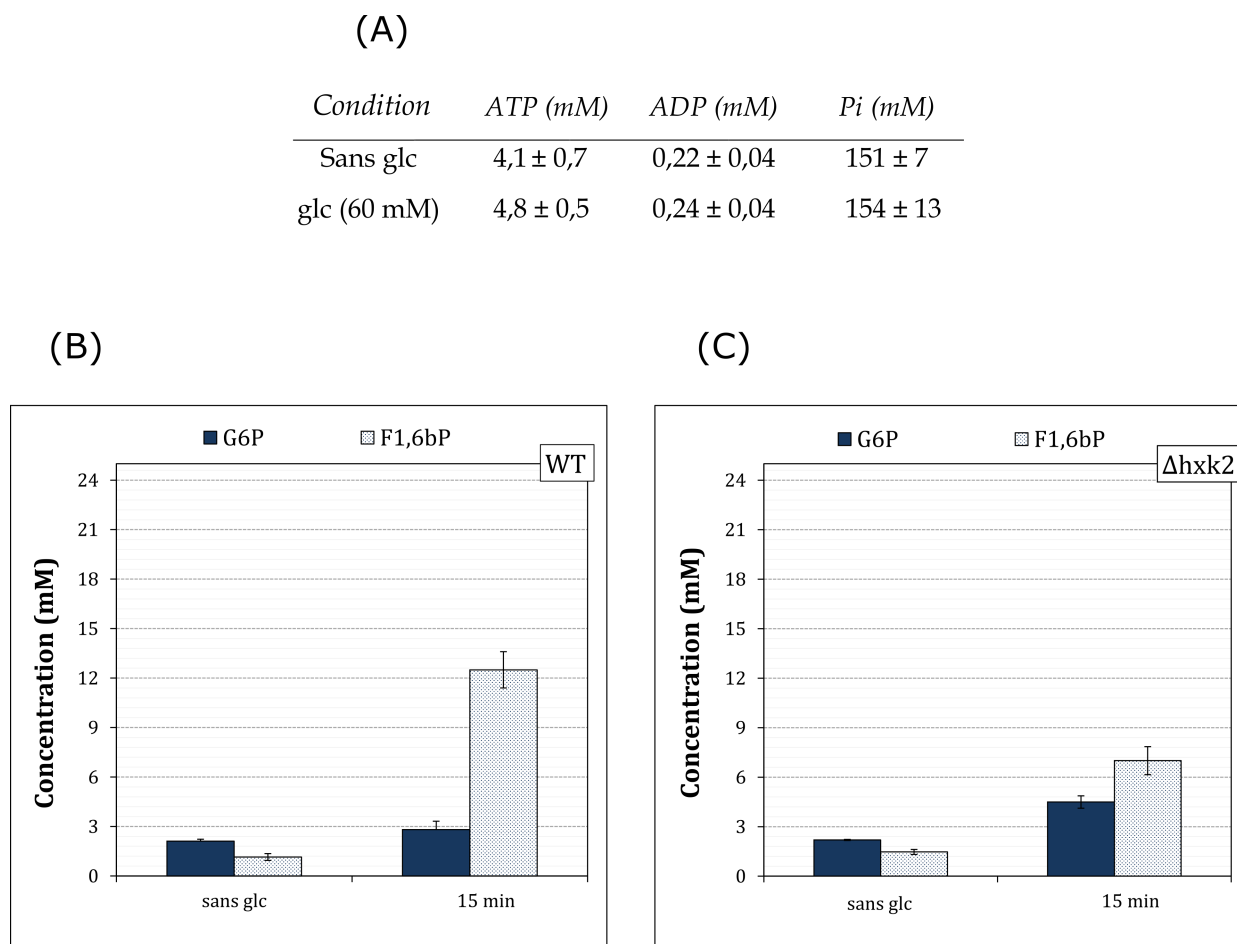
glycolytique dans le début de la cinétique (voir figure 10.3). Cette diminution du flux pourrait avoir un effet sur l'accumulation des intermédiaires de la glycolyse et par voie de conséquence sur la stœchiométrie entre le G6P et le F1,6bP. Nous avons donc étudié l'induction de l'effet Crabtree dans cette souche.

Dans la souche  $\Delta h x k 2$ , aucune inhibition de la respiration n'est observée après l'ajout de glucose (Figure 13.4) (i.e : pas d'induction de l'effet Crabtree).



**Figure 13.4 – Flux de la respiration endogène et découplée de la souche  $\Delta h x k 2$  de *S. cerevisiae*, avant et après l'ajout du glucose.** Une culture de *S. cerevisiae* ( $\Delta h x k 2$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 60 mM de glucose est ajoutée à la culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Un suivi de la respiration endogène et découplée est réalisé avant et 15 min après l'ajout de glucose. Les mesures de la respiration endogène et découplée ont été réalisées comme décrit dans le matériels et méthodes. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM). Respiration endogène :  $n=6$ ; respiration découplée :  $n=3$ .

Des mesures à la fois de l'ATP, ADP et Pi montrent que ces paramètres restent constants après l'ajout du glucose dans la souche  $\Delta h x k 2$  (Figure 13.5–A).



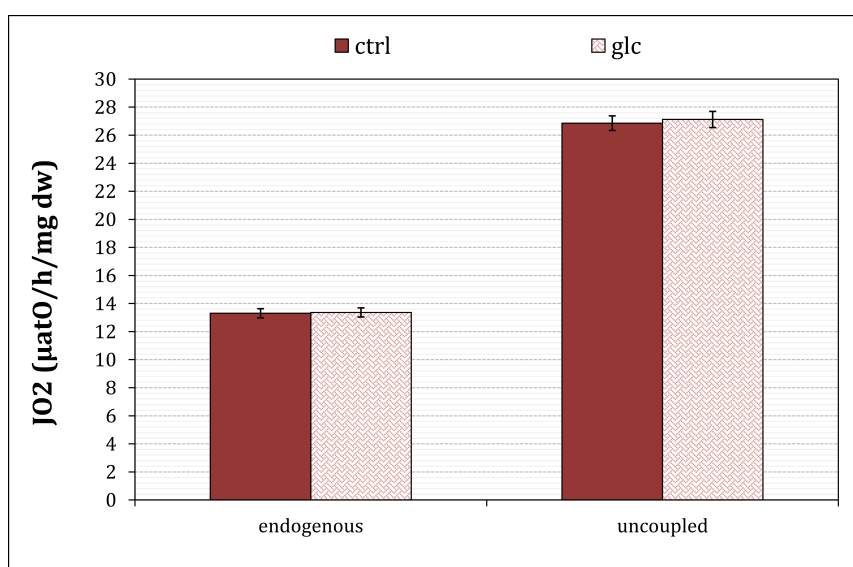
**Figure 13.5 – Évolution de concentrations intracellulaires en métabolites (G6P, F1,6bP, ATP, ADP et Pi) chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta h x k 2$ ), après l'ajout de glucose.** Deux cultures de *S. cerevisiae* (sauvage et  $\Delta h x k 2$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 60 mM de glucose est ajoutée à chaque culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Des dosages d'ATP, ADP, Pi (A), G6P et F1,6bP (B, C) sont réalisés comme décrit dans le matériels et méthodes. (A) Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ ) ± écart-type;  $n=3$ . (B, C) Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ ) ± erreur standard de la moyenne (ESM); (B) :  $n=4$ ; (C) :  $n=5$ .

La détermination des concentrations intracellulaires de G6P et F1,6bP, après l'ajout du glucose met en évidence une accumulation de F1,6bP dans les cellules  $\Delta h x k 2$  (Figure 13.5–C), mais reste moins importante par rapport à la souche sauvage (B). Pour le G6P, nous observons une légère tendance à s'accumuler dans les cellules  $\Delta h x k 2$  par rapport au sauvage.

## 13.4 La surexpression de *HAP4* empêche la mise en place de l'effet Crabtree

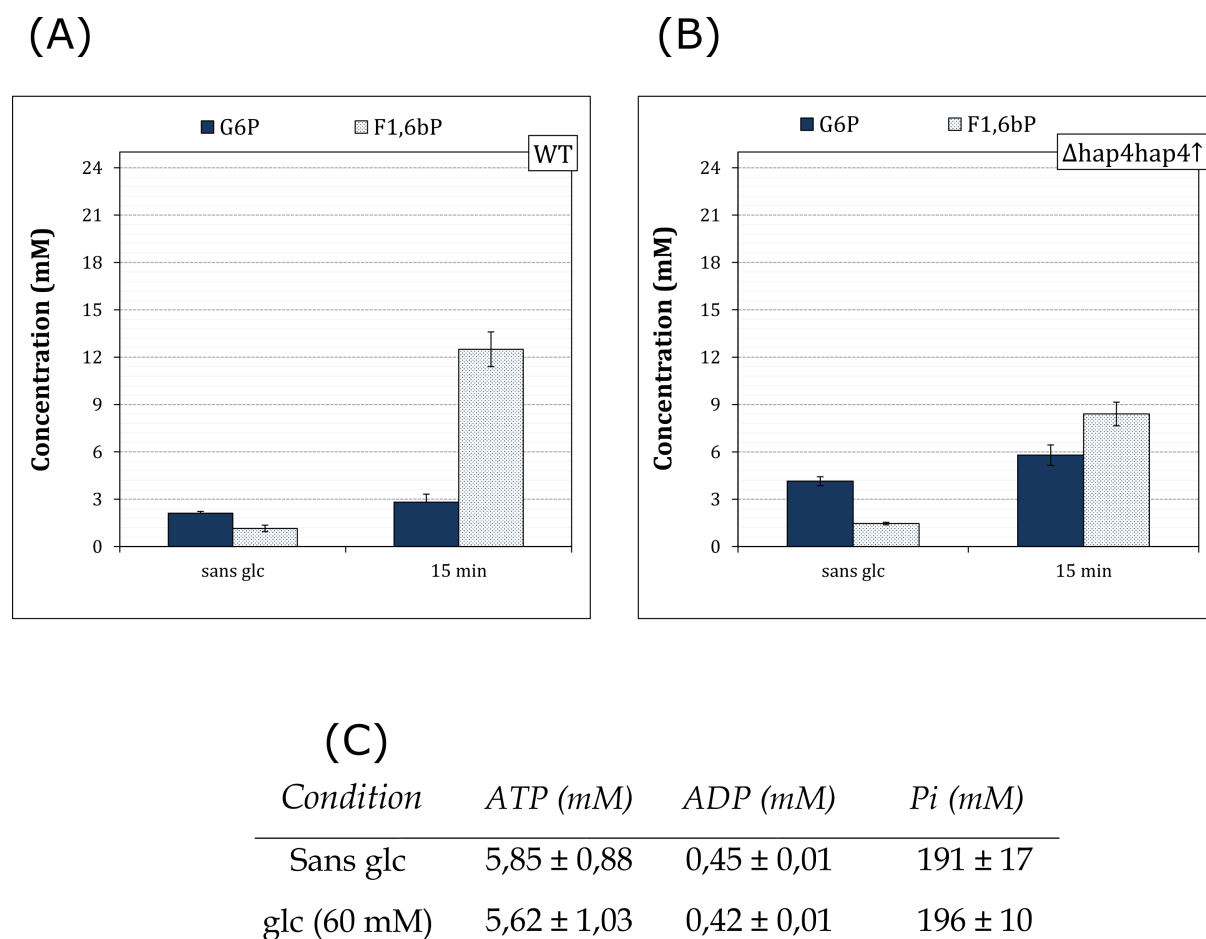
Nous avons montré dans le **chapitre 11** que la surexpression de *HAP4* induit plusieurs modulations du métabolisme énergétique, lors de la prolifération sur lactate (condition contrôle). Parmi ces modulations, l'augmentation de l'équipement enzymatique mitochondrial. Après l'ajout du glucose, les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  maintiennent un flux respiratoire comparable au contrôle, jusqu'à trois heures après l'ajout de glucose. Pour valider ce résultat et confirmer que le flux de la respiration endogène ne subit aucune inhibition immédiate/transitoire après l'ajout de glucose, nous avons déterminé l'effet court terme du glucose sur le flux respiratoire de la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (**Figure 13.6**).

Aucune inhibition immédiate de la respiration n'est observée, suite à l'ajout du glucose au milieu de culture des cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ .



**Figure 13.6** – Flux de la respiration endogène et découplée de la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  de *S. cerevisiae*, avant et après l'ajout du glucose. Une culture de *S. cerevisiae* ( $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) est réalisée. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 60 mM de glucose est ajoutée à la culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Un suivi de la respiration endogène et découplée est réalisé avant et 15 min après l'ajout du glucose. Les mesures de la respiration endogène et découplée ont été réalisées comme décrit dans le matériels et méthodes. La respiration est mesurée en micro-atomes d'oxygène par heure et par milligramme poids sec de levures. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM). Respiration endogène :  $n=4$ ; respiration découplée :  $n=5$ .

Les mesures de l'évolution des hexoses phosphates (G6P, F1,6bP) montrent que même pour les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , le F1,6bP s'accumule très rapidement (15 min) après l'ajout de glucose (Figure 13.7-B). Toutefois, cette accumulation est moins importante par rapport au sauvage (A). La concentration du G6P ne semble pas être affectée par l'ajout du glucose. Il faut signaler que la surexpression de *HAP4* que ce soit en présence ou en absence du glucose, semble induire une augmentation de la concentration du G6P. Sa concentration est en effet doublée dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , par rapport aux cellules sauvages (A).



**Figure 13.7 – Évolution des concentrations intracellulaires des métabolites (G6P, F1,6bP, ATP, ADP et Pi) chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ), après l'ajout de glucose.** Deux cultures de *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ) en milieu SC lactate 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 60 mM de glucose est ajoutée à chaque culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Des dosages de G6P, F1,6bP (A, B), ATP, ADP et Pi (C), sont réalisés comme décrit dans le matériels et méthodes. (A, B) Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ ) ± erreur standard de la moyenne (ESM); (A) :  $n=4$ ; (B) :  $n=5$ . (C) Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $X$ ) ± écart-type;  $n=3$ .



D'autre part, bien que la concentration de F1,6bP augmente significativement après l'ajout de glucose, les concentrations de Pi, ATP et ADP restent constantes dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose (C).

## 13.5 Origine de l'absence de l'induction de l'effet Crabtree dans les cellules mutées

Bien que le F1,6bP induit une inhibition de la chaîne respiratoire sur mitochondries isolées, nos résultats montrent sur cellules entières, que son accumulation dans le cytosol n'est pas un événement suffisant pour induire chez *S. cerevisiae* une inhibition de la chaîne respiratoire (effet Crabtree). D'autres paramètres influencent l'effet du F1,6bP sur la chaîne respiratoire.

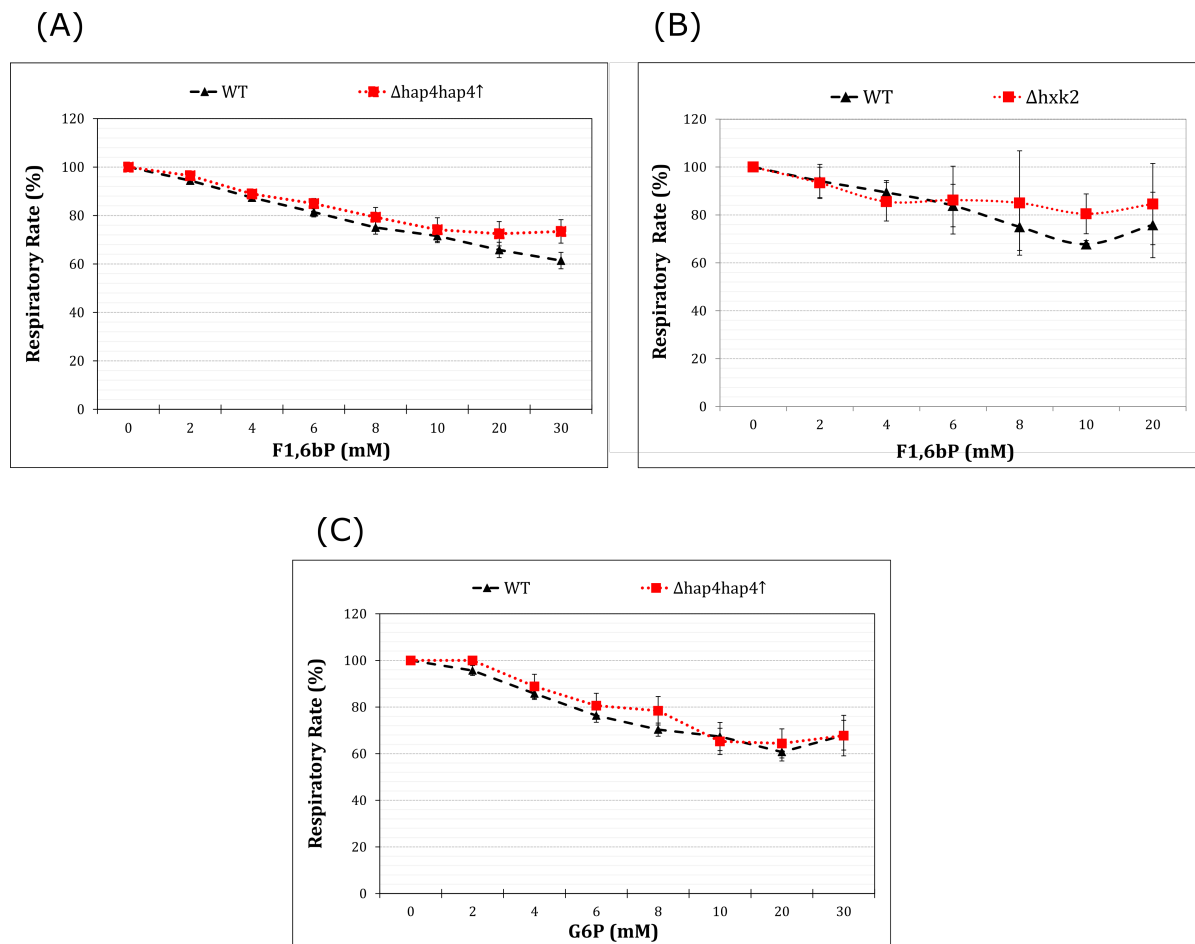
Nous avons vérifié si la délétion de *HXK2* et la surexpression de *HAP4* n'ont pas modifié la réponse des mitochondries des cellules mutées, vis-à-vis l'inhibition par le F1,6bP.

### 13.5.1 La sensibilité à l'inhibition médiée par le F1,6bP est-elle maintenue dans les souches mutées ?

Pour répondre à cette question, nous avons étudié l'effet de l'ajout de F1,6bP sur l'activité de la chaîne respiratoire sur des sphéroplastes de souches d'intérêt perméabilisés avec de la nystatine (afin de permettre l'entrée de F1,6bP dans la cellule) [9] (**Figure 13.8**).

Nous observons qu'il n'y a pas de différence significative dans l'inhibition induite par F1,6bP entre la souche sauvage,  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (A) et  $\Delta hxk2$  (B). Ainsi, l'absence d'induction de l'effet Crabtree dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  et  $\Delta hxk2$  n'est pas due à une modulation de la réponse de la chaîne respiratoire au F1,6bP.

Une expérience similaire a été réalisée avec le G6P afin de s'assurer que les chaînes respiratoires dans les cellules mutées sont bien stimulées par cet hexose phosphate. Cependant, après l'ajout du G6P, nous avons obtenu le même effet que le F1,6bP, c'est-



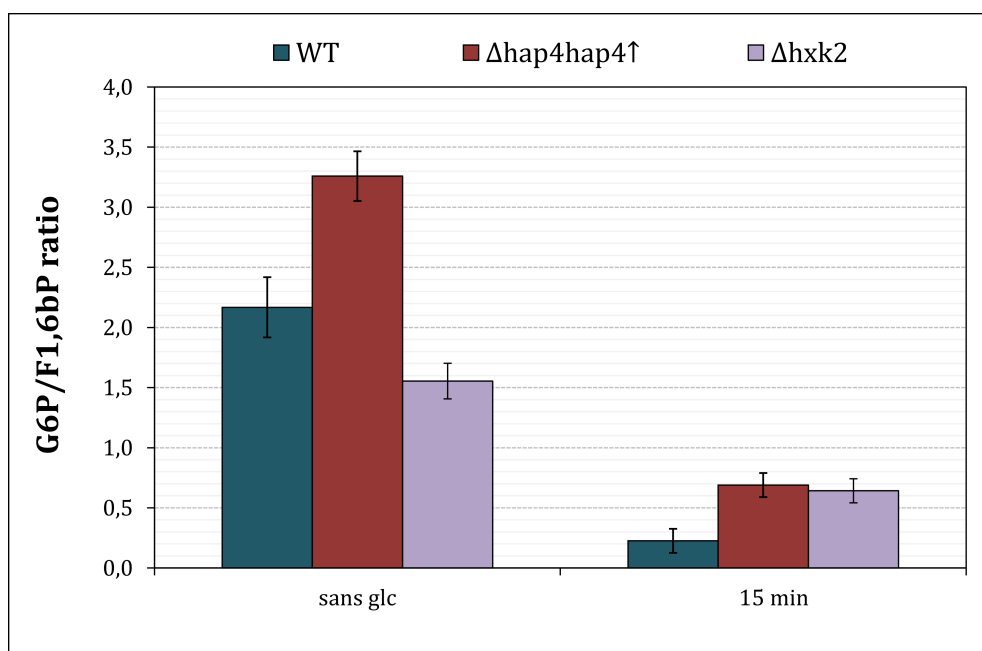
**Figure 13.8** – Effet des hexoses (G6P, F1,6bP) sur l'activité de la chaîne respiratoire dans des sphéroplastes perméabilisés de *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hap4hap4\uparrow$  et  $\Delta hxc2$ ). Les mesures de respiration sur sphéroplastes perméabilisés en présence de métabolite correspondant ont été réalisées comme décrit dans le matériels et méthodes. Toutes les mesure ont été réalisées à l'état non phosphorylant en présence d'iodoacétate (inhibiteur de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase). Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM); (A, C) :  $n=6$ ; (B)  $n=3$ .

à-dire une inhibition de la respiration. Par exemple, dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  (C), nous observons que l'ajout du G6P induit une inhibition de la respiration. En effet, contrairement aux mitochondries isolées, le G6P est métabolisé dans les sphéroplastes de manière constante en F1,6bP, rendant une telle expérience de l'effet du G6P sur la respiration dans les sphéroplastes perméabilisés techniquement impossible. En effet, contrairement au F1,6bP, où on peut empêcher son métabolisme en 1,3bPG, par l'ajout de l'iodoacétate (inhibiteur de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) (voir **figure 1.1, chapitre 1**), le blocage de la conversion du G6P en F1,6bP n'est pas possible.

### 13.5.2 Le rapport G6P / F1,6bP, un paramètre clé pour l'induction de l'effet Crabtree

Comme nous l'avons abordé dans le début de ce chapitre, le G6P et le F1,6bP ont un rôle antagoniste sur l'activité de la chaîne respiratoire [62], le G6P stimule, tandis que le F1,6bP inhibe l'activité de la chaîne respiratoire. Toutefois, lorsque le G6P et le F1,6bP sont présents à des concentrations stœchiométriques (rapport égal à 1), le flux respiratoire dans les mitochondries isolées reste comparable au contrôle (voir **figure 13.3**).

Dans la **figure 13.9**, bien que le rapport G6P/F1,6bP, après l'ajout de glucose est inférieur à 1 dans les trois souches, ce dernier est plus élevé dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  et  $\Delta hxc2$  par rapport aux cellules sauvages et corrèle avec l'absence de l'induction de l'effet Crabtree.



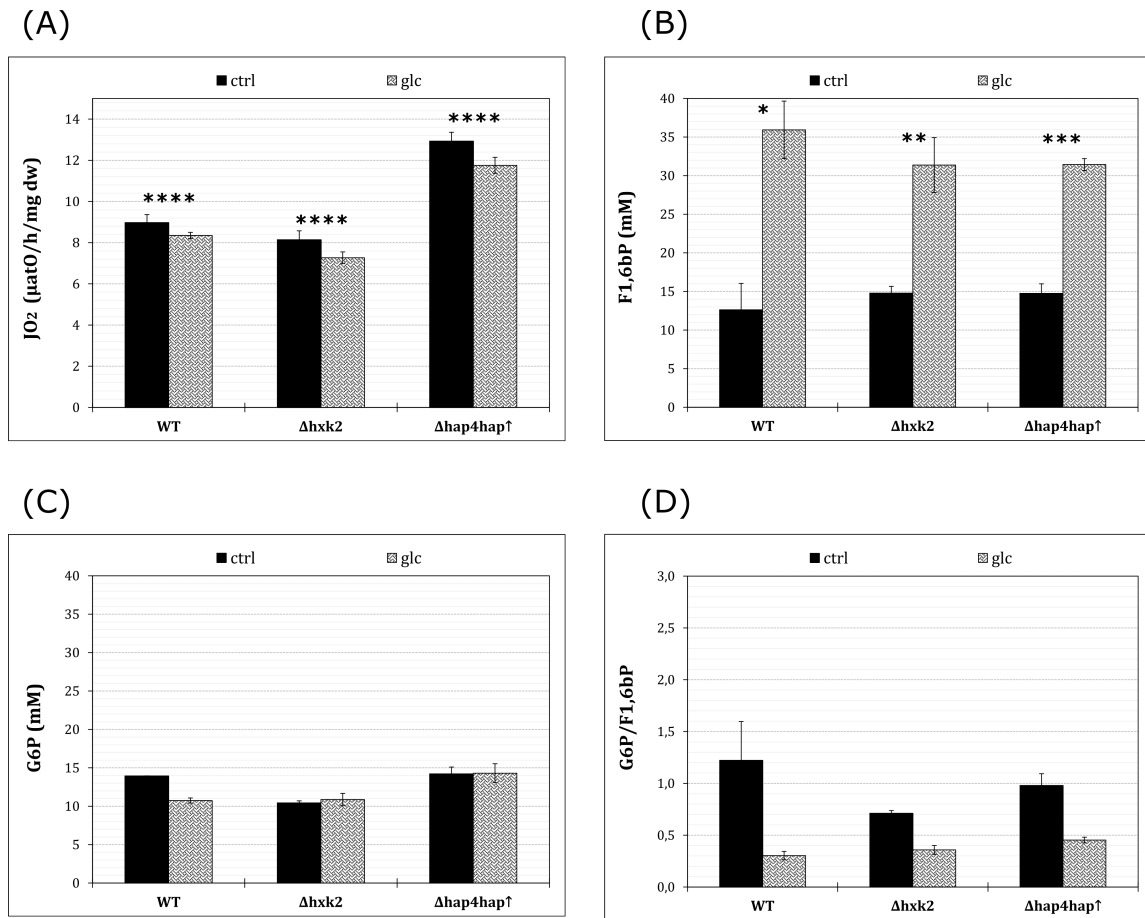
**Figure 13.9** – Évolution du rapport entre les concentrations intracellulaires du G6P et F1,6bP chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hap4hap4\uparrow$  et  $\Delta hxc2$ ), après l'ajout du glucose. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM); WT :  $n=4$ ;  $\Delta hap4hap4\uparrow$  :  $n=5$ ;  $\Delta hxc2$  :  $n=5$ .

Si l'induction ou non de l'effet Crabtree dans les cellules entières est déterminé par la variation du rapport G6P / F1,6bP, plutôt que de la concentration intracellulaire de F1,6bP, nous devrions être capables d'induire cet effet dans nos cellules mutées en

diminuant ce rapport. Pour ce faire, nous avons substitué le lactate du milieu de culture de base par le galactose. En effet, contrairement au lactate, le galactose est un substrat fermentescible, son métabolisme est effectué au niveau de la glycolyse. Pour proliférer sur galactose, les cellules doivent donc avoir une glycolyse plus active par rapport à la condition avec le lactate (2 %) comme source de carbone. Le raisonnement derrière ceci est que pour accumuler plus de F1,6bP dans nos cellules mutées, et ainsi diminuer le rapport G6P / F1,6bP, nous avons besoin d'une glycolyse bien différenciée et active.

Dans la **figure 13.10–A**, nous observons que l'ajout du glucose induit la mise en place de l'effet Crabtree dans les trois souches : sauvage,  $\Delta h x k 2$ ,  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ . Ceci est associé à une augmentation de la concentration de F1,6bP dans les cellules sauvages et mutées (**B**) alors que la concentration du G6P reste pratiquement inchangée (**C**). Par conséquent, dans cette condition où le glucose induit un effet Crabtree dans les cellules mutées, le rapport G6P / F1,6bP diminue d'une manière similaire à ce que nous avons observé dans la souche sauvage (**D**).

Par ailleurs, il faut souligner que l'inhibition du flux respiratoire après l'ajout du glucose lorsque les cellules sont cultivées sur du milieu galactose est inférieure à celle évaluée lorsque les cellules sont cultivées sur milieu non fermentescible (lactate 2 %), ceci est vrai pour les trois souches. Cependant, dans ces cellules en l'absence de glucose, le rapport G6P / F1,6bP est déjà inférieur à un (1) et plus faible par rapport à la condition lactate (voir **figure 13.9**). Ainsi, dans cette configuration expérimentale, la chaîne respiratoire est probablement déjà légèrement inhibée en raison d'une concentration de F1,6bP un peu plus élevée que la concentration en G6P.



**Figure 13.10 – Effet du glucose sur l'induction de l'effet Crabtree chez *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hxc2$  et  $\Delta hap4hap1$ ), cultivées en galactose (2 %).** Trois cultures de *S. cerevisiae* (sauvage,  $\Delta hxc2$  et  $\Delta hap4hap1$ ) en milieu SC galactose 2 % (p/v) sont réalisées. À  $T=0$ , une quantité correspondante à 60 mM de glucose est ajoutée à chaque culture lorsque celle-ci atteint 0,5 unités DO/ml. Un suivi de la respiration endogène est réalisé avant et 15 min après l'ajout du glucose (A). Puis un dosage de F1,6bP (B) et G6P (C) est réalisé comme décrit dans le matériels et méthodes. Les données sont présentées sous forme de moyenne ( $\bar{X}$ )  $\pm$  erreur standard de la moyenne (ESM). (A) :  $n=4$ ; (B, C et D) :  $n=3$ . La significativité des différences entre les souches a été analysée par la réalisation du teste T de student. (\* :  $p<0,05$ ); (\*\* :  $p<0,01$ ); (\*\*\*) :  $p<0,001$ ); (\*\*\*\* :  $p<0,001$ ).

## Discussion

Dans ce chapitre, nous avons évalué un certain nombre de paramètres qui ont été proposés pour être responsables de l'induction de l'effet Crabtree, dans un modèle de cellules entières : la levure *S. cerevisiae*. Les paramètres qui ont été proposés pour être responsables de cet effet, tels que l'ADP, le Pi et le potentiel phosphate, n'ont pas varié dans nos conditions expérimentales, après l'ajout de glucose. Nos résultats indiquent

clairement une inhibition de la chaîne respiratoire comme source de l'effet Crabtree. Si l'ADP et Pi sont responsables de cet effet, la diminution de leur concentration devrait inhiber l'activité du système des OXPHOS au niveau de l'ATP synthase.

Après l'ajout du glucose, alors que nous avons observé très peu de variations de la concentration de G6P dans les cellules, le F1,6bP quant à lui s'est largement accumulé et a induit une inhibition de la chaîne respiratoire. En étudiant l'absence d'induction de l'effet Crabtree chez la souche  $\Delta h x k 2$  et  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , nous avons pu montrer que l'accumulation du F1,6bP n'est pas la seule condition nécessaire pour l'induction de l'effet Crabtree, mais la concentration intracellulaire du G6P joue aussi un rôle dans le processus. En effet, le G6P ayant un effet antagoniste (stimulation) sur la chaîne respiratoire mitochondriale par rapport au F1,6bP, sa présence à des concentrations proches du F1,6bP réprime l'effet inhibiteur du F1,6bP sur la chaîne respiratoire. Pour avoir une inhibition de la respiration (effet Crabtree) par le F1,6bP, le rapport entre G6P et F1,6bP doit être nettement inférieur à un (1).

Cette hypothèse est renforcée par le fait que nous avons pu induire l'effet Crabtree dans les cellules mutées, par une diminution du rapport G6P/F1,6bP.

D'après notre étude, nous proposons donc que les hexoses phosphates issus de la glycolyse, à savoir le G6P et F1,6bP, jouent un rôle clé dans l'induction de l'effet Crabtree. Des études supplémentaires seront nécessaires pour déterminer si un tel mécanisme peut constituer un mécanisme unificateur dans d'autres types de cellules eucaryotes, Crabtree positives.



# CONCLUSION GÉNÉRALE

Mon travail de thèse s'inscrit dans le cadre des études de recherche qui visent à comprendre les relations existantes dans une cellule eucaryote, entre le développement de l'effet Warburg et l'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire. Dans cette démarche, nous avons essayé une nouvelle approche, celle de l'étude dans le temps, la cinétique de mise en place des variations métaboliques qui caractérisent l'effet Warburg, à savoir : le flux glycolytique, le métabolisme fermentaire et le métabolisme oxydatif. Pour cette étude, nous avons utilisé le modèle de levure Crabtree positive (+) *Saccharomyces cerevisiae*. Contrairement aux cellules tumorales, il est possible et simple d'induire expérimentalement dans cette levure, la mise en place de l'effet Warburg (par l'ajout d'une concentration importante de glucose).

En aérobiose, immédiatement après l'ajout du glucose au milieu de culture, les cellules de *S. cerevisiae* développent un métabolisme plus glycolytique, répriment le métabolisme oxydatif et fermentent une partie du glucose consommé en éthanol. Cette réorganisation du métabolisme énergétique est couplée à une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire. À partir de ce point de départ, nous avons cherché de comprendre au mieux, les relations qui règnent les voies du métabolisme énergétique (glycolyse, respiration mitochondriale, fermentation alcoolique), au cours du processus d'augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire.

## **Relation inverse entre flux glycolytique et flux du métabolisme oxydatif.**

Grâce à notre étude, nous avons pu montrer, au cours de la mise en place de l'effet Warburg, une évolution inverse du flux glycolytique par rapport au flux du métabolisme oxydatif. Après l'ajout du glucose, le flux de la glycolyse augmente significativement



et progressivement jusqu'à l'arrivée à un état stationnaire. Ceci est accompagné d'une diminution parallèle du flux du métabolisme oxydatif. Cette diminution du flux respiratoire semble sans effet sur la capacité des cellules à satisfaire leur besoin énergétique. Au contraire, bien que les cellules augmentent en vitesse de prolifération, avec seulement 40 % du flux respiratoire initial (avant ajout de glucose), elles parviennent à augmenter leur statut énergétique (rapport ATP/ADP). En effet, dans ces conditions, en raison d'un flux glycolytique élevé, le flux de synthèse d'ATP glycolytique est aussi important par conséquence.

Des études récentes sur le métabolisme des cellules tumorales ont mis en évidence qu'une glycolyse très active peut apporter des avantages à la cellule en prolifération tant en terme bioénergétique qu'en terme de métabolisme intermédiaire [241, 67]. Il a été montré que le flux glycolytique élevé, peut être à la fois une source importante d'ATP et d'intermédiaires métaboliques. Dans les conditions de prolifération, le flux d'ATP que la cellule produit à partir de la glycolyse peut dépasser celui produit à partir des oxydations phosphorylantes [104, 249].

À la lumière de ces résultats, nous avons formulé l'hypothèse que la répression du métabolisme oxydatif dans ces conditions, pourrait être un réarrangement métabolique, qui vise à diminuer le flux de synthèse d'ATP mitochondrial. Ceci est afin de compenser en quelque sorte l'augmentation du flux de synthèse d'ATP glycolytique et prévenir ainsi toute contrainte thermodynamique, qui pourrait être exercée sur le flux de la glycolyse par le biais du rapport ATP/ADP.

### **Relation inverse entre flux du métabolisme fermentaire et flux du métabolisme oxydatif.**

L'augmentation du flux de la glycolyse n'a pas pour conséquence seule, l'augmentation du flux de synthèse d'ATP glycolytique, elle est aussi accompagnée d'une augmentation du flux de réduction de  $\text{NAD}^+$  cytosolique. Le potentiel redox cytosolique (rapport  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ ) étant un paramètre important pour la poursuite de la glycolyse, la réoxydation du  $\text{NADH}$  cytosolique produit est primordiale. Chez *S. cerevisiae*, dans les conditions aérobies, l'oxydation du  $\text{NADH}$  cytosolique ce fait prioritairement par le

système des OXPHOS, grâce aux déshydrogénases Nde1p/2p de la chaîne respiratoire mitochondriale. Toutefois ce processus est couplé à une synthèse d'ATP (dissipation par l'ATP synthase du potentiel électrochimique établi par la chaîne respiratoire).

D'après nos résultats, la tendance des cellules de *S. cerevisiae* de réorienter le flux de réoxydation du NADH cytosolique vers le métabolisme fermentaire, au détriment du métabolisme oxydatif est évidente. Après l'ajout du glucose, nous avons pu montrer une évolution inverse du flux du métabolisme fermentaire par rapport au flux du métabolisme oxydatif.

Cette évolution inverse entre le métabolisme fermentaire et oxydatif, est génétiquement programmée chez *S. cerevisiae*. La signalisation déclenchée par le glucose, induit une augmentation de l'expression de l'isoforme 1 de l'alcool déshydrogénase d'une part, et un arrêt/diminution de la biogenèse mitochondriale d'autre part. Ce dernier mécanisme est réalisé à travers la répression transcriptionnelle du gène *HAP4*, qui code pour la sous-unité régulatrice du complexe HAP (responsable de l'activation de l'expression des gènes du compartiment mitochondrial). Dans les conditions de prolifération rapide, nous avons montré que l'arrêt/diminution de la biogenèse mitochondriale induit avec les cycles de division la diminution de la quantité de l'équipement enzymatique mitochondrial des cellules par effet de dilution.

Le déclenchement du métabolisme fermentaire dans ces conditions de répression « volontaire » du métabolisme oxydatif, pourrait être un deuxième réarrangement métabolique, qui permet de compenser la diminution des capacités du système des OXPHOS dans la réoxydation du NADH cytosolique.

• En seconde étape nous avons testé la pertinence de notre hypothèse dans des conditions de maintien de la biogenèse mitochondriale, après l'ajout du glucose (surexpression ectopique de *HAP4*) et/ou de délétion du gène *HXK2*, codant pour l'hexokinase II. Ce dernier étant, à la fois facteur de transcription impliqué dans le processus de la répression par le glucose et à la fois enzyme de la glycolyse, exclusivement exprimée dans les conditions de forte concentration de glucose, nous avons pu mettre en évidence que la délétion de l'*HXK2* provoque un retard dans la cinétique d'augmentation du flux glycolytique par rapport à la souche sauvage. Ceci a été accompagné de maintien d'une capacité respiratoire plus élevée par rapport à la souche sauvage.

En effet, en utilisant les souches mutées (délétion de l'*HXK2* et/ou surexpression de *HAP4*), nous avons pu confirmer, l'existence d'une balance dynamique entre flux de la glycolyse et flux de la respiration endogène, d'une sorte que l'augmentation du flux respiratoire est accompagnée d'une diminution du flux glycolytique et vice-versa. Ceci, soutient fortement notre hypothèse qui suggère que dans les conditions de prolifération sur glucose, une balance dynamique est nécessaire entre la glycolyse et le système des oxydations phosphorylantes en termes du flux de synthèse d'ATP, afin de maintenir des conditions thermodynamiques favorables à la poursuite de la glycolyse.

### **Évolution constante entre flux glycolytique et flux du métabolisme fermentaire.**

D'autre part, l'étude de la cinétique d'induction de l'effet Warburg dans les souches mutées, nous a permis de mettre en évidence une évolution proportionnelle du flux du métabolisme fermentaire par rapport au flux de la glycolyse. Quel que soit le flux de cette dernière, toujours environ 50 % du flux glycolytique est orienté vers la fermentation. En effet, dans les cellules  $\Delta hap4hap4\uparrow$  et  $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , bien que la surexpression de *HAP4* a permis le maintien d'une capacité d'oxydation de NADH cytosolique par les OXPHOS plus importante, ceci ne semble pas permettre aux cellules de réduire le flux de la fermentation alcoolique de façon sélective, sans que cela aura une conséquence (diminution) sur le flux glycolytique. Ces résultats, soutiennent fortement l'hypothèse que le phénotype de l'effet Warburg est la traduction d'un mécanisme de régulation stricte du métabolisme énergétique.

Nos résultats montrent que dans les conditions de prolifération rapide, une balance dynamique existe entre les trois voies d'oxydation du glucose (glycolyse, OXPHOS et fermentation).

### **La répression du métabolisme oxydatif, plus qu'une simple régulation transcriptionnelle de *HAP4*.**

Malgré l'expression ectopique de *HAP4*, que ce soit chez la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$  ou  $\Delta hxc2hap4\uparrow$ , nous n'avons pas réussi à prévenir la répression du métabolisme oxydatif chez *S. cerevisiae*, après l'ajout de glucose. Notre étude de la cinétique d'évolution du flux respiratoire et la quantité du compartiment mitochondrial, dans les quatre souches utilisées, suggère une régulation plus complexe de la capacité respiratoire des cellules en présence du glucose, qu'une simple régulation transcriptionnelle du gène *HAP4*. Nos résultats suggèrent que cette régulation s'étale sur l'ensemble des niveaux de régulation des oxydations phosphorylantes (régulation de l'activité du complexe HAP, dégradation de Hap4p, maturation mitochondriale, niveau du couplage des OXPHOS).

Contrairement à ce qui est admis dans la littérature, nous avons pu montrer que la sous-unité Hap4p pourrait être exprimée dans des conditions de forte concentration de glucose (>30 mM). En effet, bien que l'ajout du glucose induit très rapidement une répression de la transcription de *HAP4*, nos résultats montrent que cette répression pourrait être levée même en présence d'une concentration importante du glucose. Il semblerait que cette expression de *HAP4* permet la réactivation de la biogenèse du compartiment mitochondrial. En effet, la mise en corrélation entre évolution de la concentration de cytochromes et vitesse de prolifération dans la souche sauvage, nous a permis de mettre en évidence une réduction du degré de dilution des mitochondries, dans la fin de la cinétique de prolifération sur glucose, par rapport au début.

À partir de ces résultats, nous avons formulé l'hypothèse que le maintien d'une capacité respiratoire minimale pourrait jouer un rôle pour maintenir l'homéostasie cellulaire dans nos conditions de culture.

Dans la souche sauvage, nous avons mis en évidence que l'activité du système des OXPHOS est largement augmentée en fin de cinétique, alors que les cellules diminuent «

volontairement » la quantité de l'équipement enzymatique mitochondrial, à travers la répression transcriptionnelle de *HAP4*. Or, il a été montré que l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire est associée à une diminution du rendement ATP/O et par conséquent, une diminution du rendement ATP produit / NADH oxydé ("gaspillage" de l'énergie redox). Ceci est dû en effet à l'augmentation de la perméabilité de la membrane interne mitochondriale aux protons due aux espaces temporaire laissés entre la bicouche lipidique et les complexes de la chaîne respiratoire, lors des changements séquentiels de conformation « leak actif ».

Nous avons donc formulé l'hypothèse que la mise en place d'un tel phénomène « leak actif » pourrait permettre aux cellules en prolifération rapide dans les conditions réduits, de découpler « partiellement » la synthèse d'ATP de l'oxydation du NADH. Ce phénomène prendra l'utilité avec l'accumulation de l'éthanol dans le milieu de culture, lorsque la réaction de conversion du pyruvate en éthanol par l'ADH-1 (réaction réversible) se rapproche de l'état d'équilibre.

D'après nos résultats, l'amplitude du phénomène du « leak actif » semble augmenter avec le maintien d'une quantité plus importante d'équipement enzymatique mitochondrial. Dans les cellules surexprimant *HAP4*, nous avons mis en évidence sur le long terme, une diminution plus importante du niveau de couplage entre la chaîne respiratoire et l'ATP synthase, par rapport à la souche sauvage.

En termes de rendement énergétique, le système des oxydations phosphorylantes n'est pas parfait, une partie de l'énergie potentielle du glucose est perdu (chaleur, fuite de protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale). Si pour la glycolyse, la stœchiométrie entre l'oxydation du substrat et la production de l'ATP est constante (1 glc : 2 ATP), cette dernière est variable pour les oxydations phosphorylantes. Elle est en effet, influencée par plusieurs facteurs (pH, température, composition lipidique de la membrane interne mitochondriale). La variation du couplage du système des OXPHOS et donc le rendement énergétique correspond à tout phénomène capable de moduler le rapport ATP/O, soit en modifiant la perméabilité de la membrane interne mitochondriale au proton (découplage extrinsèque), soit en modifiant la stœchiométrie du pompage de protons au niveau de la chaîne respiratoire ( $H^+/e^-$ ) ou l'ATP synthase  $H^+/ATP$  (décou-

plage intrinsèque). Nos résultats montrent que le maintien de l'équipement enzymatique mitochondrial corrèle avec une augmentation de cette perte en rendement cellulaire de conversion d'énergie.

En outre, dans la souche  $\Delta hap4hap4\uparrow$ , nous avons mis en évidence une diminution de l'équipement enzymatique mitochondrial rapidement après l'ajout de glucose, alors que la biogenèse mitochondriale, est sensée être maintenue, en raison de l'expression ectopique de *HAP4*. Ceci nous a conduits à soulever la question relative à l'activité du complexe HAP. Est-ce l'expression de *HAP4* est suffisante pour avoir une activité du complexe HAP? Ou, le glucose peut réprimer son activité, malgré la présence de sa sous-unité régulatrice Hap4p? Cependant, en raison du temps de génération très long (supérieur à 2h) de notre modèle d'étude, nous n'avons pas pu utiliser le système  $\beta$ -galactosidase pour étudier l'activité du complexe HAP.

Toutefois, la combinaison de la délétion de *HXK2*, avec la surexpression de *HAP4* semble supprimer cette diminution de mitochondries, après l'ajout de glucose. Les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , maintiennent plus de mitochondries par rapport à la souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ . Ceci corrèle avec une augmentation de la stabilité de la sous-unité Hap4p dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , par rapport à la souche  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ .

D'autre part, l'étude du turn-over de Hap4p dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , nous a permis de mettre en évidence un éventuel rôle du glucose dans la régulation de la stabilité de Hap4p, de sorte que la présence du glucose, diminue largement la stabilité de la sous-unité Hap4p. Ce mécanisme, qui ne pourrait pas être mis en évidence dans la souche sauvage en raison du turn-over rapide de Hap4p, pourrait être dû à l'induction ou une accélération médiée par le glucose du mécanisme de dégradation de Hap4p.

Par ailleurs, bien que les cellules  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  maintiennent une quantité plus importante d'équipement enzymatique mitochondrial, ceci n'a pas permis aux cellules de préserver en permanence le flux de la respiration endogène, après l'ajout de glucose. La mise en relation entre flux de la respiration ( $JO_2$ ) et quantité de cytochromes, nous a permis de mettre en évidence une modification de la relation  $JO_2$ /cytochromes, dans les souches surexprimant *HAP4*, d'une sorte que l'équipement enzymatique mitochondrial des cellules surexprimant *HAP4* est moins efficace que celui des cellules exprimant

seulement *HAP4* endogène. Nous avons donc formulé l'hypothèse qu'une partie de l'équipement enzymatique mitochondrial des cellules surexprimant *HAP4* est non fonctionnelle. En effet, des images de microscopie ont mis en évidence des différences morphologiques au niveau des mitochondries de ces cellules. Il serait donc probable qu'un défaut dans la maturation mitochondriale, pourrait être à l'origine de cette variation de la relation  $\text{JO}_2/\text{cytochromes}$ .

### **L'effet Crabtree est induit par les hexoses phosphates dérivés de la glycolyse [212].**

Dans le dernier chapitre, nous avons étudié l'effet immédiat de l'ajout du glucose sur le métabolisme énergétique de *S. cerevisiae*. Nous avons pu mettre en évidence que, l'inhibition immédiate du flux de la respiration observée après l'ajout de glucose (effet Crabtree) est étroitement liée à la fois à la concentration et la stœchiométrie de concentration cellulaire en G6P, et F1,6bP. Ces deux intermédiaires de la glycolyse ont la capacité « sur mitochondries isolées » de moduler l'activité de la chaîne respiratoire (G6P stimule, F1,6bP inhibe).

Très rapidement après l'ajout du glucose, nous avons mis en évidence une accumulation rapide du F1,6bP, alors qu'aucune modification au niveau de concentration du G6P n'a été constatée. Cette accumulation du F1,6bP influence en effet la stœchiométrie de concentration cellulaire entre le G6P et le F1,6bP. En utilisant les souches  $\Delta h x k 2$  et  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , nous avons pu montrer que l'accumulation seule du F1,6bP n'est pas suffisante pour induire un effet Crabtree chez *S. cerevisiae*. En effet, bien que le F1,6bP s'accumule dans les souches  $\Delta h x k 2$  et  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , très rapidement après l'ajout de glucose, aucun effet sur la respiration n'a été constaté. Or, en modulant le rapport de concentration cellulaire G6P/F1,6bP nous avons pu induire ou non un effet Crabtree dans ces deux souches. D'après nos résultats, l'induction de l'effet Crabtree chez *S. cerevisiae*, serait due à une diminution importante du rapport G6P/F1,6bP, suite à l'accumulation de F1,6bP.

## Perspective

L'issue de notre étude, nous amène à aborder dans le futur les questions suivantes :

### *Avantage(s) de la répression du métabolisme oxydatif dans les conditions de prolifération rapide :*

La mise en évidence d'une balance dynamique entre flux respiratoire et flux glycolytique n'implique pas nécessairement que la diminution du flux respiratoire dans ces conditions ait dans l'objectif de maintenir un flux dynamique de synthèse d'ATP entre la glycolyse et les OXPHOS, favorable à la poursuite de la glycolyse. En effet, dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , nous avons mis en évidence une diminution du flux glycolytique, alors que le statut énergétique des cellules est faible (rapport ATP/ADP faible).

D'autre part, contrairement, à la souche sauvage, où nous avons mis en évidence un découplage dans les conditions d'abondance d'ATP (rapport ATP/ADP élevé), nous avons montré dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  une mise en place rapide du découplage après l'ajout de glucose, alors que le rapport ATP/ADP était faible.

Ces résultats contrarient notre hypothèse formulée à partir de ceux de la souche sauvage, relative aux avantages de la répression du métabolisme oxydatif et le déclenchement du métabolisme fermentaire, lors de la prolifération rapide sur glucose.

Dans la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ , alors que les cellules possèdent un flux respiratoire plus élevée par rapport à la souche sauvage, nous avons mis en évidence une incapacité de ces cellules à augmenter leurs statut énergétique (rapport ATP/ADP élevé). Dans les souches mutées (principalement les souches délétées pour l'*HXK2*), des diminutions non homogènes au niveau des concentrations des nucléotides ATP et ADP ont été mises en évidence, après l'ajout de glucose. Si lors de la prolifération sur glucose, un défaut au niveau de la biogenèse des nucléotides d'adénine est provoqué par la délétion de l'*HXK2* et/ou surexpression de *HAP4*, un piégeage de l'ATP dans les biomolécules pourrait avoir une conséquence sur le rapport entre les nucléotides ATP, ADP, AMP.

Pour aller plus loin dans la réflexion, il est important de déterminer :



- l'origine de la diminution du flux glycolytique dans la souche  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  ;
- l'origine de l'incapacité des cellules  $\Delta hxk2hap4\uparrow$  à augmenter le statut énergétique, malgré la possession d'une capacité respiratoire importante.

Nous proposons donc de compléter cette étude par les manipulations suivantes :

- ☛ Étude du profil d'expression des transporteurs du glucose HXT dans les quatre souches (sauvage,  $\Delta hxk2$ ,  $\Delta hap4hap4\uparrow$ ,  $\Delta hxk2hap4\uparrow$ ), après l'ajout du glucose.
- ☛ Détermination de l'évolution de la concentration des nucléotides, principalement l'ATP, ADP, AMP, après l'ajout de glucose ;
- ☛ Détermination de l'évolution du potentiel redox cellulaire, après l'ajout de glucose. Ceci étant un paramètre important pour déterminer l'environnement redox dans lequel les enzymes de la glycolyse et les complexes de la chaîne respiratoire évoluent.
- ☛ Comparaison de la capacité globale de réoxydation du NADH cytosolique des quatre souches utilisées, par la quantification du glycérol dans le milieu de culture ;
- ☛ Étude de l'évolution du potentiel membranaire mitochondrial dans la souche  $\Delta hxk2hap4\uparrow$ , après l'ajout de glucose. En effet, en mesurant l'évolution du potentiel de la membrane interne mitochondriale dans cette souche, nous serons en mesure de déterminer l'origine de la diminution du flux respiratoire dans cette souche (chaîne respiratoire non fonctionnelle?). Toutefois, en raison de la présence d'une paroi cellulaire entourant la membrane plasmique chez la levure (difficulté de perméabilisation), cette étude sera compliquée à réaliser, avec les techniques actuelles que nous disposons pour mesurer le potentiel de membrane mitochondrial sur cellules entières (cytométrie en flux).

***Le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans le changement de la relation flux de respiration et quantité de cytochromes dans les cellules surexprimant HAP4 :***

Un point de départ dans cette étude serait la détermination si toutes les mitochondries sont capables d'assurer leurs fonctions de transfert d'électrons. Ceci pourrait peut être mis en évidence en étudiant le potentiel de membrane dans des mitochondries isolées obtenues à partir des cellules qui surexpriment *HAP4*.

***Rôle de l'hexokinase II dans la régulation de l'activité du complexe HAP et/ou la dégradation de la sous-unité Hap4p :***

La compréhension de l'origine de l'évolution différentielle de quantité de l'équipement enzymatique mitochondrial entre la souche  $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$  et  $\Delta h a p 4 h a p 4 \uparrow$ , implique une étude comparative approfondie de l'activité du complexe HAP. Ainsi, il serait intéressant de chercher le rôle de l'hexokinase II dans la modulation du turn-over Hap4p. Un point de départ, dans cette démarche, serait de vérifier si l'hexokinase II pourrait interagir avec la sous-unité Hap4p.



## Bibliographie

- [1] Deifilia Ahuatzí, Pilar Herrero, Tamara de la Cera, and Fernando Moreno. The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is mig1-dependent. *The Journal of biological chemistry*, 279 :14440–14446, April 2004.
- [2] S Aiston, K Y Trinh, A J Lange, C B Newgard, and L Agius. Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. evidence against feedback inhibition of glucokinase. *The Journal of biological chemistry*, 274 :24559–24566, August 1999.
- [3] M Fernanda Amary, Krisztian Bacsi, Francesca Maggiani, Stephen Damato, Dina Halai, Fitim Berisha, Robin Pollock, Paul O'Donnell, Anita Grigoriadis, Tim Diss, Malihe Eskandarpour, Nadège Presneau, Pancras Cw Hogendoorn, Andrew Futreal, Roberto Tirabosco, and Adrienne M Flanagan. Idh1 and idh2 mutations are frequent events in central chondrosarcoma and central and periosteal chondromas but not in other mesenchymal tumours. *The Journal of pathology*, 224 :334–343, July 2011.
- [4] Dimitrios Anastasiou, George Pouligiannis, John M Asara, Matthew B Boxer, Jian-kang Jiang, Min Shen, Gary Bellinger, Atsuo T Sasaki, Jason W Locasale, Douglas S Auld, Craig J Thomas, Matthew G Vander Heiden, and Lewis C Cantley. Inhibition of pyruvate kinase m2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science (New York, N.Y.)*, 334 :1278–1283, December 2011.
- [5] Dimitrios Anastasiou, Yimin Yu, William J Israelsen, Jian-Kang Jiang, Matthew B Boxer, Bum Soo Hong, Wolfram Tempel, Svetoslav Dimov, Min Shen, Abhishek Jha, Hua Yang, Katherine R Mattaini, Christian M Metallo, Brian P Fiske, Kevin D

- Courtney, Scott Malstrom, Tahsin M Khan, Charles Kung, Amanda P Skoumbourdis, Henrike Veith, Noel Southall, Martin J Walsh, Kyle R Brimacombe, William Leister, Sophia Y Lunt, Zachary R Johnson, Katharine E Yen, Kaiko Kunii, Shawn M Davidson, Heather R Christofk, Christopher P Austin, James Inglese, Marian H Harris, John M Asara, Gregory Stephanopoulos, Francesco G Salituro, Shengfang Jin, Lenny Dang, Douglas S Auld, Hee-Won Park, Lewis C Cantley, Craig J Thomas, and Matthew G Vander Heiden. Pyruvate kinase m2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis. *Nature chemical biology*, 8 :839–847, October 2012.
- [6] R P Andrade and M Casal. Expression of the lactate permease gene *jen1* from the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Fungal genetics and biology : FG & B*, 32 :105–111, March 2001.
- [7] R P Andrade, P Kötter, K-D Entian, and M Casal. Multiple transcripts regulate glucose-triggered mrna decay of the lactate transporter *jen1* from *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 332 :254–262, June 2005.
- [8] N Avéret, H Aguilaniu, O Bunoust, L Gustafsson, and M Rigoulet. Ndh is specifically channeled through the mitochondrial porin channel in *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 34 :499–506, December 2002.
- [9] N Avéret, V Fitton, O Bunoust, M Rigoulet, and B Guérin. Yeast mitochondrial metabolism : from in vitro to in situ quantitative study. *Molecular and cellular biochemistry*, 184 :67–79, July 1998.
- [10] B S Baliga, A W Pronczuk, and H N Munro. Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. *The Journal of biological chemistry*, 244 :4480–4489, August 1969.
- [11] Joao T Barata, Ana Silva, Joana G Brandao, Lee M Nadler, Angelo A Cardoso, and Vassiliki A Boussiotis. Activation of pi3k is indispensable for interleukin 7-mediated viability, proliferation, glucose use, and growth of t cell acute lymphoblastic leukemia cells. *The Journal of experimental medicine*, 200 :659–669, September 2004.

- [12] M V Barone and S A Courtneidge. Myc but not fos rescue of pdgf signalling block caused by kinase-inactive src. *Nature*, 378 :509–512, November 1995.
- [13] U Baumgartner, B Hamilton, M Piskacek, H Ruis, and H Rottensteiner. Functional analysis of the zn(2)cys(6) transcription factors oaf1p and pip2p. different roles in fatty acid induction of beta-oxidation in *saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 274 :22208–22216, August 1999.
- [14] B E Baysal, J E Willett-Brozick, E C Lawrence, C M Drovdic, S A Savul, D R McLeod, H A Yee, D E Brackmann, W H Slattery, E N Myers, R E Ferrell, and W S Rubinstein. Prevalence of sdhb, sdhc, and sdhd germline mutations in clinic patients with head and neck paragangliomas. *Journal of medical genetics*, 39 :178–183, March 2002.
- [15] Bora E Baysal. A recurrent stop-codon mutation in succinate dehydrogenase subunit b gene in normal peripheral blood and childhood t-cell acute leukemia. *PloS one*, 2 :e436, May 2007. Original DateCompleted : 20070727.
- [16] Kavita P Bhat and Susanna F Greer. Proteolytic and non-proteolytic roles of ubiquitin and the ubiquitin proteasome system in transcriptional regulation. *Biochimica et biophysica acta*, 1809 :150–155, February 2011.
- [17] H C Birnboim and J Doly. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid dna. *Nucleic acids research*, 7 :1513–1523, November 1979.
- [18] L F Bisson, D M Coons, A L Kruckeberg, and D A Lewis. Yeast sugar transporters. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, 28 :259–308, 1993.
- [19] T K Blackwell, L Kretzner, E M Blackwood, R N Eisenman, and H Weintraub. Sequence-specific dna binding by the c-myc protein. *Science (New York, N.Y.)*, 250 :1149–1151, November 1990.
- [20] J Blom, M J De Mattos, and L A Grivell. Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor hap4p. *Applied and environmental microbiology*, 66 :1970–1973, May 2000.
- [21] Katharina Bluemlein, Matthias Glückmann, Nana-Maria Grüning, René Feichtinger, Antje Krüger, Mirjam Wamelink, Hans Lehrach, Stephen Tate, Daniel Neureiter,

- Barbara Kofler, and Markus Ralser. Pyruvate kinase is a dosage-dependent regulator of cellular amino acid homeostasis. *Oncotarget*, 3 :1356–1369, November 2012.
- [22] L Bodnar, R Stec, S Cierniak, A Synowiec, G Wcisto, M Jesiotr, R Koktysz, W Koztowski, and C Szczylik. Clinical usefulness of pi3k/akt/mtor genotyping in companion with other clinical variables in metastatic renal cell carcinoma patients treated with everolimus in the second and subsequent lines. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 26 :1385–1389, July 2015.
- [23] E Boles, H W Göhlmann, and F K Zimmermann. Cloning of a second gene encoding 5-phosphofructo-2-kinase in yeast, and characterization of mutant strains without fructose-2,6-bisphosphate. *Molecular microbiology*, 20 :65–76, April 1996.
- [24] E Boles and C P Hollenberg. The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS microbiology reviews*, 21 :85–111, August 1997.
- [25] Ingrid Bourges, Marie-Helene Mucchielli, Christopher J Herbert, Bernard Guiard, Geneviève Dujardin, and Brigitte Meunier. Multiple defects in the respiratory chain lead to the repression of genes encoding components of the respiratory chain and tca cycle enzymes. *Journal of molecular biology*, 387 :1081–1091, April 2009.
- [26] J S Boyle and A M Lew. An inexpensive alternative to glassmilk for dna purification. *Trends in genetics : TIG*, 11 :8, January 1995.
- [27] M Christiane Brahim-Horn, Johanna Chiche, and Jacques Pouysségur. Hypoxia signalling controls metabolic demand. *Current opinion in cell biology*, 19 :223–229, April 2007.
- [28] K Brand. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. pathways of glutamine and glutamate metabolism. *The Biochemical journal*, 228 :353–361, June 1985.
- [29] Daniel K Bricker, Eric B Taylor, John C Schell, Thomas Orsak, Audrey Boutron, Yu-Chan Chen, James E Cox, Caleb M Cardon, Jonathan G Van Vranken, Noah Dephoure, Claire Redin, Sihem Boudina, Steven P Gygi, Michèle Brivet, Carl S Thummel, and Jared Rutter. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate

- uptake in yeast, drosophila, and humans. *Science (New York, N.Y.)*, 337 :96–100, July 2012.
- [30] Janyne F Brons, Marian De Jong, Michèle Valens, Leslie A Grivell, Monique Bolotin-Fukuhara, and Jolanda Blom. Dissection of the promoter of the hap4 gene in *s. cerevisiae* unveils a complex regulatory framework of transcriptional regulation. *Yeast (Chichester, England)*, 19 :923–932, August Brons.
- [31] Joslyn K Brunelle, Eric L Bell, Nancy M Quesada, Kristel Vercauteren, Valeria Tiranti, Massimo Zeviani, Richard C Scarpulla, and Navdeep S Chandel. Oxygen sensing requires mitochondrial ros but not oxidative phosphorylation. *Cell metabolism*, 1 :409–414, June 2005.
- [32] Odile Bunoust, Anne Devin, Nicole Avéret, Nadine Camougrand, and Michel Rigoulet. Competition of electrons to enter the respiratory chain : a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 280 :3407–3413, February 2005.
- [33] C F Burant, J Takeda, E Brot-Laroche, G I Bell, and N O Davidson. Fructose transporter in human spermatozoa and small intestine is glut5. *The Journal of biological chemistry*, 267 :14523–14526, July 1992.
- [34] S Buschlen, J-M Amillet, B Guiard, A Fournier, C Marcireau, and M Bolotin-Fukuhara. The *s. cerevisiae* hap complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comparative and functional genomics*, 4 :37–46, 2003.
- [35] K. Cain and D. E Griffiths. Studies of energy-linked reactions. localization of the site of action of trialkyltin in yeast mitochondria. *Biochem. J.*, 162(3) :575–580, mar 1977.
- [36] Griffiths DE Cain K, Partis MD. Dibutylchloromethyltin chloride, a covalent inhibitor of the adenosine triphosphate synthase complex. *Biochem. J.*, 166(3) :593–602, sep 1977.
- [37] Rob A Cairns, Isaac S Harris, and Tak W Mak. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer*, 11 :85–95, February 2011.
- [38] Jason R Cantor and David M Sabatini. Cancer cell metabolism : one hallmark, many faces. *Cancer discovery*, 2 :881–898, October 2012.



- [39] M Carlson. Regulation of glucose utilization in yeast. *Current opinion in genetics & development*, 8 :560–564, October 1998.
- [40] M Carlson. Glucose repression in yeast. *Current opinion in microbiology*, 2 :202–207, April 1999.
- [41] M Casal, S Paiva, R P Andrade, C Gancedo, and C Leão. The lactate-proton symport of *saccharomyces cerevisiae* is encoded by *jen1*. *Journal of bacteriology*, 181 :2620–2623, April 1999.
- [42] BRITTON CHANCE. Spectra and reaction kinetics of respiratory pigments of homogenized and intact cells. *Nature*, 169(4293) :215–221, feb 1952.
- [43] Britton Chance and G. R. Williams. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation : Ii. difference spectra. *Journal of Biological Chemistry*, 217(1) :395–408, 1955.
- [44] Barbara Chaneton, Petra Hillmann, Liang Zheng, Agnès C L Martin, Oliver D K Maddocks, Achuthanunni Chokkathukalam, Joseph E Coyle, Andris Jankevics, Finn P Holding, Karen H Vousden, Christian Frezza, Marc O'Reilly, and Eyal Gottlieb. Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase m2. *Nature*, 491 :458–462, November 2012.
- [45] Xiaozhuo Chen, Yanrong Qian, and Shiyong Wu. The warburg effect : evolving interpretations of an established concept. *Free radical biology & medicine*, 79 :253–263, February 2015.
- [46] C. Chevtzoff, E. D. Yoboue, A. Galinier, L. Casteilla, B. Daignan-Fornier, M. Rigoulet, and A. Devin. Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(3) :1733–1742, nov 2010.
- [47] Stefan Christen and Uwe Sauer. Intracellular characterization of aerobic glucose metabolism in seven yeast species by <sup>13</sup>C flux analysis and metabolomics. *FEMS yeast research*, 11 :263–272, May 2011.
- [48] Heather R Christofk, Matthew G Vander Heiden, Marian H Harris, Arvind Ramanathan, Robert E Gerszten, Ru Wei, Mark D Fleming, Stuart L Schreiber, and Lewis C Cantley. The m2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature*, 452 :230–233, March 2008.

- [49] Paul G Corn, M Stacey Ricci, Kimberly A Scata, Andrew M Arsham, M Celeste Simon, David T Dicker, and Wafik S El-Deiry. Mxi1 is induced by hypoxia in a hif-1-dependent manner and protects cells from c-myc-induced apoptosis. *Cancer biology & therapy*, 4 :1285–1294, November 2005.
- [50] Marta Cortés-Cros, Christelle Hemmerlin, Stephane Ferretti, Juan Zhang, John S Gounarides, Hong Yin, Alban Muller, Anne Haberkorn, Patrick Chene, William R Sellers, and Francesco Hofmann. M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 :489–494, January 2013.
- [51] A S H Costa and C Frezza. Metabolic reprogramming and oncogenesis : One hallmark, many organelles. *International review of cell and molecular biology*, 332 :213–231, 2017.
- [52] Vitor Costa, Alexandre Quintanilha, and Pedro Moradas-Ferreira. Protein oxidation, repair mechanisms and proteolysis in *saccharomyces cerevisiae*. *IUBMB life*, 59 :293–298, 2007.
- [53] H G Crabtree. The carbohydrate metabolism of certain pathological overgrowths. *The Biochemical journal*, 22 :1289–1298, 1928.
- [54] H G Crabtree. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *The Biochemical journal*, 23 :536–545, 1929.
- [55] A M CRESTFIELD, K C SMITH, and F W ALLEN. The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast. *The Journal of biological chemistry*, 216 :185–193, September 1955.
- [56] Garth R Cronwright, Johann M Rohwer, and Bernard A Prior. Metabolic control analysis of glycerol synthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 68 :4448–4456, September 2002.
- [57] Pierre Crozet, Leonor Margalha, Ana Confraria, Américo Rodrigues, Cláudia Martinho, Mattia Adamo, Carlos A Elias, and Elena Baena-González. Mechanisms of regulation of snf1/ampk/snrk1 protein kinases. *Frontiers in plant science*, 5 :190, 2014.
- [58] C V Dang and G L Semenza. Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences*, 24 :68–72, February 1999.

- [59] Chi V Dang, Anne Le, and Ping Gao. Myc-induced cancer cell energy metabolism and therapeutic opportunities. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15 :6479–6483, November 2009.
- [60] Lenny Dang, David W White, Stefan Gross, Bryson D Bennett, Mark A Bittinger, Edward M Driggers, Valeria R Fantin, Hyun Gyung Jang, Shengfang Jin, Marie C Keenan, Kevin M Marks, Robert M Prins, Patrick S Ward, Katharine E Yen, Linda M Liao, Joshua D Rabinowitz, Lewis C Cantley, Craig B Thompson, Matthew G Vander Heiden, and Shinsan M Su. Cancer-associated *idh1* mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462 :739–744, December 2009.
- [61] V D Dang, M Valens, M Bolotin-Fukuhara, and B Daignan-Fornier. A genetic screen to isolate genes regulated by the yeast *ccaat*-box binding protein *hap2p*. *Yeast (Chichester, England)*, 10 :1273–1283, October 1994.
- [62] Rodrigo Díaz-Ruiz, Nicole Avéret, Daniela Araiza, Benoît Pinson, Salvador Uribe-Carvajal, Anne Devin, and Michel Rigoulet. Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. a possible role in crabtree effect induction? *The Journal of biological chemistry*, 283 :26948–26955, October 2008.
- [63] R H De Deken. The crabtree effect : a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology*, 44 :149–156, August 1966.
- [64] M J De Vit, J A Waddle, and M Johnston. Regulated nuclear translocation of the *mig1* glucose repressor. *Molecular biology of the cell*, 8 :1603–1618, August 1997.
- [65] J H de Winde and L A Grivell. Global regulation of mitochondrial biogenesis in *saccharomyces cerevisiae*. *Progress in nucleic acid research and molecular biology*, 46 :51–91, 1993.
- [66] J H De Winde and L A Grivell. Regulation of mitochondrial biogenesis in *saccharomyces cerevisiae*. intricate interplay between general and specific transcription factors in the promoter of the *qcr8* gene. *European journal of biochemistry*, 233 :200–208, October 1995.
- [67] Ralph J DeBerardinis, Julian J Lum, Georgia Hatzivassiliou, and Craig B Thompson. The biology of cancer : metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell metabolism*, 7 :11–20, January 2008.

- [68] J L DeRisi, V R Iyer, and P O Brown. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science (New York, N.Y.)*, 278 :680–686, October 1997.
- [69] Anne Devin, Laurent Dejean, Bertrand Beauvoit, Cyrille Chevtzoff, Nicole Avéret, Odile Bunoust, and Michel Rigoulet. Growth yield homeostasis in respiring yeast is due to a strict mitochondrial content adjustment. *The Journal of biological chemistry*, 281 :26779–26784, September 2006.
- [70] R Diaz-Ruiz, S Uribe-Carvajal, A Devin, and M Rigoulet. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1796 :252–265, December 2009.
- [71] Rodrigo Diaz-Ruiz, Michel Rigoulet, and Anne Devin. The warburg and crabtree effects : On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochimica et biophysica acta*, 1807 :568–576, June 2011.
- [72] J A Diderich, L M Raamsdonk, A L Kruckeberg, J A Berden, and K Van Dam. Physiological properties of *saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase ii has been deleted. *Applied and environmental microbiology*, 67 :1587–1593, April 2001.
- [73] J A Diderich, M Schepper, P van Hoek, M A Luttik, J P van Dijken, J T Pronk, P Klaassen, H F Boelens, M J de Mattos, K van Dam, and A L Kruckeberg. Glucose uptake kinetics and transcription of hxt genes in chemostat cultures of *saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 274 :15350–15359, May 1999.
- [74] J A Diderich, J M Schuurmans, M C Van Gaalen, A L Kruckeberg, and K Van Dam. Functional analysis of the hexose transporter homologue hxt5 in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 18 :1515–1524, December 2001.
- [75] Veronique Douard and Ronaldo P Ferraris. Regulation of the fructose transporter glut5 in health and disease. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 295 :E227–E237, August 2008.
- [76] R Egner, Y Mahé, R Pandjaitan, and K Kuchler. Endocytosis and vacuolar degradation of the plasma membrane-localized pdr5 atp-binding cassette multidrug

- transporter in *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 15 :5879–5887, November 1995.
- [77] Martin Eilers and Robert N Eisenman. Myc's broad reach. *Genes & development*, 22 :2755–2766, October 2008.
- [78] Karin Elbing, Christer Larsson, Roslyn M Bill, Eva Albers, Jacky L Snoep, Eckhard Boles, Stefan Hohmann, and Lena Gustafsson. Role of hexose transport in control of glycolytic flux in *saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 70 :5323–5330, September 2004.
- [79] K D Entian. Genetic and biochemical evidence for hexokinase *pii* as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. *Molecular & general genetics : MGG*, 178 :633–637, 1980.
- [80] K D Entian, K U Fröhlich, and D Mecke. Regulation of enzymes and isoenzymes of carbohydrate metabolism in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 799 :181–186, June 1984.
- [81] M Erecińska and D F Wilson. Regulation of cellular energy metabolism. *The Journal of membrane biology*, 70 :1–14, 1982.
- [82] Jennifer C Ewald, Andreas Kuehne, Nicola Zamboni, and Jan M Skotheim. The yeast cyclin-dependent kinase routes carbon fluxes to fuel cell cycle progression. *Molecular cell*, 62 :532–545, May 2016.
- [83] Valeria R Fantin, Julie St-Pierre, and Philip Leder. Attenuation of *ldh-a* expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer cell*, 9 :425–434, June 2006.
- [84] A Fiechter, G F Fuhrmann, and O Käppli. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *Advances in microbial physiology*, 22 :123–183, 1981.
- [85] Maria E Figueroa, Omar Abdel-Wahab, Chao Lu, Patrick S Ward, Jay Patel, Alan Shih, Yushan Li, Neha Bhagwat, Aparna Vasanthakumar, Hugo F Fernandez, Martin S Tallman, Zhuoxin Sun, Kristy Wolniak, Justine K Peeters, Wei Liu, Sung E Choe, Valeria R Fantin, Elisabeth Paietta, Bob Löwenberg, Jonathan D Licht, Lucy A Godley, Ruud Delwel, Peter J M Valk, Craig B Thompson, Ross L Levine, and Ari Melnick. Leukemic *idh1* and *idh2* mutations result in a hypermethylation

- phenotype, disrupt tet2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer cell*, 18 :553–567, December 2010.
- [86] Daniel Finley. Recognition and processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annual review of biochemistry*, 78 :477–513, 2009.
- [87] Sébastien L Floor, Jacques E Dumont, Carine Maenhaut, and Eric Raspe. Hallmarks of cancer : of all cancer cells, all the time ? *Trends in molecular medicine*, 18 :509–515, September 2012.
- [88] E M Fontaine, A Devin, M Rigoulet, and X M Leverve. The yield of oxidative phosphorylation is controlled both by force and flux. *Biochemical and biophysical research communications*, 232 :532–535, March 1997.
- [89] S L Forsburg and L Guarente. Identification and characterization of hap4 : a third component of the ccaat-bound hap2/hap3 heteromer. *Genes & development*, 3 :1166–1178, August 1989.
- [90] Thomas F Franke, Christoph P Hornik, Lisa Segev, Grigoriy A Shostak, and Chizuru Sugimoto. Pi3k/akt and apoptosis : size matters. *Oncogene*, 22 :8983–8998, December 2003.
- [91] Pauline Gaignard, Minal Menezes, Manuel Schiff, Aurélien Bayot, Malgorzata Rak, Hélène Ogier de Baulny, Chen-Hsien Su, Mylene Gilleron, Anne Lombes, Heni Abida, Alexander Tzagoloff, Lisa Riley, Sandra T Cooper, Kym Mina, Padma Sivadorai, Mark R Davis, Richard J N Allcock, Nina Kresoje, Nigel G Laing, David R Thorburn, Abdelhamid Slama, John Christodoulou, and Pierre Rustin. Mutations in cyc1, encoding cytochrome c1 subunit of respiratory chain complex iii, cause insulin-responsive hyperglycemia. *American journal of human genetics*, 93 :384–389, August 2013.
- [92] J M Gancedo. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 62 :334–361, June 1998.
- [93] J M Gancedo, D Clifton, and D G Fraenkel. Yeast hexokinase mutants. *The Journal of biological chemistry*, 252 :4443–4444, July 1977.
- [94] A P Gasch, P T Spellman, C M Kao, O Carmel-Harel, M B Eisen, G Storz, D Botstein, and P O Brown. Genomic expression programs in the response of yeast cells to

- environmental changes. *Molecular biology of the cell*, 11 :4241–4257, December 2000.
- [95] Robert A Gatenby and Robert J Gillies. Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nature reviews. Cancer*, 4 :891–899, November 2004.
- [96] Géraldine Gentric, Virginie Mieulet, and Fatima Mechta-Grigoriou. Heterogeneity in cancer metabolism : New concepts in an old field. *Antioxidants & redox signaling*, 26 :462–485, March 2017.
- [97] John D Gordan, Jessica A Bertout, Cheng-Jun Hu, J Alan Diehl, and M Celeste Simon. Hif-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer cell*, 11 :335–347, April 2007.
- [98] John D Gordan and M Celeste Simon. Hypoxia-inducible factors : central regulators of the tumor phenotype. *Current opinion in genetics & development*, 17 :71–77, February 2007.
- [99] John D Gordan, Craig B Thompson, and M Celeste Simon. Hif and c-myc : sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer cell*, 12 :108–113, August 2007.
- [100] A G GORNALL, C J BARDAWILL, and M M DAVID. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *The Journal of biological chemistry*, 177 :751–766, February 1949.
- [101] G Gstraunthaler, T Seppi, and W Pfaller. Impact of culture conditions, culture media volumes, and glucose content on metabolic properties of renal epithelial cell cultures. are renal cells in tissue culture hypoxic? *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 9 :150–172, 1999.
- [102] David A Guertin and David M Sabatini. Defining the role of mtor in cancer. *Cancer cell*, 12 :9–22, July 2007.
- [103] Jorge J. Gumucio and Jonathan D. Kaunitz. Localizing glucose transport proteins : Active investigation of passive carriers. *Hepatology*, 13(4) :800–802, 1991.
- [104] M Guppy, E Greiner, and K Brand. The role of the crabtree effect and an endogenous fuel in the energy metabolism of resting and proliferating thymocytes. *European journal of biochemistry*, 212 :95–99, February 1993.

- [105] A P Halestrap. Pyruvate and ketone-body transport across the mitochondrial membrane. exchange properties, pH-dependence and mechanism of the carrier. *The Biochemical journal*, 172 :377–387, June 1978.
- [106] Nouredine Hammad, Monica Rosas-Lemus, Salvador Uribe-Carvajal, Michel Rigoulet, and Anne Devin. The crabtree and warburg effects : Do metabolite-induced regulations participate in their induction? *Biochimica et biophysica acta*, 1857 :1139–1146, August 2016.
- [107] D Hanahan and R A Weinberg. The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 :57–70, January 2000.
- [108] John Hanna and Daniel Finley. A proteasome for all occasions. *FEBS letters*, 581 :2854–2861, June 2007.
- [109] Kristina Hedbacker and Marian Carlson. Snf1/ampk pathways in yeast. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, 13 :2408–2420, January 2008.
- [110] C J Hedeskov. Early effects of phytohaemagglutinin on glucose metabolism of normal human lymphocytes. *The Biochemical journal*, 110 :373–380, November 1968.
- [111] J Heinisch, K Vogelsang, and C P Hollenberg. Transcriptional control of yeast phosphofructokinase gene expression. *FEBS letters*, 289 :77–82, September 1991.
- [112] P Herrero, J Galíndez, N Ruiz, C Martínez-Campa, and F Moreno. Transcriptional regulation of the *saccharomyces cerevisiae* *hvk1*, *hvk2* and *glk1* genes. *Yeast (Chichester, England)*, 11 :137–144, February 1995.
- [113] P. G. Heytler. Uncoupling of oxidative phosphorylation by carbonyl cyanide phenylhydrazones. i. some characteristics of m-ci-ccp action on mitochondria and chloroplasts. *Biochemistry*, 2 (2) :357–361, 1963.
- [114] M Hirai, A Tanaka, and S Fukui. Difference in pyruvate kinase regulation among three groups of yeasts. *Biochimica et biophysica acta*, 391 :282–291, June 1975.
- [115] Johannes Hirrlinger and Ralf Dringen. The cytosolic redox state of astrocytes : Maintenance, regulation and functional implications for metabolite trafficking. *Brain research reviews*, 63 :177–188, May 2010.



- [116] Taro Hitosugi, Sumin Kang, Matthew G Vander Heiden, Tae-Wook Chung, Shannon Elf, Katherine Lythgoe, Shaozhong Dong, Sagar Lonial, Xu Wang, Georgia Z Chen, Jianxin Xie, Ting-Lei Gu, Roberto D Polakiewicz, Johannes L Roesel, Titus J Boggon, Fadlo R Khuri, D Gary Gilliland, Lewis C Cantley, Jonathan Kaufman, and Jing Chen. Tyrosine phosphorylation inhibits pkm2 to promote the warburg effect and tumor growth. *Science signaling*, 2 :ra73, November 2009.
- [117] Seung-Pyo Hong, Fiona C Leiper, Angela Woods, David Carling, and Marian Carlson. Activation of yeast snf1 and mammalian amp-activated protein kinase by upstream kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 :8839–8843, July 2003.
- [118] L E Huang, Z Arany, D M Livingston, and H F Bunn. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry*, 271 :32253–32259, December 1996.
- [119] Jennifer S Isaacs, Yun Jin Jung, David R Mole, Sunmin Lee, Carlos Torres-Cabala, Yuen-Li Chung, Maria Merino, Jane Trepel, Berton Zbar, Jorge Toro, Peter J Ratcliffe, W Marston Linehan, and Len Neckers. Hif overexpression correlates with biallelic loss of fumarate hydratase in renal cancer : novel role of fumarate in regulation of hif stability. *Cancer cell*, 8 :143–153, August 2005.
- [120] Stephan W Jahn, Karl Kashofer, Andrea Thüringer, Luca Abete, Elke Winter, Sylvia Eidenhammer, Christian Viertler, Fattaneh Tavassoli, and Farid Moinfar. Mutation profiling of usual ductal hyperplasia of the breast reveals activating mutations predominantly at different levels of the pi3k/akt/mtor pathway. *The American journal of pathology*, 186 :15–23, January 2016.
- [121] M Johnston. Feasting, fasting and fermenting. glucose sensing in yeast and other cells. *Trends in genetics : TIG*, 15 :29–33, January 1999.
- [122] Caroline Jose, Nadège Bellance, and Rodrigue Rossignol. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation : a tumor's dilemma? *Biochimica et biophysica acta*, 1807 :552–561, June 2011.

- [123] M S Jurica, A Mesecar, P J Heath, W Shi, T Nowak, and B L Stoddard. The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate. *Structure (London, England : 1993)*, 6 :195–210, February 1998.
- [124] Aneta Kaniak, Zhixiong Xue, Daniel Macool, Jeong-Ho Kim, and Mark Johnston. Regulatory network connecting two glucose signal transduction pathways in *saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 3 :221–231, February 2004.
- [125] Hiren Karathia, Ester Vilaprinyo, Albert Sorribas, and Rui Alves. *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism : a comparative study. *PloS one*, 6 :e16015, February 2011.
- [126] Kaisa Karhumaa, Boqian Wu, and Morten C Kielland-Brandt. Conditions with high intracellular glucose inhibit sensing through glucose sensor *snf3* in *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of cellular biochemistry*, 110 :920–925, July 2010.
- [127] G J Kato, J Barrett, M Villa-Garcia, and C V Dang. An amino-terminal c-myc domain required for neoplastic transformation activates transcription. *Molecular and cellular biology*, 10 :5914–5920, November 1990.
- [128] Ömur Kayikci and Jens Nielsen. Glucose repression in *saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 15, September 2015.
- [129] Michael A Kiebish, Xianlin Han, Hua Cheng, and Thomas N Seyfried. In vitro growth environment produces lipidomic and electron transport chain abnormalities in mitochondria from non-tumorigenic astrocytes and brain tumours. *ASN neuro*, 1, May 2009.
- [130] Jung-whan Kim, Ping Gao, Yen-Chun Liu, Gregg L Semenza, and Chi V Dang. Hypoxia-inducible factor 1 and dysregulated c-myc cooperatively induce vascular endothelial growth factor and metabolic switches hexokinase 2 and pyruvate dehydrogenase kinase 1. *Molecular and cellular biology*, 27 :7381–7393, November 2007.
- [131] Jung-whan Kim, Irina Tchernyshyov, Gregg L Semenza, and Chi V Dang. Hif-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase : a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell metabolism*, 3 :177–185, March 2006.

- [132] A King, M A Selak, and E Gottlieb. Succinate dehydrogenase and fumarate hydratase : linking mitochondrial dysfunction and cancer. *Oncogene*, 25 :4675–4682, August 2006.
- [133] C J Klein, J J Rasmussen, B Rønnow, L Olsson, and J Nielsen. Investigation of the impact of mig1 and mig2 on the physiology of *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 68 :197–212, February 1999.
- [134] M KLINGENBERG. [on the reversibility of oxidative phosphorylation. iv. relation between the redox state of cytochrome c and the phosphorylation potential of adenosine triphosphate]. *Biochemische Zeitschrift*, 335 :263–272, 1961.
- [135] Christine Klockow, Frank Stahl, Thomas Scheper, and Bernd Hitzmann. In vivo regulation of glucose transporter genes at glucose concentrations between 0 and 500 mg/l in a wild type of *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biotechnology*, 135 :161–167, June 2008.
- [136] D H Koobs. Phosphate mediation of the crabtree and pasteur effects. *Science (New York, N.Y.)*, 178 :127–133, October 1972.
- [137] Minori Koshiji and L Eric Huang. Dynamic balancing of the dual nature of hif-1alpha for cell survival. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 3 :853–854, July 2004.
- [138] Sho Koyasu, Minoru Kobayashi, Yoko Goto, Masahiro Hiraoka, and Hiroshi Harada. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity : Two decades of knowledge. *Cancer science*, 109 :560–571, March 2018.
- [139] A L Kruckeberg. The hexose transporter family of *saccharomyces cerevisiae*. *Archives of microbiology*, 166 :283–292, November 1996.
- [140] Charles Kung, Jeff Hixon, Sung Choe, Kevin Marks, Stefan Gross, Erin Murphy, Byron DeLaBarre, Giovanni Cianchetta, Shalini Sethumadhavan, Xiling Wang, Shunqi Yan, Yi Gao, Cheng Fang, Wentao Wei, Fan Jiang, Shaohui Wang, Kevin Qian, Jeff Saunders, Ed Driggers, Hin Koon Woo, Kaiko Kunii, Stuart Murray, Hua Yang, Katharine Yen, Wei Liu, Lewis C Cantley, Matthew G Vander Heiden, Shinsan M Su, Shengfang Jin, Francesco G Salituro, and Lenny Dang. Small molecule activation of pkm2 in cancer cells induces serine auxotrophy. *Chemistry & biology*, 19 :1187–1198, September 2012.

- [141] U K Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227 :680–685, August 1970.
- [142] C Larsson, I L Pålman, and L Gustafsson. The importance of atp as a regulator of glycolytic flux in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 16 :797–809, June 2000.
- [143] Romeo Lascaris, Harmen J Bussemaker, André Boorsma, Matt Piper, Hans van der Spek, Les Grivell, and Jolanda Blom. Hap4p overexpression in glucose-grown *saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome biology*, 4 :R3, 2003.
- [144] Maria José Leandro, César Fonseca, and Paula Gonçalves. Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts : an overview. *FEMS yeast research*, 9 :511–525, June 2009.
- [145] J Lee, C Godon, G Lagniel, D Spector, J Garin, J Labarre, and M B Toledano. Yap1 and skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *The Journal of biological chemistry*, 274 :16040–16046, June 1999.
- [146] B C Lewis, H Shim, Q Li, C S Wu, L A Lee, A Maity, and C V Dang. Identification of putative c-myc-responsive genes : characterization of rcl, a novel growth-related gene. *Molecular and cellular biology*, 17 :4967–4978, September 1997.
- [147] Jason W Locasale, Alexandra R Grassian, Tamar Melman, Costas A Lyssiotis, Katherine R Mattaini, Adam J Bass, Gregory Heffron, Christian M Metallo, Taru Muranen, Hadar Sharfi, Atsuo T Sasaki, Dimitrios Anastasiou, Edouard Mullarky, Natalie I Vokes, Mika Sasaki, Rameen Beroukhim, Gregory Stephanopoulos, Azra H Ligon, Matthew Meyerson, Andrea L Richardson, Lynda Chin, Gerhard Wagner, John M Asara, Joan S Brugge, Lewis C Cantley, and Matthew G Vander Heiden. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nature genetics*, 43 :869–874, July 2011.
- [148] T Lodi, F Fontanesi, and B Guiard. Co-ordinate regulation of lactate metabolism genes in yeast : the role of the lactate permease gene *jen1*. *Molecular genetics and genomics : MGG*, 266 :838–847, January 2002.
- [149] Marie Odile Loret, Lene Pedersen, and Jean François. Revised procedures for yeast metabolites extraction : application to a glucose pulse to carbon-limited

- yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. *Yeast (Chichester, England)*, 24 :47–60, January 2007.
- [150] M Lundin, J O Nehlin, and H Ronne. Importance of a flanking at-rich region in target site recognition by the gc box-binding zinc finger protein mig1. *Molecular and cellular biology*, 14 :1979–1985, March 1994.
- [151] Sophia Y Lunt and Matthew G Vander Heiden. Aerobic glycolysis : meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annual review of cell and developmental biology*, 27 :441–464, 2011.
- [152] L L Lutfiyya and M Johnston. Two zinc-finger-containing repressors are responsible for glucose repression of suc2 expression. *Molecular and cellular biology*, 16 :4790–4797, September 1996.
- [153] H Ma and D Botstein. Effects of null mutations in the hexokinase genes of *saccharomyces cerevisiae* on catabolite repression. *Molecular and cellular biology*, 6 :4046–4052, November 1986.
- [154] Kyle D Mansfield, Robert D Guzy, Yi Pan, Regina M Young, Timothy P Cash, Paul T Schumacker, and M Celeste Simon. Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic hif-alpha activation. *Cell metabolism*, 1 :393–399, June 2005.
- [155] A M MARKO and G C BUTLER. The isolation of sodium desoxyribonucleate with sodium dodecyl sulfate. *The Journal of biological chemistry*, 190 :165–176, May 1951.
- [156] Alvaro Marín-Hernández, Sara Rodríguez-Enríquez, Paola A Vital-González, Fanny L Flores-Rodríguez, Marina Macías-Silva, Marcela Sosa-Garrocho, and Rafael Moreno-Sánchez. Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growth tumor cells. flux control by an over-expressed but strongly product-inhibited hexokinase. *The FEBS journal*, 273 :1975–1988, May 2006.
- [157] Marta Marques, Dominik Mojzita, Maria A Amorim, Teresa Almeida, Stefan Hohmann, Pedro Moradas-Ferreira, and Vítor Costa. The pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but pep4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)*, 152 :3595–3605, December 2006.

- [158] Wesley Leoriccy Marques, Robert Mans, Eko Roy Marella, Rosa Lorizolla Cordeiro, Marcel van den Broek, Jean-Marc G Daran, Jack T Pronk, Andreas K Gombert, and Antonius J A van Maris. Elimination of sucrose transport and hydrolysis in *saccharomyces cerevisiae* : a platform strain for engineering sucrose metabolism. *FEMS yeast research*, 17, January 2017.
- [159] Andriy Marusyk and Kornelia Polyak. Tumor heterogeneity : causes and consequences. *Biochimica et biophysica acta*, 1805 :105–117, January 2010.
- [160] S P Mathupala, A Rempel, and P L Pedersen. Glucose catabolism in cancer cells : identification and characterization of a marked activation response of the type ii hexokinase gene to hypoxic conditions. *The Journal of biological chemistry*, 276 :43407–43412, November 2001.
- [161] R R McCartney and M C Schmidt. Regulation of snf1 kinase. activation requires phosphorylation of threonine 210 by an upstream kinase as well as a distinct step mediated by the snf4 subunit. *The Journal of biological chemistry*, 276 :36460–36466, September 2001.
- [162] D S McNabb, Y Xing, and L Guarente. Cloning of yeast hap5 : a novel subunit of a heterotrimeric complex required for ccaat binding. *Genes & development*, 9 :47–58, January 1995.
- [163] David S McNabb and Inés Pinto. Assembly of the hap2p/hap3p/hap4p/hap5p-dna complex in *saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell*, 4 :1829–1839, November 2005.
- [164] Kathryn A. Melzak, Chris S. Sherwood, Robin F.B. Turner, and Charles A. Haynes. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 181(2) :635–644, aug 1996.
- [165] Antje Menssen and Heiko Hermeking. Characterization of the c-myc-regulated transcriptome by sage : identification and analysis of c-myc target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99 :6274–6279, April 2002.
- [166] Donald M Miller, Shelia D Thomas, Ashraful Islam, David Muench, and Kara Sedoris. c-myc and cancer metabolism. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18 :5546–5553, October 2012.

- [167] P MITCHELL. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*, 191 :144–148, July 1961.
- [168] D R Mole, P H Maxwell, C W Pugh, and P J Ratcliffe. Regulation of hif by the von hippel-lindau tumour suppressor : implications for cellular oxygen sensing. *IUBMB life*, 52 :43–47, July 2001.
- [169] Fernando Moreno and Pilar Herrero. The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *saccharomyces cerevisiae*. *FEMS microbiology reviews*, 26 :83–90, March 2002.
- [170] Rafael Moreno-Sánchez, Alvaro Marín-Hernández, Juan Carlos Gallardo-Pérez, Héctor Quezada, Rusely Encalada, Sara Rodríguez-Enríquez, and Emma Saavedra. Phosphofructokinase type 1 kinetics, isoform expression, and gene polymorphisms in cancer cells. *Journal of cellular biochemistry*, 113 :1692–1703, May 2012.
- [171] Rafael Moreno-Sánchez, Sara Rodríguez-Enríquez, Alvaro Marín-Hernández, and Emma Saavedra. Energy metabolism in tumor cells. *The FEBS journal*, 274 :1393–1418, March 2007.
- [172] Arnaud Mourier, Anne Devin, and Michel Rigoulet. Active proton leak in mitochondria : a new way to regulate substrate oxidation. *Biochimica et biophysica acta*, 1797 :255–261, February 2010.
- [173] Arnaud Mourier, Julie Vallortigara, Edgar D Yoboue, Michel Rigoulet, and Anne Devin. Kinetic activation of yeast mitochondrial d-lactate dehydrogenase by carboxylic acids. *Biochimica et biophysica acta*, 1777 :1283–1288, October 2008.
- [174] W Mulder, I H Scholten, and L A Grivell. Distinct transcriptional regulation of a gene coding for a mitochondrial protein in the yeasts *saccharomyces cerevisiae* and *kluveromyces lactis* despite similar promoter structures. *Molecular microbiology*, 17 :813–824, September 1995.
- [175] W H MUNYON and D J MERCHANT. The relation between glucose utilization, lactic acid production and utilization and the growth cycle of l strain fibroblasts. *Experimental cell research*, 17 :490–498, June 1959.
- [176] Masafumi Muratani and William P Tansey. How the ubiquitin-proteasome system controls transcription. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4 :192–201, March 2003.

- [177] H Muratsubaki and T Katsume. Distribution of hexokinase isoenzymes depending on a carbon source in *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and biophysical research communications*, 86 :1030–1036, February 1979.
- [178] J. Murphy and J.P. Riley. A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27 :31–36, 1962.
- [179] R A Nakashima, M G Paggi, L J Scott, and P L Pedersen. Purification and characterization of a bindable form of mitochondrial bound hexokinase from the highly glycolytic as-30d rat hepatoma cell line. *Cancer research*, 48 :913–919, February 1988.
- [180] Klaus Natter and Sepp D Kohlwein. Yeast and cancer cells - common principles in lipid metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1831 :314–326, February 2013.
- [181] I Nogue and M Johnston. Isolation and characterization of the *zwf1* gene of *saccharomyces cerevisiae*, encoding glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Gene*, 96 :161–169, December 1990.
- [182] Intawat Nookaew, Roberto Olivares-Hernández, Sakarindr Bhumiratana, and Jens Nielsen. Genome-scale metabolic models of *saccharomyces cerevisiae*. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 759 :445–463, 2011.
- [183] Bola Olayanju, James Jensen Hampsey, and Michael Hampsey. Genetic analysis of the warburg effect in yeast. *Advances in biological regulation*, 57 :185–192, January 2015.
- [184] J Olesen, S Hahn, and L Guarente. Yeast *hap2* and *hap3* activators both bind to the *cyc1* upstream activation site, *uas2*, in an interdependent manner. *Cell*, 51 :953–961, December 1987.
- [185] J T Olesen and L Guarente. The *hap2* subunit of yeast *ccat* transcriptional activator contains adjacent domains for subunit association and dna recognition : model for the *hap2/3/4* complex. *Genes & development*, 4 :1714–1729, October 1990.
- [186] R C Osthus, H Shim, S Kim, Q Li, R Reddy, M Mukherjee, Y Xu, D Wonsey, L A Lee, and C V Dang. Deregulation of glucose transporter 1 and glycolytic gene expression by *c-myc*. *The Journal of biological chemistry*, 275 :21797–21800, July 2000.



- [187] Angela M Otto. Warburg effect(s)-a biographical sketch of otto warburg and his impacts on tumor metabolism. *Cancer & metabolism*, 4 :5, 2016.
- [188] Taofeek K Owonikoko and Fadlo R Khuri. Targeting the pi3k/akt/mTOR pathway : biomarkers of success and tribulation. *American Society of Clinical Oncology educational book. American Society of Clinical Oncology. Meeting*, 2013.
- [189] S Ozcan and M Johnston. Function and regulation of yeast hexose transporters. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63 :554–569, September 1999.
- [190] Sabire Ozcan. Two different signals regulate repression and induction of gene expression by glucose. *The Journal of biological chemistry*, 277 :46993–46997, December 2002.
- [191] Sandra Paiva, Neide Vieira, Isabelle Nondier, Rosine Haguenaue-Tsapis, Margarida Casal, and Danièle Urban-Grimal. Glucose-induced ubiquitylation and endocytosis of the yeast jen1 transporter : role of lysine 63-linked ubiquitin chains. *The Journal of biological chemistry*, 284 :19228–19236, July 2009.
- [192] Aaron Palomino, Pilar Herrero, and Fernando Moreno. Rgt1, a glucose sensing transcription factor, is required for transcriptional repression of the hXK2 gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 388 :697–703, June 2005.
- [193] Ioanna Papandreou, Rob A Cairns, Lucrezia Fontana, Ai Lin Lim, and Nicholas C Denko. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell metabolism*, 3 :187–197, March 2006.
- [194] A B Pardee, R Dubrow, J L Hamlin, and R F Kletzien. Animal cell cycle. *Annual review of biochemistry*, 47 :715–750, 1978.
- [195] A K Pearce, K Crimmins, E Groussac, M J Hewlins, J R Dickinson, J Francois, I R Booth, and A J Brown. Pyruvate kinase (pyk1) levels influence both the rate and direction of carbon flux in yeast under fermentative conditions. *Microbiology (Reading, England)*, 147 :391–401, February 2001.
- [196] Peter L Pedersen, Saroj Mathupala, Annette Rempel, J F Geschwind, and Young Hee Ko. Mitochondrial bound type II hexokinase : a key player in the growth and survival of many cancers and an ideal prospect for therapeutic intervention. *Biochimica et biophysica acta*, 1555 :14–20, September 2002.

- [197] Rafael Peláez, Pilar Herrero, and Fernando Moreno. Functional domains of yeast hexokinase 2. *The Biochemical journal*, 432 :181–190, November 2010.
- [198] D A Persons, N Schek, B L Hall, and O J Finn. Increased expression of glycolysis-associated genes in oncogene-transformed and growth-accelerated states. *Molecular carcinogenesis*, 2 :88–94, 1989.
- [199] T Petit, J A Diderich, A L Kruckeberg, C Gancedo, and K Van Dam. Hexokinase regulates kinetics of glucose transport and expression of genes encoding hexose transporters in *saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bacteriology*, 182 :6815–6818, December 2000.
- [200] Thomas Pfeiffer and Annabel Morley. An evolutionary perspective on the crabtree effect. *Frontiers in molecular biosciences*, 1 :17, 2014.
- [201] Vijayendran Raghevendran, Kiran Raosaheb Patil, Lisbeth Olsson, and Jens Nielsen. Hap4 is not essential for activation of respiration at low specific growth rates in *saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*, 281 :12308–12314, May 2006.
- [202] Ronald W. Raven. *The Theory and Practice of Oncology : Historical Evolution and Present Principles*. Parthenon Pub Group, 1990.
- [203] D Reibstein, J A den Hollander, S J Pilkis, and R G Shulman. Studies on the regulation of yeast phosphofructo-1-kinase : its role in aerobic and anaerobic glycolysis. *Biochemistry*, 25 :219–227, January 1986.
- [204] E Reifenberger, E Boles, and M Ciriacy. Kinetic characterization of individual hexose transporters of *saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *European journal of biochemistry*, 245 :324–333, April 1997.
- [205] Michel Rigoulet, Arnaud Mourier, Anne Galinier, Louis Casteilla, and Anne Devin. Electron competition process in respiratory chain : regulatory mechanisms and physiological functions. *Biochimica et biophysica acta*, 1797 :671–677, 2010.
- [206] A Rodríguez, T De La Cera, P Herrero, and F Moreno. The hexokinase 2 protein regulates the expression of the *glk1*, *hvk1* and *hvk2* genes of *saccharomyces cerevisiae*. *The Biochemical journal*, 355 :625–631, May 2001.

- [207] S Rodríguez-Enríquez, O Juárez, J S Rodríguez-Zavala, and R Moreno-Sánchez. Multisite control of the crabtree effect in ascites hepatoma cells. *European journal of biochemistry*, 268 :2512–2519, April 2001.
- [208] Tatyana I. Rokitskaya, Tatyana M. Ilyasova, Inna I. Severina, Yuri N. Antonenko, and Vladimir P. Skulachev. Electrogenic proton transport across lipid bilayer membranes mediated by cationic derivatives of rhodamine 19 : comparison with anionic protonophores. *European Biophysics Journal*, 42(6) :477–485, 2013.
- [209] D F Rolfe and G C Brown. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiological reviews*, 77 :731–758, July 1997.
- [210] Filip Rolland, Joris Winderickx, and Johan M Thevelein. Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS yeast research*, 2 :183–201, May 2002.
- [211] D Roos and J A Loos. Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. ii. relative importance of glycolysis and oxidative phosphorylation on phytohaemagglutinin stimulation. *Experimental cell research*, 77 :127–135, March 1973.
- [212] Mónica Rosas Lemus, Elodie Roussarie, Nouredine Hammad, Alexis Mougeolle, Stéphane Ransac, Razanne Issa, Jean-Pierre Mazat, Salvador Uribe-Carvajal, Michel Rigoulet, and Anne Devin. The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the crabtree effect. *The Journal of biological chemistry*, 293 :12843–12854, August 2018.
- [213] I B Rosenwald. Upregulated expression of the genes encoding translation initiation factors eif-4e and eif-2alpha in transformed cells. *Cancer letters*, 102 :113–123, April 1996.
- [214] I B Rosenwald, D B Rhoads, L D Callanan, K J Isselbacher, and E V Schmidt. Increased expression of eukaryotic translation initiation factors eif-4e and eif-2 alpha in response to growth induction by c-myc. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 :6175–6178, July 1993.
- [215] M G Rush and R C Warner. Alkali denaturation of covalently closed circular duplex deoxyribonucleic acid. *The Journal of biological chemistry*, 245 :2704–2708, May 1970.

- [216] Pascual Sanz, Rosa Viana, and Maria Adelaida Garcia-Gimeno. Ampk in yeast : The snf1 (sucrose non-fermenting 1) protein kinase complex. *EXS*, 107 :353–374, 2016.
- [217] R H Schiestl and R D Gietz. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current genetics*, 16 :339–346, December 1989.
- [218] E V Schmidt. The role of c-myc in cellular growth control. *Oncogene*, 18 :2988–2996, May 1999.
- [219] J Merijn Schuurmans, André Boorsma, Romeo Lascaris, Klaas J Hellingwerf, and M Joost Teixeira de Mattos. Physiological and transcriptional characterization of *saccharomyces cerevisiae* strains with modified expression of catabolic regulators. *FEMS yeast research*, 8 :26–34, February 2008.
- [220] Gregg L Semenza. Hif-1 and tumor progression : pathophysiology and therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 8 :S62–S67, 2002.
- [221] Reuben J Shaw and Lewis C Cantley. Ras, pi(3)k and mtor signalling controls tumour cell growth. *Nature*, 441 :424–430, May 2006.
- [222] H Shim, C Dolde, B C Lewis, C S Wu, G Dang, R A Jungmann, R Dalla-Favera, and C V Dang. c-myc transactivation of ldh-a : implications for tumor metabolism and growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 :6658–6663, June 1997.
- [223] Michael G Smith and Michael Snyder. Yeast as a model for human disease. *Current protocols in human genetics*, Chapter 15 :Unit 15.6, February 2006.
- [224] Berend Snijder and Lucas Pelkmans. Origins of regulated cell-to-cell variability. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 12 :119–125, February 2011.
- [225] G E Staal, A Kalff, E C Heesbeen, C W van Veelen, and G Rijksen. Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas. *Cancer research*, 47 :5047–5051, October 1987.
- [226] Robert C Stanton. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, nadph, and cell survival. *IUBMB life*, 64 :362–369, May 2012.

- [227] Anna Stincone, Alessandro Prigione, Thorsten Cramer, Mirjam M C Wamelink, Kate Campbell, Eric Cheung, Viridiana OlinSandoval, NanaMaria Grüning, Antje Krüger, Mohammad Tauqeer Alam, Markus A Keller, Michael Breitenbach, Kevin M Brindle, Joshua D Rabinowitz, and Markus Ralser. The return of metabolism : biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90 :927–963, August 2015.
- [228] A Strickaert, M Saiselet, G Dom, X De Deken, J E Dumont, O Feron, P Sonveaux, and C Maenhaut. Cancer heterogeneity is not compatible with one unique cancer cell metabolic map. *Oncogene*, 36 :2637–2642, May 2017.
- [229] Charles A Stuart, Deling Yin, Mary E A Howell, Rhesa J Dykes, John J Laffan, and Arny A Ferrando. Hexose transporter mrnas for glut4, glut5, and glut12 predominate in human muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 291 :E1067–E1073, November 2006.
- [230] F W STUDIER. Sedimentation studies of the size and shape of dna. *Journal of molecular biology*, 11 :373–390, February 1965.
- [231] Zhenguo Sun, Zhou Wang, Xiangyan Liu, and Dong Wang. New development of inhibitors targeting the pi3k/akt/mtor pathway in personalized treatment of non-small-cell lung cancer. *Anti-cancer drugs*, 26 :1–14, January 2015.
- [232] Catherine M Sutherland, Simon A Hawley, Rhonda R McCartney, Anna Leech, Michael J R Stark, Martin C Schmidt, and D Grahame Hardie. Elm1p is one of three upstream kinases for the saccharomyces cerevisiae snf1 complex. *Current biology : CB*, 13 :1299–1305, August 2003.
- [233] M Takeda. Glucose-induced inactivation of mitochondrial enzymes in the yeast saccharomyces cerevisiae. *The Biochemical journal*, 198 :281–287, August 1981.
- [234] Bernard Thorens and Mike Mueckler. Glucose transporters in the 21st century. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 298 :E141–E145, February 2010.
- [235] W N Tian, L D Braunstein, J Pang, K M Stuhlmeier, Q C Xi, X Tian, and R C Stanton. Importance of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity for cell growth. *The Journal of biological chemistry*, 273 :10609–10617, April 1998.

- [236] Ian P M Tomlinson, N Afrina Alam, Andrew J Rowan, Ella Barclay, Emma E M Jaeger, David Kelsell, Irene Leigh, Patricia Gorman, Hanan Lamlum, Shamima Rahman, Rebecca R Roylance, Simon Olpin, Stephen Bevan, Karen Barker, Nicholas Hearle, Richard S Houlston, Maija Kiuru, Rainer Lehtonen, Auli Karhu, Susa Vilkki, Päivi Laiho, Carita Eklund, Outi Vierimaa, Kristiina Aittomäki, Marja Hietala, Pertti Sistonen, Anders Paetau, Reijo Salovaara, Riitta Herva, Virpi Launonen, Lauri A Aaltonen, and Multiple Leiomyoma Consortium. Germline mutations in *fh* predispose to dominantly inherited uterine fibroids, skin leiomyomata and papillary renal cell cancer. *Nature genetics*, 30 :406–410, April 2002.
- [237] Xuemei Tong, Fangping Zhao, and Craig B Thompson. The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Current opinion in genetics & development*, 19 :32–37, February 2009.
- [238] R J Trumbly. Glucose repression in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 6 :15–21, January 1992.
- [239] A Valera, A Pujol, X Gregori, E Riu, J Visa, and F Bosch. Evidence from transgenic mice that *myc* regulates hepatic glycolysis. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 9 :1067–1078, August 1995.
- [240] H B Van Den Hazel, M C Kielland-Brandt, and J R Winther. Review : biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast (Chichester, England)*, 12 :1–16, January 1996.
- [241] Matthew G Vander Heiden, Lewis C Cantley, and Craig B Thompson. Understanding the warburg effect : the metabolic requirements of cell proliferation. *Science (New York, N.Y.)*, 324 :1029–1033, May 2009.
- [242] R L Veech, J W Lawson, N W Cornell, and H A Krebs. Cytosolic phosphorylation potential. *The Journal of biological chemistry*, 254 :6538–6547, July 1979.
- [243] René Verwaal, Johannes W G Paalman, Astrid Hogenkamp, Arie J Verkleij, C Theo Verrips, and Johannes Boonstra. Hxt5 expression is determined by growth rates in *saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)*, 19 :1029–1038, September 2002.

- [244] R B Walsh, D Clifton, J Horak, and D G Fraenkel. *Saccharomyces cerevisiae* null mutants in glucose phosphorylation : metabolism and invertase expression. *Genetics*, 128 :521–527, July 1991.
- [245] G L Wang, B H Jiang, E A Rue, and G L Semenza. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-pas heterodimer regulated by cellular o<sub>2</sub> tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 :5510–5514, June 1995.
- [246] G L Wang and G L Semenza. General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90 :4304–4308, May 1993.
- [247] T Wang, C Marquardt, and J Foker. Aerobic glycolysis during lymphocyte proliferation. *Nature*, 261 :702–705, June 1976.
- [248] O Warburg. The chemical constitution of respiration ferment. *Science (New York, N.Y.)*, 68 :437–443, November 1928.
- [249] O WARBURG. On the origin of cancer cells. *Science (New York, N.Y.)*, 123 :309–314, February 1956.
- [250] O. & Minami S Warburg. Versuche an Überlebendem carcinomgewebe. *Klin Wochenschr*, 2(17) :776–7, 1923.
- [251] Otto Heinrich Warburg. The classic : The chemical constitution of respiration ferment. *Clinical orthopaedics and related research*, 468 :2833–2839, November 2010.
- [252] S Weinhouse. Glycolysis, respiration, and anomalous gene expression in experimental hepatomas : G.h.a. clowes memorial lecture. *Cancer research*, 32 :2007–2016, October 1972.
- [253] Heather L Wieman, Jessica A Wofford, and Jeffrey C Rathmell. Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/akt regulation of glut1 activity and trafficking. *Molecular biology of the cell*, 18 :1437–1446, April 2007.
- [254] W A Wilson, S A Hawley, and D G Hardie. Glucose repression/derepression in budding yeast : Snf1 protein kinase is activated by phosphorylation under

- derepressing conditions, and this correlates with a high amp :atp ratio. *Current biology : CB*, 6 :1426–1434, November 1996.
- [255] O WINGE and C ROBERTS. The relation between the polymeric genes for maltose raffinose, and sucrose fermentation in yeasts. *Comptes rendus des travaux du Laboratoire Carlsberg. Serie physiologique*, 25 :141–171, 1952.
- [256] David R Wise, Ralph J DeBerardinis, Anthony Mancuso, Nabil Sayed, Xiao-Yong Zhang, Harla K Pfeiffer, Ilana Nissim, Evgueni Daikhin, Marc Yudkoff, Steven B McMahon, and Craig B Thompson. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 :18782–18787, December 2008.
- [257] A Woods, M R Munday, J Scott, X Yang, M Carlson, and D Carling. Yeast snf1 is functionally related to mammalian amp-activated protein kinase and regulates acetyl-coa carboxylase in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 269 :19509–19515, July 1994.
- [258] Weihua Wu and Shimin Zhao. Metabolic changes in cancer : beyond the warburg effect. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 45 :18–26, January 2013.
- [259] Wei Xu, Hui Yang, Ying Liu, Ying Yang, Ping Wang, Se-Hee Kim, Shinsuke Ito, Chen Yang, Pu Wang, Meng-Tao Xiao, Li-xia Liu, Wen-qing Jiang, Jing Liu, Jin-ye Zhang, Bin Wang, Stephen Frye, Yi Zhang, Yan-hui Xu, Qun-ying Lei, Kun-Liang Guan, Shi-min Zhao, and Yue Xiong. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of a  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer cell*, 19 :17–30, January 2011.
- [260] L Ye, A L Kruckeberg, J A Berden, and K van Dam. Growth and glucose repression are controlled by glucose transport in *saccharomyces cerevisiae* cells containing only one glucose transporter. *Journal of bacteriology*, 181 :4673–4675, August 1999.
- [261] Edgar D Yoboue, Eric Augier, Anne Galinier, Corinne Blancard, Benoît Pinson, Louis Casteilla, Michel Rigoulet, and Anne Devin. camp-induced mitochondrial compartment biogenesis : role of glutathione redox state. *The Journal of biological chemistry*, 287 :14569–14578, April 2012.



- [262] Edgard Djaha YOBOUE. *Contrôle et régulation de la biogenèse mitochondriale chez la levure Saccharomyces cerevisiae*. PhD thesis, 2011.
- [263] Shimin Zhao, Yan Lin, Wei Xu, Wenqing Jiang, Zhengyu Zha, Pu Wang, Wei Yu, Zhiqiang Li, Lingling Gong, Yingjie Peng, Jianping Ding, Qunying Lei, Kun-Liang Guan, and Yue Xiong. Glioma-derived mutations in *idh1* dominantly inhibit *idh1* catalytic activity and induce *hif-1alpha*. *Science (New York, N.Y.)*, 324 :261–265, April 2009.
- [264] Jie Zheng. Energy metabolism of cancer : Glycolysis versus oxidative phosphorylation (review). *Oncology letters*, 4 :1151–1157, December 2012.
- [265] Xin Lin Zu and Michael Guppy. Cancer metabolism : facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and biophysical research communications*, 313 :459–465, January 2004.

# ***ANNEXE***



## The Crabtree and Warburg effects: Do metabolite-induced regulations participate in their induction?☆



Noureddine Hammad<sup>a,b,1</sup>, Monica Rosas-Lemus<sup>a,b,c,1</sup>, Salvador Uribe-Carvajal<sup>c</sup>, Michel Rigoulet<sup>a,b</sup>, Anne Devin<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Université Bordeaux, IBGC, UMR 5095, Bordeaux, France

<sup>b</sup> Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, Bordeaux, France

<sup>c</sup> Department of Molecular Genetics, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Mexico DF, Mexico

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 22 January 2016

Received in revised form 24 March 2016

Accepted 25 March 2016

Available online 9 April 2016

#### Keywords:

Crabtree

Warburg

Oxidative phosphorylation

Glycolysis

Metabolites

### ABSTRACT

The Crabtree and Warburg effects are two well-known deviations of cell energy metabolism that will be described herein. A number of hypotheses have been formulated regarding the molecular mechanisms leading to these cellular energy metabolism deviations. In this review, we will focus on the emerging notion that metabolite-induced regulations participate in the induction of these effects. All throughout this review, it should be kept in mind that no regulatory mechanism is exclusive and that it may vary in cancer cells owing to different cell types or oncogenic background. This article is part of a Special Issue entitled 'EBEC 2016: 19th European Bioenergetics Conference, Riva del Garda, Italy, July 2–6, 2016', edited by Prof. Paolo Bernardi.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. The Crabtree effect [1]

A careful review of the recent literature did not show that this field has much evolved since our previous review [1]. Consequently, the paragraph below is largely taken from our previous work [1] with permission.

The Crabtree effect is defined as the glucose-induced repression of respiratory flux [2]. The addition of external glucose to Crabtree-sensitive cells triggers in a few seconds the partial inhibition of O<sub>2</sub>

**Abbreviations:** 2HG, 2-hydroxyglutarate; 6PGD, 6-phosphogluconate dehydrogenase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; ANT, adenine nucleotide translocase; ADP, adenosine diphosphate; AMP, adenosine monophosphate; AMPK, AMPK kinase; ATP, adenosine triphosphate; Fru6P, fructose 6 phosphate; Fru1,6BP, fructose 1,6-biphosphate; FH, fumarate hydratase; G6PDH, glucose 6 phosphate dehydrogenase; Glc6P, glucose 6 phosphate; HIF, hypoxia inducible factor; Hxk2, type 2 hexokinase; IDH, isocitrate dehydrogenase; LKB1, tumor suppressor liver kinase B1; PKM2, M2 isoform of pyruvate kinase; MO25, scaffolding-like adaptor protein mouse protein 25; MPC, mitochondrial pyruvate carrier; NADPH, nicotinamide adenine nucleotide phosphate reduced form; PPP, oxidative pentose phosphate pathway; PTP, permeability transition pore; PKM1, M1 isoform of pyruvate kinase; PHDs, prolyl hydroxylase enzymes; Ru-5-P, Ribulose-5-phosphate; ROS, reactive oxygen species; STRAD, pseudokinase Ste20-related adaptor; SDH, succinate dehydrogenase; TCA, tricarboxylic acid cycle.

☆ This article is part of a Special Issue entitled 'EBEC 2016: 19th European Bioenergetics Conference, Riva del Garda, Italy, July 2–6, 2016', edited by Prof. Paolo Bernardi.

\* Corresponding author at: Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, 1, rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France.

E-mail address: [anne.devin@ibgc.cnrs.fr](mailto:anne.devin@ibgc.cnrs.fr) (A. Devin).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally.

consumption, which discards the involvement of gene expression and *de novo* protein synthesis. Even though a number of hypotheses have been formulated, its triggering mechanisms are still unknown. It is also possible that its induction is due to a combination of several factors [3]. One of the most accepted hypothesis is that two glycolysis enzymes (phosphoglycerate kinase and pyruvate kinase) and mitochondria compete for free cytosolic ADP [3,4]. If glycolysis is overactive it could, in theory, override mitochondria regarding ADP uptake. As the latter is one of the substrates of oxidative phosphorylation, this would limit one of the substrates of the ATP synthase and consequently respiration would be decreased. Nonetheless, it is unlikely that this could occur *in vivo* as the K<sub>m</sub> for the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) is almost 100-times lower than that of the glycolysis enzymes [5]. This led authors to conclude that mitochondria would still use cytosolic ADP even if the glycolysis enzymes increase their activity. However, it should be stressed here that glycolysis enzymes use Mg<sup>2+</sup>-chelated nucleotides as substrates whereas the actual substrates for ANT are non-chelated nucleotides. Thus this eventual competition for free ADP between glycolysis and mitochondria will highly depend on the ratio between chelated and non-chelated ADP.

The Crabtree effect on some tumor cells could be eliminated by adding an excess of phosphate (Pi) *in vitro*. It thus has been proposed that a decrease in Pi was the actual trigger of this metabolic phenomenon [6]. This seems in accordance with the dramatic decrease in Pi levels observed after glucose addition in tumor cells [3]. The thermodynamic phosphate potential (*i.e.* [ATP/ADP·Pi]) [5], may be crucial during the

Crabtree effect [7], changes in this parameter have been detected in response to glucose addition to sarcoma ascites tumor cells [7]. Further,  $\text{Ca}^{2+}$  has been proposed to be involved in the induction of the Crabtree effect. Cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels could increase depending on physiological conditions and in response to specific stimuli. One study showed an increased mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uptake in response to glucose [8]. In these conditions, this cation inhibited the mitochondrial ATP synthase inducing a decrease of respiration [9]. However, this could not be taken as a common mechanism for Crabtree-positive cells as (i)  $\text{Ca}^{2+}$  levels were shown to be constant in response to glucose in a hepatoma cell line [3] (ii) *Saccharomyces cerevisiae* cells are well known to lack a mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter [10]. Another proposed mechanism is the permeability of the mitochondrial outer membrane through the porin channel. Indeed this channel regulates the access of substrates to the intermembrane space and thus it could regulate oxidative phosphorylation [11]. If ADP or the respiratory substrates were kept in the cytoplasm this would induce a decreased respiratory flux. This possibility has been overlooked, although it has been suggested that respiratory substrate availability may decrease upon induction of the Crabtree effect [12]. However, it has also been shown that in normal adult cardiomyocytes and HL-1 cardiac cell line, intracellular local restrictions of diffusion of adenine nucleotides and metabolic feedback regulation of respiration via phosphotransfer networks are different, most probably related to differences in structural organization of these cells [13]. Contrary to cardiomyocytes where mitochondria and CaMgATPases are organized into tight complexes which ensure effective energy transfer and feedback signaling mediated by Creatine Kinase and Adenylate Kinase isoforms, in HL-1 cells energy metabolism is less organized [14]. In these cells the permeability of the outer membrane for ADP and other substrates is increased and the mitochondrial compartment is very dynamic leading to an increase in ATP consumption [15,16].

Our laboratory has shown that one metabolite that links glycolysis to the inhibition of respiration is fructose 1,6-biphosphate (Fru1,6BP) [17]. Indeed, we have shown that three glycolysis hexoses phosphates, namely Glc6P, Fru6P and Fru1,6BP regulate the respiratory flux. At low, physiological concentrations, whereas Glc6P and Fru6P slightly stimulated the respiratory flux, Fru1,6BP inhibits mitochondrial respiratory rate at the level of respiratory complexes III and IV. Moreover, when added in the presence of Glc6P, Fru1,6BP strongly antagonized the Glc6P-induced increase in respiration. In permeabilized spheroplasts and at physiological concentrations of hexoses phosphates, the only observed effect was an inhibition of respiration by Fru1,6BP. The Fru1,6BP mediated inhibition of mitochondrial respiration was observed in mitochondria isolated from Crabtree positive yeast whereas no inhibition was observed in mitochondria isolated from Crabtree negative yeast. Last but not least, we were able to show that this inhibition is observed in isolated rat liver mitochondria, which shows that this process is conserved and extends to mammalian cells. Altogether, these results led us to propose that Fru1,6BP participates in the establishment of the Crabtree effect. This regulation points to the fact that an impairment of mitochondrial function is not a prerequisite for Crabtree effect induction since the same decrease of respiration caused by Fru1,6BP can be observed in mitochondria obtained from a non-tumor source. In addition a protective role of Fru1,6BP was observed in the brain [18], liver and heart in ischemia reperfusion injury [19] and in hypoxic astrocytes [20]. In these studies the authors proposed that Fru1,6BP could be metabolized and buffer the ATP ratio, as well as decrease the ROS production through activation of G6PDH, which increases the levels of NADPH leading to an increase in reduced glutathione ratio (Fig. 1). Further studies are needed in order to know if these effects are related with an inhibition of respiration. Recently it has been shown that Fru1,6BP inhibits the permeability transition pore (PTP) in *S. cerevisiae* [21], but its influence on the PTP of mammalian cells has not yet been investigated. Last, an antiapoptotic effect of Fru1,6BP through NO overproduction was proposed [22]. Glc6P is another hexose phosphate that seems to have an impact on mitochondrial function. The presence of this

hexose-monophosphate is important for the release of mitochondria-bound hexokinase and to enhance Bax-mediated release of cytochrome c [23]. The detachment of mitochondrial Hxk2 by Glc6P overproduction may play an important role in the promotion of apoptosis and respiration [24]. In addition it was proposed that in oocytes of *Xenopus laevis*, Glc6P inhibits apoptotic signals through overproduction of NADPH, which prevents the activation of caspase II [25].

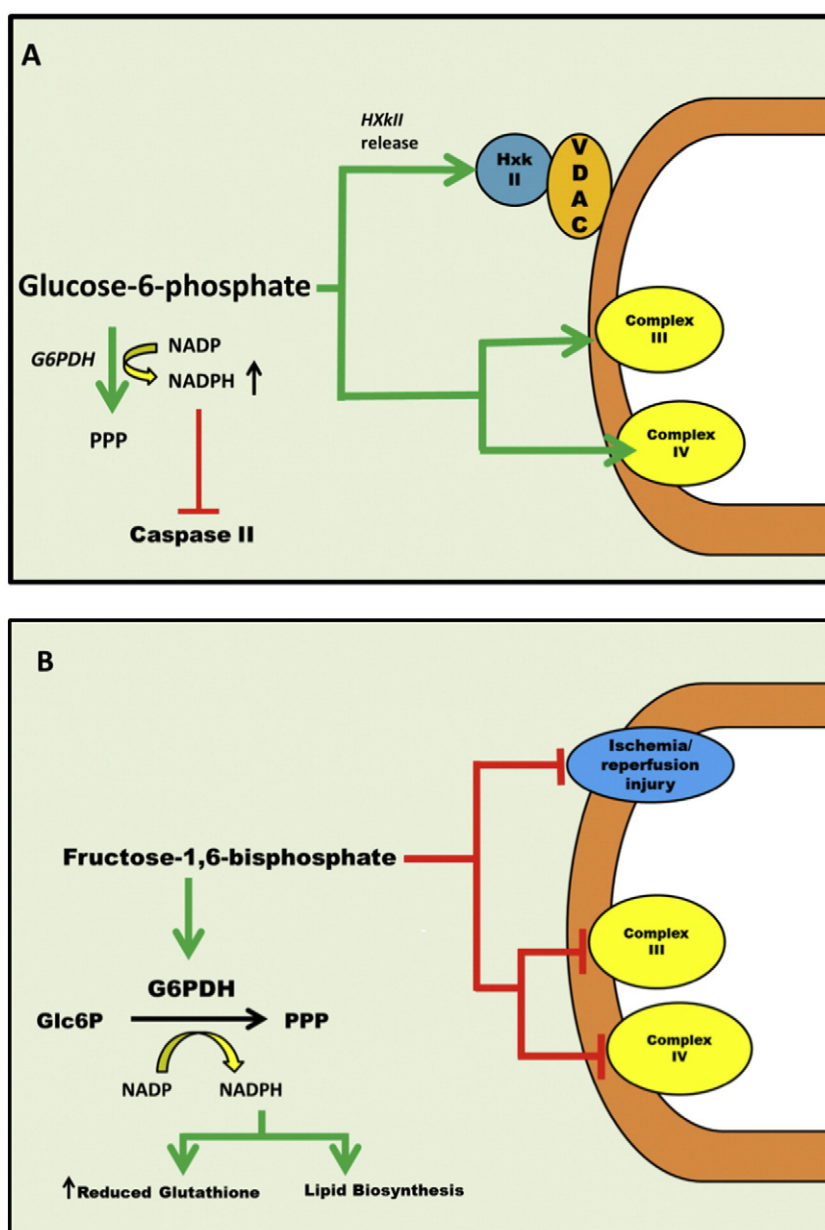
As a conclusion, from the above-mentioned data (Fig. 1), we propose that the participation of hexose phosphates as metabolic messengers and their influence on tumor cell oxidative metabolism needs to be further evaluated.

## 2. The Warburg effect

The Warburg effect in cancer cells may require several hours or even days to develop, and hence transcriptional/translational regulations are necessarily involved. However, we will focus here on what seems to be an overlooked mechanism involved in the phenotypic expression of this effect, which is metabolite-induced regulations.

In order to proliferate, cells must comply with the energy demand imposed by vital processes such as macromolecule biosynthesis, DNA replication, ion gradients generation and cell structure maintenance. Mitochondria play an important role in the response to this energy demand as they synthesize most of the cellular ATP through oxidative phosphorylation. However, it was observed early on by Otto Warburg that cancer cells exhibit a decreased mitochondrial oxidative metabolism [26]. The early discoveries from O. Warburg pointed out that cancer cells display a decreased respiration along with an enhanced lactate production, whose respective rates correlate with the increase in cellular proliferation i.e. the faster the cell proliferate the higher the lactate production rate, suggesting that cancer cells depend mainly on fermentative metabolism for ATP generation [26]. Despite the decrease in energy yield as a consequence of the “glycolytic phenotype” this seems to allow an increase in cell proliferation rate and be applicable to other fast growing cells [27]. Because the repression of oxidative metabolism occurs even in the presence of oxygen, this metabolic phenomenon is known as “aerobic glycolysis” or the “Warburg effect”. The specific advantages that cancer cells acquire by undergoing this metabolic switch have been suggested to be an acceleration through anabolic pathways, most of which arise from glycolysis intermediates. It is also possible that cells use this mechanism in order to proliferate in hypoxic environments, such as conditions prevailing within solid tumors [28]. A correlation between the glycolytic phenotype and tumor invasiveness has also been suggested [4]. Nonetheless, there is a considerable body of evidence that challenges the paradigm of the purely “glycolytic” cancer cell [29]. It has been demonstrated that some glioma, hepatoma and breast cancer cell lines possess functional mitochondria and that they obtain their ATP mainly from oxidative phosphorylation [30,31,32,33]. Moreover, it has been demonstrated that some cancer cells can reversibly switch between fermentation and oxidative metabolism, depending on the absence (where glucose is replaced by galactose) or the presence of glucose and the environmental conditions [34,35,36]. This suggests that the metabolic plasticity observed *in vitro* may have an impact on tumor physiology *in vivo*. Therefore, it is crucial to understand the molecular mechanisms by which cancer cells can reversibly regulate their energy metabolism.

A major mitochondrial metabolic pathway that is modified in cancer cells is glutamine metabolism. Glutamine is the most abundant free alpha-amino acid in plasma (0.6–0.9 mmol/l) and skeletal muscle. This nutrient plays an important role in regulating gene expression, protein turnover, anti-oxidative function, nutrient metabolism, and acid-base balance. In proliferating cells, where anabolic pathways are very active, the tricarboxylic acid (TCA) cycle furnishes intermediates for biosynthesis pathways [37]. In this scheme, glutamine plays a major anaplerotic role since its degradation to  $\alpha$ -ketoglutarate allows the maintenance of intermediates in the TCA cycle [38]. Moreover, it has



**Fig. 1.** (A) scheme illustrating the glucose 6 phosphate-induced regulations on mitochondria and PPP. Physiological concentrations of glucose 6-phosphate stimulate the respiratory flux. Glucose 6 phosphate is important for the release of mitochondria-bound hexokinase and to enhance Bax-mediated release of cytochrome c. In oocytes of *Xenopus laevis*, G6P inhibits apoptotic signals through overproduction of NADPH, which prevents the activation of caspase II (B) scheme illustrating the fructose-1,6-bisphosphate-induced regulations on metabolism. PPP: pentose phosphate pathway, G6PDH, glucose-6-phosphatodehydrogenase. Fru1,6BP inhibits mitochondrial respiration. Fru1,6BP has a protective role in ischemia reperfusion injury.

been shown that NADPH levels can be a controlling factor for cell proliferation [39]. Using  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy, DeBerardinis et al. [37] studied the metabolism of glioblastoma cells that exhibit aerobic glycolysis. They were able to show that in these cells, the TCA cycle was active and that intermediates of this cycle were used in biosynthetic pathways such as fatty acid synthesis. Moreover, they clearly showed that this process, that requires both NADPH and oxaloacetate, was ascribable to a high rate of glutamine metabolism.  $[3-^{13}\text{C}]$  glutamine consumption (glutaminolysis) showed oxidation of glutamine-derived malate by malic enzyme, which produces NADPH. Moreover, they were able to show that the glutaminolytic flux was at least as high as the G6PDH flux (the other major source of NADPH). Since this flux is higher than what is needed for fatty acid synthesis, they proposed that glutaminolysis flux is enough to provide the NADPH required for fatty acid synthesis. Moreover, in their conditions, anaplerotic acetate is

derived from glutamine. In conclusion, their  $^{13}\text{C}$  NMR study clearly shows that glutamine catabolism provides a carbon source that supports cell proliferation. Glutamine can also be the main source of acetyl-coA and citrate in proliferating cells when pyruvate transport in the mitochondria is reduced. Indeed, pyruvate enters the mitochondrial matrix through to the MPC carrier [40,41]. This carrier is a heterodimer composed of two subunits: MPC1 and MPC2. Whenever one of these subunits is dysfunctional, matrix citrate decreases [40,41]. This decrease can be reversed by synthesis of acetyl-CoA and citrate from glutamine [37]. Consequently, it should be taken in account that (i) glutamine metabolism might be a significant source of Krebs cycle intermediates in cells proliferating at a high rate (ii) lactate might not only arise from glucose metabolism but also from glutamine metabolism, thus, lactate production flux is not necessarily representative of the flux through glycolysis.

As stated above, cancer cells mainly depend on fermentative metabolism for ATP generation. This occurs even in the presence of oxygen (the Warburg effect). Below, we will review the metabolite-induced regulations that lead to a modulation of fermentative metabolism to achieve ATP production. First, it has been shown that the M2 isoform of pyruvate kinase (PKM2) is positively regulated by serine. Consequently, in the presence of high levels of serine (that is necessary for biomass production), PKM2 is fully active and glycolysis rate is high – a hallmark of the Warburg effect-. Moreover, the activity of the master regulator of cell energy homeostasis, AMPK is negatively regulated by ribulose 5P which diverts carbons away from glycolysis – “a counter Warburg effect”-. Phosphofructokinase, that is a major glycolysis controlling enzyme in non-transformed cells is expressed and modulated in such a way in cancer cells that its allosteric inhibition by citrate is alleviated. This allows an increase in the flux through this enzyme, a decrease in its control over the glycolytic flux and thus an increase in glycolytic rate – a hallmark of the Warburg effect-. Last, oncometabolites have been shown to inhibit competitively  $\alpha$ -ketoglutarate dependent dehydrogenases. This leads to a stabilization of the transcription factor HIF1 $\alpha$  and induces the changes in gene expression in response to hypoxia (regarding energy metabolism: mainly an increase in glycolysis and a decrease in oxidative phosphorylation). Consequently the build-up of these metabolites elicits a hypoxia-like response in the presence of oxygen – the Warburg effect-.

### 2.1. Pyruvate kinase M2 is allosterically activated by metabolic intermediates [42]

Pyruvate kinase catalyzes the final step of glycolysis, the synthesis of ATP and pyruvate from phosphoenol pyruvate and ADP. In mammals, there are four PK isoforms (PKM1, PKM2, PKL – liver, and PKR – red blood cells). PKM1 is present in many terminally differentiated tissues, whereas PKM2 is present in tissues with anabolic functions, proliferating cells, and cancer cells. It has been shown that cancer cells engineered to express PKM1 fail to support tumor growth [39,43]. However, a conflicting report shows that M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth [44]. PKM1 and PKM2 are alternative splice isoforms of the *Pykm* gene and differ only by the inclusion of one mutually exclusive exon. Despite their substantial sequence similarity, PKM1 and PKM2 have very different catalytic and regulatory properties. PKM1 has constitutively high catalytic activity whereas PKM2 activity is subject to complex allosteric regulation. Thus, pyruvate kinase catalyzes a step in glucose metabolism that can be crucial for controlling cell proliferation. The regulation of PKM2 allows cells access to the ATP producing function of the enzyme when it is in the active state and allows the use of glycolysis to support biosynthesis when in the off state (increase in glycolysis intermediates concentrations). PKM1 is constitutively active because it forms a stable tetramer whereas PKM2 can exist either as an active tetramer or an inactive non-tetramer.

Several post translational modifications of PKM2 have been described [45]. However, we will focus here on metabolite-induced modifications. A well-known activator of PKM2 is the glycolytic intermediate fructose 1,6 biphosphate (Fru1,6BP) that promotes the tetramerization of the enzyme in its active conformation. Consequently, PKM2 exists in a monomer–tetramer equilibrium that can be altered by the presence of Fru1,6BP. PKM2 activators may impair tumor cell proliferation by interfering with anabolic metabolism indeed, activator treatment *in vitro* and *in vivo* results in decreased pools of ribose-phosphate and serine, which are key precursors for nucleotide and amino acid metabolism [43]. Consequently, an activation of PKM2 through Fru1,6BP alleviates the building up of glycolytic intermediates and their engulfment in anabolic pathways.

The amino acid L-serine, one of the so-called non-essential amino acids, plays a central role in cellular proliferation. L-Serine is the predominant source of one-carbon groups for *de novo* synthesis of purine nucleotides and deoxythymidine monophosphate. Its metabolism is an anabolic pathway required for growth and proliferation [46]. It

recruits carbon away from the energy production pathway of glucose utilization. While investigating the relationship between glycolysis and the serine biosynthesis pathway (that arises from glycolysis), Chaneton et al. [47] were able to show that serine directly activates PKM2, independently of Fru1,6BP mediated activation. This activation occurs within the physiological range of serine concentration. Further, this activation is specific of PKM2 since PKM1, that exhibits a high basal activity is refractory to both serine and Fru1,6BP activation. When serine is abundant PKM2 is fully active enabling the maximal use of glucose through glycolysis and when the steady state level of serine drops an attenuation of PKM2 activity occurs which redirects glucose derived carbons back in the serine biosynthetic pathway (Fig. 2).

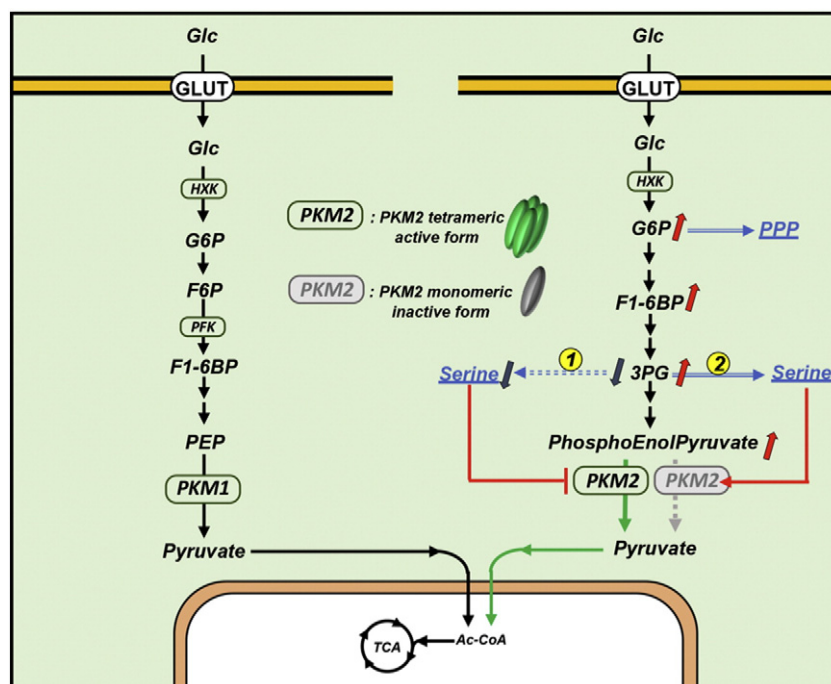
Last, it was shown that SAICAR (succinylaminoimidazolecarboxamide ribose-5'-phosphate, an intermediate of the *de novo* purine nucleotide synthesis pathway) specifically stimulates PKM2 [48]. Using liquid-chromatography mass spectrometry, the authors were able to show that SAICAR is a metabolite that interacts with PKM2. Moreover, assessment of PKM2 *in vitro* activity in the presence or absence of SAICAR showed that the binding of SAICAR to this enzyme activates it in such a way that its activity became close to that of PKM1. They were able to show that this regulation has an *in vivo* relevance since in cancer cells, metabolic flux and cellular energy balance were altered by changes in SAICAR concentration.

### 2.2. Role of Ru-5-P concentration in the balance between fatty acid degradation and synthesis through AMPK inactivation; link between the pentose-phosphate pathway and lipogenesis

In cancer cells, the high activity of aerobic glycolysis is associated to a rise in different intermediates of this pathway leading to an increase in some precursors for anabolic biosynthesis of macromolecules that allow rapid cell proliferation and an activation of the oxidative pentose phosphate pathway (PPP) – through glucose-6-phosphate – that produces ribose-5-phosphate (a precursor for nucleotide synthesis) and NADPH which is required for biosynthesis of lipids, appropriate redox status and antioxidant defense (Fig. 1A). Thus PPP plays an important role in the metabolic reorganization that favors tumor cell proliferation and disease development. A molecular mechanism that links PPP activation and the increase in lipogenesis has been recently evidenced [49]. At high concentration, Ribulose-5-phosphate (Ru-5-P) produced by the 6-phosphogluconate dehydrogenase (6PGD) disrupts the association between LKB1 (tumor suppressor liver kinase B1), MO25 (scaffolding-like adaptor protein mouse protein 25) and STRAD (pseudokinase Ste20-related adaptor) that is required for full AMPK (AMPKinase) activation. Such a decrease in AMPK activity leads to an increase in fatty-acid and cholesterol synthesis and inhibition of two main metabolic enzymes that participate in fatty-acids degradation *i.e.* acetyl-CoA carboxylase (ACC) 1 and 2. The above-mentioned study suggests that 6PGD provides an additional link between the oxidative PPP and lipogenesis through Ru-5-P-dependent inhibition of LKB1/AMPK signaling. Although it was shown in that study that the intracellular level of Ru-5-P decreased in 6PGD knockdown cells, which suggests an important role for 6PGD in maintaining the intracellular Ru-5-P level that cannot be compensated by other pathways. This does not exclude the potential contribution of non-oxidative PPP in maintaining physiological Ru5-P levels to regulate lipogenesis. In addition, these findings regarding a commonly important role of 6PGD in the oxidative PPP in cancer cells are different from the previous report using H1975 lung cancer cells suggesting that 6PGD functions may vary in cancer cells owing to different cell types or oncogenic background [50].

### 2.3. Regulation of phosphofructokinase (PFK) activity by citrate and fructose 2,6-biphosphate (Fru2,6BP)

In the carbohydrate catabolism pathway, PFK is one of the most regulated enzymes and it has been shown that, in different types of cancer,



**Fig. 2.** Scheme illustrating the PKM regulations and the consequences of these regulations on anabolic pathways. PKM1 has constitutively high catalytic activity. PKM2 activity is subject to allosteric regulation. PKM1 is constitutively active because it forms a stable tetramer whereas PKM2 can exist either as an active tetramer or an inactive non-tetramer. When serine is abundant PKM2 is fully active enabling the maximal use of glucose through glycolysis. When the steady state level of serine drops an attenuation of PKM2 activity occurs which redirects glucose-derived carbons back in the serine biosynthetic pathway.

the rate of glycolysis is, at least in part, determined by PFK activity. The allosteric regulation of PFK is essentially due to 5 metabolites: AMP, ADP and Fru2,6BP are activators while ATP and citrate are inhibitors. In non-transformed cells one of the most important regulation concerns the allosteric response of PFK activity to citrate, a metabolite that is at the crossroad of the Krebs cycle and lipid metabolism. Increase in this metabolite concentration strongly inhibits glycolysis through PFK inhibition and favors fatty acid beta-oxidation. In many kinds of tumors, it has been shown that PFK allosteric regulation is largely altered in such a way that this enzyme is more sensitive to Fru2,6BP and less sensitive to citrate. Indeed, in mammalian cells, PFK is a homo or heterotetramer of L, M and C isoforms which are differently expressed in various tissues *i.e.* L is the main isoform expressed in liver and kidney, M is the sole isoform found in skeletal muscle while C is predominantly expressed in platelets. These isoforms possess different kinetic properties, particularly concerning the sensitivity towards allosteric effectors (for a detailed description of these kinetic properties of PFK isoforms, see [51]). For instance, the M isoform is the most sensitive to Fru2,6BP and the L isoform is the less sensitive to the citrate induced-inhibition. In cancer cells, the over-expressed isoforms are preferentially the ones for which the sensitivity to citrate is low (L isoform essentially). It has been proposed that in some human gliomas this L isoform may be specifically phosphorylated [52]. However this phosphorylation has not been associated to any significant modification in the kinetic properties of PFK.

Another process leading to a large decrease in PFK sensitivity to ATP and citrate and to an increase in Fru2,6BP induced PFK activation has been described in a tumor tissue developed in mice after subcutaneous infection with tumorigenic B16-F10 cells. In this case, a posttranslational modification of M isoform of PFK induced by proteolysis leads to a short fragment (47 kD instead 87 kD) in which the regulatory properties are changed: its activity is insensitive to citrate, and compared to the native isoform it presents a low sensitivity to ATP and is strongly activated by Fru2,6BP [53]. Such regulations of PFK activity in rapidly proliferating cells allow an increase in the flux through glycolysis. Indeed, it has been

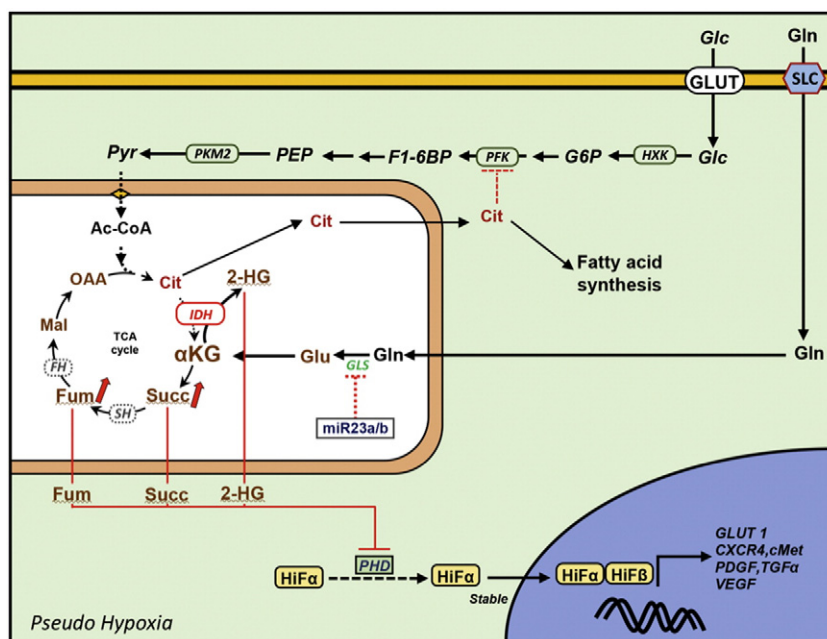
shown that the regulations of PFK in cancer cells are such that this enzyme does not exert significant control over the glycolytic flux [54,55].

#### 2.4. Oncometabolites and their role in metabolism deviation

The term oncometabolite has recently been coined and assigned with confidence to 2-hydroxyglutarate, the reduced form of 2-oxoglutarate (2OG). An oncometabolite is a small molecule component (or enantiomer) of normal metabolism whose accumulation causes metabolic dysregulation and consequently primes cells allowing future progression to cancer. We will here focus on the dysregulations induced by these oncometabolites that arise from the Krebs cycle.

##### 2.4.1. $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG)-dependent dioxygenases

$\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG)-dependent dioxygenases are important modulators of both the oxygen-sensing machinery and the epigenome. Regarding the oxygen-sensing machinery, the majority of the changes in gene expression observed in response to hypoxia are due to HIFs, heterodimeric transcription factors that are tightly linked to tumorigenesis [56]. HIF transcription factors consist of an  $\alpha$ - and a  $\beta$ -subunit that are constitutively expressed. However, under normoxia the  $\alpha$ -subunit is highly labile [57], [58] and the rapid degradation of HIF $\alpha$  is regulated by oxygen-dependent prolyl hydroxylase enzymes (PHDs), which hydroxylate two defined prolyl residues in its oxygen-dependent degradation (ODD) domain. This in turn recruits an E3 ubiquitin ligase complex containing pVHL, resulting in HIF $\alpha$  ubiquitylation and degradation by the proteasome. Consequently, any dysregulation of the hydroxylation process would lead to a stabilization of HIF. Recently, metabolic changes driven by mutations in genes related to the TCA cycle, have indicated an alternative role, that of the 'oncometabolite' [59]. A particular metabolite builds up within the cell and contributes to the tumorigenic process. Three enzymes of the TCA cycle have been shown to be involved in this process: fumarate hydratase, succinate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase. Mutations in fumarate hydratase (FH) and succinate dehydrogenase (SDH) subunits lead to loss of gene function, and



**Fig. 3.** Scheme illustrating the regulations induced by oncometabolites. The majority of the changes in gene expression observed in response to hypoxia are due to HIFs, heterodimeric transcription factors that are tightly linked to tumorigenesis. The rapid degradation of HIF $\alpha$  is down-regulated by the competitive inhibition of oxygen-dependent prolyl hydroxylase enzymes (PHDs) by the three oncometabolites succinate, fumarate and 2-HG. The build up of these metabolites is due to mutations in fumarate hydratase, succinate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase. The inhibition of these enzymes leads to the stabilization of HIF1 $\alpha$  through a decrease in its hydroxylation rate and induce the majority of the changes in gene expression observed in response to hypoxia. This allows a “hypoxia-like” cellular response even in the presence of oxygen.

accumulation of the substrates fumarate and succinate, respectively. Conversely, for isocitrate dehydrogenase (IDH), a single-allele mutation confers a gain of function, producing an excess of a new metabolite, 2-hydroxyglutarate (2HG) [59]. These three oncometabolites inhibit competitively the  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG)-dependent dioxygenases. Succinate and fumarate, which are structurally similar, inhibit these enzymes through product inhibition, since it has been shown that the effects of both metabolites can be reversed by the addition of excess  $\alpha$ KG *in vitro* and *in vivo* [60]. 2HG is structurally very similar to  $\alpha$ KG and glutamate, the only difference is the presence of a hydroxyl group instead of a ketone or amine group, respectively. It is this similarity that results in the competitive inhibition of  $\alpha$ KG-dependent dioxygenases by 2HG, as it occupies the same binding site as  $\alpha$ KG [61]. As stated above, the inhibition of these enzymes leads to the stabilization of HIF1 $\alpha$  through a decrease in its hydroxylation rate and induce the majority of the changes in gene expression observed in response to hypoxia. This allows a “hypoxia-like” cellular response even in the presence of oxygen (Fig. 3).

#### 2.4.2. Histone methylation [62]

Recent studies have shown that Krebs cycle intermediates can shape the epigenetic landscape of chromatin by regulating DNA and histone methylation.  $\alpha$ -ketoglutarate is a key metabolite in the Krebs cycle and is also an obligatory substrate for  $\alpha$ -oxoglutarate-dependent dioxygenases. This enzyme family includes the major enzymes of DNA and histone demethylation, *i.e.* Ten-Eleven Translocation and Jumonji C domain containing demethylases. As stated above, succinate and fumarate, are potent inhibitors of  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG)-dependent dioxygenases enzymes, *i.e.* the balance of the Krebs cycle reactions can affect the level of DNA and histone methylation and thus control gene expression.

### 3. Conclusion

Metabolites *i.e.*, the intermediaries from diverse metabolic pathways, are demonstrating their role as metabolic messengers that

regulate the activity of diverse enzymes and impinge on the half-life of enzymes. This concept opens a whole new field on the control of cell survival and metabolism.

### Transparency Document

The [Transparency document](#) associated with this article can be found in online version.

### Acknowledgements

This work was supported by the Ligue contre le Cancer, the Agence Nationale de la Recherche (ANR2011BSV502501), the CNRS (Conseil National de la Recherche Scientifique) and the Comité de Dordogne & Gironde de la Ligue Nationale Contre le Cancer. The authors wish to thank Dr. Manuel Rojo and Dr. Arnaud Mourier for careful proofreading of the manuscript and constructive discussions.

### References

- [1] R. Diaz-Ruiz, M. Rigoulet, A. Devin, The Warburg and Crabtree effects: on the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression, *Biochim. Biophys. Acta* 1807 (2011) 568–576.
- [2] H.G. Crabtree, Observations on the carbohydrate metabolism of tumours, *Biochem. J.* 23 (1929) 536–545.
- [3] S. Rodríguez-Enríquez, O. Juárez, J.S. Rodríguez-Zavala, R. Moreno-Sánchez, Multi-site control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells, *Eur. J. Biochem. FEBS* 268 (2001) 2512–2519.
- [4] S. Weinhouse, Glycolysis, respiration, and anomalous gene expression in experimental hepatomas: GHA Clowes memorial lecture, *Cancer Res.* 32 (1972) 2007–2016.
- [5] R.L. Veech, J.W. Lawson, N.W. Cornell, H.A. Krebs, Cytosolic phosphorylation potential, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 6538–6547.
- [6] D.H. Koops, Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects, *Science* 178 (1972) 127–133.
- [7] I. Sussman, M. Erecińska, D.F. Wilson, Regulation of cellular energy metabolism: the Crabtree effect, *Biochim. Biophys. Acta* 591 (1980) 209–223.
- [8] L. Wojtczak, V.V. Teplova, K. Bogucka, A. Czyż, A. Makowska, M.R. Więckowski, J. Duszyński, Y.V. Evtodienko, Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in Ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial energetics, *Eur. J. Biochem.* 263 (1999) 495–501.



- [9] YuV Evtodienko, null, V.V. Teplova, J. Duszyński, K. Bogucka, L. Wojtczak, The role of cytoplasmic  $[Ca^{2+}]$  in glucose-induced inhibition of respiration and oxidative phosphorylation in Ehrlich ascites tumour cells: a novel mechanism of the Crabtree effect, *Cell Calcium* 15 (1994) 439–446.
- [10] S. Uribe, P. Rangel, J.P. Pardo, Interactions of calcium with yeast mitochondria, *Cell Calcium* 13 (1992) 211–217.
- [11] V. Saks, Y. Belikova, E. Vasilyeva, A. Kuznetsov, E. Fontaine, C. Keriél, X. Leverve, Correlation between degree of rupture of outer mitochondrial membrane and changes of kinetics of regulation of respiration by ADP in permeabilized heart and liver cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208 (1995) 919–926.
- [12] E.F. Greiner, M. Guppy, K. Brand, Glucose is essential for proliferation and the glycolytic enzyme induction that provokes a transition to glycolytic energy production, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 31484–31490.
- [13] T. Anmann, R. Guzun, N. Beraud, S. Pelloux, A.V. Kuznetsov, L. Kogerman, T. Kaambre, P. Sikk, K. Paju, N. Peet, E. Seppet, C. Ojeda, Y. Toumeur, V. Saks, Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and in HL-1 cardiac cells: importance of cell structure/organization for respiration regulation, *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* 1757 (2006) 1597–1606.
- [14] M. Eimre, K. Paju, S. Pelloux, N. Beraud, M. Roosimaa, L. Kadaja, M. Gruno, N. Peet, E. Orlova, R. Remmelkoor, A. Piirsoo, V. Saks, E. Seppet, Distinct organization of energy metabolism in HL-1 cardiac cell line and cardiomyocytes, *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* 1777 (2008) 514–524.
- [15] N. Beraud, S. Pelloux, Y. Usson, A.V. Kuznetsov, X. Ronot, Y. Toumeur, V. Saks, Mitochondrial dynamics in heart cells: very low amplitude high frequency fluctuations in adult cardiomyocytes and flow motion in non beating HL-1 cells, *J. Bioenerg. Biomembr.* 41 (2009) 195–214.
- [16] V. Saks, R. Guzun, N. Timohhina, K. Tepp, M. Varikmaa, C. Monge, N. Beraud, T. Kaambre, A. Kuznetsov, L. Kadaja, M. Eimre, E. Seppet, Structure-function relationships in feedback regulation of energy fluxes in vivo in health and disease: mitochondrial interactosome, *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* 1797 (2010) 678–697.
- [17] R. Díaz-Ruiz, N. Avéret, D. Araiza, B. Pinson, S. Uribe-Carvajal, A. Devin, M. Rigoulet, Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 26948–26955.
- [18] Z.S. Vexler, A. Wong, C. Francisco, C. Manabat, S. Christen, M. Täuber, D.M. Ferriero, G. Gregory, Fructose-1,6-bisphosphate preserves intracellular glutathione and protects cortical neurons against oxidative stress, *Brain Res.* 960 (2003) 90–98.
- [19] W. Sano, F. Watanabe, H. Tamai, E. Furuya, M. Mino, Beneficial effect of fructose-1,6-bisphosphate on mitochondrial function during ischemia-reperfusion of rat liver, *Gastroenterology* 108 (1995) 1785–1792.
- [20] J.A. Kelleher, P.H. Chan, T.Y. Chan, G.A. Gregory, Energy metabolism in hypoxic astrocytes: protective mechanism of fructose-1,6-bisphosphate, *Neurochem. Res.* 20 (1995) 785–792.
- [21] M. Rosas-Lemus, C. Uribe-Alvarez, N. Chiquete-Félix, S. Uribe-Carvajal, In *Saccharomyces cerevisiae* fructose-1,6-bisphosphate contributes to the Crabtree effect through closure of the mitochondrial unspecific channel, *Arch. Biochem. Biophys.* 555–556 (2014) 66–70.
- [22] R. Calafell, J. Boada, A.F. Santidrian, J. Gil, T. Roig, J.C. Perales, J. Bermudez, Fructose 1,6-bisphosphate reduced TNF- $\alpha$ -induced apoptosis in galactosamine sensitized rat hepatocytes through activation of nitric oxide and cGMP production, *Eur. J. Pharmacol.* 610 (2009) 128–133.
- [23] J.G. Pastorino, N. Shulga, J.B. Hoek, Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 7610–7618.
- [24] V.V. Lemesko, VDAC electronics: 1. VDAC-hexo(gluc)kinase generator of the mitochondrial outer membrane potential, *Biochim. Biophys. Acta* 1838 (2014) 1362–1371.
- [25] L.K. Nutt, The Xenopus oocyte: a model for studying the metabolic regulation of cancer cell death, *Semin. Cell Dev. Biol.* 23 (2012) 412–418.
- [26] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* 123 (1956) 309–314.
- [27] K. Brand, Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield, *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 (1997) 355–364.
- [28] R.A. Gatenby, R.J. Gillies, Why do cancers have high aerobic glycolysis? *Nat. Rev. Cancer* 4 (2004) 891–899.
- [29] R. Moreno-Sánchez, S. Rodríguez-Enríquez, A. Marín-Hernández, E. Saavedra, Energy metabolism in tumor cells, *FEBS J.* 274 (2007) 1393–1418.
- [30] M. Guppy, P. Leedman, X. Zu, V. Russell, Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells, *Biochem. J.* 364 (2002) 309–315.
- [31] S. Rodríguez-Enríquez, P.A. Vital-González, F.L. Flores-Rodríguez, A. Marín-Hernández, L. Ruiz-Azuara, R. Moreno-Sánchez, Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215 (2006) 208–217.
- [32] M. Martin, B. Beauvoit, P.J. Voisin, P. Canioni, B. Guérin, M. Rigoulet, Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine deprivation, *J. Bioenerg. Biomembr.* 30 (1998) 565–578.
- [33] P. Pasdois, C. Deveaud, P. Voisin, V. Bouchaud, M. Rigoulet, B. Beauvoit, Contribution of the phosphorylatable complex I in the growth phase-dependent respiration of C6 glioma cells in vitro, *J. Bioenerg. Biomembr.* 35 (2003) 439–450.
- [34] S. Rodríguez-Enríquez, J.C. Gallardo-Pérez, A. Avilés-Salas, A. Marín-Hernández, L. Carreño-Fuentes, V. Maldonado-Lagunas, R. Moreno-Sánchez, Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids, *J. Cell. Physiol.* 216 (2008) 189–197.
- [35] K. Smolková, N. Bellance, F. Scandurra, E. Génot, E. Gnaiger, L. Plecítá-Hlavatá, P. Ježek, R. Rossignol, Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia, *J. Bioenerg. Biomembr.* 42 (2010) 55–67.
- [36] R. Rossignol, R. Gilkerson, R. Aggeler, K. Yamagata, S.J. Remington, R.A. Capaldi, Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells, *Cancer Res.* 64 (2004) 985–993.
- [37] C. Yang, B. Ko, C.T. Hensley, L. Jiang, A.T. Wasti, J. Kim, J. Sudderth, M.A. Calvaruso, L. Lumata, M. Mitsche, J. Rutter, M.E. Merritt, R.J. DeBerardinis, Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport, *Mol. Cell* 56 (2014) 414–424.
- [38] R.J. DeBerardinis, A. Mancuso, E. Daikhin, I. Nissim, M. Yudkoff, S. Wehrl, C.B. Thompson, Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 19345–19350.
- [39] H.R. Christofk, M.G. Vander Heiden, M.H. Harris, A. Ramanathan, R.E. Gerszten, R. Wei, M.D. Fleming, S.L. Schreiber, L.C. Cantley, The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth, *Nature* 452 (2008) 230–233.
- [40] S. Herzig, E. Raemy, S. Montessuit, J.-L. Veuthey, N. Zamboni, B. Westermann, E.R.S. Kunji, J.-C. Martinou, Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier, *Science* 337 (2012) 93–96.
- [41] D.K. Bricker, E.B. Taylor, J.C. Schell, T. Orsak, A. Boutron, Y.-C. Chen, J.E. Cox, C.M. Cardon, J.G. Van Vranken, N. Dephore, C. Redin, S. Boudina, S.P. Gygi, M. Brivet, C.S. Thummel, J. Rutter, A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, *Drosophila*, and humans, *Science* 337 (2012) 96–100.
- [42] D.Y. Gui, C.A. Lewis, M.G. Vander Heiden, Allosteric regulation of PKM2 allows cellular adaptation to different physiological states, *Sci. Signal.* 6 (2013) pe7.
- [43] D. Anastasiou, Y. Yu, W.J. Israelsen, J.-K. Jiang, M.B. Boxer, B.S. Hong, W. Tempel, S. Dimov, M. Shen, A. Jha, H. Yang, K.R. Mattaini, C.M. Metallo, B.P. Fiske, K.D. Courtney, S. Malsstrom, T.M. Khan, C. Kung, A.P. Skoumbourdis, H. Veith, N. Southall, M.J. Walsh, K.R. Brimacombe, W. Leister, S.Y. Lunt, Z.R. Johnson, K.E. Yen, K. Kunii, S.M. Davidson, H.R. Christofk, C.P. Austin, J. Inglese, M.H. Harris, J.M. Asara, G. Stephanopoulos, F.G. Salituro, S. Jin, L. Dang, D.S. Auld, H.-W. Park, L.C. Cantley, C.J. Thomas, M.G. Vander Heiden, Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis, *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 839–847.
- [44] M. Cortes-Cros, C. Hemmerlin, S. Ferretti, J. Zhang, J.S. Gounarides, H. Yin, A. Muller, A. Haberkorn, P. Chene, W.R. Sellers, F. Hofmann, M2 isoform of pyruvate kinase is dispensable for tumor maintenance and growth, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110 (2013) 489–494.
- [45] Z. Li, P. Yang, Z. Li, The multifaceted regulation and functions of PKM2 in tumor progression, *Biochim. Biophys. Acta* 1846 (2014) 285–296.
- [46] T.J. De Koning, K. Snell, M. Duran, R. Berger, B.-T. Poll-The, R. Surtees, L-serine in disease and development, *Biochem. J.* 371 (2003) 653–661.
- [47] B. Chaneton, P. Hillmann, L. Zheng, A.C.L. Martin, O.D.K. Maddocks, A. Chokkathakulam, J.E. Coyle, A. Jankevics, F.P. Holding, K.H. Vousden, C. Frezza, M. O'Reilly, E. Gottlieb, Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2, *Nature* 491 (2012) 458–462.
- [48] K.E. Keller, I.S. Tan, Y.-S. Lee, SAICAR stimulates pyruvate kinase isoform M2 and promotes cancer cell survival in glucose-limited conditions, *Science* 338 (2012) 1069–1072.
- [49] R. Lin, S. Elf, C. Shan, H.-B. Kang, Q. Ji, L. Zhou, T. Hitosugi, L. Zhang, S. Zhang, J.H. Seo, J. Xie, M. Tucker, T.-L. Gu, J. Sudderth, L. Jiang, M. Mitsche, R.J. DeBerardinis, S. Wu, Y. Li, H. Mao, P.R. Chen, D. Wang, G.Z. Chen, S.J. Hurwitz, S. Lonial, M.L. Arellano, H.J. Khoury, F.R. Khuri, B.H. Lee, Q. Lei, D.J. Brat, K. Ye, T.J. Boggon, C. He, S. Kang, J. Fan, J. Chen, 6-Phosphogluconate dehydrogenase links oxidative PPP, lipogenesis and tumour growth by inhibiting LKB1-AMPK signalling, *Nat. Cell Biol.* 17 (2015) 1484–1496.
- [50] V.P. Sukhatme, B. Chan, Glycolytic cancer cells lacking 6-phosphogluconate dehydrogenase metabolize glucose to induce senescence, *FEBS Lett.* 586 (2012) 2389–2395.
- [51] R. Moreno-Sánchez, A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, H. Quezada, R. Encalada, S. Rodríguez-Enríquez, E. Saavedra, Phosphofructokinase type 1 kinetics, isoform expression, and gene polymorphisms in cancer cells, *J. Cell. Biochem.* 113 (2012) 1692–1703.
- [52] G.E. Staal, A. Kalff, E.C. Heesbeen, C.W. van Veelen, G. Rijkssen, Subunit composition, regulatory properties, and phosphorylation of phosphofructokinase from human gliomas, *Cancer Res.* 47 (1987) 5047–5051.
- [53] A. Šmerc, E. Sodja, M. Legiša, Posttranslational modification of 6-phosphofructo-1-kinase as an important feature of cancer metabolism, *PLoS One* 6 (2011) e19645.
- [54] A. Marín-Hernández, S. Rodríguez-Enríquez, P.A. Vital-González, F.L. Flores-Rodríguez, M. Macías-Silva, M. Sosa-Garrocho, R. Moreno-Sánchez, Determining and understanding the control of glycolysis in fast-growing tumor cells, *FEBS J.* 273 (2006) 1975–1988.
- [55] A. Marín-Hernández, J.C. Gallardo-Pérez, S. Rodríguez-Enríquez, R. Encalada, R. Moreno-Sánchez, E. Saavedra, Modeling cancer glycolysis, *Biochim. Biophys. Acta BBA Bioenerg.* 1807 (2011) 755–767.
- [56] P.H. Maxwell, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe, Activation of the HIF pathway in cancer, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11 (2001) 293–299.
- [57] G.L. Wang, B.H. Jiang, E.A. Rue, G.L. Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular  $O_2$  tension, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 5510–5514.
- [58] B.H. Jiang, E. Rue, G.L. Wang, R. Roe, G.L. Semenza, Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 1771–1777.
- [59] L. Dang, D.W. White, S. Gross, B.D. Bennett, M.A. Bittinger, E.M. Driggers, V.R. Fantin, H.G. Jiang, S. Jin, M.C. Keenan, K.M. Marks, R.M. Prins, P.S. Ward, K.E. Yen, L.M. Liau, J.D. Rabinowitz, L.C. Cantley, C.B. Thompson, M.G. Vander Heiden, S.M. Su, Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate, *Nature* 462 (2009) 739–744.

- [60] M.A. Selak, S.M. Armour, E.D. MacKenzie, H. Boulahbel, D.G. Watson, K.D. Mansfield, Y. Pan, M.C. Simon, C.B. Thompson, E. Gottlieb, Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- $\alpha$  prolyl hydroxylase, *Cancer Cell* 7 (2005) 77–85.
- [61] W. Xu, H. Yang, Y. Liu, Y. Yang, P. Wang, S.-H. Kim, S. Ito, C. Yang, P. Wang, M.-T. Xiao, L. Liu, W. Jiang, J. Liu, J. Zhang, B. Wang, S. Frye, Y. Zhang, Y. Xu, Q. Lei, K.-L. Guan, S. Zhao, Y. Xiong, Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases, *Cancer Cell* 19 (2011) 17–30.
- [62] A. Salminen, A. Kauppinen, M. Hiltunen, K. Kaarniranta, Krebs cycle intermediates regulate DNA and histone methylation: epigenetic impact on the aging process, *Ageing Res. Rev.* 16 (2014) 45–65.

**The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect**

**Mónica Rosas Lemus<sup>1,2,\*</sup>, Elodie Roussarie<sup>1,2,\*</sup>, Nouredine Hammad<sup>1,2,\*</sup>, Alexis Mougeolle<sup>1,2</sup>, Stéphane Ransac<sup>1,2</sup>, Razanne Issa<sup>1,2</sup>, Jean-Pierre Mazat<sup>1,2</sup>, Salvador Uribe-Carvajal<sup>3</sup>, Michel Rigoulet<sup>1,2</sup>, Anne Devin<sup>1,2,\$</sup>**

\* authors contributed equally

\$ To whom correspondence should be addressed

1. Université Bordeaux, IBGC, UMR 5095, Bordeaux, France

2. Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, Bordeaux, France

Correspondence to: Anne Devin<sup>1,2</sup> Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, 1, rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France. Tel.:+33 556 999 035; Fax:+33 556 999 040; Email: [anne.devin@ibgc.cnrs.fr](mailto:anne.devin@ibgc.cnrs.fr)

3. Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México

Running title: *The Crabtree effect*

Keywords: Crabtree effect, oxidative phosphorylation, fructose 1,6-bisphosphate, glucose-6-phosphate, mitochondria, , metabolic flux, glycolysis, hexose phosphate, mitochondrial respiration, respiratory flux

## ABSTRACT

Evidence for the Crabtree effect was first reported by H. Crabtree in 1929 and is defined as the glucose-induced decrease of cellular respiratory flux. This effect was observed in tumor cells and was not detected in most non-tumor cells. A number of hypotheses on the mechanism underlying the Crabtree effect have been formulated. However, to this day, no consensual mechanism for this effect has been described. In a previous study on isolated mitochondria, we have proposed that fructose-1,6-bisphosphate (F1,6bP), which inhibits the respiratory chain, induces the Crabtree effect. Using whole cells from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model, we show here not only that F1,6bP plays a key role in the process but that glucose-6-phosphate (G6P), a hexose that has an effect opposite to that of F1,6bP on the regulation of the respiratory flux, does as well. Thus, these findings reveal that the Crabtree effect strongly depends on the ratio between these two glycolysis-derived hexose phosphates. Last, *in silico* modeling of the Crabtree effect illustrated the requirement of an inhibition of the respiratory flux by a coordinated variation of glucose-6-phosphate and fructose-1,6-bisphosphate to fit the respiratory rate decrease observed upon glucose addition to cells. In summary, we conclude that two glycolysis-derived hexose phosphates, G6P and F1,6bP, play a key role in the induction of the Crabtree effect.

## INTRODUCTION

The Crabtree effect was first described by H. Crabtree in 1929 and is defined as the glucose-induced decrease of cellular respiratory flux (1). This effect was observed in tumor cells and had no occurrence in most non-tumor cells (1). Consequently, studies aiming to decipher the molecular mechanism leading to the Crabtree effect were mostly conducted by comparing tumor cell lines and their non-tumorigenic counterpart. The origin of the glucose-induced repression of cellular respiratory flux has long been sought and even though a number of hypotheses have been formulated, its triggering mechanism(s) is (are) still unknown. It is possible that its induction may be due to a combination of several factors (2). In

some tumor cells, a drastic decrease in phosphate (Pi) was observed upon glucose addition and the Crabtree effect was eliminated by adding an excess of Pi. This led the authors to propose that a decreased cytosolic Pi concentration was the actual trigger of this phenomenon (3). Another hypothesis is that the glycolytic enzymes (phosphoglycerate kinase and pyruvate kinase) compete with mitochondria for free cytoplasmic ADP (2, 4). Addition of glucose would trigger an overactive glycolysis that would outcompete mitochondria for ADP uptake. ADP being one of the substrates of the mitochondrial ATP synthase, the activity of this enzyme would decrease and so would mitochondrial respiration. However this hypothesis might not hold true *in vivo* since the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT)  $K_M$  is almost 100-times lower than that of the glycolytic enzymes (5). Consequently mitochondria would still import cytosolic ADP regardless of glycolysis activation. In the same line of thought, it has been shown that the thermodynamic phosphate potential (i.e. [ATP/ADP $\times$ Pi]) changes in response to glucose addition to sarcoma ascites tumor cells (6), due to a decrease in both ADP and Pi.

Cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels have also been proposed as being responsible for the Crabtree effect. Indeed, one study showed that glucose addition increased mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake inhibiting the ATP synthase (7). However, such a regulation cannot be proposed as an unequivocal mechanism of induction of the Crabtree effect since in a hepatoma cell line Ca<sup>2+</sup> levels did not change in response to glucose (2).

It has also been proposed that since the mitochondrial outer membrane regulates the access of substrates to the intermembrane space, it could regulate oxidative phosphorylation rate (8). Indeed if ADP or the respiratory substrates were kept in the cytoplasm this would induce a decrease in respiratory flux. In agreement with this hypothesis, it has been shown that, in proteoliposomes, physiological concentrations of NADH close reconstituted porin (the external mitochondrial membrane main permeability barrier) (9). It has also been shown that within normal adult cardiomyocytes and HL-1 cardiac cell line, intracellular local diffusion restrictions of adenine nucleotides and metabolic feedback regulation of respiration via phosphotransfer networks are

different, most probably as a result of differences in structural organization of these cells (10). Cardiomyocytes contain tight complexes where mitochondria and  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ATPases are organized to ensure effective energy transfer and feedback signaling via specialized pathways. In contrast, these complexes do not exist in HL-1 cells, which exhibit less organized energy metabolism (11). Hence diffusion restrictions are most likely not involved in the induction of the Crabtree effect.

Some years ago work from our laboratory pointed to a possible induction of the Crabtree effect by glycolysis derived hexoses phosphate, namely F1,6bP (12). We showed that on isolated mitochondria, F1,6bP inhibits mitochondrial respiratory chain whereas G6P stimulates it. More precisely, at physiological levels, F1,6bP inhibits mitochondrial complexes III and IV (12). This inhibition was shown on mitochondria isolated from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and on mitochondria isolated from rat liver (mammalian mitochondria). However, no inhibition from F1,6bP was observed on mitochondria isolated from Crabtree negative yeast – yeast that do not harbor an inhibition of cellular respiration when glucose is added to the culture medium. These results led us to propose that F1,6bP that accumulated within the cell upon glucose addition was responsible for the induction of the Crabtree effect.

We show here on whole cells of *Saccharomyces cerevisiae* that glycolysis hexose phosphate, namely glucose-6-phosphate that activates the respiratory chain and fructose-1,6-bisphosphate that inhibits the respiratory chain play a crucial role in the induction of the Crabtree effect. We show that not only the F1,6bP-induced inhibition of the respiratory chain plays a role in the induction of the Crabtree effect but also, the activation of the respiratory chain by G6P is important. In comparable stoichiometries, both hexose phosphates have opposite effects on the respiratory chain activity. Thus, the induction of the Crabtree effect depends on the ratio between these two hexose phosphates. Last, in silico modeling of the Crabtree effect taking into account our experimental results shows that the hexose phosphates-induced kinetic regulation of respiratory chain activity is mandatory to observe the Crabtree effect.

## RESULTS

### *The Crabtree effect is due to an inhibition of the mitochondrial respiratory chain*

We investigated the induction of the Crabtree effect in our model *Saccharomyces cerevisiae*. As previously shown (12), glucose addition to yeast cells grown on non-fermentative substrate, induced a decrease in respiratory rate (Figure 1A). In order to determine whether this inhibition was due to a respiratory chain inhibition or to a decrease in the phosphorylation processes at the mitochondrial level, we assessed the respiratory rate under uncoupled conditions – where the respiratory chain flux is at a maximal rate –. Upon glucose addition, the uncoupled respiratory rate of wild type cells decreased (Figure 1A), pointing to respiratory chain inhibition. Glucose addition did not modify significantly adenine nucleotides or inorganic phosphate (Figure 1C). These results rule out an involvement of ADP or Pi on the induction of the Crabtree effect in the *Saccharomyces cerevisiae* wild type strain.

To this day, the only mechanism proposed for the glucose-induced respiratory chain inhibition is the effect of fructose-1,6-bisphosphate, a glycolysis intermediary that accumulates upon glucose addition to cells (12). We thus measured this intermediate in wild type cells upon glucose addition. Figure 1B shows that whereas in cells grown on lactate as a carbon source fructose-1,6-bisphosphate concentration is quite low, it significantly rises up eight times upon glucose addition.

### *Deletion of hexokinase 2 prevents the induction of the Crabtree effect*

To further investigate the role of F1,6bP on the induction of the Crabtree effect we explored means to alter the accumulation of glycolysis metabolites in response to glucose addition. Hexokinase is the first enzyme of the glycolysis pathway. There are a number of isoenzymes in both yeast and mammalian cells. However hexokinase2 (hvk2) is the predominant hexokinase during growth on glucose. It is the yeast homolog of glucokinase, which is overexpressed in tumor cells and it is not inhibited by its product, glucose-6-

phosphate. As a consequence its activity should result in high accumulation of glycolysis intermediates in response to glucose addition (13). We thus studied the induction of the Crabtree effect in a *hvk2*-deletion strain. In the  $\Delta$ *hvk2* strain, no inhibition of the respiratory rate was observed upon glucose addition (Figure 2A). In the  $\Delta$ *hvk2* strain neither adenine nucleotides nor inorganic phosphate concentrations were significantly affected upon glucose addition (Figure 2D).

To ensure that in  $\Delta$ *hvk2* cells the absence of respiratory rate inhibition was not due to no variation or decreased F1,6bP accumulation in response to glucose addition, we measured fructose-1,6-bisphosphate concentration. Figure 2B shows that whereas fructose-1,6-bisphosphate concentration is low in cells grown on lactate as a carbon source, upon glucose addition its concentration rises significantly in the  $\Delta$ *hvk2* cells. However, upon glucose addition the overall concentration remains slightly lower in the  $\Delta$ *hvk2* cells as compared to the wild type cells (see figure 1). It has previously been shown that glucose-6-phosphate antagonizes the fructose-1,6-bisphosphate effect on respiratory chain activity: it activates the respiratory chain (12). We thus determined the glucose-6-phosphate concentration change in response to glucose addition both in wild type and  $\Delta$ *hvk2* cells. Glucose addition induced a significant increase in glucose-6-phosphate in  $\Delta$ *hvk2*, whereas the increase of G6P in wild type cells is lower and not statistically significant (Figure 2C).

#### ***Not only F1,6bP but also G6P plays a crucial role in the induction of the Crabtree effect***

HAP4p (master regulator of the HAP transcription complex) plays a crucial role in the orientation of fermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (14). Hap4p is the activator subunit of the transcriptional complex involved in carbon source-dependent regulation of respiratory function (15; 16). Transcription of this subunit is glucose repressible (16), suggesting that Hap4p is the key component of the complex in terms of its control of transcriptional activity in response to carbon source. Thus a strain overexpressing HAP4p should exhibit an increased mitochondrial content and a strong orientation of energetic metabolism towards respiratory

metabolism, altering the relationship between glycolysis intermediates and respiratory rate. In this strain, glucose addition did not inhibit the respiratory rate (Figure 3A) whereas the Crabtree effect was present in the wild type cells (control cells harboring an empty plasmid). Measurements of both adenine nucleotides and inorganic phosphate showed that these parameters were mostly unaffected upon glucose addition in both the wild type strain and the strain overexpressing the HAP4p subunit (Figure 3D).

Whereas fructose-1,6-bisphosphate concentration is quite low in cells grown on lactate as a carbon source, it increases upon glucose addition in both the wild type and the HAP4p overexpressing cells (Figure 3B). The absence of an induction of the Crabtree effect in the HAP4p overexpressing cells is thus not due to an absence of fructose-1,6-bisphosphate accumulation upon glucose addition even though in the HAP4p overexpressing cells, F1,6bP never reaches a concentration comparable to the one in the wild type cells. We next investigated the effect of glucose on glucose-6-phosphate (which stimulates the respiratory chain) concentration in wild type cells and in cells overexpressing HAP4p. For each strain, glucose-6-phosphate does not vary significantly upon glucose addition (Figure 3C). However, its concentration is significantly doubled in the HAP4p overexpressing cells as compared to the wild type cells (see Figure 3C). This result could imply an increase in the antagonist effect of glucose-6-phosphate on the activity of the respiratory chain in HAP4p overexpressing cells.

#### ***The sensitivity of mutant cells to F1,6bP-mediated inhibition is maintained***

The results described above raised the question of whether the respiratory chain from  $\Delta$ *hvk2* and HAP4p-overexpressing cells remained sensitive to F1,6bP. To address this question, we studied the respiratory chain F1,6bP-mediated inhibition on the respiratory activity of nystatin-permeabilized spheroplasts from each of the strains of interest (17).

Figure 4 (A&B) clearly shows that there are no significant difference in the F1,6bP-mediated inhibition between the wild type and the mutant cells. Thus the absence of Crabtree effect

induction in the  $\Delta$ hvk2 and HAP4p overexpressing cells was not due to a modulation of the respiratory chain response to F1,6bP.

A similar experiment was performed with G6P in order to ensure that respiratory chains in mutant cells were indeed stimulated by this hexose phosphate (data not shown). However, upon its addition to spheroplasts G6P was steadily metabolized into F1,6bP making such a control experiment impossible.

***Both glucose-6phosphate and fructose-1,6-bisphosphate play a crucial role in the induction of the Crabtree effect.***

As mentioned above, whereas F1,6bP has been shown to inhibit mitochondrial respiratory chain, G6P stimulates it. In our previous paper, on isolated mitochondria (12), we showed that, in the presence of G6P, F1,6bP inhibited the mitochondrial respiratory chain only above the point where a stoichiometric amount of each hexose was required i.e. the respiratory chain is inhibited when the G6P/F1,6bP ratio drops below 1. In order to determine whether in whole cells the G6P/F1,6bP ratio rather than the F1,6bP concentration alone was the key inducer of the Crabtree effect, we assessed this ratio in wild type,  $\Delta$ hvk2 and HAP4 overexpressing cells. Figure 5 clearly shows that whereas the G6P/F1,6bP ratio drops well below 1 in wild type cells upon glucose addition, it stays pretty close to this value in the  $\Delta$ hvk2 and HAP4 overexpressing cells.

***The G6P/F1,6bP ratio is the key player for the induction of the Crabtree effect.***

If our hypothesis stands true, i.e. the induction of the Crabtree effect relies upon the G6P/F1,6bP ratio, this ratio may be manipulated in our mutant cells to trigger the Crabtree effect. To perform this experiment, yeast cells were grown in galactose medium, where the glycolysis pathway is active and the glycolytic enzymatic content is higher than in a non-fermentable medium (used in our previous experiments). The reasoning behind this is that in order to accumulate more F1,6bP in our mutant cells, and thus decrease the G6P/F1,6bP ratio, active glycolytic enzymes are required. Consequently, wild type and mutant cells were grown on galactose medium and the Crabtree effect was induced by the addition of 60mM glucose. Figure 6A shows that upon glucose

addition, wild type and mutant ( $\Delta$ hvk2 and HAP4 overexpressing) cells exhibit a statistically significant Crabtree effect as well as a consequent increase in F1,6bP concentration in wild type and mutant cells (Figure 6B) while the variations of G6P concentration are not statistically significantly different (Figure 6C). So in galactose-grown wild type or mutant cells, glucose induced both a Crabtree effect and a decrease in the G6P/F1,6bP ratio, even if the effect of glucose addition was lower than the one observed in cells grown in non fermentative medium (figure 1A). It should be stressed here that the respiratory rate inhibition upon glucose addition when cells are grown on galactose medium is lower (but still statistically significant) than the one assessed when cells are grown on non fermentative medium (figure 1A); this stands true for all three strains. However, in these cells and in the absence of glucose, G6P/F1,6bP ratio is already below one (figure 6D), due to an active glycolysis. Thus in this experimental setup, the respiratory chain is most likely already slightly inhibited due to a concentration of F1,6bP a bit higher than the G6P concentration.

***An in silico study of the Crabtree effect confirms a role for glycolysis derived hexoses phosphate***

There are good models of yeast metabolism with an accurate representation of the kinetics of glycolytic enzymes. It was thus tempting to see whether these models, developed for other purposes, would reproduce the experimental features of the Crabtree effect. We choose the recent model of Smallbone et al. (21) developed to fit the experimental glycolytic metabolites concentrations and to calculate the control coefficients of the glycolytic enzymes on the glycolytic flux. Two questions were addressed here: (i) do we reproduce *in silico* the experimental variations of F1,6bP and G6P and (ii) is a regulation by these metabolites necessary to obtain the Crabtree effect or could the Crabtree effect be obtained independently of such a regulation? To do so, as described in the Materials and Methods section and considering our previous experimental results (12) we introduced a regulatory function which is a Hill function of the G6P/F1,6bP ratio. Because the ATP and ADP concentrations did not

appreciably change experimentally, we fixed their values in the model to the experimental values.

Concerning the effect on respiratory rate ( $VO_2 = OXPHOS\_NADH + OXPHOS\_LAC$ ), in the absence of regulation of the OXPHOS rate by the G6P/F1,6bP ratio, the addition of a high concentration of glucose (60 mM) slightly increases the respiratory rate about 4%. This increase is entirely due to an increase in OXPHOS\_NADH as expected (NADH increases upon glucose addition to cells). OXPHOS\_LAC is fixed due to the fixed ratio ATP/ADP (Table 1 & figure 7). In the presence of a regulation of the OXPHOS rate by the G6P/F1,6bP ratio, both OXPHOS\_NADH and OXPHOS\_LAC decrease when glucose increases (up to 60 mM) (Table 2). OXPHOS\_NADH shows a lower value at high glucose concentration due to a low G6P/F1,6bP value, despite the higher concentration of NADH. Respiratory rate ( $VO_2 = OXPHOS\_NADH + OXPHOS\_LAC$ ) decreases by about 20% (Table 2 & figure 8), in accordance with experimental values (see Fig. 4 for example)

Figure 9 A and B show that the concentrations of F1,6bP and G6P obtained in the model are close to the experimental values. They do not depend much upon the presence of the regulatory Hill function of the G6P/F1,6bP ratio. At low glucose concentration, the F1,6bP is equal to 0.6 as compared to an experimental value of 1 and the G6P value is equal to 1.8 as compared to an experimental value of 2 which gives a G6P/F1,6bP ratio of 2.6 as compared to the experimental value of 2. In the presence of high concentrations of glucose, both concentrations reach values between 7.8 and 8.7 mM for F1,6bP and between 3.12 and 3.16 for G6P (the experimental values being between 8 and 9 and between 3.3 and 3.7 respectively) which gives G6P/F1,6bP values around 0.4 as compared to experimental values between 0.3 and 0.4). Consequently, the results of Fig. 9 show that the model actually fits the experimental values of F1,6bP and G6P and their increase in the presence of glucose. Thus, modeling illustrates the need to consider the G6P- and F1,6bP-mediated modulation of oxidative phosphorylation in order to simulate the decrease in the respiratory rate observed after glucose addition.

Last, we plotted the relationship between the rate of respiration and the G6P/F1,6bP ratio with the values obtained throughout this work (Figure 10). The points, coming from figures 1, 2 and 3 (summarized in Fig. 5) and from figure 6 are remarkably gathered, which substantiate our hypothesis of an apparent regulation of the Crabtree effect induction by the G6P/F1,6bP ratio. In optimizing the parameters K of the model to fit the experimental results drawn in Fig. 10, we found that  $K = 0.27$  gives a good fit of the experimental results, perfectly describing the inhibition of respiration for G6P/F1,6bP values below 0.7-0.8. As stressed previously, we show that when this ratio is above 0.8, no inhibition of the respiratory rate is observed. Further, the calculation of the G6P/F1,6bP ratio from the literature on ascite tumor cells (2, 6). shows that it decreases upon glucose addition to cells and the plot of the first values corresponding to ascite tumor cells is in accordance with our values in yeast (Figure 10). Of note, these authors respiratory rate inhibition is higher than what is seen in yeast, most likely due to the synergistic effects of hexoses phosphate and phosphate potential.

## DISCUSSION

The Crabtree effect was first evidenced by H. Crabtree in 1929 (1). Ever since then a number of studies were conducted on different models in order to decipher the molecular mechanisms responsible for the inhibition of the respiratory rate upon glucose addition. A number of hypotheses were formulated, depending on the cellular model and the experimental conditions used. However, to this day no unifying mechanism has been evidenced. We have previously shown that glycolysis-derived hexose phosphates were able to stimulate (G6P) or inhibit (F1,6bP) the mitochondrial respiratory chain. This previous work was done on mitochondrial isolated either from yeast or rat liver. The F1,6bP-induced inhibition of the respiratory chain led us to propose that the accumulation of this metabolite upon glucose addition to cells was a key player in the induction of the Crabtree effect. However, these experiments were mostly conducted on isolated mitochondria as a model system. In this paper, we used whole yeast cells, which are a more



physiological model to study the molecular events leading to the Crabtree effect.

We assessed a number of parameters upon induction of the Crabtree effect. Parameters that were proposed to be responsible for this effect, such as ADP, Pi and the phosphate potential did not vary appreciably under our experimental conditions, regardless of the glucose concentration used to induce the Crabtree effect. Furthermore, the fact that the uncoupled respiratory rate is decreased upon glucose addition clearly points to a respiratory chain inhibition as the source of the Crabtree effect. Should ADP and Pi be responsible for this effect, they would decrease the cellular respiratory rate and yet have no effect on the uncoupled respiratory rate. G6P concentration varied only marginally upon glucose addition in wild type cells. In contrast, F1,6bP accumulated widely while the respiration is inhibited. In order to strengthen our hypothesis that the increase in F1,6bP and G6P are one of the cause of the Crabtree effect induction, we used different means to vary their concentrations, including culture media and mutations. The assessment of G6P and F1,6bP concentrations in the wild type as well as in the mutant strains demonstrated that not only was F1,6bP accumulation mandatory for the induction of the Crabtree effect but that the G6P intracellular concentration plays a key role too. Indeed, G6P stimulates the mitochondrial respiratory chain, antagonizing the F1,6bP mediated inhibition in such a way that the ratio between G6P and F1,6bP has to be below 0.7-0.8 to trigger a Crabtree effect (Figure 10) i.e. the cytoplasmic concentration of F1,6bP has to be slightly higher than that of G6P. It should be stressed here that on isolated mitochondria the ratio between these hexoses also has to be below one in order to inhibit the respiratory chain (12). Finally an *in silico* model developed in (21) predicts an increase in the hexose phosphate concentrations following the addition of glucose and the simulated G6P/F1,6bP ratio changes in response to glucose addition were quantitatively in good agreement with our experimental results. However, the main interest of the model was to show that it is mandatory to implement the G6P/F1,6bP ratio- induced modulation of oxidative phosphorylation in order to reproduce the glucose-mediated decrease in respiratory rate observed after the addition of glucose to cells.

To summarize our study we plotted the rate of respiration as a function of the G6P/ F1,6bP ratio for all our experimental conditions (see fig. 10). The fact that all points are remarkably gathered drawing a smooth curve with a threshold around 0.7-0.8 indicates that the G6P/ F1,6bP ratio is a rather good variable to express the antagonist effect of G6P and F1,6bP on the respiratory chain (12). Moreover, tumor cell lines exhibit the Crabtree effect (1, 2) and previous work from the literature on ascite tumor cells have shown that the concentrations of hexose phosphate increase upon glucose addition (2, 6). The calculation of the G6P/F1,6bP ratio from these data shows that it decreases upon glucose addition to cells and the plot of the first values corresponding to ascite tumor cells is in accordance with our values corresponding to yeast cells (see fig. 10). This further reinforces both our results and our hypothesis of a role of the G6P/ F1,6bP ratio in the induction of the Crabtree effect. We propose that hexoses phosphates that arise from glycolysis, namely G6P and F1,6bP play a key role in the induction of the Crabtree effect. Further studies will be necessary to determine whether such a mechanism applies to a number of cell types.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Yeast strains, culture medium and growth conditions

The following yeast strains were used in this study: BY4742 (MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0); BY4742  $\Delta$ hap4 (MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; hap4 :: kanMX4); BY4742  $\Delta$ Hxk2 (MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; Hxk2 :: kan MX4). Cells were grown aerobically at 28°C in the following medium: 0.175% yeast nitrogen base w/o sulfate (Difco), 0.2% casein hydrolysate (Merck), 0.5% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2% lactate (w/v) (Prolabo), pH 5.5, 20 mg.L<sup>-1</sup> L-tryptophan (Sigma), 40 mg.L<sup>-1</sup> adenine hydrochloride (Sigma) and 20 mg.L<sup>-1</sup> uracil (Sigma). When cells carried a plasmid (pTET-HAP4 (18)), the relevant amino-acid was omitted from the medium. Growth was measured at 600 nm in a Safas spectrophotometer (Monaco). Dry weight determinations were performed on samples of cells harvested throughout the growth period and washed twice in distilled water. Cellular volume determination was

performed measuring the median cell volume of asynchronous yeast cell cultures using a Coulter-counter apparatus (Beckman-Coulter). The volumes stipulated in Table 3 were determined.

#### Oxygen consumption assays:

Oxygen consumption was measured polarographically at 28°C using a Clark oxygen electrode in a 1 ml thermostatically controlled chamber. Respiratory rates ( $JO_2$ ) were determined from the slope of a plot of  $O_2$  concentration versus time. Respiration assays of growing cells were performed in the growth medium except in the case of uncoupled respiration (10 $\mu$ M CCCP), where 100mM ethanol was added in order to avoid any kinetic control upstream the respiratory chain.

#### Adenine nucleotides measurement:

Cellular extracts were prepared by an ethanol extraction method adapted from the one described in (19). Briefly, cells were harvested by rapid filtration on nitrocellulose filter (1  $\mu$ m). The filter was immediately dropped into a glass tube containing 5 ml of ethanol/Hepes 10mM pH 7.2 (4/1), and the tube was then incubated at 80°C for 3 min. The mixture was cooled down on ice for at least 3 min, and the ethanol/HEPES solution was eliminated by evaporation using a rotavapor apparatus. The residue was suspended in 500  $\mu$ l of water. Insoluble particles were eliminated by centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C) and adenine nucleotides content was determined on the supernatant. ATP and ADP were measured using a luciferin/luciferase enzymatic kit (ATPlite 1step, Perkin Elmer). For ADP content determination, the extract was incubated for a half hour at 28°C in the following buffer:  $KH_2PO_4$  75mM,  $MgSO_4$  15mM, phosphoenolpyruvate 0.1mM and 1U pyruvate kinase in order to transform ADP into ATP, then quantified using the ATPlite kit.

#### Inorganic phosphate determination:

Inorganic phosphate was determined according to the method of Sumner (20)

#### Hexoses phosphate measurements:

Glycolysis hexose phosphates were measured in the following buffer: 50 mM Triethanolamine, 7.5 mM  $MgCl_2$ , 3.75 mM EDTA. G6P was measured in the presence of 1 mM  $NAD^+$  and 0.3 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase.

NADH absorbance was followed at 340nm and the signal was calibrated with standard NADH of known concentration.

F1,6bP was measured in the following buffer: Triethanolamine 50 mM,  $MgCl_2$  7,5 mM, EDTA 3,75 mM, 1 mM  $NAD^+$ , 1 mM Pi, 1 mM ADP, 0.6 U/ml phosphoglycerate kinase and 0.3U/ml aldolase. The reaction was started by adding 0.3U/ml glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase. NADH absorbance was followed at 340nm and the signal was calibrated with standard NADH.

#### Spheroplasts preparation :

Spheroplasts were obtained according to Avéret *et al.* (17) and were suspended in the following buffer : 1 M sorbitol, 1.7 mM NaCl, 0.5 mM EGTA, 10 mM KCl, 1 mM potassium phosphate, 10 mM Tris-HCl, 10 mM  $NH_4Cl$ , 6 mM iodoacetate whenever required, and 1 % bovine serum albumin, pH 6.8. Protein determination was done using the biuret method with BSA as a standard.

#### Model description:

To further investigate the role of glycolysis hexoses phosphates in the induction of the Crabtree effect, we performed an *in silico* study of the induction of this effect. We started from a yeast glycolysis model developed in (21). This model involved a detailed description of all glycolysis reactions as well as the pathway from pyruvate to ethanol through acetaldehyde (pyruvate decarboxylase (PDC) and alcohol dehydrogenase (ADH)) and two branches: one towards acetate (acetate branch: acetaldehyde  $\rightarrow$  acetate) and the other towards succinate thus summarizing most of the TCA cycle (succinate branch: pyruvate  $\rightarrow$  succinate).

We adapted this model to our experimental conditions by suppressing the acetate branch and replacing the succinate branch by a more detailed representation of the TCA cycle involving pyruvate dehydrogenase (PDH) and the TCA cycle reactions: acetyl-CoA + 4 NAD + ADP + Pi  $\rightarrow$  4 NADH + ATP, both modeled by an irreversible mass action equation. For the sake of simplicity, the reduction of quinone Q within the TCA cycle was replaced by the reduction of an extra molecule

of NAD which has the same proton stoichiometry in yeast since *Saccharomyces cerevisiae* does not contain a proton pumping complex I. Instead of the acetate branch we added a reaction called ALD\_ACS (acetaldehyde dehydrogenase and acetyl-CoA synthase) that represents the production of acetyl-CoA from acetaldehyde: acetaldehyde + NAD + ATP → Acetyl-CoA + NADH + ADP + Pi, also modeled by an irreversible mass action equation. PDC and ALD\_ACS is the major pathway of pyruvate entry in the TCA cycle in our experimental conditions in which two substrates (NADH and lactate) are feeding the respiratory chain in different entry points. Thus the OXPHOS modeling involves two equivalent reactions with different stoichiometries:

- 1/ OXPHOS\_NADH : NADH + 1.5 ADP + 1.5 Pi → NAD + 1.5 ATP
- 2/ OXPHOS\_LAC : Lactate + ADP + Pi → Pyruvate + ATP

Both reactions are considered as irreversible and modeled by a Henri-Michaelis-Menten equation (22) with two inhibitor terms (INH\_ATP and GF\_Inhib):

$$OXPHOS\_NADH = \frac{V_{\max\_NADH} \times GF\_inhib \times INH\_ATP \times NADH \times ADP}{K_{NADH} \times K_{ADP} \times \left(1 + \frac{NADH}{K_{NADH}}\right) \times \left(1 + \frac{ADP}{K_{ADP}}\right)}$$

$$OXPHOS\_LAC = \frac{V_{\max\_lactate} \times GF\_inhib \times INH\_ATP \times lactate \times ADP}{K_{lactate} \times K_{ADP} \times \left(1 + \frac{lactate}{K_{lactate}}\right) \times \left(1 + \frac{ADP}{K_{ADP}}\right)}$$

With:

$$INH\_ATP = \frac{2 * KA}{KA + \frac{ATP}{ADP}}$$

## ACKNOWLEDGEMENTS:

This work was supported by the CNRS (Conseil National de la Recherche Scientifique), the Comité de Dordogne & Gironde de la Ligue Nationale Contre le Cancer, The Fondation ARC pour la recherche sur le Cancer, the Plan cancer 2014-2019 No BIO 2014 06 and the French Association against Myopathies. This project has been funded with support of the European Commission (HN PhD). This publication reflects the view only of the author, and the European Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein. The authors wish to thank Cyrielle Bouchez and Louise Injarabian for technical help. The authors wish to thank Dr. Manuel Rojo and Dr. Arnaud Mourier for careful proofreading of the manuscript and constructive discussions.

$$GF\_Inhib = \frac{\left(\frac{G6P}{F1,6bP}\right)^4}{K^4 + \left(\frac{G6P}{F1,6bP}\right)^4}$$

$$V_{\max\_NADH}=50 \text{ mM/s and } V_{\max\_lactate}=33 \text{ mM/s}$$

$$K_{ADP}=1 \text{ mM}; K_{lactate}=1 \text{ mM}; K_{NADH}=1 \text{ }\mu\text{M}$$

INH\_ATP function is a decreasing hyperbola representing the OXPHOS inhibition at high ATP concentration (KA=1)

GF\_Inhib term summarizes the activation and inhibition by G6P and F1,6bP respectively (K=0.005). It is a sigmoid function of the ratio G6P / F1,6bP taking values between 0 and 1.

The concentration and flux values at steady-state are obtained using Copasi (<http://copasi.org/>). The .xml file of the model is given in the supplementary data.

## Data Analysis

Data are presented as mean ± SEM. Differences between substrate conditions were analyzed by *t* test, with the following code in the figures: (\*) for  $p < 0.05$ , (\*\*) for  $p < 0.01$ , (\*\*\*) for  $p < 0.001$  and (\*\*\*\*) for  $p \ll 0.001$ . When comparing different values obtained in the same experiment (typically the value without glucose and the value with glucose added in the same sample) the mean of the differences was compared to zero (matched pairs differences) with the same representation code in the figures.

## CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The corresponding author declares no conflict of interests on behalf of all authors

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

AD conceived and coordinated the study and wrote the paper. MR and SUC coordinated the study. MRL, ER, NH and AM designed, performed and analyzed the experiments. JPM and SR designed, and analyzed the model. JPM performed statistical analysis of the data in this paper. RI performed and analyzed the model. NH contributed to the preparation of the figures. All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript

## REFERENCES

1. Crabtree, H. G. (1929) Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem. J.* 23, 536–545
2. Rodriguez-Enriquez, S., Juarez, O., Rodriguez-Zavala, J. S., and Moreno-Sanchez, R. (2001) Multisite control of the Crabtree effect in ascites hepatoma cells. *Eur J Biochem.* 268(8),2512-9.
3. Koobs, D. H. (1972) Phosphate mediation of the Crabtree and Pasteur effects. *Science.* 178, 127–133
4. Weinhouse, S. (1972) Glycolysis, respiration, and anomalous gene expression in experimental hepatomas: GHA Clowes memorial lecture. *Cancer Res.* 32, 2007–2016
5. Veech, R. L., Lawson, J. W., Cornell, N. W., and Krebs, H. A. (1979) Cytosolic phosphorylation potential. *J. Biol. Chem.* 254, 6538–6547
6. Sussman, I., Erecińska, M., and Wilson, D. F. (1980) Regulation of cellular energy metabolism: the Crabtree effect. *Biochim. Biophys. Acta.* 591, 209–223
7. Wojtczak, L., Teplova, V. V., Bogucka, K., Czyż, A., Makowska, A., Więckowski, M. R., Duszyński, J., and Evtodienko, Y. V. (1999) Effect of glucose and deoxyglucose on the redistribution of calcium in Ehrlich ascites tumour and Zajdela hepatoma cells and its consequences for mitochondrial energetics. *Eur. J. Biochem.* 263, 495–501
8. Saks, V., Belikova, Y., Vasilyeva, E., Kuznetsov, A., Fontaine, E., Keriel, C., and Leverve, X. (1995) Correlation Between Degree of Rupture of Outer Mitochondrial Membrane and Changes of Kinetics of Regulation of Respiration by ADP in Permeabilized Heart and Liver Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 208, 919–926
9. Zizi, M., Forte, M., Blachly-Dyson, E., and Colombini, M. (1994) NADH regulates the gating of VDAC, the mitochondrial outer membrane channel. *J. Biol. Chem.* 269, 1614–1616
10. Anmann, T., Guzun, R., Beraud, N., Pelloux, S., Kuznetsov, A. V., Kogerman, L., Kaambre, T., Sikk, P., Paju, K., Peet, N., Seppet, E., Ojeda, C., Tourneur, Y., and Saks, V. (2006) Different kinetics of the regulation of respiration in permeabilized cardiomyocytes and in HL-1 cardiac cells: Importance of cell structure/organization for respiration regulation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1757, 1597–1606
11. Eimre, M., Paju, K., Pelloux, S., Beraud, N., Roosimaa, M., Kadaja, L., Gruno, M., Peet, N., Orlova, E., Remmelkoor, R., Piirsoo, A., Saks, V., and Seppet, E. (2008) Distinct organization of energy metabolism in HL-1 cardiac cell line and cardiomyocytes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1777, 514–524
12. Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., and Rigoulet, M. (2008) Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate. A possible role in Crabtree effect induction? *J. Biol. Chem.* 283, 26948–26955
13. Aiston, S., Trinh, K. Y., Lange, A. J., Newgard, C. B., and Agius, L. (1999) Glucose-6-phosphatase overexpression lowers glucose 6-phosphate and inhibits glycogen synthesis and glycolysis in hepatocytes without affecting glucokinase translocation. Evidence against feedback inhibition of glucokinase. *J. Biol. Chem.* 274, 24559–24566

14. van Maris, A. J., Bakker, B. M., Brandt, M., Boorsma, A., Teixeira de Mattos, M. J., Grivell, L. A., Pronk, J. T., and Blom, J. (2001) Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of HAP4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 1, 139–149
15. de Winde, J. H., and Grivell, L. A. (1993) Global regulation of mitochondrial biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 46, 51–91
16. Forsburg, S. L., and Guarente, L. (1989) Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* 3, 1166–1178
17. Avéret, N., Fitton, V., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Guérin, B. (1998) Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol. Cell. Biochem.* 184, 67–79
18. Chevtzoff, C., Yoboue, E. D., Galinier, A., Casteilla, L., Daignan-Fornier, B., Rigoulet, M., and Devin, A. (2010) Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285, 1733–1742
19. Loret, M. O., Pedersen, L., and François, J. (2007) Revised procedures for yeast metabolites extraction: application to a glucose pulse to carbon-limited yeast cultures, which reveals a transient activation of the purine salvage pathway. *Yeast.* 24, 47–60
20. Sumner, J. B. (1944) A METHOD FOR THE COLORIMETRIC DETERMINATION OF PHOSPHORUS. *Science.* 100, 413–414
21. Smallbone, K., Messiha, H. L., Carroll, K. M., Winder, C. L., Malys, N., Dunn, W. B., Murabito, E., Swainston, N., Dada, J. O., Khan, F., Pir, P., Simeonidis, E., Spasić, I., Wishart, J., Weichart, D., Hayes, N. W., Jameson, D., Broomhead, D. S., Oliver, S. G., Gaskell, S. J., McCarthy, J. E. G., Paton, N. W., Westerhoff, H. V., Kell, D. B., and Mendes, P. (2013) A model of yeast glycolysis based on a consistent kinetic characterisation of all its enzymes. *FEBS Lett.* 587, 2832–2841
22. Cornish-Bowden, A., Mazat, J.-P., and Nicolas, S. (2014) Victor Henri: 111 years of his equation. *Biochimie.* 107 Pt B, 161–166

#### **ABBREVIATIONS**

F1,6bP: Fructose-1,6-bisphosphate  
 G6P : Glucose-6-phosphate

## TABLES

Glucose mM	G6P	F1,6bP	G6P/F1, 6bP	OXPHOS_ NADH	OXPHOS_ LAC	VO2	ATPASE	NADH	PYR
0.5	1.81	0.61	2.96	2.94	1.04	3.98	14.29	0.015	1.99
60	3.16	7.49	0.42	3.10	1.04	4.13	14.29	0.08	5.13

**Table 1** : Simulation results without modulation of the respiratory rate by the ratio G6P/F1,6bP.

<b>Glucose mM</b>	<b>G6P</b>	<b>F1,6bP</b>	<b>G6P/F1,6 bP</b>	<b>OXPHOS _NADH</b>	<b>OXPHOS _LAC</b>	<b>VO2</b>	<b>ATPASE</b>	<b>NADH</b>	<b>PYR</b>
<b>0.5</b>	1.81	0.61	2.96	2.94	1.04	3.98	14.29	0.015	1.99
<b>60</b>	3.15	8.50	0.37	2.46	0.82	3.28	14.29	0.09	4.78

**Table 2:** Simulation results with OXPHOS modulation by the ratio G6P/F1,6bP.

Strain	Volume (fentoliter/cell)	±
WT	32	1
$\Delta$ Hxk2	33	1
WTp	37	2
HAP4	63	4

**Table 3** : Cellular volumes of the different strains used in this study. Cellular volume determination was performed as described in the Materials and Methods section. Results are means of at least three separate experiments  $\pm$ SD.



**FIGURES LEGENDS :**

**Figure 1: Study of the Crabtree effect in wild type cells :** (A) Glucose induced decrease in respiratory rate. Glucose concentrations were as follows: none (black), 30mM (gray), 60mM (red) and 90mM (white). (B) fructose-1,6-bisphosphate accumulation and (C) ATP (black), ADP (gray) and Pi (white). Respiratory rates, fructose-1,6-bisphosphate, adenine nucleotides and Pi determination were performed as described in the Materials and Methods section. Results are means of at least three separate experiments  $\pm$ SEM.

**Figure 2: Study of the Crabtree effect in  $\Delta$ hvk2 cells :** (A) Respiratory rate. Glucose concentrations were as follows: none (black), 30mM (gray), 60mM (red) and 90mM (white). and (B) fructose-1,6-bisphosphate accumulation in  $\Delta$ hvk2 cells upon glucose addition. (C) Glucose induced glucose-6-phosphate modulations in wild type (white) and  $\Delta$ hvk2 (black) cells and (D) ATP (black), ADP (gray) and Pi (white) in  $\Delta$ hvk2 cells. Respiratory rates and fructose-1,6-bisphosphate, glucose-6-phosphate, adenine nucleotides and Pi determination were performed as described in the Materials and Methods section. Results are means of at least three separate experiments  $\pm$ SEM.

**Figure 3: Study of the Crabtree effect in HAP4p overexpressing cells** (A) Respiratory rate. Glucose concentrations were as follows: none (black), 30mM (gray), 60mM (red) and 90mM (white). and (B) fructose-1,6-bisphosphate accumulation in wild type (white) and HAP4p overexpressing (black) cells upon glucose addition. (C) Glucose induced glucose-6-phosphate modulations in wild type (white) and HAP4p overexpressing cells (black) cells and (D) ATP (black), ADP (gray) and Pi (white) in wild type and HAP4p overexpressing cells. Respiratory rates, fructose-1,6-bisphosphate, glucose-6-phosphate, adenine nucleotides and Pi determination were performed as described in the Materials and Methods section. Results are means of at least three separate experiments  $\pm$ SEM. HAP4OX :  $\Delta$ hap4 strain harboring a plasmid overexpressing HAP4p. Results are means of at least three separate experiments  $\pm$ SEM.

**Figure 4: Fructose 1,6 bisphosphate-induced inhibition of respiration on permeabilized spheroplasts** (A) Fructose 1,6 bisphosphate-induced inhibition of respiration on permeabilized spheroplasts isolated from wild type (black) and  $\Delta$ hvk2 (red) cells. (B) Fructose 1,6 bisphosphate-induced inhibition of respiration on permeabilized spheroplasts isolated from wild type (black) and HAP4p overexpressing (red) cells. Respiratory rates were measured as described in the Materials and Methods section. Results are means of at least three separate experiments  $\pm$ SEM. The values at F1,6bp = 10 mM are statistically different from the value at F1,6bP = 0 mM for each strain (WT, hvk2 and  $\Delta$ HAP4 OX).

**Figure 5: G6P/F1,6bP ratio in wild type &  $\Delta$ hvk2 (A) and Wtp & HAP4OX (B) overexpressing cells.** The ratios were calculated from Figure 1, 2 and 3 data. Wild type (white) and mutant (black) are represented.

**Figure 6: Study of the Crabtree effect in galactose grown cells without (white) or with (black) glucose.** (A) Glucose induced decrease in respiratory rate (B) fructose-1,6-bisphosphate accumulation (C) glucose-6-phosphate modulation in cells and (D) Data from Figure 6B and 6C were used to calculate the G6P/F1,6bP ratio. Respiratory rates, fructose-1,6-bisphosphate and glucose-6-phosphate were measured as described in the Materials and Methods section Results are means of at least three separate experiments  $\pm$ SEM.

**Figure 7: Theoretical fluxes in the metabolic network with 0.5/60 mM external glucose in the absence of G6P/F1,6bP modulation.** The first value of flux corresponds to 0.5 mM external glucose and the second value to 60 mM external glucose. The red steps have their flux increased after addition of glucose 60 mM and the green ones decreased. The ratio G6P/F1,6bP goes from 2.95 (0.5 mM glucose) to 0.42 (60 mM glucose). A slight OXPHOS activation is observed in this case.

**Figure 8: Theroretical fluxes in the metabolic network with 0.5/60 mM external glucose in the presence of G6P/F1,6BP modulation.** The red steps have their flux increased after addition of glucose and the green ones decreased. An OXPHOS inhibition is observed in this case.

**Figure 9: Experimental (blue, values are from the wild type) and simulated (orange-without inhibition- and green-with inhibition) values of F1,6bP (A) and G6P (B) at various glucose concentrations.**

**Figure 10: Respiratory rate as a function of the [G6P] / [F1,6bP] ratio**

Black full circles correspond to the WT,  $\Delta$ hxx2 and HAP4p overexpressing cells grown on lactate medium (Fig. 1, 2, 3 and 5). Blue full squares correspond to the same strains grown on galactose medium (Figure 6). The red points correspond to values from the literature on ascite tumor cells. red circles are from (2) and red triangles are from (6). The full curve is drawn according to the model described in the Material and Methods section with  $K = 0.27$  in the regulatory Hill's curve as a function of the G6P/F1,6bP ratio (Hill's  $n = 4$ ). The dotted line corresponds to an absence of regulatory Hill's function.

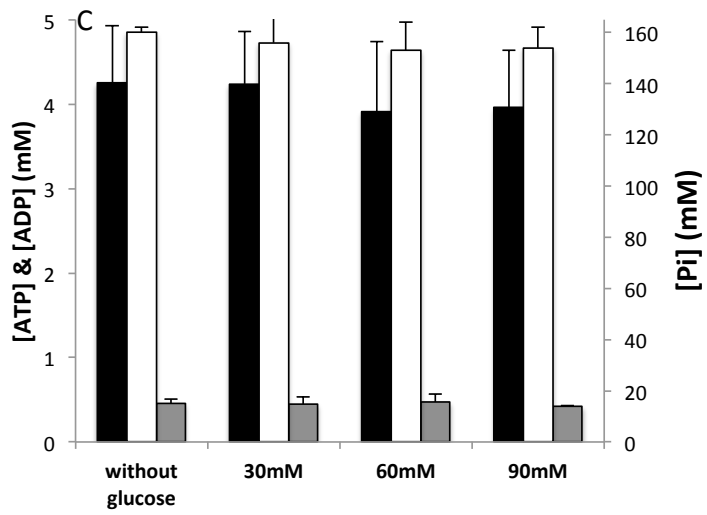
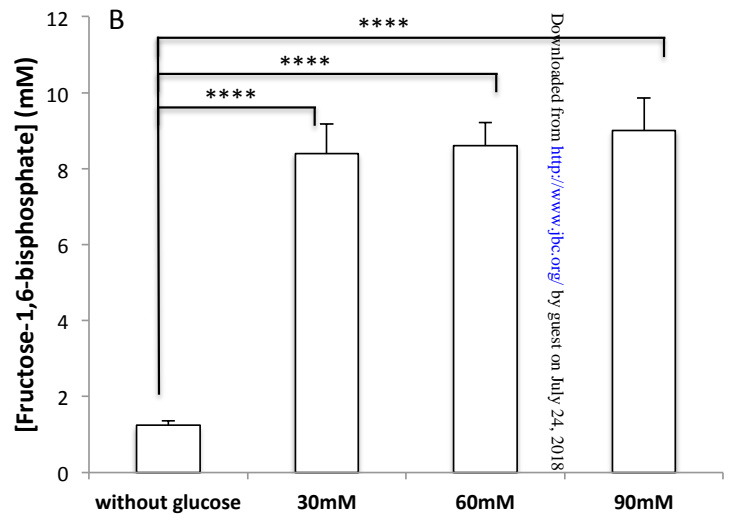
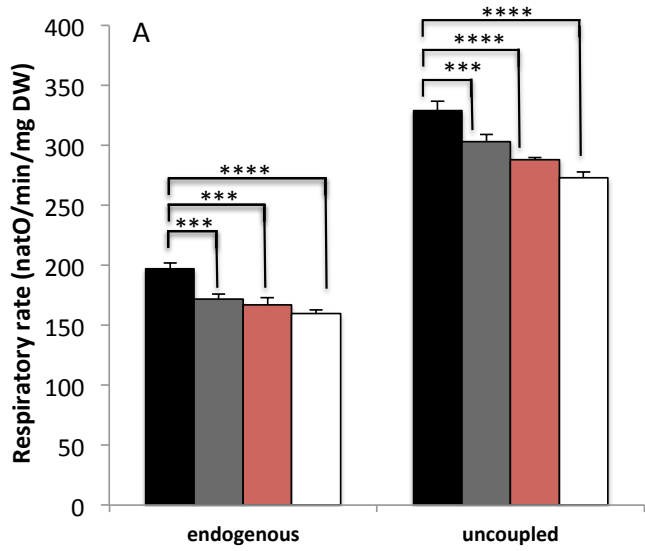


Figure 1

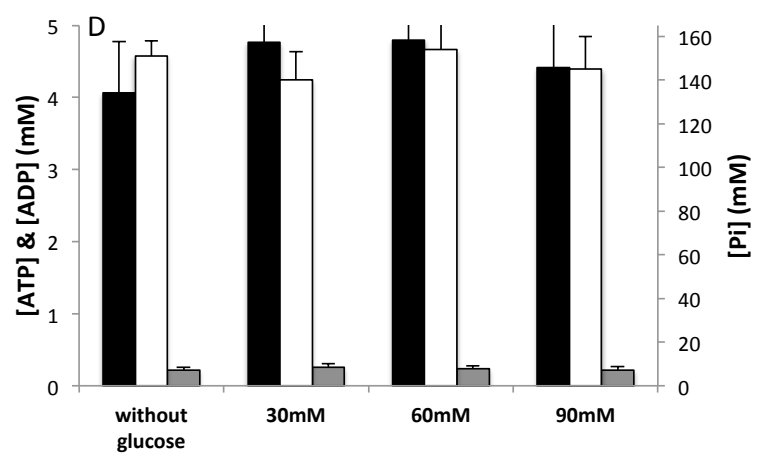
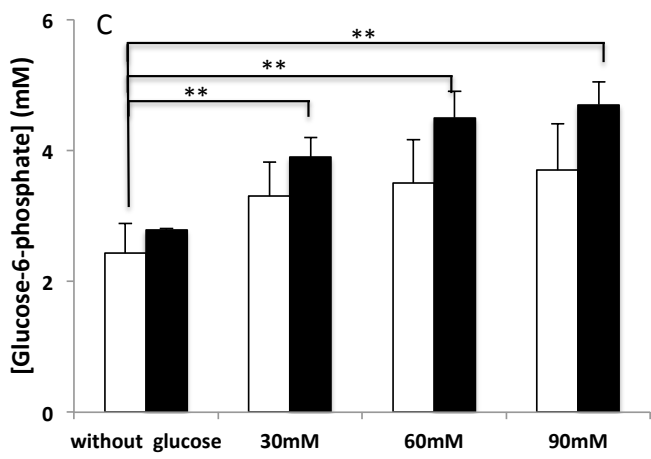
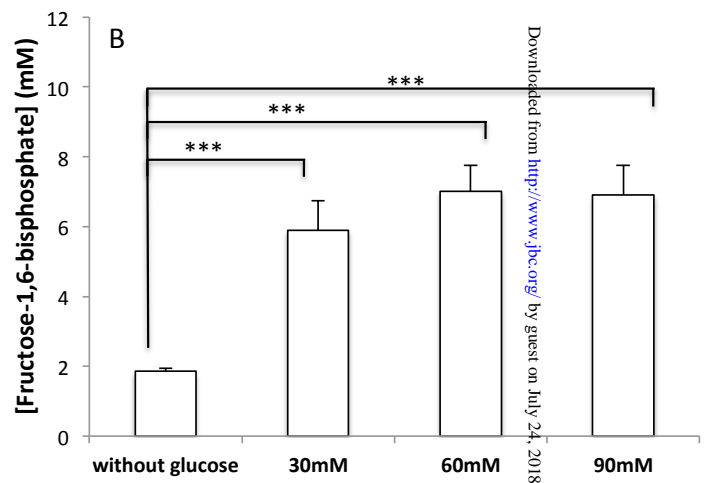
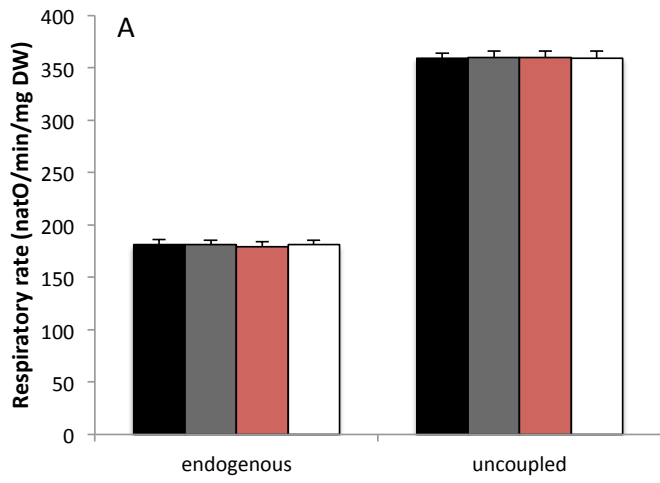


Figure 2

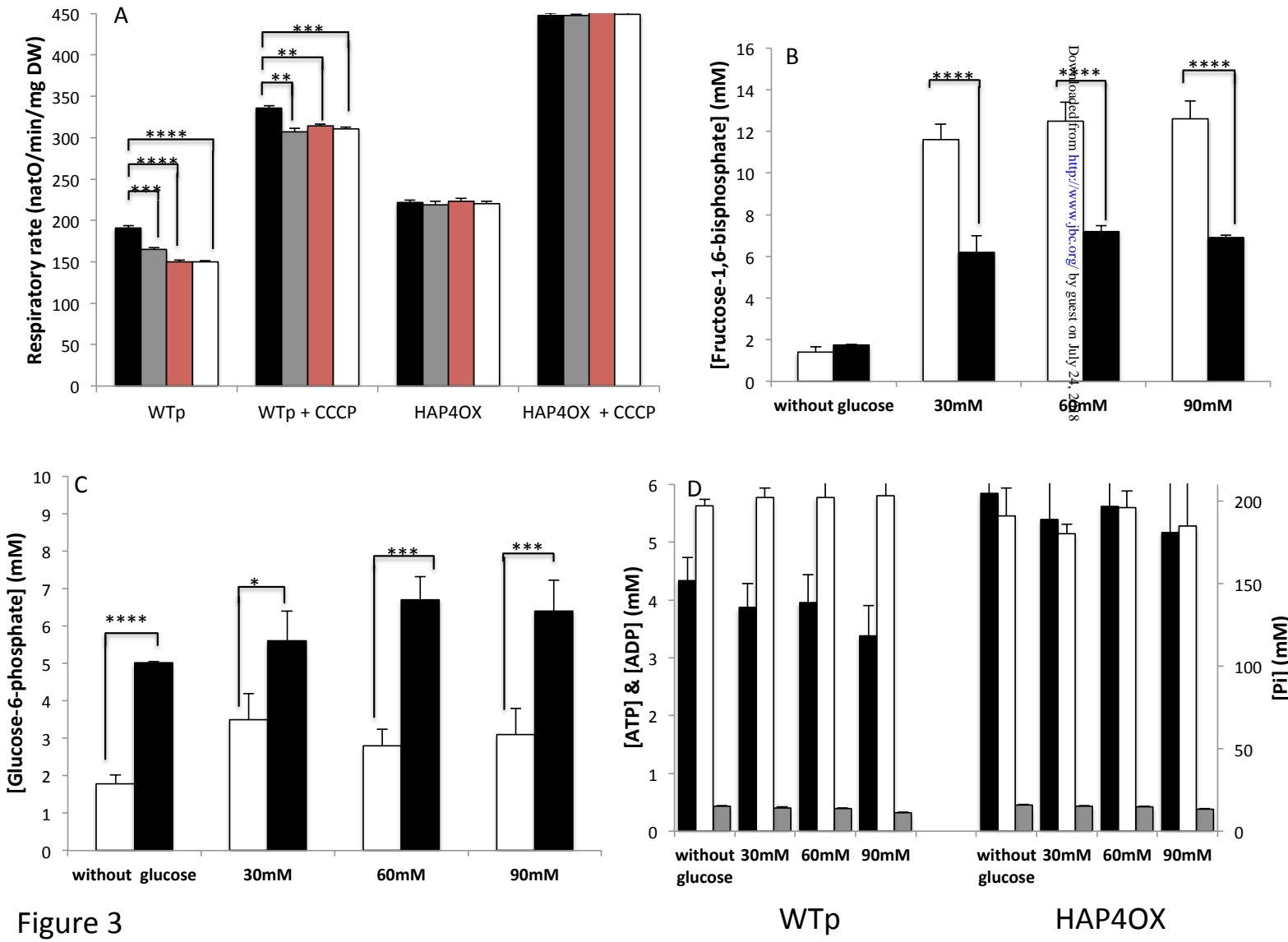


Figure 3

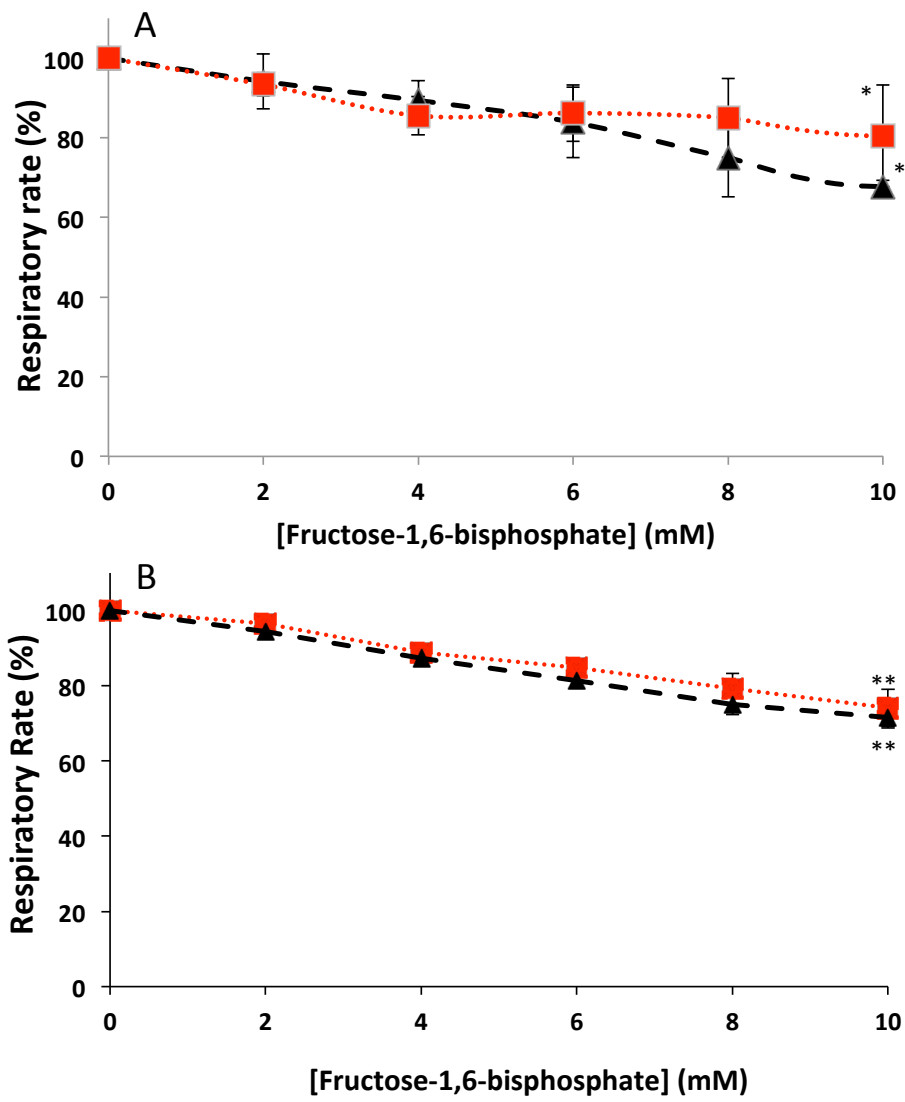


Figure 4

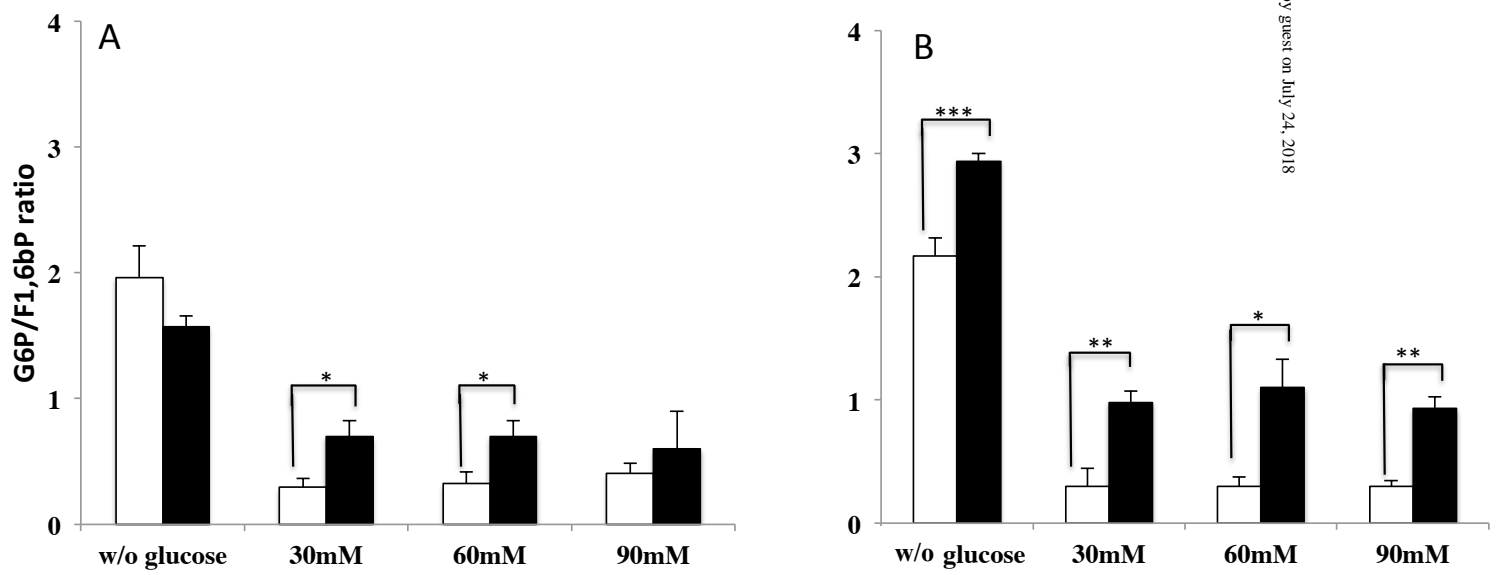


Figure 5

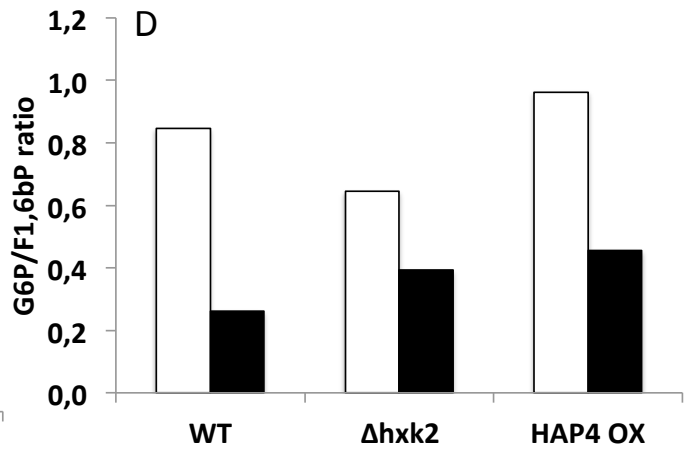
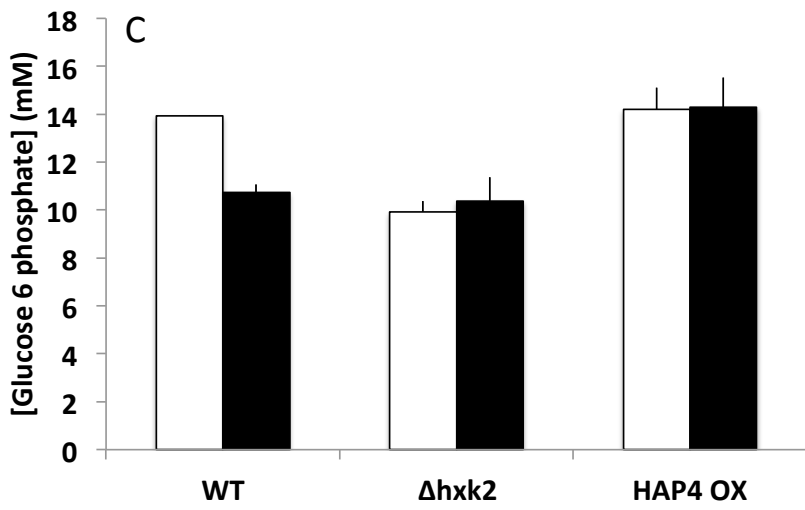
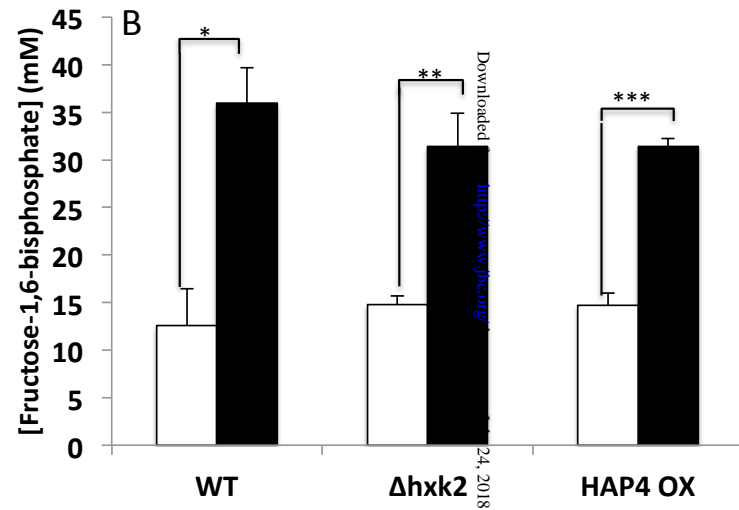
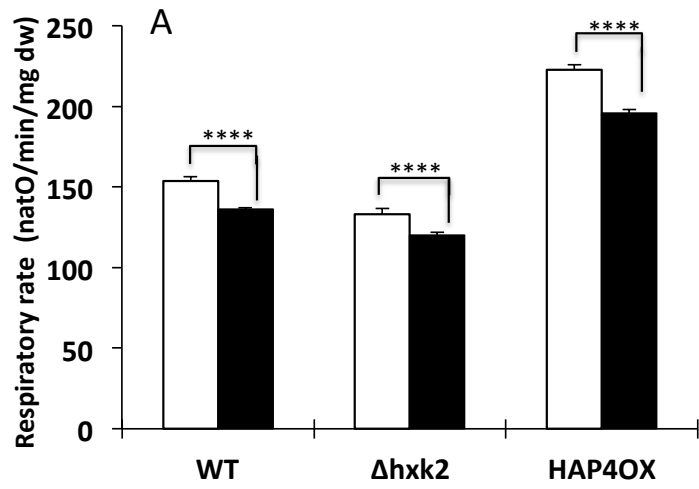


Figure 6



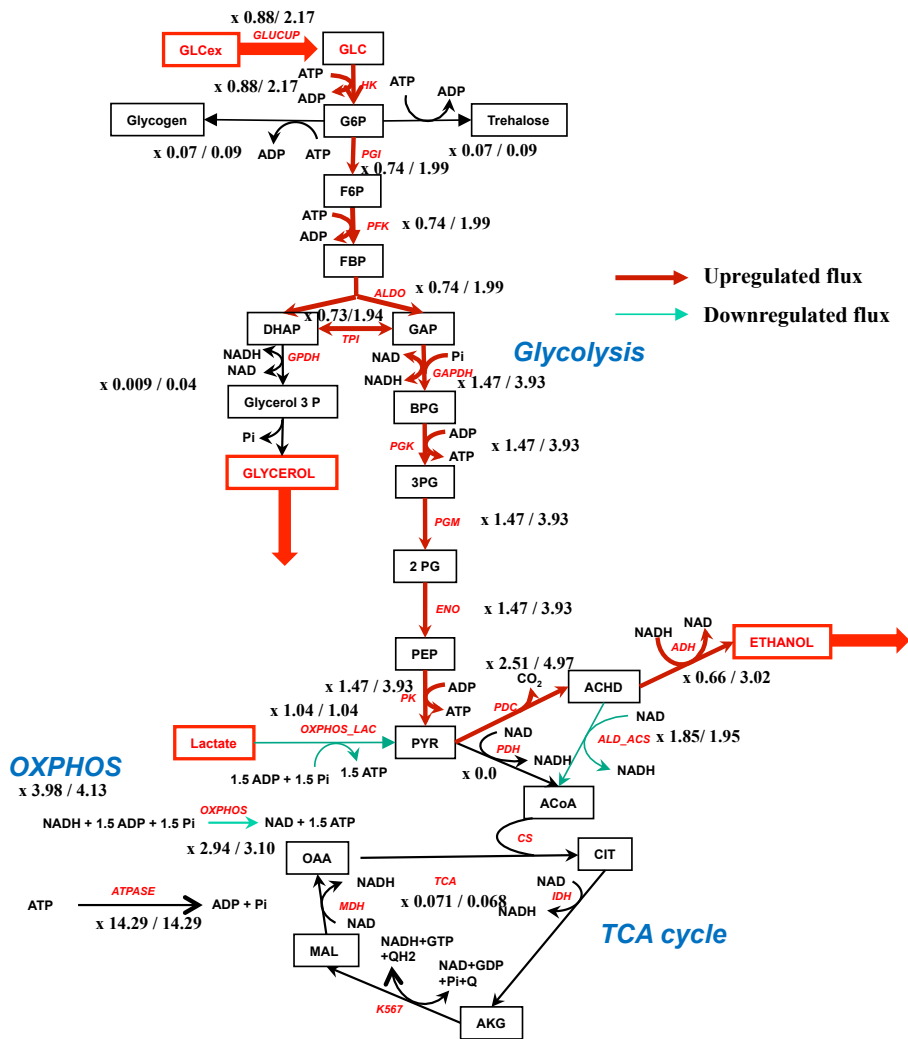


Figure 7

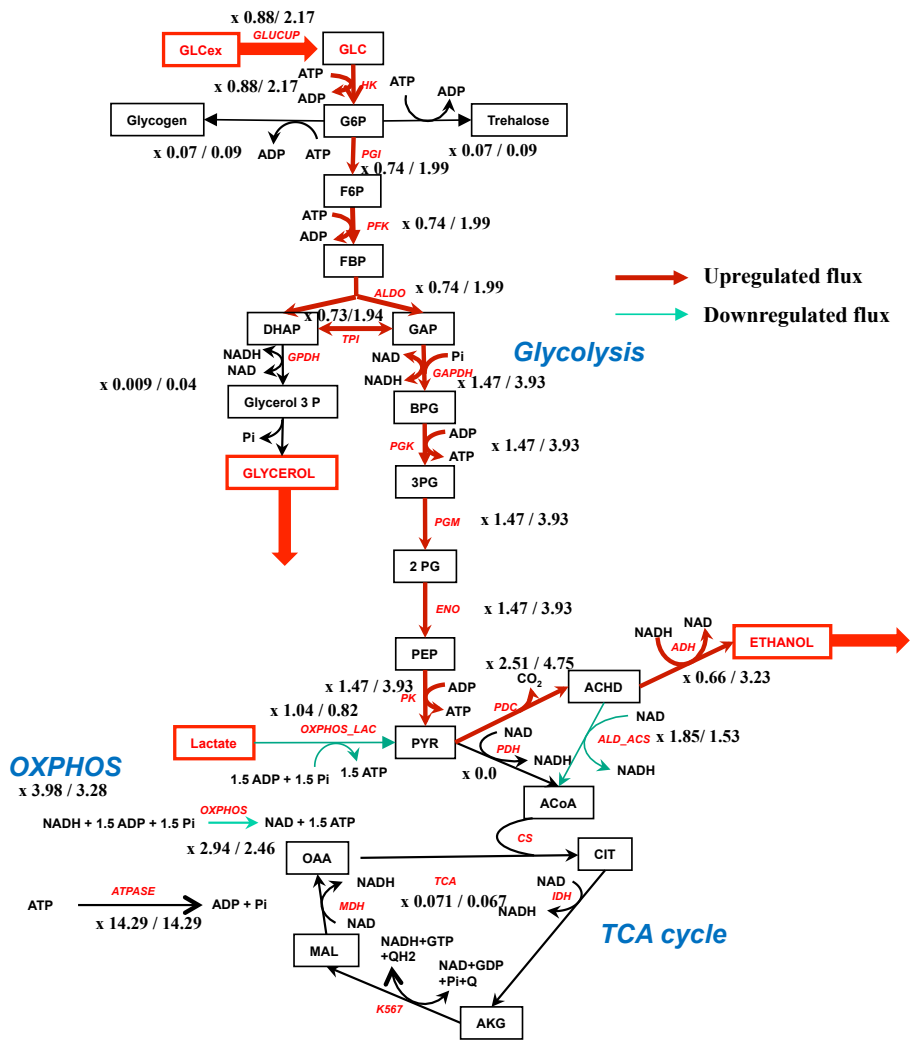


Figure 8

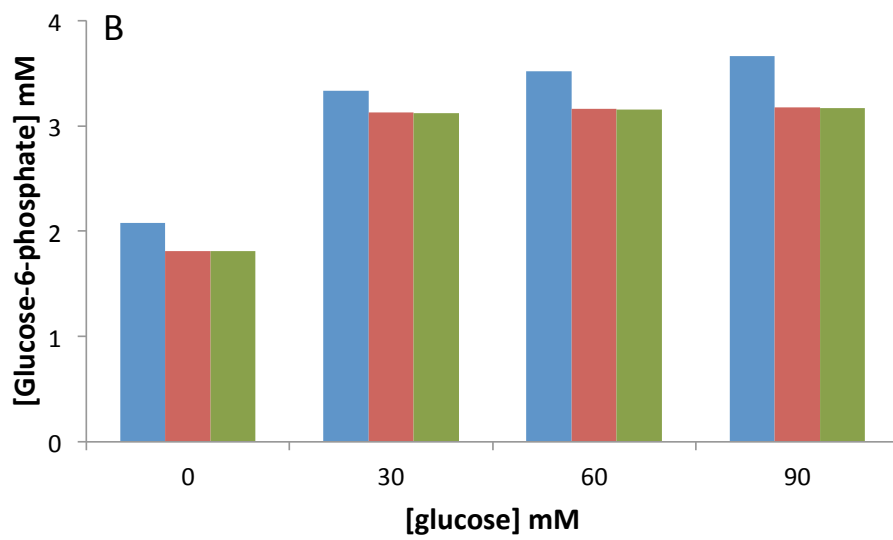
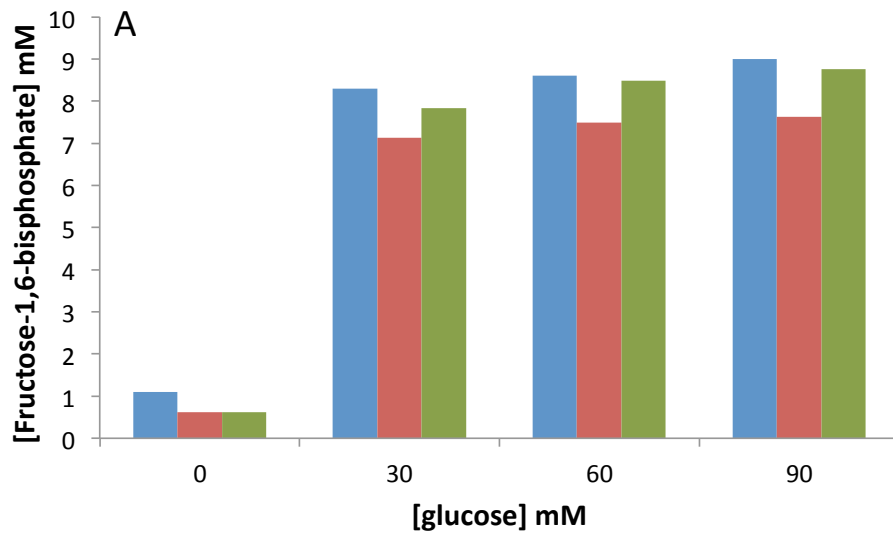


Figure 9

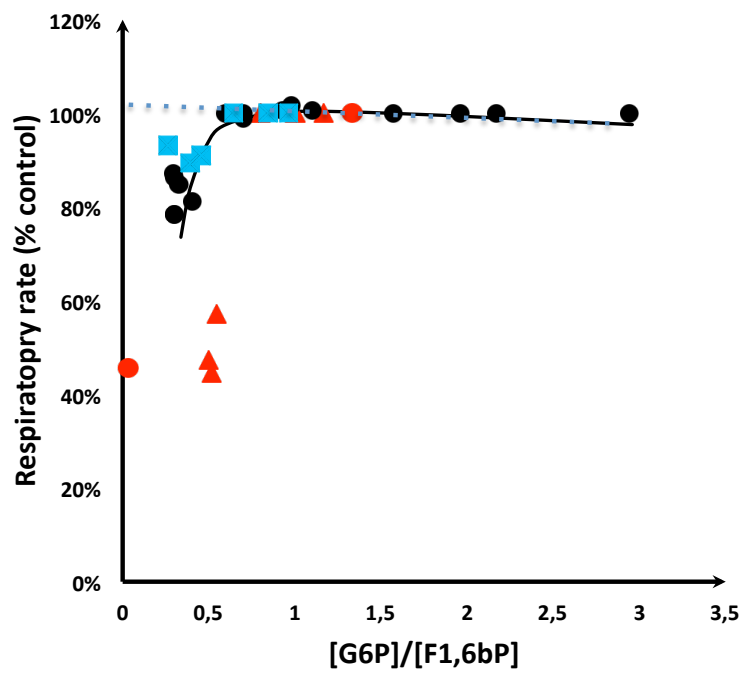


Figure 10

## **The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect**

Mónica Rosas Lemus, Elodie Roussarie, Nouredine Hammad, Alexis Mougeolle, Stéphane Ransac, Razanne Issa, Jean-Pierre Mazat, Salvador Uribe-Carvajal, Michel Rigoulet and Anne Devin

*J. Biol. Chem.* published online June 15, 2018

---

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.RA118.003672](https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003672)

### Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts