



HAL
open science

Étude de la régulation de la biogénèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Cyrielle Bouchez

► **To cite this version:**

Cyrielle Bouchez. Étude de la régulation de la biogénèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2020. Français. NNT : 2020BORD0188 . tel-03270875

HAL Id: tel-03270875

<https://theses.hal.science/tel-03270875>

Submitted on 25 Jun 2021

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

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

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ Biochimie

présentée et soutenue publiquement le
23 Novembre 2020
par

Cyrielle Bouchez

née le 16 Juin 1994 à Bordeaux

**Étude de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez
la levure *Saccharomyces cerevisiae***

Sous la direction de : **Anne Devin**

Membres du jury

Mme Nadine CAMOUGRAND, Directeur de recherche CNRS, Bordeaux	Examineur
M. Bertrand BEAUVOIT, Maître de conférences, Université de Bordeaux	Examineur
Mme Geneviève DUJARDIN, Directeur de recherche, CNRS, Gif-sur-Yvette	Rapporteur
M. Frédéric BOUILLAUD, Directeur de recherche, INSERM, Paris	Rapporteur
Mme Anne DEVIN, Directeur de recherche, CNRS, Bordeaux	Directeur de Thèse
M. Michel RIGOLET, Professeur émérite, Université de Bordeaux	Invité

« Plier, plier toujours, n'est-ce pas déjà trop
le pli de l'humaine nature »
Anouilh

Étude de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Dans la cellule, les fonctions cellulaires majeures, telles que la prolifération cellulaire, impliquent une consommation très importante d'énergie sous forme d'Adénosine Triphosphate (ATP). Pour répondre à l'augmentation de la demande énergétique, une production continue d'ATP est nécessaire. Dans ce contexte, les mitochondries sont les principaux producteurs d'ATP via le système des oxydations phosphorylantes (ou OXPHOS). Ce système couple l'activité de la chaîne respiratoire (consommation d'oxygène) à celle de l'ATP synthase grâce au gradient électrochimique en protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ceci fait de la mitochondrie un élément central qui peut être régulé pour s'adapter aux demandes énergétiques de la cellule. En effet, une régulation cinétique de l'activité de la mitochondrie peut mener à une régulation plus globale du flux de production d'ATP tout comme une régulation du nombre de mitochondries au sein la cellule. Le réseau mitochondrial dans la cellule est géré par deux phénomènes : leur synthèse (biogénèse) et leur dégradation (ou mitophagie). Dans la souche de levure *S. cerevisiae*, la biogenèse mitochondriale est contrôlée par un hétérotétramère formé par les facteurs de transcription Hap2/3/4/5. L'activation du complexe dépend de la présence de la sous-unité régulatrice Hap4p, homologue fonctionnel de PGC1 α . Ce complexe transcriptionnel est responsable de l'activation de l'expression de nombreux gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs, les enzymes de biosynthèse de l'hème et les enzymes de la chaîne respiratoire. Nous nous sommes intéressés aux différentes voies de régulation de la biogenèse mitochondriale et ce, par l'étude de la régulation de la protéine Hap4p. Nos résultats sont les premiers à clairement mettre en évidence une régulation de Hap4p par l'hème labile. Nous avons également étudié le rôle de la répression glucose sur la biogenèse mitochondriale et avons pu mettre en évidence un parallèle avec l'effet Warburg mis en place dans les cellules cancéreuses. Nos résultats ont notamment montré une décorrélation entre le remodelage métabolique dû à l'effet Warburg et l'augmentation de la vitesse de prolifération. Cette étude suggère également que l'augmentation du flux glycolytique n'a pas pour conséquence une augmentation de la production d'ATP dans les cellules. L'ensemble de ce travail permet un apport supplémentaire dans la compréhension de l'effet Warburg et dans l'étude de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez *S. cerevisiae*.

Mots-clefs : Mitochondrie ; Métabolisme énergétique ; Hap4p ; *S. cerevisiae* ; Hème ; Warburg

Study of the regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

In cells, major cellular functions such as cell growth involve a very high consumption of energy in the form of ATP. To answer the increased demand for energy, continued production of Adenosine Triphosphate (ATP) is required. In this context, mitochondria are the main producers of ATP *via* the phosphorylating oxidation system (or OXPHOS). This system couples the activity of the respiratory chain (oxygen consumption) to that of ATP synthase thanks to the electrochemical gradient in protons across the mitochondrial inner membrane. This makes the mitochondria a central key that can be regulated to adapt to the energy demands of the cell. Indeed, a kinetic regulation of the activity of the mitochondria can lead to a more global regulation of the ATP production flow just like a regulation of the number of mitochondria within the cell. The mitochondrial pool in the cell is driven by two phenomena: their synthesis (biogenesis) and their degradation (or mitophagy). In the *S. cerevisiae* yeast strain, mitochondrial biogenesis is controlled by a heterotetramer formed by the transcription factors Hap2/3/4/5. Activation of the complex depends on the presence of the Hap4p regulatory subunit, a functional homolog of PGC1 α . This transcriptional complex is responsible for activating the expression of many genes encoding Krebs cycle enzymes, heme biosynthetic enzymes and respiratory chain enzymes. We are therefore interested in the different regulatory pathways of mitochondrial biogenesis, through the study of the regulation of the Hap4p protein. Our results are the first to clearly show a regulation of Hap4p by labile heme. We have also studied the role of glucose repression on mitochondrial biogenesis and were able to demonstrate a parallel with the Warburg effect established in cancer cells. Our results notably showed a decorrelation between the metabolic switch due to the Warburg effect and the increased proliferation rate. This study also suggests that increased glycolytic flow does not result in increased ATP production in cells. All of this work provides additional input in the understanding of this mechanism and in the study of the regulation of mitochondrial biogenesis in *S. cerevisiae*.

Keywords: Mitochondria; Energy metabolism; Hap4p; *S. cerevisiae*; Heme; Warburg

Remerciements

Le travail présenté dans ce manuscrit a été réalisé dans le laboratoire d'étude du métabolisme énergétique cellulaire de l'Institut de Biochimie et de Génétique Cellulaire de Bordeaux.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury pour avoir accepté de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse et pour les discussions, commentaires et critiques constructives dont ils m'ont fait part. Merci également d'avoir répondu présent lors de ma soutenance malgré la situation particulière que nous vivons actuellement et les dispositions qui ont dû être prises et qui ont rendu cette soutenance plus ou moins compliquée.

Mes remerciements vont ensuite à ma directrice de thèse Anne Devin. Je te suis, tout d'abord, reconnaissante de m'avoir entraînée au concours de l'école doctorale et de m'avoir permis de l'obtenir, d'avoir cru en une personne qui ne savait pas ce qu'était un état 3. Merci pour ton soutien jusqu'au bout et ta consilience en cette fin de thèse sportive et inédite. Je te remercie aussi pour ta disponibilité et la patience qu'il t'a fallu pour comprendre mon langage parfois approximatif durant ses trois ans, finalement le bambou n'aura pas trop été utilisé ! Merci Chef de m'avoir appris que mettre des bretelles en plus de la ceinture était souvent nécessaire en biologie.

Je remercie également tout le reste de l'équipe pour votre soutien, votre bonne humeur et vos conseils. Je voudrais remercier en particulier Stéphane pour tes conseils toujours à propos et toutes nos conversations et Sylvain pour toutes nos journées d'oxygraphie et toutes nos blagues nulles (j'adore l'humour !). Tant pis si tu n'as pas de goût en matière de musique, tu as les bonnes références cinématographiques ;) . Merci pour ces deux ans et à l'année prochaine !

Je remercie bien sûr l'équipe du 3 au grand complet, pour toutes ses heures passées ensemble, ses cafés et ces moments de craquages, vous êtes la pire équipe du monde ! Arnaud, merci de ton aide et ton écoute et merci pour tes phrases improbables mais toujours très imagées. Cloclo, tu es un peu notre maman à tous, alors merci pour ta patience, ta disponibilité et ta gentillesse et merci d'avance pour toutes les fois où je viendrai t'embêter à l'avenir. Thomas, merci pour ton humour et ta légèreté, merci pour ton écoute et merci pour mon futur salaire :p ! Elo, tu feras toujours partie de cette équipe même si tu es passée à l'ennemi ! Ai-je besoin de te dire à quel point tu as été importante pour moi pendant ses trois ans ? Je pense que nos soirées sushi et pizza Emilie, nos séances de sport et tous nos fous-rires parlent pour moi. Même Ginger et la Team du Virgin Tonic savent que tu es une amie en or, alors merci tout simplement. Un jour, on se revoit devant Black Mirror, allez, à plus dans le bus !

Je remercie aussi toutes les personnes de l'institut que j'aurai pu oublier et qui ont contribué à la réalisation de ce travail !

Petit Big up à ma chaise de bureau qui m'a transporté à travers tous les étages durant deux mois et demi (encore désolée pour le bruit Cloclo).

D'un point de vue plus personnel, je tiens également à remercier ma famille. Merci à mes parents pour leur soutien durant toutes ces années, qui remontent à bien avant le concours, pour leur aide aussi bien matérielle que morale et pour leur amour indéfectible. Mes sœurs, et bien sûr mes beaux-frères et mes amours de neveux et nièces, vous avez été mes piliers durant toutes ces années. Karyne, tu as toujours cru en moi, tu m'as toujours soutenu et tu avais toujours une bouteille de rouge pour accompagner nos grandes conversations. J'espère que tu es contente de lire la thèse de Cyrielle ! Auré, tu as toujours su me remotiver et me conseiller, tu as été mon modèle durant cette thèse et je suis fière de pouvoir te la présenter aujourd'hui. Attention, elle ne parle pas de trypsine, ni d'apoptose ou

de bébé des coraux et promis tous les mots veulent dire quelque chose pour de vrai... Merci mes sœurs pour nos fous-rires et votre amour soeurternelle, vous m'avez permis d'arriver jusqu'ici.

C'est grâce à vous tous que je suis, maintenant, un docteur qui soigne pas les gens.

A mes amis,

En particulier Mélina, pour ta relecture (si si ça compte quand même) et nos heures aux téléphones, Sandrine, David, pour nos journées qui m'ont permis de décompresser et de me rappeler que la vie ce n'est pas que la thèse

Mes GF, je ferai un mot beaucoup moins long qu'Ellie parce que je suis nulle pour ça mais votre écoute et tous les moments qu'on a passé ensemble ont été inestimables, depuis 8ans et pour les années à venir.

Merci à tous pour votre présence à tout instant.

Et enfin, parce qu'on garde toujours le meilleur pour la fin, Thibaut merci d'être toi tout simplement. Dès les premiers instants de notre rencontre tu as influé sur ma vie. Tu m'as permis de faire cette thèse à Bordeaux et tu m'as apporté énormément à chaque moment de ses trois ans jusqu'à devenir l'homme qui partage ma vie. Alors pour tout ce que nous avons construit, partagé et tout ce qui nous reste à vivre, merci mon Amour. Je t'aime.

Sommaire

Chapitre 1 Introduction Générale	1
1.1 La cellule, échange et production d'énergie	3
1.1.1 La mitochondrie.....	4
1.1.2 Phosphorylation au niveau du substrat (Figure 4).....	6
1.1.3 Le système des oxydations phosphorylantes (Figure 5)	8
1.2 La biogenèse mitochondriale, une communication entre le noyau et la mitochondrie....	13
1.2.1 La biogenèse mitochondriale chez les mammifères.....	14
1.2.2 La biogenèse mitochondriale chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
1.3 Projet de thèse :	21
Chapitre 2 Matériels et Méthodes.....	23
2.1 Culture cellulaire et conditions de cultures	25
2.1.1 Souches de levures et de bactéries	25
2.1.2 Milieux de culture.....	27
2.1.3 Conditions de culture	28
2.2 Technique de biologie moléculaire	29
2.2.1 Récupération de l'ADN plasmidique.....	29
2.2.2 Transformation des levures par la méthode à l'acétate de lithium	30
2.3 Technique de biochimie	31
2.3.1 Isolation de mitochondries (Figure 11)	31
2.3.2 Mesure du flux de consommation d'oxygène par oxygraphie	34
2.3.3 Quantification des cytochromes sur cellules entières.....	38
2.3.4 Mesure d'activité de facteurs de transcription par le système de gène rapporteur β -galactosidase	40
2.3.5 Dosage d'activités enzymatiques	41
2.3.6 Dosage glucose	43
2.3.7 Dosage glycérol.....	45
2.3.8 Dosage éthanol.....	46
2.3.9 Purification de protéines sur colonne « Glutathion sepharose »	48
2.3.10 Test d'interaction Hémine-Hap4p <i>in vitro</i>	49
2.4 Technique d'analyse de protéines (Figure 14)	50
2.4.1 Extraction protéique.....	50
2.4.2 Dosage protéique	50
2.4.3 SDS-PAGE	51
2.4.4 Immunodétection des protéines : Western-blots	52
2.4.5 Suivi du turn-over de Hap4p.....	54
2.4.6 Co-précipitation avec l'hémine.....	55
2.4.7 Gel Natif et Activité in gel.....	55
2.5 Technique de microscopie.....	57
2.5.1 Microscopie électronique.....	57
2.5.2 Microscopie épifluorescente	58
2.6 Analyse Statistique	58

Chapitre 3 Etude du rôle de l'hème sur la biogenèse mitochondriale via Hap4p 59

3.1	Introduction.....	61
3.1.1	Généralités sur l'hème.....	61
3.1.2	Le complexe HAP et l'hème.....	63
3.1.3	Problématique.....	67
3.2	Mise au point des conditions de culture.....	67
3.2.1	Conditions de culture.....	67
3.2.2	Titration de l'hème labile par l'ajout d'ALA.....	69
3.3	Le rôle de l'hème sur le pool global mitochondrial.....	71
3.3.1	Modification du métabolisme cellulaire.....	71
3.3.2	Modification de l'activité enzymatique mitochondriale.....	74
3.3.3	Modification de la quantité de mitochondries au sein des cellules.....	76
3.4	Le rôle de l'hème sur la biogenèse mitochondriale via le complexe HAP.....	84
3.4.1	Régulation de l'activité du complexe HAP dans les cellules.....	85
3.4.2	Régulation de la quantité d'Hap4p dans la cellule.....	85
3.4.3	Indépendance de Hap1p dans la régulation du complexe HAP.....	88
3.4.4	Une interaction directe entre l'hème et Hap4p.....	94
3.5	Validation du rôle l'hème sous sa forme labile.....	99
3.5.1	La deutéroporphyrine, un homologue non métabolisable de l'hème.....	99
3.5.2	Condition de culture et vérification du modèle.....	100
3.5.3	La deutéroporphyrine IX induit une augmentation de la quantité de mitochondries.....	103
	106
3.5.4	La deutéroporphyrine IX induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale.....	106
3.6	Un effet synergique entre antioxydants et hème labile ?.....	109
3.6.1	Historique du questionnement.....	109
3.6.2	Conditions de culture.....	109
3.6.3	Influence de l'anti oxydant sur la quantité de mitochondries.....	110
3.6.4	Influence de l'anti oxydant sur la biogenèse mitochondriale.....	115

Chapitre 4 Etude de la répression glucose sur la biogenèse mitochondriale via Hap4p 121

4.1	Introduction.....	123
4.1.1	Le cas de la cellule saine.....	123
4.1.2	Le glucose dans la cellule saine.....	125
4.1.3	Rôle répresseur du glucose.....	128
4.1.4	L'effet Warburg.....	130
4.1.5	Influence sur le réseau mitochondrial.....	132
4.1.6	Problématique.....	133
4.2	Conditions de culture.....	135
4.3	<i>S. cerevisiae</i> en tant que modèle Warburg.....	135
4.4	Origine du remodelage métabolique et en particulier de la diminution de respiration 137	
4.4.1	Effet de l'ajout du glucose sur la consommation du lactate.....	137
4.4.2	Effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i> : diminution de la quantité ou de la qualité mitochondriale ?..	138
4.4.3	Le glucose à l'origine d'une répression de la biogenèse mitochondriale.....	144
4.5	Le remodelage métabolique n'est pas nécessaire à l'augmentation de la prolifération 150	

4.5.1	Effet de la surexpression de Hap4p sur l'effet Warburg	151
4.5.2	Effet de la délétion de Hxk2p sur l'induction de l'effet Warburg	155
4.5.3	Influence de la délétion de <i>HXK2</i> associée à une surexpression de Hap4p.....	159
4.6	Résultats complémentaires de la caractérisation de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i>	164
4.6.1	Influence de l'inhibition de Hap4p sur la mise en place de l'effet Warburg chez <i>S. cerevisiae</i>	164
4.6.2	Est-ce que l'ALA peut augmenter la biogenèse dans ces conditions ?	170
4.6.3	Influence du substrat dans la mise en place de l'effet Warburg	171
4.7	Effet du glucose sur la souche <i>Candida utilis</i>, une souche respiratoire obligatoire	173
4.8	Le flux de synthèse ATP ne contrôle pas le taux de prolifération cellulaire.....	179
Chapitre 5	<i>Etude de la souche K. lactis</i>.....	183
5.1	Introduction	185
5.2	Conditions de culture	185
5.3	Etude de la souche <i>K. lactis</i> comme souche Crabtree négative	185
5.3.1	La souche <i>K. lactis</i> ne semble pas mettre en place l'effet Warburg après ajout du glucose.....	185
5.3.2	La souche <i>K. lactis</i> est peu sensible au découplant.	191
5.4	Etude de la chaîne respiratoire de la souche <i>K. lactis</i>.....	196
Chapitre 6	Conclusion Générale.....	203
6.1	Régulation positive par l'hème	205
6.2	Répression positive par le glucose	207
6.3	Le cas de la souche <i>K. lactis</i>	209
Chapitre 7	Abréviations.....	211
Chapitre 8	Références	215

Liste des tableaux

TABLEAU I : LISTE DES SOUCHES UTILISEES.....	25
TABLEAU II : LISTE DES PLASMIDES UTILISES.....	26
TABLEAU III : LISTE DES MILIEUX DE CULTURES UTILISES	27
TABLEAU IV : LISTE DU POIDS SEC/UDO POUR CHAQUE SOUCHE ETUDIEE	28
TABLEAU V : LISTE DES SUBSTRATS UTILISES POUR LES RESPIRATIONS SUR MITOCHONDRIES ISOLEES.....	37
TABLEAU VI : LISTE DES INHIBITEURS UTILISES POUR LES RESPIRATIONS SUR MITOCHONDRIES ISOLEES.....	38
TABLEAU VII : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL POUR LE DOSAGE DU GLUCOSE.	44
TABLEAU VIII : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL POUR LE DOSAGE DU GLYCEROL.	46
TABLEAU IX : COMPOSITION DU MELANGE REACTIONNEL POUR LE DOSAGE DE L'ETHANOL.....	47
TABLEAU X : LISTES DES ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES	54
TABLEAU XI. LISTE NON EXHAUSTIVE DE PROTEINES REGULEES PAR L'HEME LABILE	65
TABLEAU XII. COMPARAISON DES FLUX DE RESPIRATION DES CELLULES WT ET $\Delta HEM1$ A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ALA EN PRESENCE (+) OU NON (-) DE NAC (\pm S.E.M)	112
TABLEAU XIII. COMPARAISON DES ACTIVITES COX DES CELLULES WT ET $\Delta HEM1$ A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ALA EN PRESENCE (+) OU NON (-) DE NAC (%WT \pm S.E.M)	112
TABLEAU XIV. COMPARAISON DES ACTIVITES CITRATE SYNTHASE DES CELLULES WT ET $\Delta HEM1$ A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ALA EN PRESENCE OU NON DE NAC (%WT \pm S.E.M)	114
TABLEAU XV. QUANTITE RELATIVE DE HAP4P DANS LES CELLULES $\Delta HEM1$ A DIFFERENTES CONCENTRATION D'ALA EN PRESENCE OU NON DE NAC (%WT \pm S.E.M)	117
TABLEAU XVI. CONCENTRATION DE GLUCOSE EN mM DOSEE DANS LES CULTURES (\pm S.E.M)	149
TABLEAU XVII. COMPARAISON DE LA QUANTITE DE CYTOCHROMES MITOCHONDRIAUX DANS LES SOUCHES WT ET $\Delta HXK2$ (\pm S.E.M)	158
TABLEAU XVIII. AUGMENTATION DE LA PROLIFERATION DANS LA SOUCHE <i>C. UTILIS</i> APRES AJOUT DE GLUCOSE EN PRESENCE OU NON DE P.A EN FONCTION DE LEUR CONTROLE RESPECTIF (% DU TO \pm S.E.M).....	177
TABLEAU XIX. RAPPORT ADP/O POUR CHAQUE SOUCHE	196

Table des Figures

FIGURE 1. ILLUSTRATION DES PRINCIPAUX SYSTEMES DE TRANSFORMATIONS D'ENERGIE DANS LES CELLULES EN PROLIFERATION	3
FIGURE 2. ILLUSTRATION DE LA THEORIE DE L'ENDOSYMBIOSE	4
FIGURE 3. CARTE DE L'ADN MITOCHONDRIAL DE CONTENU DANS LES CELLULES HUMAINES ET DE <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	5
FIGURE 4. ILLUSTRATION DE LA GLYCOLYSE ET DU CYCLE DE KREBS	7
FIGURE 5. ILLUSTRATION DU SYSTEME DES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES	8
FIGURE 6. ILLUSTRATION DE LA REOXYDATION DU NADH CYTOSOLIQUE PAR LA G3PDH CYTOSOLIQUE ET GUT2P	10
FIGURE 7. REGULATION TRANSCRIPTIONNELLE DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE DANS LES CELLULES MAMMIFERES.....	15
FIGURE 8. GENES CIBLES DU COMPLEXE HAP	18
FIGURE 9. LA VOIE RAS-CAMP/PKA DANS LES CELLULES DE LEVURES.....	20
FIGURE 10. VARIATION DU POIDS SEC CHEZ <i>C. UTILIS</i> EN FONCTION DU TEMPS EN PRESENCE OU NON DE GLUCOSE	29
FIGURE 11. SCHEMA DU PROTOCOLE DE L'ISOLATION DE MITOCHONDRIES DE LEVURE	32
FIGURE 12. ILLUSTRATION DU FONCTIONNEMENT DE L'ELECTRODE DE CLARK	34
FIGURE 13. ILLUSTRATION DU FONCTIONNEMENT DU CCCP AU NIVEAU DE LA MITOCHONDRIE.....	37
FIGURE 14. ILLUSTRATION DES DIFFERENTES ETAPES DES TECHNIQUES D'ANALYSE DES PROTEINES.....	53
FIGURE 15. STRUCTURES DE LA PROTOPORPHYRINE IX ET DU (PROTO)HEME	61
FIGURE 16. VOIE DE BIOSYNTHESE DE L'HEME CHEZ LES EUKARYOTES.....	62
FIGURE 17. ACTIVATION DE HAP1P	64
FIGURE 18. DEPENDANCE DE LA SOUCHE Δ HEM1 A L'ALA	68
FIGURE 19. EVALUATION DU NIVEAU D'HEME LABILE GRACE A L'ACTIVITE DU GENE PROMOTEUR <i>HMG2-LACZ</i> A DIFFERENTES CONCENTRATIONS D'ALA	70
FIGURE 20. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LA PROLIFERATION ET LA RESPIRATION	72
FIGURE 21. RELATION ENTRE LA VITESSE DE PROLIFERATION ET LA VITESSE DE RESPIRATION EN MILIEU NON FERMENTESCIBLE	73
FIGURE 22. ILLUSTRATION DU SYSTEME DES OXPHOS ET DU CYCLE DE KREBS.....	74
FIGURE 23. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR L'ACTIVITE ENZYMATIQUE MITOCHONDRIALE.....	75
FIGURE 24. EFFET DE L'AJOUT DE L'ALA SUR LA QUANTITE DE CYTOCHROMES MITOCHONDRIAUX.....	78
FIGURE 25. EFFET DE L'AJOUT DE L'ALA SUR LA QUANTITE RELATIVE DE LA PORINE.....	79
FIGURE 26. ILLUSTRATION DES CHANGEMENTS DE LA RSV.....	80
FIGURE 27. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LE RSV	81
FIGURE 28. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LE DIAMETRE MITOCHONDRIAL.....	82
FIGURE 29. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LA MORPHOLOGIE DU RESEAU MITOCHONDRIAL	83
FIGURE 30. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR L'ACTIVITE DU COMPLEXE HAP	84
FIGURE 31. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LA QUANTITE D'HAP4P.....	86
FIGURE 32. EFFET DE LA SUREXPRESSION DE HAP4P EN PRESENCE D'UNE FAIBLE CONCENTRATION D'ALA AJOUTE SUR LA PROLIFERATION ET LA RESPIRATION.....	87
FIGURE 33. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LA QUANTITE D'HEME LIBRE SUR LA SOUCHE Δ HEM1 Δ HAP1	89
FIGURE 34. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LA VITESSE DE RESPIRATION ET DE PROLIFERATION DANS LES SOUCHES Δ HAP1	90
FIGURE 35. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR L'ACTIVITE ET LA QUANTITE DE PROTEINES MITOCHONDRIALES DANS LES CELLULES Δ HAP1	92
FIGURE 36. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR L'ACTIVITE DU COMPLEXE HAP ET QUANTITE D'HAP4P DANS LES CELLULES Δ HAP1.....	93
FIGURE 37. SEQUENCE DE LA PROTEINE HAP4P.....	94
FIGURE 38. EFFET DE LA PROTEINE GST-HAP4(330-554) SUR LE SPECTRE DE L'HEMINE.....	95
FIGURE 39. ETUDE DE L'INTERACTION HEME ET HAP4P	96
FIGURE 40. EFFET DE L'AJOUT D'ALA SUR LA STABILITE DE HAP4P	98
FIGURE 41. EFFET DE LA DP IX SUR L'ACTIVITE DU PROMOTEUR DU GENE <i>HMG2</i>	101
FIGURE 42. EFFET DE LA DP IX SUR LA PROLIFERATION ET RESPIRATION	102
FIGURE 43. EFFET DE LA DP IX SUR L'ACTIVITE DES ENZYMES MITOCHONDRIALES.....	104
FIGURE 44. EFFET DE LA DP IX SUR LE DIAMETRE MITOCHONDRIAL	105
FIGURE 45. EFFET DE LA DP IX SUR LA MORPHOLOGIE DU RESEAU MITOCHONDRIAL.....	106
FIGURE 46. EFFET DE LA DP IX SUR L'ACTIVITE DU COMPLEXE HAP ET SUR LA QUANTITE D'HAP4P.....	107
FIGURE 47. EFFET DE LA DP IX SUR LA STABILITE DE HAP4P.....	108
FIGURE 48. EFFET DE L'AJOUT DU NAC SUR L'ACTIVITE DU PROMOTEUR <i>HMG2</i>	110

FIGURE 49. EFFET DE L'AJOUT DU NAC SUR LA PROLIFERATION ET LA RESPIRATION.....	111
FIGURE 50. EFFET DE L'AJOUT DU NAC SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES.	113
FIGURE 51. EFFET DE L'AJOUT DU NAC SUR L'ACTIVITE DU COMPLEXE HAP.....	115
FIGURE 52. EFFET DE L'AJOUT DU NAC SUR L'ACTIVITE DU COMPLEXE HAP ET LA QUANTITE RELATIVE DE HAP4P.....	116
FIGURE 53. EFFET DE L'AJOUT DU NAC SUR LA STABILITE DE HAP4P.....	118
FIGURE 54. EFFET DES ANTIOXYDANTS SUR L'INTERACTION HEMINE/HAP4P.....	119
FIGURE 55. ILLUSTRATION DE LA GLYCOLYSE, DES OXPHOS ET DU CYCLE DE KREBS DES CELLULES DE MAMMIFERES.....	124
FIGURE 56. ILLUSTRATION DES DIFFERENCES ENTRE L'OXYDATION PHOSPHORYLANTE ET LA GLYCOLYSE ANAEROBIE.....	125
FIGURE 57. LE DEVENIR DU GLUCOSE.....	128
FIGURE 58. ILLUSTRATION DES DIFFERENCES ENTRE LA GLYCOLYSE AEROBIE ET ANAEROBIE.....	129
FIGURE 59. ILLUSTRATION DE L'EFFET WARBURG.....	130
FIGURE 60. EFFET DE L'AJOUT DU GLUCOSE SUR LES TROIS PARAMETRES DE L'EFFET WARBURG.....	134
FIGURE 61. EFFET DU GLUCOSE SUR L'ACTIVITE HXK ET LA PRODUCTION DE GLYCEROL.....	136
FIGURE 62. EFFET DE L'ANTIMYCINE A SUR LA RESPIRATION EN PRESENCE DE DIFFERENTS MILIEUX.....	138
FIGURE 63. EFFET DU GLUCOSE SUR LE RSV.....	140
FIGURE 64. EFFET DU GLUCOSE SUR LA QUANTITE DE CYTOCHROMES MITOCHONDRIAUX.....	141
FIGURE 65. EFFET DU GLUCOSE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES MITOCHONDRIALES.....	142
FIGURE 66. EFFET DU GLUCOSE SUR LA QUANTITE RELATIVE DE PORINE.....	143
FIGURE 67. EFFET DU GLUCOSE SUR L'INDUCTION DU PROCESSUS D'AUTOPHAGIE ET/OU DE LA MITOPHAGIE.....	144
FIGURE 68. EFFET DU GLUCOSE SUR LA STABILITE ET LA QUANTITE DE HAP4P.....	145
FIGURE 69. EFFET DU GLUCOSE SUR LA QUANTITE DES SOUS-UNITES DU COMPLEXE HAP.....	146
FIGURE 70. EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE GLUCOSE SUR LES TROIS PARAMETRES DE L'EFFET WARBURG.....	148
FIGURE 71. EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE GLUCOSE SUR LA QUANTITE RELATIVE DE HAP4P ET DE LA PORINE.....	150
FIGURE 72. ILLUSTRATION DU SYSTEME D'EXPRESSION GENIQUE TET-OFF REGULE PAR LA DOXYCYCLINE.....	151
FIGURE 73. EFFET DU GLUCOSE SUR LA SUREXPRESSION DE HAP4P.....	152
FIGURE 74. EFFET DU GLUCOSE SUR LES TROIS PARAMETRES DE L'EFFET WARBURG DANS LES CELLULES Δ HAP4 \uparrow	153
FIGURE 75. EFFET DU GLUCOSE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES CELLULES Δ HAP4 \uparrow	155
FIGURE 76. EFFET DE LA DELETION DE <i>HXK2</i> SUR LES PARAMETRES DE L'EFFET WARBURG. (ISSU DE LA THESE DE NOUREDDINE HAMMAD).....	157
FIGURE 77. EFFET DU GLUCOSE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES CELLULES Δ HXK2.....	159
FIGURE 78. EFFET DE LA DOUBLE MUTATION SUR LES PARAMETRES DE L'EFFET WARBURG.....	160
FIGURE 79. EFFET DU GLUCOSE SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LES CELLULES Δ HXK2HAP4 \uparrow	161
FIGURE 80. EFFET DU GLUCOSE SUR LA QUANTITE RELATIVE DE HAP4P DANS LES CELLULES Δ HXK2HAP4 \uparrow	162
FIGURE 81. EFFET DU GLUCOSE SUR LA QUANTITE DE CYTOCHROMES MITOCHONDRIAUX DANS LA SOUCHE Δ HXK2HAP4 \uparrow . (ISSUS DE LA THESE DE NOUREDDINE HAMMAD).....	163
FIGURE 82. EFFET DE LA DOX SUR LA QUANTITE DE HAP4P DANS LA SOUCHE Δ HAP4 \uparrow	165
FIGURE 83. EFFET DE LA DOX SUR LA PROLIFERATION ET LA RESPIRATION DANS LA SOUCHE Δ HAP4 \uparrow	166
FIGURE 84. EFFET DU GLUCOSE ASSOCIE A LA DOX SUR LA PROLIFERATION ET LA RESPIRATION DANS LES CELLULES Δ HAP4 \uparrow	167
FIGURE 85. EFFET DU GLUCOSE ET DE LA DOX SUR LA GLYCOLYSE DANS LES CELLULES Δ HAP4 \uparrow	168
FIGURE 86. EFFET DE L'ALA DANS UN CONTEXTE DE REPRESSION GLUCOSE.....	169
FIGURE 87. EFFET DU FRUCTOSE SUR LA PROLIFERATION, LA RESPIRATION ET LA QUANTITE DE HAP4P.....	172
FIGURE 88. EFFET DU GLUCOSE SUR LES TROIS PARAMETRES DE L'EFFET WARBURG CHEZ <i>C. UTILIS</i>	174
FIGURE 89. EFFET DU GLUCOSE SUR LE CONTENU MITOCHONDRIAL CHEZ <i>C. UTILIS</i>	175
FIGURE 90. EFFET DE LA PIERICIDINE A ASSOCIEE AU GLUCOSE SUR LA YEAST FOAM.....	176
FIGURE 91. EFFET DE LA PIERICIDINE A ASSOCIEE AU GLUCOSE DANS LA <i>C. UTILIS</i>	177
FIGURE 92. EFFET DU GLUCOSE SUR LE FLUX DE CONSOMMATION DE GLUCOSE ET DE PRODUCTION D'ETHANOL.....	179
FIGURE 93. EFFET DU GLUCOSE SUR LE FLUX DE SYNTHESE DE L'ATP DANS LES DIFFERENTES SOUCHES DE <i>S. CEREVISIAE</i>	180
FIGURE 94. EFFET DU GLUCOSE SUR LE FLUX DE REOXYDATION DU NADH DANS LES DIFFERENTES SOUCHES DE <i>S. CEREVISIAE</i>	182
FIGURE 95. EFFET DU GLUCOSE SUR LA VITESSE DE RESPIRATION DES CELLULES DES TROIS SOUCHES.....	186
FIGURE 96. EFFET DU GLUCOSE SUR LA VITESSE DE PROLIFERATION SUR LES CELLULES DES TROIS SOUCHES.....	187
FIGURE 97. CONSOMMATION DE GLUCOSE DES CELLULES <i>K. LACTIS</i> CULTIVEES EN GLYCEROL.....	188
FIGURE 98. SUIVI DES PARAMETRES DE L'EFFET WARBURG SUR LES CELLULES <i>K. LACTIS</i> CULTIVEES EN GLYCEROL OU EN GLUCOSE.....	189
FIGURE 99. EFFET DU CCCP SUR LES VITESSES DE PROLIFERATION ET DE RESPIRATION SUR LES TROIS SOUCHES.....	190

FIGURE 100. ILLUSTRATION DE L'UTILISATION POSSIBLE DU GLYCEROL PAR LES CELLULES <i>K. LACTIS</i>	192
FIGURE 101. EFFET DU CCCP SUR LA PRODUCTION D'ETHANOL DANS LES CELLULES <i>K. LACTIS</i>	192
FIGURE 102. COMPARAISON DE LA RESPIRATION ENDOGENE, DECOUPLEE ET NON PHOSPHORYLANTE DANS LA SOUCHE <i>K. LACTIS</i> ...	193
FIGURE 103. EFFET DU CCCP SUR LES ACTIVITES ENZYMATIQUES DANS LA SOUCHE <i>K. LACTIS</i>	193
FIGURE 104. EFFET DU CCCP SUR LA QUANTITE DE CYTOCHROMES DANS LA SOUCHE <i>K. LACTIS</i>	194
FIGURE 105. EFFET DU CCCP ET DU GLUCOSE SUR LA PROLIFERATION, LA RESPIRATION ET LES ACTIVITES ENZYMATIQUES MITOCHONDRIALES DANS LA SOUCHE <i>K. LACTIS</i>	195
FIGURE 106. ETUDE DE LA RESPIRATION SUR MITOCHONDRIES ISOLEES DE <i>K. LACTIS</i>	197
FIGURE 107. ETUDE DE LA RESPIRATION SUR MITOCHONDRIES ISOLEES SUIVANT DIFFERENTS SUBSTRATS FOURNIS SUR LES TROIS SOUCHES.....	197
FIGURE 108. EFFET DES INHIBITEURS DU COMPLEXE A SUR LES TROIS SOUCHES.....	198
FIGURE 109. ACTIVITE EN GEL DE COMPLEXES DU SYSTEME OXPHOS DANS LES TROIS SOUCHES.....	199
FIGURE 110. EFFET DE DIFFERENTES CONCENTRATIONS DE DIGITONINE SUR L'ACTIVITE SUR GEL DES NADH DESHYDROGENASES DANS DES MITOCHONDRIES DE LEVURES.....	200
FIGURE 111. ILLUSTRATION DES MECANISMES DE REGULATION DE LA BIOGENESEMITOCHONDRIALE VIA L'HEME.....	206
FIGURE 112. ILLUSTRATION DE L'EFFET DU GLUCOSE SUR LA BIOGENESEMITOCHONDRIALE DANS LA SOUCHE <i>S. CEREVISIAE</i>	208



Chapitre 1

Introduction

Générale

1.1 La cellule, échange et production d'énergie

La cellule est, au sens thermodynamique, un système ouvert, c'est à dire échangeant avec son environnement de la matière et de l'énergie. Des processus essentiels à son maintien tels que la prolifération ou la division sont liés à des transformations d'énergie, que ce soit de l'énergie osmotique, due à la différence de potentiel chimique entre deux compartiments, ou de l'énergie impliquant des réactions d'oxydoréduction ou des réactions liées à l'instabilité relative d'une liaison entre deux groupements d'une molécule chimique.

Le métabolisme énergétique cellulaire consiste en des échanges de l'énergie entre des voies connectées par des intermédiaires. Par les voies anaboliques, la cellule consomme les substrats carbonés présents dans son environnement afin de générer de la biomasse comme des lipides, des glucides, des acides aminés ou nucléiques (**Figure 1**).

Les processus anaboliques, ou production nette de biomasse, et les processus de maintenance cellulaire, vont globalement entraîner l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate, ou ATP, en ADP et phosphate, ainsi qu'une réduction des coenzymes comme le NAD^+ par exemple. L'ATP est la molécule énergétique essentielle de la cellule. L'énergie libérée lors de son hydrolyse est couplée à la synthèse de protéines et autres molécules complexes, ou encore à la contraction musculaire. Afin de permettre le bon fonctionnement des voies anaboliques, il

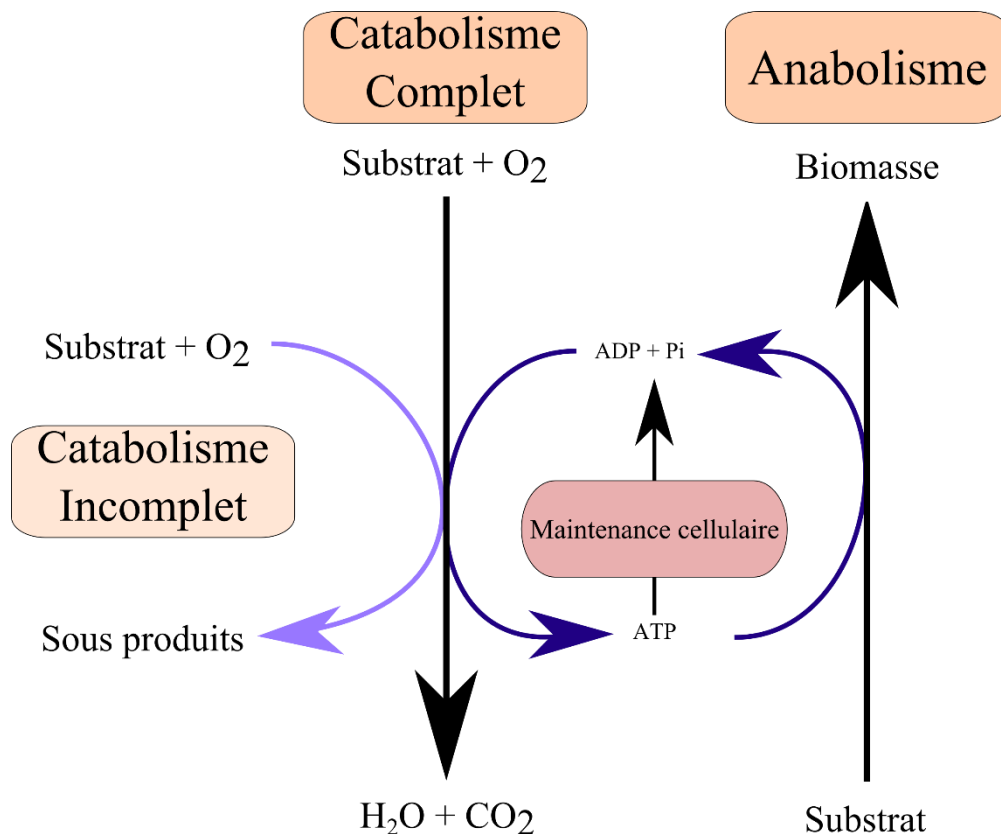


Figure 1. Illustration des principaux systèmes de transformations d'énergie dans les cellules en prolifération

est nécessaire de réoxyder les coenzymes réduits et de régénérer l'ATP par les voies cataboliques. Les processus cataboliques sont des oxydations totales du substrat carboné en H₂O ou CO₂ ou incomplètes permettant la production de composés partiellement oxydés. La réaction de synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate est une réaction endothermique, c'est-à-dire une réaction défavorisée thermodynamiquement qui nécessite d'être couplée à une réaction favorisée pour pouvoir se réaliser.

Pour les cellules eucaryotes non-chlorophylliennes, il existe deux systèmes permettant la synthèse d'ATP : (1) les phosphorylations au niveau du substrat et (2) les oxydations phosphorylantes (OXPHOS) qui se produisent au niveau des mitochondries.

1.1.1 La mitochondrie

Cet organe présent dans les cellules eucaryotes a été observé pour la première fois en 1857 par Rudolf Albert Von Kölliker et tient son nom du grec mitos (fil) et chondros (grains), du fait de ces premières observations. Il a été décrit que son origine serait endosymbiotique. La mitochondrie serait à l'origine un organisme procaryote qui aurait été endocyté par une autre cellule procaryote comme décrit par Margulis en 1985 (Margulis and Bermudes, 1985) **Figure 2**.

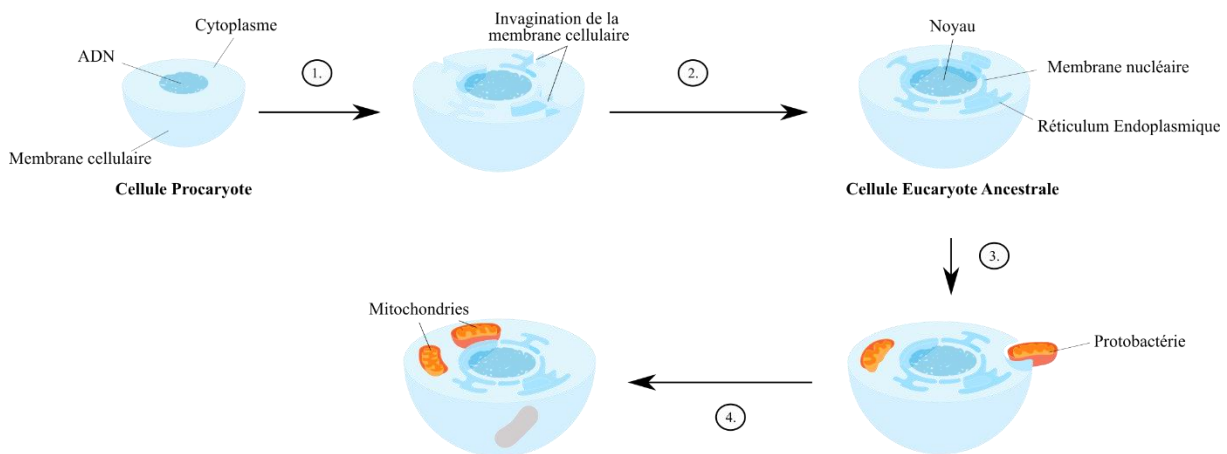


Figure 2. Illustration de la théorie de l'endosymbiose

1. La cellule procaryote ancestrale a développé des invaginations membranaires augmentant son rapport surface/volume. **2.** Les replis finissent par former un système nucléaire précoce. Il renferme l'ADN. C'est la première cellule eucaryote. **3.** Une protéobactérie aérobie pénètre dans l'eucaryote, en tant que proie ou parasite, et parvient à éviter la digestion. **4.** La capacité à utiliser l'oxygène pour produire de l'énergie devient un atout pour l'hôte, lui permettant de prospérer dans un environnement de plus en plus riche en oxygène alors que les autres eucaryotes ancestraux disparaissent. La protéobactérie est finalement assimilée et devient une mitochondrie.

Les mitochondries possèdent deux membranes, une externe et une interne délimitant deux autres compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. Une grande diversité de protéines est présente que ce soit au niveau de ces membranes ou des deux compartiments qu'elles délimitent. Ces protéines participent aux nombreux processus cellulaires dans laquelle la mitochondrie est impliquée tels que le cycle de Krebs, la biosynthèse de l'hème ou encore le processus de mort cellulaire par apoptose. Elles participent aussi aux échanges de métabolites entre cet organite et le reste de la cellule. La membrane interne forme des invaginations dans la matrice mitochondriale appelées crêtes (Frey and Mannella, 2000).

Du fait de la symbiose existant entre la mitochondrie et ce qui fut initialement la cellule hôte, la majeure partie des protéines mitochondriales sont codées par l'ADN nucléaire. Les mitochondries possèdent, cependant, à l'intérieur de la matrice leur propre ADN mitochondrial (ADNmt), probablement vestige du génome du procaryote ancestral. Parmi les milliers de protéines présentes dans la mitochondrie, l'ADNmt ne code qu'une dizaine d'entre elles **Figure 3**.

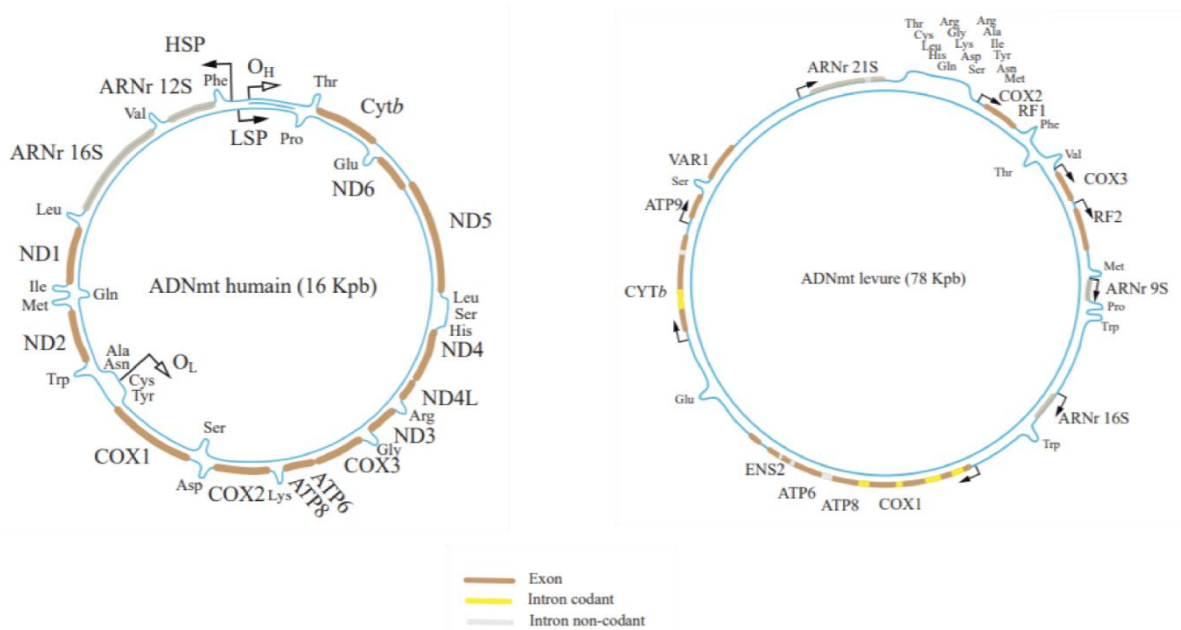


Figure 3. Carte de l'ADN mitochondrial de contenu dans les cellules humaines et de *Saccharomyces cerevisiae*

Dans les cellules animales, quatorze sous-unités des complexes des OXPHOS sont codées par l'ADNmt alors que l'ADNmt de *S. cerevisiae* codent pour sept sous-unités. Dans les deux espèces, il code pour le cytochrome b du complexe III, trois sous-unités du complexe IV : COX1, COX2 et COX3, et trois sous-unités de l'ATPsynthase : ATP6, ATP8 et ATP9. D'après (Bietenhader, 2009).

La dépendance de la mitochondrie vis à vis de l'ADN nucléaire pour sa composition protéique implique la présence d'une machinerie d'import et de repliement de ces différentes protéines mitochondriales reposant sur un système de translocases et de protéines chaperonnes (Chacinska et al., 2009). Cette dualité génomique fait du processus de biogenèse mitochondriale un élément central de la communication mitochondrie-noyau. De plus, les mitochondries ne doivent pas être considérées comme des organites individuels de taille et nature définies. En effet, il est maintenant très bien établi qu'elles constituent un réseau dynamique avec des processus dits de fusion et de fission. La nature de ce réseau mitochondrial repose sur l'équilibre entre ces différents événements de fusion et fission qui mettent en jeu divers acteurs moléculaires (Mcbride and Neuspiel, 2006; Cervený et al., 2007; Hoppins et al., 2007).

Comme dit précédemment, la mitochondrie est le siège de la principale voie métabolique permettant la formation d'ATP, le système des OXPHOS qui diffère des mécanismes formant de l'ATP à partir de la phosphorylation au niveau du substrat. Ce système couple l'oxydation de ses substrats et la réduction de l'oxygène à une extrusion des protons matriciels vers l'espace intermembranaire. La membrane interne étant quasi imperméable aux protons, cela permet la formation d'un gradient de proton à l'origine de la formation de d'ATP par l'ATP synthase. Comme, il sera décrit ci-après, le système des OXPHOS participe, par exemple, à la réoxydation du NADH en NAD^+ , ce dernier étant lui-même nécessaire au processus glycolytique. Dans le même ordre d'idée, le pyruvate, produit lors de la glycolyse, est nécessaire au fonctionnement du cycle de Krebs qui est lui aussi lié au fonctionnement du système des OXPHOS de par les coenzymes réduits qu'il produit.

1.1.2 Phosphorylation au niveau du substrat (Figure 4)

Les phosphorylations au niveau du substrat sont réalisées lors de la glycolyse et du cycle de Krebs. Ainsi, au cours de l'oxydation du glucose en pyruvate dans le cytosol, il y aura formation d'ATP lors de la transformation du 1,3-biphosphoglycérate en 3-phosphoglycérate par la phosphoglycérate kinase et de celle du phosphoénolpyruvate en pyruvate par la pyruvate kinase. Au niveau du cycle de Krebs, qui a lieu dans la matrice mitochondriale, la transformation du succinyl-CoA en succinate par la succinyl-coA synthase conduit à la production d'ATP chez les levures et les plantes (Kaufman and Alivisatos, 1955; Rigoulet et al., 1985), et/ou de GTP (Guanosine 5' tri-phosphate) chez les mammifères, notamment dans le foie (Sanadi et al., 1954; Johnson et al., 1998; Lambeth et al., 2004). Ces enzymes productrices d'ATP sont très régulées. La pyruvate kinase est inhibée par des métabolites tels que l'acétyl-coA, l'alanine et l'ATP. *A contrario*, le fructose-1,6-bis-phosphate est un activateur allostérique de cette enzyme (Pilkis and Granner, 1992; Ichai et al., 2001).

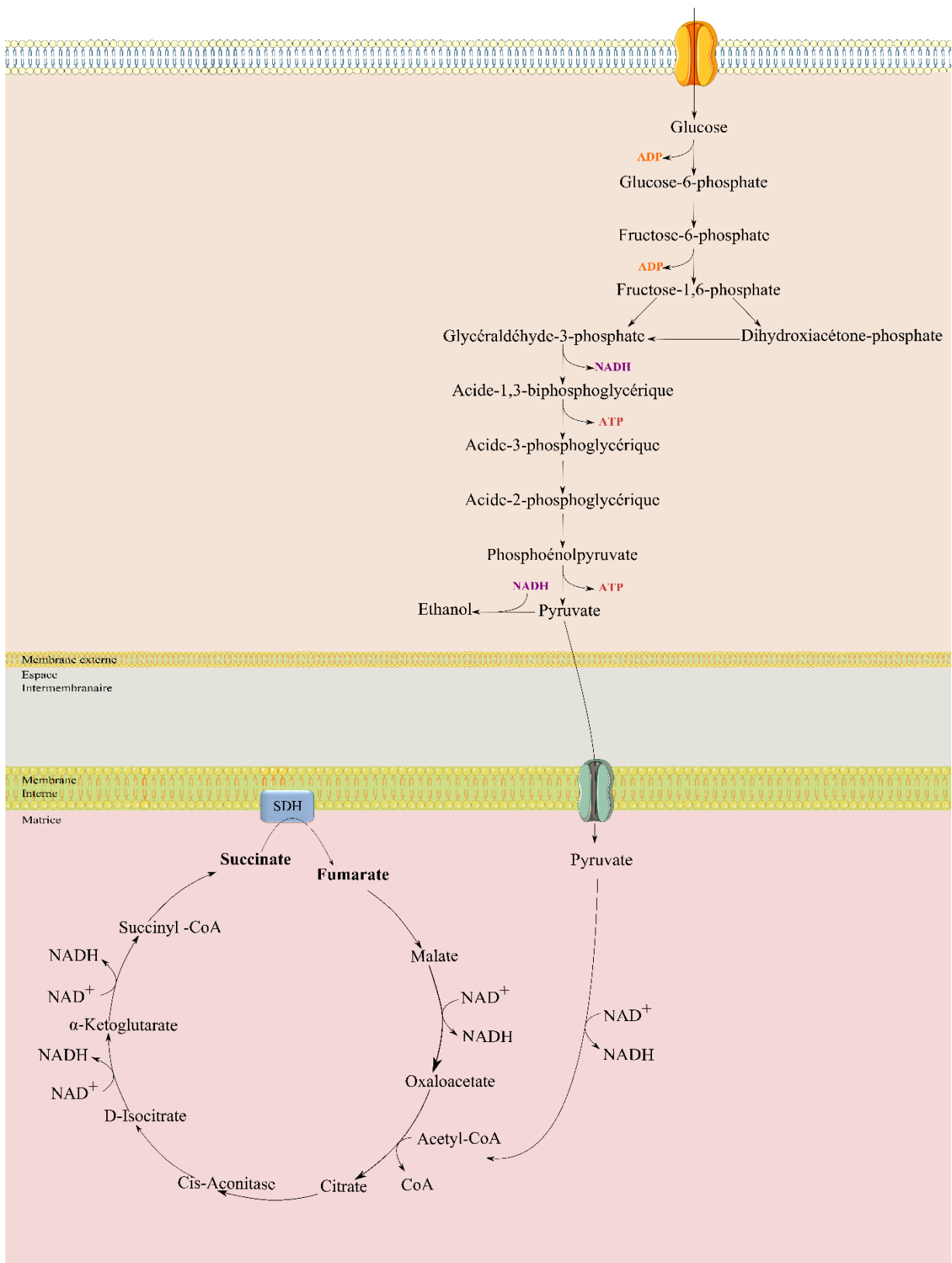


Figure 4. Illustration de la glycolyse et du cycle de krebs

1.1.3 Le système des oxydations phosphorylantes (Figure 5)

Il est localisé dans la membrane interne des mitochondries. Il se définit comme un couplage chimioosmotique entre l'activité de la chaîne respiratoire et d'un système phosphorylant, composé de l'ATP synthase, permettant la synthèse de l'ATP et des transporteurs de phosphate et d'ADP.

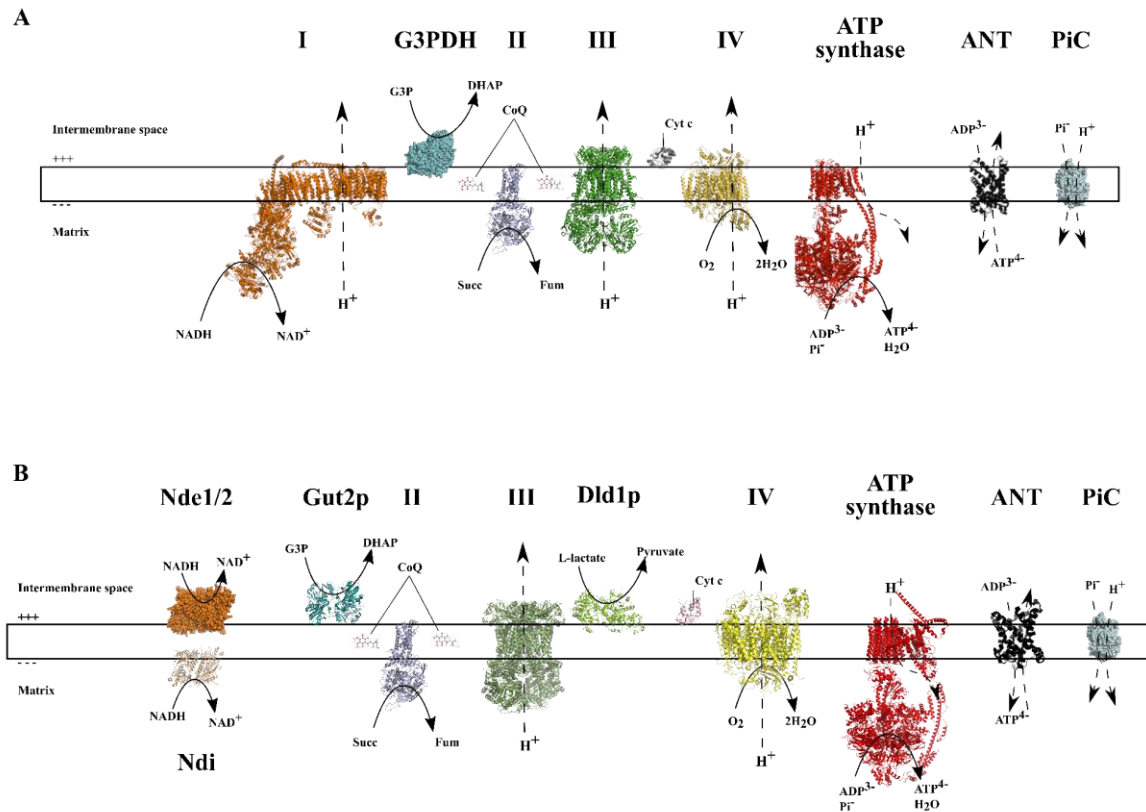


Figure 5. Illustration du système des oxydations phosphorylantes

A. Système des OXPHOS des cellules de mammifères. **B.** Système des OXPHOS des cellules de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Le système des OXPHOS peut être décrit comme deux entités : la chaîne respiratoire et le système phosphorylant. La chaîne respiratoire est fonctionnellement couplée au système phosphorylant composé par l'ATP synthase, les transporteurs de nucléotides adényliques (ANT) et de phosphate inorganique (PiC). Les structures PDB utilisées sont : **(A)** Complexes I, III and IV : 5GPN de *Bos Taurus* (respirasome) ; Complexe II : 3SFD de *Sus scrofa* ; ATP synthase : 5FIL de *Bos Taurus* ; Cyt c : 2B4Z de *Bos Taurus* ; ANT : 1OKC de *Bos Taurus* ; G3PDH : 2QCU de *Escherichia coli*. **(B)** Ndi : 4G9K de *S. cerevisiae* ; Nde1/2 : 4G6H (NDH avec NADH de *S. cerevisiae*) ; Complexe II : 1ORZ de *S. cerevisiae* ; Gut2p : 3PYM de *S. cerevisiae* ; Complexe III : 1KB9 de *S. cerevisiae* ; Complexe IV : 1V54 de *Bos Taurus* ; Cyt c : 1CRH de *S. cerevisiae* ; Dld1p : 1LDC de *S. cerevisiae* ; ATP synthase : 6B8H de *S. cerevisiae* ; ANT : 4C9G de *S. cerevisiae*.

1.1.3.1 La chaîne respiratoire

1.1.3.1.1 Complexe I

La NADH-coenzyme Q réductase, ou Complexe I, est composée de 45 sous-unités chez le bœuf pour une masse moléculaire d'environ 1MDa (Carroll et al., 2006). Dans cette structure se trouvent plusieurs centres fer-soufre et un groupement flavine de type FMN impliqués dans les processus d'oxydation du NADH mitochondrial et de transferts d'électrons aux quinones. Cette réaction d'oxydo-réduction est couplée à l'extrusion de protons vers l'espace intermembranaire mitochondriale.

1.1.3.1.2 NADH déshydrogénases interne et externes

La chaîne respiratoire de *Saccharomyces cerevisiae*, contrairement aux chaînes respiratoires décrites chez les mammifères, les bactéries (Leif et al., 1993, 1995; Sled' et al., 1993) et certaines levures telles que *Candida utilis* (Grossman et al., 1974; Cogley et al., 1975), présente la particularité de ne pas posséder de complexe I. En revanche, elle possède des NADH déshydrogénases qui ne sont pas couplées à l'extrusion de protons.

Les premières études réalisées dans les années 1970 ont permis de montrer que la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* pouvait accepter les électrons provenant de l'oxydation du NADH cytosolique grâce aux NADH déshydrogénases externes (Nde1/2p), (von Jagow and Klingenberg, 1970; Luttkik et al., 1998; Small and McAlister-Henn, 1998). Ces chaînes respiratoires peuvent aussi accepter les électrons provenant de l'oxydation du NADH matriciel grâce à la NADH déshydrogénase interne (Ndip) (von Jagow and Klingenberg, 1970). La Ndip permet, quant à elle, la réoxydation du NADH produit au niveau du cycle de Krebs, de l'alcool déshydrogénase mitochondriale et de l'acétaldéhyde déshydrogénase mitochondriale déterminante pour certaines souches lors d'une prolifération sur éthanol (Tessier et al., 1998; Boubekour et al., 2001). Elle est synthétisée dans le cytosol sous la forme d'un précurseur avant d'être importée sur la face interne de la membrane interne mitochondriale et de subir un clivage par une peptidase matricielle. Ces NADH déshydrogénases transmettent ensuite leurs électrons aux quinones.

Ces déshydrogénases ne possèdent pas de centre fer/soufre ni de canal à proton, ce qui les rend insensibles aux inhibiteurs classiques du complexe I tels que la roténone ou la piericidine A (Ohnishi, 1972).

1.1.3.1.3 Complexe II

La Succinate déshydrogénase, ou Complexe II, couple sa fonction d'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Située du côté matriciel de la membrane interne mitochondriale, ce complexe est constituée de quatre sous-unités (Sdh1p, Sdh2p, Sdh3p et Sdh4p) dont deux (Sdh3p et Sdh4p) sont ancrées dans la membrane (Lombardo et al., 1990; Chapman et al., 1992; Bullis and Lemires, 1994; Daignan-Fornier et al., 1994; Oyedotun and Lemire, 2004). Trois centres fer-soufre, un groupement FAD et un hème b sont aussi présents dans ce complexe et participent à la réaction d'oxydation du succinate. Un transfert d'électrons se fait alors du complexe II vers les quinones.

1.1.3.1.4 La glycérol-3-phosphate déshydrogénase

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase est notée G3PDH dans les cellules de mammifères et Gut2p pour les levures. Cette protéine comme les Nde1/2 p est située sur la face externe de la membrane interne mitochondriale. Elle permet l'oxydation du glycérol-3-phosphate (G3P) en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). La Gut2p, comme les Ndip, a pour cofacteur le FAD (von Jagow and Klingenberg, 1970; Sprague and Cronan, 1977; Rønnow and Kielland-Brandt, 1993), et permet la réoxydation du NADH cytosolique *via* la G3PDH cytosolique (**Figure 6**) (Larsson et al., 1998; Pålman et al., 2001, 2002).

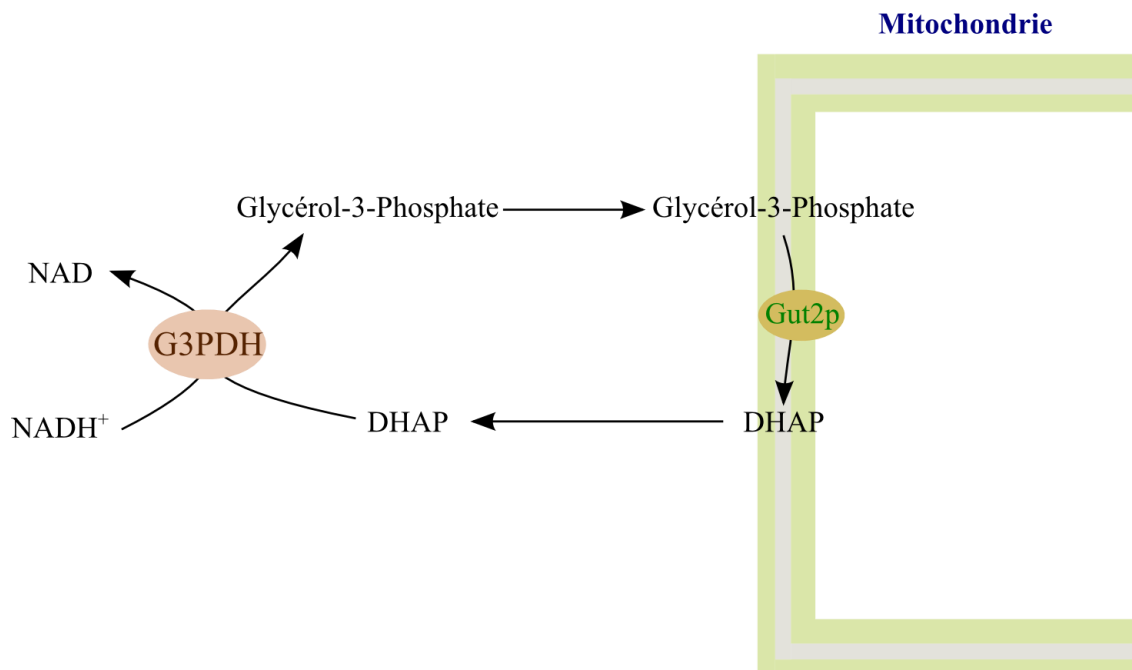


Figure 6. Illustration de la réoxydation du NADH cytosolique par la G3PDH cytosolique et Gut2p

1.1.3.1.5 Complexe III

L'ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase, ou Complexe III, catalyse le transfert des électrons de l'ubiquinol vers le cytochrome c. Le transfert des électrons à travers ce complexe est couplé à une extrusion de protons transmembranaire. Chez la levure, ce complexe est constitué de 10 sous-unités. Trois d'entre elles sont des sous-unités catalytiques qui contiennent les groupes prosthétiques (coenzymes liés de façon covalente à la protéine) : cytochrome b, cytochrome c1 et la protéine fer-soufre (protéine de Rieske). Le complexe III au sein de la membrane interne mitochondriale est toujours associé en homodimère (Brandt et al., 1994; Tzagoloff, 1995).

Au niveau du site Q_o (pour Quinone outside), les quinols vont séquentiellement transférer un électron au cytochrome b_L et un électron au centre fer/soufre. Lors de ce processus les quinols vont donner un électron, passant ainsi par un état de semiquinone avant de céder l'autre électron. L'électron transmis au b_L va ensuite être transféré au cytochrome b_H puis à une quinone oxydée au niveau du site Q_i, créant ainsi une forme semiquinone. Cette semiquinone sera par la suite réduite par les électrons transmis par l'oxydation d'une deuxième quinol au niveau du site Q_o.

1.1.3.1.6 Complexe IV

La cytochrome c oxydase, ou Complexe IV, est le dernier complexe de la chaîne respiratoire catalysant la dernière des réactions successives d'oxydoréduction conduisant à la réduction du dioxygène en eau. Ce complexe respiratoire permet de transférer les électrons provenant du cytochrome c à l'oxygène. Cette étape irréversible est couplée à une extrusion de protons, ce qui fait de la cytochrome c oxydase le dernier site de couplage. Chez la levure, la cytochrome c oxydase est composée de onze sous-unités. Les trois sous-unités majeures sont codées par le génome mitochondrial (Cox1p, Cox2p et Cox3p), les neuf autres sous-unités périphériques sont codées par le génome nucléaire (Saraste, 1999; Beauvoit and Rigoulet, 2001).

Le complexe IV possède un premier centre cuivre, nommé Cu_A, capable de récupérer les électrons transmis par le cytochrome c. Puis, les électrons sont transférés au second centre cuivre, Cu_B, après avoir été transmis aux hèmes a et a₃. C'est au niveau du centre Cu_B qu'a lieu l'oxydation de l'oxygène, l'accepteur final des électrons.

1.1.3.1.7 Lactate déshydrogénase

Les mitochondries de *S. cerevisiae* contrairement à celles de la cellule animale ont la particularité de posséder une D-lactate déshydrogénase, Dld1 située entre les complexes III et

IV (Nygaard, 1961). Cette enzyme mitochondriale est située sur la face externe de la membrane interne. Elle oxyde le D-lactate en pyruvate et transfère ses électrons au cytochrome c *via* les centres Zn^{++} et FAD (Gregolin and Singer, 1961, 1962, 1963; Gregolin and D'Alberon, 1964; Gregolin and Scaella, 1964; Gregolin et al., 1964).

Il existe aussi une L-lactate déshydrogénase, située dans l'espace intermembranaire. Cette LDH couple l'oxydation de la L-lactate au transfert d'électrons au cytochrome c. Ces deux LDH sont impliquées dans la prolifération des levures sur lactate comme substrat carboné.

Les différents complexes qui composent la chaîne respiratoire permettent de coupler le transfert des électrons, issu de l'oxydation des différents substrats par les oxydases jusqu'à l'oxygène, à un transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Les complexes I, III et IV associent donc le transfert d'électrons et de protons quand le complexe II et les autres déshydrogénases ne transportent que les électrons. Dans ce système, les protons s'accumulent dans l'espace intermembranaire permettant ainsi une différence de potentiel électrochimique en protons. Ce potentiel est appelé force protomotrice qui prend en compte à la fois une composante électrique et une composante chimique, liées à cette accumulation de protons hors de l'espace matriciel. Le système phosphorylant, seconde entité du système des OXPHOS, utilise la force protomotrice pour la synthèse d'ATP.

1.1.3.2 Le système phosphorylant

1.1.3.2.1 L'ATP synthase

L'ATP synthase, ou F1F0-ATP synthase, permet de coupler le transfert de protons dans le sens de leur gradient électrochimique à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi. Cette enzyme est fonctionnellement réversible. Chez la levure, l'ATP synthase est composée de treize sous-unités essentielles à sa fonction. Cette enzyme possède une structure tripartite : la partie membranaire responsable du transport de protons à travers la membrane (F0), une partie matricielle responsable de l'activité catalytique permettant la synthèse d'ATP (F1) et un stator ou pied périphérique qui va permettre de maintenir la tête catalytique fixe (Abrahams et al., 1994; Boyer, 1997; Menz et al., 2001; Rubinstein et al., 2003).

1.1.3.2.2 Les transporteurs de nucléotides adényliques (ANT) et de phosphate

Le système phosphorylant fait intervenir deux transporteurs. Le premier est le transporteur de nucléotides adényliques. Il permet d'échanger de façon électrogénique l'ADP³⁻ et l'ATP⁴⁻ de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Le second est le transporteur de phosphate (PiC) qui permet le transport électroneutre du phosphate à l'intérieur

de la matrice en même temps qu'un proton. Chez la levure, ce transporteur a été beaucoup étudié, il constitue un élément important du contrôle des oxydations phosphorylantes (Guerin et al., 1977; Rigoulet et al., 1977, 1983; Rigoulet and Guerin, 1979).

Le système OXPHOS a une importance capitale chez les organismes aérobies qui est soumis à différents niveaux de régulation. Ces régulations sont pour la plupart toutes liées aux propriétés intrinsèques des enzymes constituant ce système des OXPHOS et modifient donc essentiellement les propriétés cinétiques de ces enzymes. Cependant, pour réguler sa conversion d'énergie au niveau mitochondrial, la cellule peut aussi mettre en place tout un système de signalisation visant à modifier la quantité d'enzymes mitochondriales et sans nécessairement modifier les propriétés cinétiques des enzymes constituant les oxydations phosphorylantes.

1.2 La biogenèse mitochondriale, une communication entre le noyau et la mitochondrie

La biogenèse mitochondriale est un processus important et complexe pour la cellule eucaryote. L'état stationnaire dans lequel se trouve la cellule vivante implique que la production d'ATP compense sa consommation. Ainsi, la cellule doit s'adapter aux variations de la demande énergétique. Du fait de l'importance des OXPHOS dans la production d'ATP, la mitochondrie se trouve au premier plan dans cette régulation. Même si des régulations cinétiques du système OXPHOS existent, l'adaptation à la demande énergétique peut être aussi obtenue par l'ajustement de la quantité du matériel mitochondrial de manière plus globale. Dans ce cas, ce ne sera pas le flux de synthèse d'ATP au niveau des oxydations phosphorylantes qui sera modifié mais la quantité de matériel mitochondrial. En effet, il a pu être mis en évidence que dans un milieu non fermentescible, l'activité du système des OXPHOS, *via* la vitesse de la respiration, était parfaitement proportionnelle au contenu en cytochromes mitochondriaux, composant des sous-unités de la chaîne respiratoire. Ainsi, dans un tel milieu, doubler le nombre d'unités de chaînes respiratoires, revient à doubler la synthèse d'ATP (Devin et al., 2006). La biogenèse mitochondriale intervient donc à ce niveau. Il s'agit d'un processus complexe puisque la cellule doit mettre à contribution deux génomes pour synthétiser différentes protéines, les importer, les assembler, insérer à la fois des co-facteurs et certains complexes dans les membranes. Ce mécanisme induit donc une réelle communication entre les deux ADN cellulaires et les deux compartiments renfermant ces ADN.

Il existe aussi un processus de dégradation sélective des mitochondries (mitophagie) et qui intervient lui aussi dans la modulation de la quantité du matériel mitochondrial (Bhatia-kissova and Camougrand, 2010; Youle and Narendra, 2011).

1.2.1 La biogenèse mitochondriale chez les mammifères

1.2.1.1 Acteurs principaux de la biogenèse mitochondriale dans la cellule (Figure 7)

La majorité des protéines mitochondriales dont celles impliquées dans la transcription de l'ADNmt sont codées par l'ADN nucléaire. Ainsi, la majeure partie des protéines régulatrices de la biogenèse mitochondriale ont été identifiées comme étant des protéines ayant une origine nucléaire. Parmi ces régulateurs ont été identifiés les NRF1 et 2, les PPAR et la famille des PGC1.

Le régulateur Nuclear Respiratory Factor-1 (NRF-1) a été identifié en étudiant le promoteur du gène codant pour le cytochrome c (Evans and Scarpullas, 1989; Evans and Scarpulla, 1990). Ce facteur de transcription de 68 kDa est sous forme homodimérique lorsqu'il se fixe sur l'ADN (Virbasius et al., 1993; Gugneja and Scarpulla, 1997). Le Nuclear Respiratory Factor-2 (NRF-2), quant à lui, a été découvert en étudiant les gènes de la cytochrome c oxydase (Virbasius and Scarpulla, 1991). Il s'agit d'un complexe qui implique cinq protéines, α , β_1 , β_2 , γ_1 et γ_2 (Gugneja et al., 1995). Les protéines NRF-1 et NRF-2 partagent de nombreuses cibles et sont à l'origine de la transcription de nombreux gènes mitochondriaux tels que celui codant le cytochrome c, des sous unités des différents complexes du système des OXPHOS, de différents transporteurs et navettes membranaires et protéines impliquées dans la régulation de l'expression des gènes mitochondriaux ou encore de la première enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème (Kelly and Scarpulla, 2004). Une autre cible de ces deux facteurs de transcription est un gène nucléaire codant pour TFAM, le facteur de transcription permettant l'expression des gènes mitochondriaux.

La famille des PPARs (Peroxisome Proliferator Associated Receptors) comprenant PPAR α , PPAR β et PPAR γ . sont des récepteurs hormonaux, c'est-à-dire qu'ils sont activés suite à la fixation d'un ligand. Ce sont également des facteurs de transcription et une fois activés ils régulent l'expression de gènes spécifiques (Glass and Rosenfeld, 2000; Alaynick, 2008). Les PPARs fonctionnent en formant des hétérodimères avec une autre famille de récepteurs nucléaires, les RXRs. Un membre de la famille en particulier, PPAR γ , a été un acteur majeur dans la découverte d'une famille de régulateurs de la biogenèse mitochondriale chez les mammifères : la famille PGC-1.

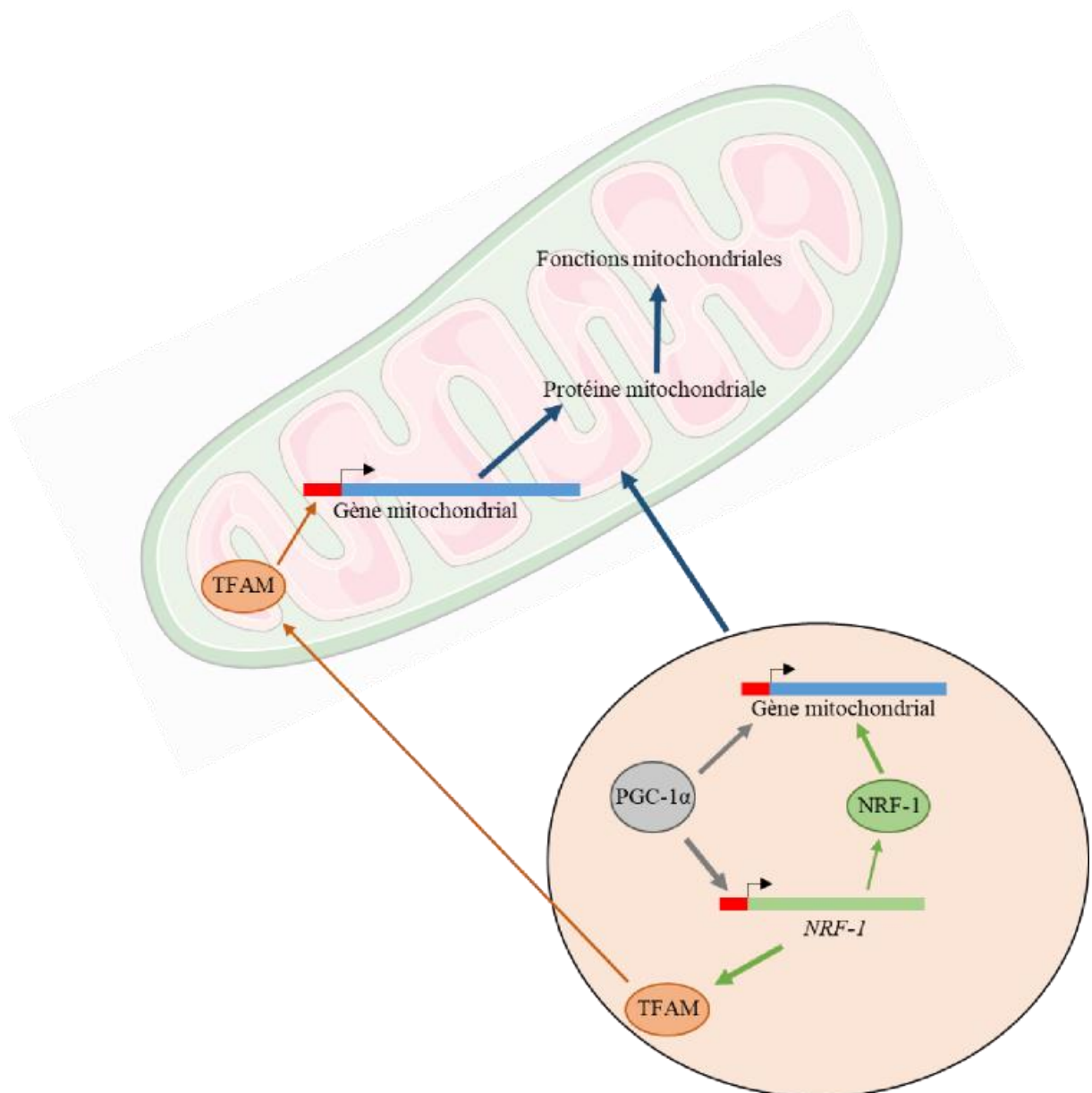


Figure 7. Régulation transcriptionnelle de la biogenèse mitochondriale dans les cellules mammifères

L'expression des gènes mitochondriaux codés par le génome nucléaire est régulée par des facteurs transcriptionnels tels que NRF-1 et son coactivateur PGC-1 α . Le TFAM est impliqué dans l'expression des gènes codés par l'ADNmt.

La famille PPAR Gamma Coactivator-1 (PGC-1) est constituée des protéines PGC- 1 α , PRC et PGC-1 β . Le premier membre, PGC-1 α , a été identifié comme pouvant interagir avec le récepteur nucléaire PPAR γ et comme étant un élément clef du phénomène de thermogénèse adaptative (Puigserver et al., 1998). Cette famille protéique agit comme co-activateurs transcriptionnels c'est à dire que ces protéines interagissent avec d'autres facteurs de transcription afin d'amplifier l'expression des gènes cibles. Elles sont impliquées dans le remodelage de la chromatine, l'interaction avec l'ARN polymérase de type II ou encore le recrutement d'autres coactivateurs transcriptionnels. La famille PGC-1 coordonne donc

l'activité de multiples facteurs de transcription impliqués dans le processus de biogenèse mitochondriale. En effet, non seulement ils interagissent avec divers facteurs de transcriptions tels que NRF-1 et NRF-2 mais ils participent à l'expression des gènes codant pour ces protéines.

1.2.1.2 Quelques niveaux de régulation

Les mitochondries étant un élément clef dans la synthèse d'ATP, le maintien de la balance rédox mais également la production de multiples molécules essentielles à la vie cellulaire, telle que l'hème, la biogenèse mitochondriale est un processus finement régulé. Dans les cellules de mammifères, la famille PGC-1 est régulièrement au cœur de cette régulation, en particulier la protéine PGC-1 α qui est considérée comme un des acteurs majeurs de ce processus.

1.2.1.2.1 Niveau transcriptionnel :

Au niveau nucléaire, la voie AMPc/PKA est à l'origine d'une régulation de l'expression de PGC-1 α . La kinase PKA phosphoryle et par conséquent active la protéine CREB (cAMP Responsive Element Binding protein), un cofacteur transcriptionnel dont la séquence de liaison est présente sur plusieurs promoteurs. Une fois activée, la protéine CREB initie des cascades transcriptionnelles impliquées dans de multiples mécanismes tels que la biogenèse mitochondriale (Cammarota et al., 1999; Lee et al., 2005). En effet, le promoteur PGC-1 α ainsi que certains gènes mitochondriaux, tels que ND2, ND4 et ND5, codant des sous-unités du complexe I, ont une séquence de liaison à CREB (Lee et al., 2005). Par conséquent, l'activation de la voie de l'AMPc conduit à la biogenèse mitochondriale *via* PGC-1 α .

1.2.1.2.2 Niveau post-traductionnel

PGC-1 α est contrôlé par plusieurs modifications post-traductionnelles. La protéine PGC-1 α peut être régulée par phosphorylation. En fonction des sites de phosphorylation, elle peut être soit stabilisée soit dissociée de protéines inhibitrices (Puigserver et al., 2001; Fan et al., 2004). Etant très sensible à l'état énergétique cellulaire, cette protéine est étroitement régulée par des capteurs de stress tels que AMPK (AMP-activated protein kinase) et la SIRT1. La phosphorylation médiée par AMPK et la désacétylation médiée par SIRT1 activent la PGC-1 α dans des conditions de déplétion d'énergie (Rodgers et al., 2005; Jäger et al., 2007).

1.2.1.3 Son rôle dans le métabolisme du cancer

Le rôle de PGC-1 α sur la biogenèse mitochondriale et donc sur le métabolisme énergétique fait de cette protéine une des premières cibles des oncogènes lors de la tumorigénèse. En effet, il apparaît que, suivant les cancers, PGC-1 α peut-être un suppresseur de tumeurs ou agir comme un pro-oncogène suivant les modifications post-traductionnelles exercées par les

onco-suppresseurs et les oncogènes. Ainsi, l'équipe de Yan a pu montrer qu'une stimulation de la biogenèse mitochondriale *via* la phosphorylation de PGC-1 α par la voie AMPc/PKA entraînait une différenciation des cellules du glioblastome en astrocytes normaux, et ce, *via* une stimulation des oxydations phosphorylantes (Xing et al., 2018). En revanche, il a été montré que l'activation de PGC-1 α pouvait, également, être promoteur de l'oncogénèse dans des modèles murins de carcinomes du côlon et du foie induits par des produits chimiques (Bhalla et al., 2011; Tan et al., 2016) mais aussi qu'il favorisait le phénomène métastatique dans le cancer du sein (LeBleu et al., 2015).

1.2.2 La biogenèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Comme de nombreux microorganismes, la levure *S. cerevisiae* présente une grande faculté d'adaptation à différentes situations environnementales telles que le niveau d'oxygène ou encore la source carbonée à disposition dans le milieu. Elle est capable de survivre en utilisant une grande variété de sources carbonées comme par exemple le galactose, le glycérol, l'éthanol, ou encore le lactate. Néanmoins, en présence d'une forte concentration de glucose, son métabolisme favorise ce substrat au détriment des autres ce qui se traduit alors par une réduction de l'expression des gènes codants pour des protéines impliquées dans l'utilisation d'autres sources de carbones (Hedges et al., 1995; Santangelo, 2006). L'ATP produit est ainsi essentiellement glycolytique (Santangelo, 2006; Zaman et al., 2008). Ce phénomène dit de répression catabolique touche particulièrement l'expression de l'équipement enzymatique mitochondrial. Par contre, la mitochondrie est le principal site de conversion énergétique lors de la prolifération de *S. cerevisiae* sur des substrats tels que l'éthanol ou encore le lactate, qui sont alors qualifiés de substrats purement respiratoires ou non-fermentescibles. Ainsi, lors d'une prolifération sur glucose, un substrat fermentescible, la levure va produire de l'éthanol par fermentation du pyruvate formé lors de la glycolyse. Si la concentration du glucose disponible diminue drastiquement, une reprogrammation massive au niveau de la cellule a lieu avec notamment une forte induction des enzymes mitochondriales (Derisi et al., 1997). Ce phénomène appelé « shift diauxique » est une illustration de l'implication du processus de biogenèse mitochondriale dans l'adaptation à la source carbonée.

1.2.2.1 Un acteur clé : le complexe HAP

L'un des acteurs majeurs de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez la levure *S. cerevisiae* est le facteur de transcription HAP. Il s'agit d'un complexe constitué de quatre sous-unités : Hap2p, Hap3p, Hap4p et Hap5p (**Figure 8**). Les sous-unités 2, 3 et 5 sont impliquées dans la liaison à l'ADN et sont décrites comme constitutivement exprimées tandis que Hap4p est la sous-unité activatrice du complexe (Guarente et al., 1984; Pinkham and Guarente, 1985; Hahn et al., 1988; Forsburg and Guarente, 1989; McNabb et al., 1995). Identifié au départ comme étant un régulateur de l'expression du gène du cytochrome c (CYC1), le complexe HAP est aujourd'hui connu comme régulant l'expression de nombreux gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs, de la chaîne respiratoire ou encore de la traduction mitochondriale (Buschlen et al., 2003; Lascaris et al., 2003). En tant que régulateur du complexe transcriptionnel, la protéine Hap4p est décrite comme étant l'homologue fonctionnel de PGC-1 α chez la levure. En accord avec ce rôle clef dans la biogenèse mitochondriale, la

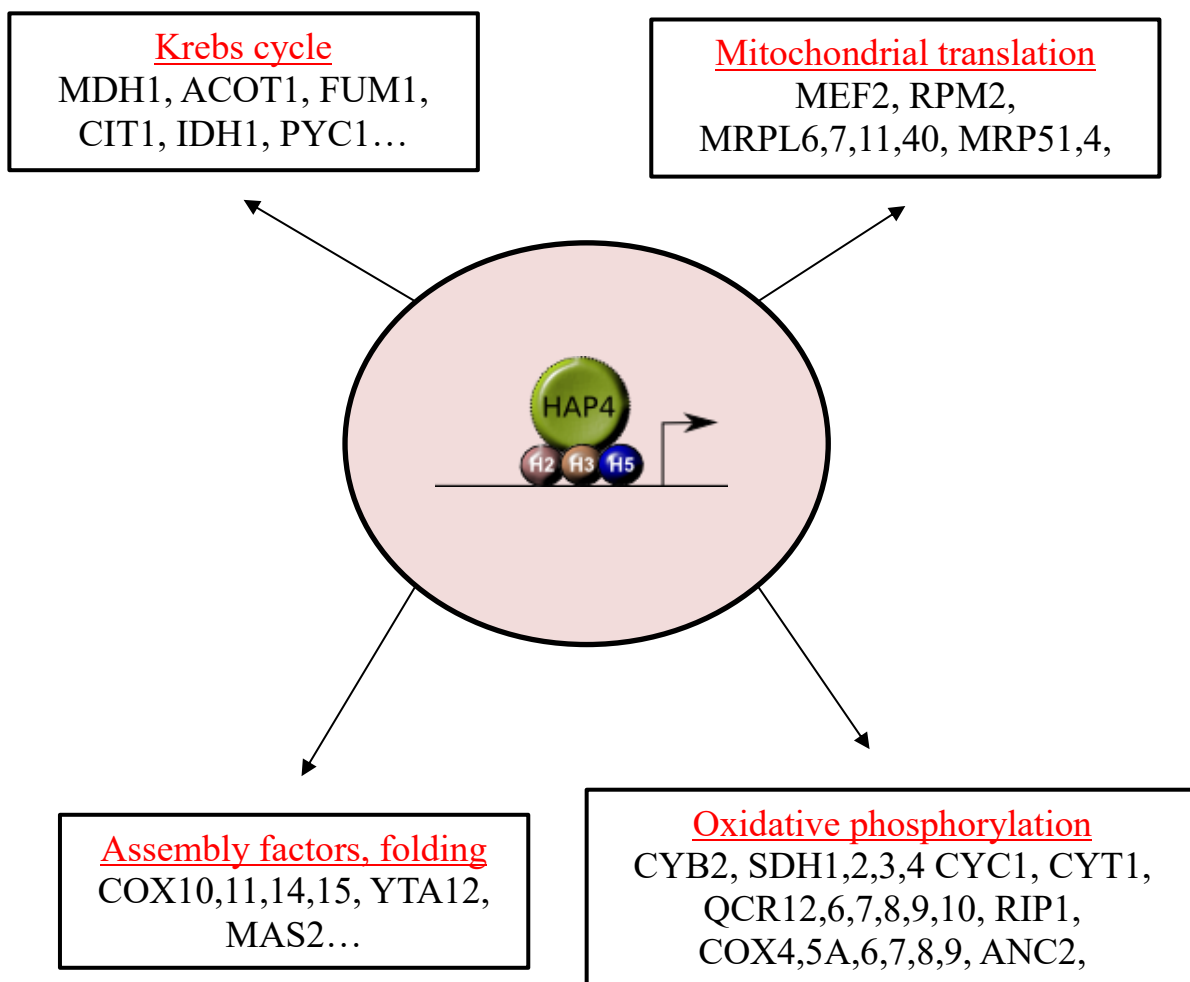


Figure 8. Gènes cibles du complexe HAP

Le complexe HAP est le régulateur clef de la biogenèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les quatre sous-unités constituant le complexe sont représentées ici, Hap2p (H2), Hap3p (H3) et Hap5p (H5) sont les sous-unités de liaison à l'ADN et Hap4p est la sous-unité activatrice du complexe.

délétion de n'importe lequel des gènes codant pour une des sous-unités de HAP entraîne une incapacité pour la levure *S. cerevisiae* de croître sur substrat respiratoire, pour lequel le système des oxydations phosphorylantes est la principale source de production d'ATP. Le rôle de HAP dans le métabolisme respiratoire est confirmé par le fait que la surexpression de la sous-unité activatrice Hap4p lors d'une prolifération de levures en glucose, entraîne une dérégulation partielle des gènes dont l'induction dépend du complexe HAP et qui sont soumis à la répression catabolique par le glucose (Blom et al., 2000; Lascaris et al., 2003).

1.2.2.2 Niveaux de régulation de la biogenèse mitochondriale

Malgré son rôle primordial dans la biogenèse du compartiment mitochondrial, peu de choses sont connues quant à la régulation du complexe HAP. À ce jour, un fait bien établi est celui de la forte induction de la sous-unité activatrice Hap4p lorsque *S. cerevisiae* croît sur substrat respiratoire. Les autres sous-unités sont, quant à elles, exprimées de façon constitutive (Forsburg and Guarente, 1989; McNabb and Pinto, 2005). Même s'il est connu que la régulation de Hap4p a lieu principalement au niveau transcriptionnel, tous les acteurs de la transcription de *HAP4* ne sont pas encore connus. Jusqu'à présent, seul le facteur de transcription Rds2p a pu être démontré comme régulant le niveau de l'ARNm de *HAP4* (Soontornngun et al., 2007). Au niveau post-traductionnel, rien n'est connu concernant la régulation de n'importe laquelle des sous-unités du complexe HAP.

L'AMPc a longtemps été considéré comme étant un inhibiteur de la biogenèse mitochondriale. Cependant, d'autres études ont montré que l'AMPc a un effet positif sur la biogenèse mitochondriale selon la source carbonée utilisée. Ces études ont contribué à mettre en évidence le rôle dans la biogenèse mitochondriale d'une voie de signalisation intimement liée à l'AMPc : la voie Ras/AMPc/PKA. Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, la voie de signalisation de l'AMPc peut être activée par deux mécanismes distincts. Le premier est un système dépendant du glucose extracellulaire basé sur l'activité du récepteur du glucose couplé à la protéine G, Gpr1. Ce système de récepteur couplé aux protéines G (GPCR) active l'adénylate cyclase, c'est-à-dire l'enzyme qui catalyse la synthèse de l'AMPc, ce qui conduit à une augmentation de l'AMPc intracellulaire (Thevelein and De Winde, 1999). La seconde dépend de l'activité des petites protéines RAS quelle que soit la source de carbone présente dans le milieu (Thevelein and De Winde, 1999). Ces protéines appartiennent à la petite famille des guanosine triphosphatases (GTPases), leur activité dépend donc de l'échange GTP/GDP. La levure présente deux isoformes Ras : Ras1 et Ras2, hautement homologues au RAS mammifère. L'adénylate cyclase est activée par RAS-GTP. La protéine kinase A de levure (PKA) est un hétérotétramère composé de deux sous-unités régulatrices et de deux sous-unités catalytiques.

Les sous-unités catalytiques sont codées par trois gènes: Tpk1, Tpk2 et Tpk3 (Toda et al., 1987b), et la sous-unité de régulation est codée par le gène *BCY1* (Toda et al., 1987a) (**Figure 9**).

Des travaux antérieurs de notre laboratoire ont montré un lien étroit entre l'activité de cette voie de signalisation et le contenu cellulaire en mitochondries (Chevtzoff et al., 2010; Rigoulet et al., 2011; Yoboue and Devin, 2012; Yoboue et al., 2012, 2014). De plus, ces travaux ont montré qu'une augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc induit une augmentation des activités enzymatiques mitochondriales et des cytochromes mitochondriaux. Cela a soulevé la question de l'origine de l'augmentation (ou de la diminution) du contenu mitochondrial cellulaire lorsque les voies de signalisation de l'AMPc sont mises en jeu. La régulation de la biogenèse mitochondriale *via* l'activité du complexe HAP a été mesurée lorsque la concentration intracellulaire d'AMPc était modulée. L'ajout d'AMPc exogène à la souche

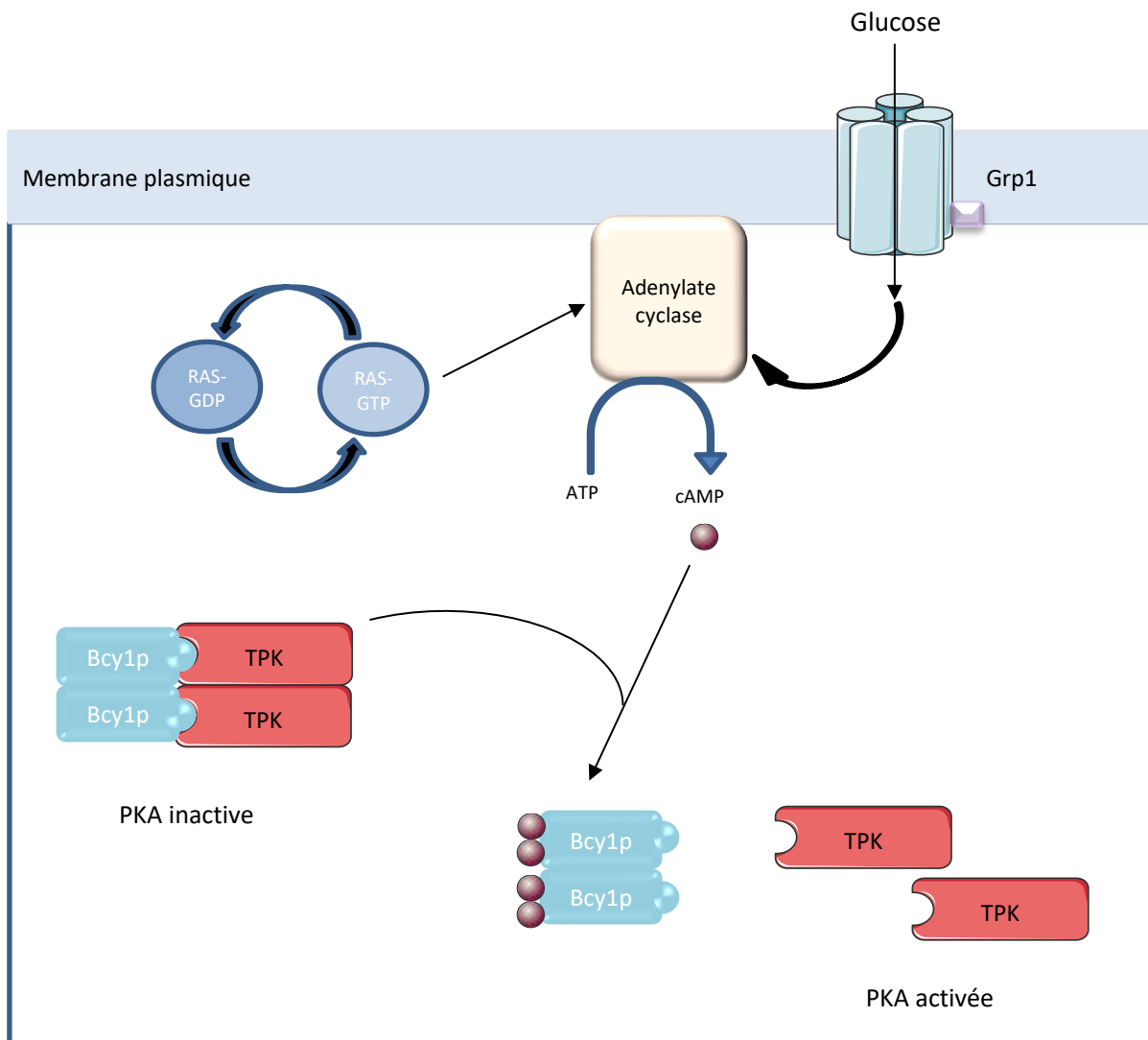


Figure 9. La voie Ras-cAMP/PKA dans les cellules de levures

Chez la levure, adénylate cyclase peut être activée par deux systèmes : Grp1 ou la voie RAS. L'AMPc synthétisé par l'adénylate cyclase se lie aux sous-unités régulatrices de la protéine PKA conduisant à l'activation des sous-unités catalytiques, Tpk, grâce à la dissociation de leurs sous-unités régulatrices.


OL556, une souche possédant des mutations au niveau de la voie Ras/AMPc/PKA, augmente l'activité du complexe HAP et donc la biogenèse mitochondriale. L'AMPc déclenche une amélioration de la stabilité de Hap4p, le régulateur du complexe HAP (Yoboue et al., 2012). Par conséquent, une augmentation de l'activité de la voie Ras/AMPc régule positivement la biogenèse mitochondriale en milieu non-fermentescible.

La modification du matériel mitochondrial représente donc un autre moyen pour la cellule de réguler sa production d'énergie sans nécessairement modifier les propriétés cinétiques des constituants de son système des OXPHOS. L'importance des mitochondries dans la cellule ne se limite pas à la production d'énergie puisque, les mitochondries sont aussi impliquées dans la signalisation cellulaire à travers divers métabolites, protéines et autres produits liés à leur fonctionnement tel que l'hème ou les espèces réactives de l'oxygène (ROS).

1.3 Projet de thèse :

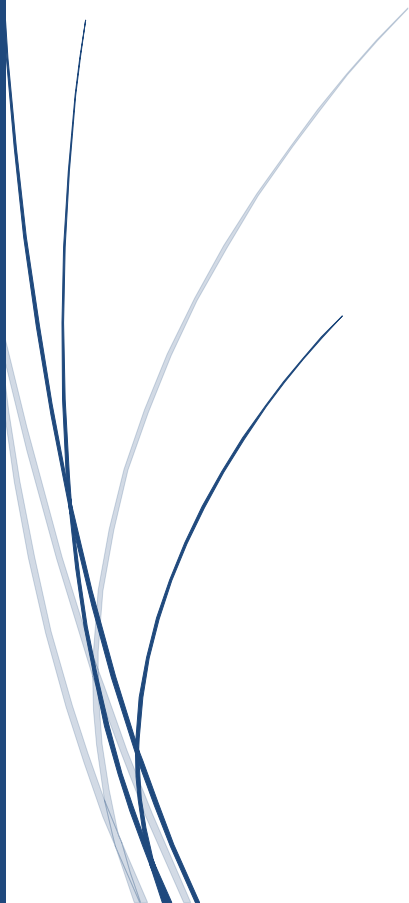
Durant ma thèse, mon travail s'est centré sur la compréhension de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez la levure *S. cerevisiae*. Pour cela, j'ai étudié une régulation positive et une régulation négative de ce mécanisme et ce à travers la régulation de la sous-unité régulatrice Hap4p. Ce travail a permis, dans un premier temps, de mettre en évidence une implication de l'hème dans la régulation du complexe HAP. Ensuite, dans la continuité des précédents travaux du laboratoire et en particulier de la thèse de Noureddine Hammad, mon projet a permis d'étudier la répression glucose comme un modèle de la mise en place de l'effet Warburg dans la levure.

D'un point de vue quantitatif, la régulation de la diminution de la biogenèse mitochondriale ont été mesurées par celle de la quantité de mitochondrie. Cette quantité est définie, dans mon travail, par celle du contenu mitochondrial, celui-ci se référant à la quantité cellulaire de cytochromes mitochondriaux, un paramètre robuste qui permet la quantification cellulaire de la quantité de chaîne respiratoire mitochondriale (Devin et al., 2006). Ainsi, tout au long de ce travail, la quantité de mitochondries sera associée à la quantité de cytochromes. Cependant, cette quantification sera toujours appuyée par celles d'autres paramètres communément utilisés comme la quantité de la Porine ou des activités enzymatiques mitochondriales.



Chapitre 2

Matériels et
Méthodes



2.1 Culture cellulaire et conditions de cultures

2.1.1 Souches de levures et de bactéries

2.1.1.1 Levures

Tableau I : Liste des souches utilisées

<i>Nom</i>	Génotype	Description	« Source »
<i>BY4742 (WT)</i>	MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0	Souche contrôle	EUROSCARF
<i>Δhap4</i>	MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0 ; ykl109w ::kanMX4	Délétion du gène codant pour le régulateur transcriptionnel Hap4p	EUROSCARF
<i>Δhem1</i>	MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0 ; ydr232w ::kanMX4	Délétion du gène codant pour l'aminolévulinate synthase Hem1p	Dr Thierry Ferreira (Université Poitiers) EUROSCARF
<i>Δhvk2</i>	MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0 ; ygl253w ::kanMX4	Délétion du gène codant pour l'hexokinase II Hvk2p	EUROSCARF
<i>Candida utilis</i>	CBS621	Souche contrôle	
<i>Kluyveromyces lactis</i>	CBS2359	Souche contrôle	NRRL Y-1140, ATCC 8585; Wésolowski- Louvel et al., 1996
<i>W303-1a</i>	MAT α ; ade2-1 ; his3-11 ; 15leu2-3 ; 112trp1-1 α ; ura3-1 ; can100	Souche contrôle	P Slonimski

2.1.1.2 Plasmides

Tableau II : Liste des plasmides utilisés

<i>Nom</i>	<i>Nature</i>	<i>Utilité</i>	<i>Sélection</i>	<i>Sources</i>
<i>pHMG2-LacZ</i>	Gène rapporteur	Activité β -Gal	URA3	(Thorsness et al., 1989)
<i>pCYC1-LacZ</i> (<i>pLG669Z</i>)	Gène rapporteur	Activité β -Gal	URA3	(Guarente et al., 1984)
<i>pVT100U-mtGFP</i>	Gène fluo	Fluorescence des mitochondries	URA3	(Westermann and Neupert, 2000)
<i>GST-Hap4(330-554)</i>	Gène de fusion	Purification d'un fragment de Hap4p	AmpR	(Neely et al., 2002)
<i>pCM189-Hap4p</i>	Gène de surexpression tet-OFF	Surexpression Hap4p	URA3	(Chevtzoff et al., 2010)

2.1.2 Milieux de culture

Le tableau ci-dessous contient la composition des différents milieux utilisés au cours de ce travail de thèse. Les pourcentages indiquent des rapports masse/volume (w/v) à raison de Xg/100ml de volume de milieu.

Tableau III : Liste des milieux de cultures utilisés

<i>Organisme</i>	Noms	Nature	Compositions
<i>Levures</i>	Milieu riche Glucose (YPD)	Solide ou liquide	Glucose 2% ; KH ₂ PO ₄ 0,1% ; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,12% ; Yeast extract 1%
<i>Levures</i>	Milieu riche Glycérol (YP Glyc)	Liquide	Glycérol 0,2% ; KH ₂ PO ₄ 0,1% ; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,12% ; Yeast extract 1% ;
<i>Levures</i>	Milieu minimum Lactate (SC Lac)	Liquide	Lactate 0,2% ou 2% ; KH ₂ PO ₄ 0,1% ; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5% ; Hydrolysate de caséine 0,2% ; Yeast Nitrogen Base sans acides aminés ni sulfate d'ammonium (YNB) 0,175% ; pH 5,5 avec le NaOH
<i>Levures</i>	Milieu minimum Glycérol (SC Glyc)	Liquide	Glycérol 0,2% ou 2% ; KH ₂ PO ₄ 0,1% ; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5% ; Hydrolysate de caséine 0,2% ; Yeast Nitrogen Base sans acides aminés ni sulfate d'ammonium (YNB) 0,175%
<i>Levures</i>	Milieu minimum Glucose (SC Gluc)	Solide	Glucose 2% ; KH ₂ PO ₄ 0,1% ; (NH ₄) ₂ SO ₄ 0,5% ; Hydrolysate de caséine 0,2% ; Yeast Nitrogen Base sans acides aminés ni sulfate d'ammonium (YNB) 0,175%
<i>Bactéries</i>	Milieu LB (Lennox Broth)	Solide ou liquide	LB 2% (Tryptophane 10g/L ; Yeast extract 5g/L ; NaCl 5g/L) ; ampiciline 100µg/ml

Pour les milieux solides, de l'agar est ajouté à raison de 2,5%. Les milieux sont stérilisés par autoclave 30 minutes à 0,5bar. Pour les milieux minimums, les marqueurs d'auxotrophie suivants sont rajoutés en fonction des besoins et pour l'expression ou non des plasmides : uracile et tryptophane à 20µg/ml et adénine à 40µg/ml. Lors de l'étude de la répression glucose, 60mM de glucose sont ajoutés à la culture en milieu lactate ou glycérol.

2.1.3 Conditions de culture

La prolifération des levures au cours du temps est suivie par mesure de l'évolution de la turbidité à travers la mesure de la densité optique (DO) à 600nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Safas, Monaco). Une relation entre la turbidité et la masse de matière sèche (poids sec) correspondante a été aussi établie. Cette dernière rend mieux compte de la production de biomasse et permet de réduire les biais qui peuvent résulter de la mesure de la turbidité (taille et forme différentes des cellules par exemple). Tous les poids secs sont mesurés sur 25 ou 50UDO en milieu minimum lactate ou glycérol, en présence ou en absence de glucose. Les cellules sont alors centrifugées à 2500g durant 5 minutes à 4°C, puis les culots sont lavés à l'eau avant d'être à nouveau centrifugés dans les mêmes conditions que la fois précédente. Le surnageant est éliminé et les culots cellulaires sont placés au moins 72 heures à 50°C. Une fois sec, les culots sont pesés et la relation entre la densité optique et le poids sec obtenu de chaque souche est résumée dans le **Tableau IV**.

Tableau IV : Liste du poids sec/UDO pour chaque souche étudiée

<i>Souches</i>	<i>Milieu</i>	<i>Mg poids sec/UDO</i>
<i>S. cerevisiae</i> - WT	SC lactate (± glucose)	0.37 (± 0.01)
<i>S. cerevisiae</i> - $\Delta hem1$	SC lactate (± glucose)	0.32 (± 0.02)
<i>S. cerevisiae</i> - $\Delta h x k 2$	SC lactate (± glucose)	0.37 (± 0.02)
<i>S. cerevisiae</i> - $\Delta hap4\uparrow$	SC lactate (± glucose)	0.44 (± 0.1)
<i>C. utilis</i>	SC lactate (± glucose)	Variable (voir Figure 10)
<i>K. lactis</i>	SC glycérol (± glucose)	0.3 (± 0.03)

Sauf précision, toutes les cultures de levures sont effectuées à 28°C, sous agitation (200 rotations/minute) et précédées d'une préculture de 24 heures dans le même milieu afin de limiter le retard à l'induction de la croissance exponentielle, ces dernières étantensemencées à partir de boîtes contenant un milieu YPD et donc en glucose où a lieu la répression glucose sur la respiration. Le milieu des cellules *Δhem1* est systématiquement supplémenté avec de l'aminolévulinate (ALA) aux concentrations indiquées.

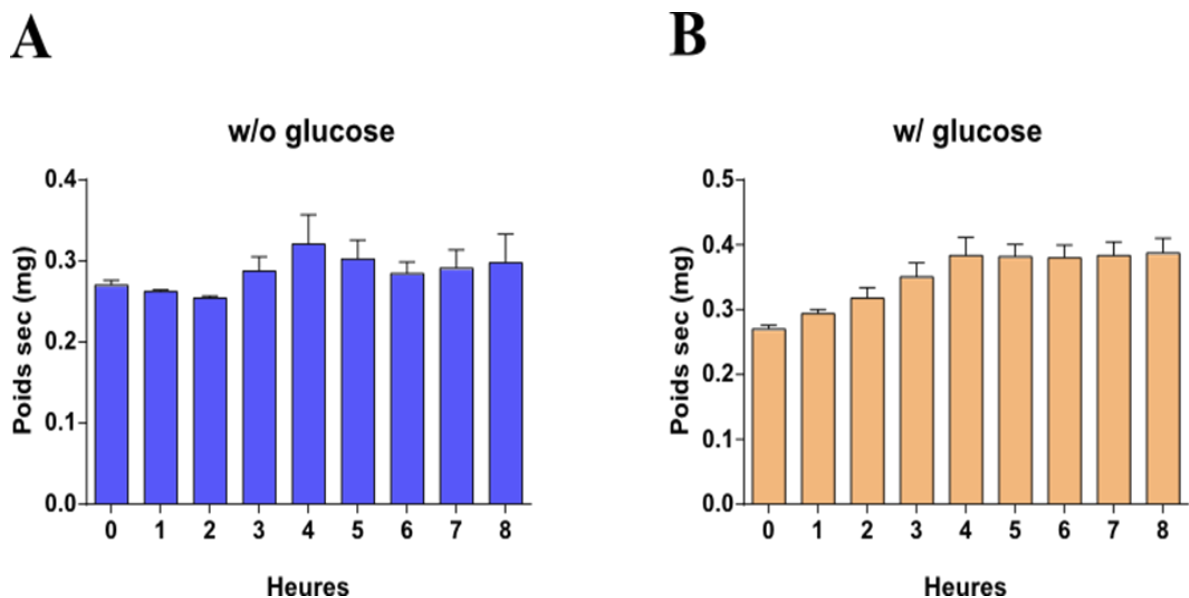


Figure 10. Variation du poids sec chez *C. utilis* en fonction du temps en présence ou non de glucose

Les cellules ont été cultivées en lactate 2% en présence (w/) ou en absence (w/o) de glucose, ajouté à T0. Toutes les deux heures 50UDO sont récupérés. Les résultats des heures impaires sont issus de la moyenne entre les deux heures l'encadrant.

2.2 Techniques de biologie moléculaire

2.2.1 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 (voir **Tableau II**), issue d'un stock conservé à -80 °C.

La récupération du plasmide bactérien a été effectuée en utilisant le kit de purification NucleoBond™ Xtra Midi/Maxi de Macherey-Nagel. Les bactéries transformées sont cultivées dans 100mL de milieu LB supplémenté par 100µg/mL d'ampicilline. Après une centrifugation de 5 minutes 4°C et 5000g, une solution de resuspension appelée Tampon « RES » est ajoutée sur le culot, puis les cellules sont lysées *via* un traitement d'hydroxyde de sodium et de SDS avec le tampon nommé Tampon « LYS ». Le mélange est incubé 5 minutes à température ambiante. Dans ces conditions, les protéines, tout comme les chromosomes et l'ADN

plasmidique, sont alors dénaturées. Le kit étant « DNase-free RNase » les ARN sont dégradés par les ARNases au cours de la lyse.

Le tampon de neutralisation « NEU », contenant de l'acétate de potassium, est ensuite ajouté au lysat, provoquant la précipitation du SDS sous la forme de dodécyl sulfate de potassium et entraînant les protéines, l'ADN chromosomique et les autres débris cellulaires. L'ADN plasmidique peut alors retrouver sa structure super enroulée native et reste en solution. Le mélange est alors chargé sur une colonne préalablement équilibrée par le tampon « EQU » (pH 6,5) afin de ne conserver que l'ADN plasmidique.

La colonne est lavée avec le tampon de lavage « WASH » (pH 7). Puis une élution est réalisée en présence de la solution « ELU » et de 2-propanol. Après une centrifugation à 4°C et 15000g durant 30 minutes, le surnageant est éliminé et le culot resuspendu dans de l'éthanol 70%. Cela permet la solubilisation des sels tout en minimisant la solubilité de l'ADN. Les sels sont donc éliminés en raison des différences de solubilité, notamment avec l'ADN agrégé. Une nouvelle centrifugation à 15000g et 4°C durant 5 minutes est effectuée, le surnageant est à nouveau éliminé et le culot séché à température ambiante puis remis en suspension dans 100µL d'eau stérile DNAase free avant dosage à 260nm, au Nanodrop et conservation à -20°C. Le dosage permettra de vérifier d'une part que l'ADN est bien purifié (rapport entre les mesures au longueur d'onde 280nm et 260nm), sans trace de protéines ou d'ARN, mais également de connaître la concentration d'ADN récupéré, ce qui sera nécessaire pour la transformation des levures.

2.2.2 Transformation des levures par la méthode à l'acétate de lithium

2.2.2.1 Principe

Tout comme la bactérie *E. coli*, la levure *S. cerevisiae* doit être rendue compétente pour pouvoir être transformée c'est-à-dire avoir la capacité de « capturer » l'ADN présent dans l'environnement. La première étape de transformation est donc de rendre les cellules compétentes « artificiellement » en les rendant « perméables » à l'entrée de l'ADN. Les premières méthodes de transformation impliquant la fabrication de sphéroplastes, cellules de levure dont la paroi a été digérée, étaient fastidieuses (Hinnen et al., 1978). C'est ainsi qu'une méthode a été par la suite développée et qui, d'une manière assez similaire à la transformation de bactéries au CaCl₂, implique l'utilisation de cations alcalins notamment le lithium (Ito et al., 1983). Cette méthode qui implique aussi l'utilisation de Polyéthylène glycol (PEG) a connu par la suite plusieurs variantes afin d'améliorer son efficacité notamment par l'ajout au système d'un

« carrier » qui, comme son nom l'indique, aidera au transport de l'ADN dans la cellule à transformer (Schiestl and Gietz, 1989). La technique utilisée ici dérive de cette dernière mais améliore la porosité des cellules par l'utilisation d'agents réducteurs comme le dithiothréitol (DTT) qui est un agent réducteur fort permettant la réduction des ponts disulfures de la paroi cellulaire (Klebe et al., 1983; Brzobohaty and Kovac, 1986; Chen et al., 1992).

2.2.2.2 Protocole

Une préculture et une culture des levures à transformer sont réalisées dans le milieu approprié (YPD). Lorsque la DO atteint une valeur comprise entre 0,8 et 1,2, les cellules sont récoltées par une centrifugation durant 5 minutes à 1000g. On effectue ensuite au moins deux lavages avec de l'eau stérile toujours par centrifugation (au moins un des lavages doit être effectué dans un volume deux fois supérieur ou égal à celui de la culture).

Puis le culot cellulaire est resuspendu dans 100 μ L d'une solution de transformation (Acétate de lithium 0,2M ; PEG 3350 40% (p/w); DTT 0,1M ; 10 μ g 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. Au moins 1 μ g de l'ADN plasmique qui va servir à la transformation est ensuite ajouté à la solution de transformation. Le mélange est vortexé et subit un choc thermique lors d'une incubation de 30 minutes à 45°C. L'ensemble du mélange est ensuite étalé sur un milieu sélectif approprié (**Tableau II**) et incubé quelques jours à 28°C afin d'obtenir les cellules transformées.

2.3 Techniques de biochimie

2.3.1 Isolation des mitochondries (Figure 11)

Les cellules *K. lactis* sont mises en culture en milieu complet glycérol puis lorsque la culture atteint une concentration aux alentours de 3 à 4UDO, les cellules sont récoltées dans des pots d'un litre puis centrifugées à 5000g pendant 5 minutes. Les levures sont ainsi culottées, et le milieu de culture est éliminé. Après la centrifugation, deux à trois lavages supplémentaires sont effectués durant lesquels le culot cellulaire est remis en suspension dans de l'eau distillée puis reculotté.

Le culot cellulaire est remis en suspension dans du tampon de pré-incubation β -SH (Tris 0,1M, β -mercaptoéthanol 0,5M, pH 9,3 avec NaOH), puis placé sous agitation 15 minutes à 28°C. Ce tampon est ajouté à raison de 20mL/g de poids sec. Cette étape va permettre de fragiliser la paroi en réduisant les ponts disulfures des protéines constituant cette dernière.

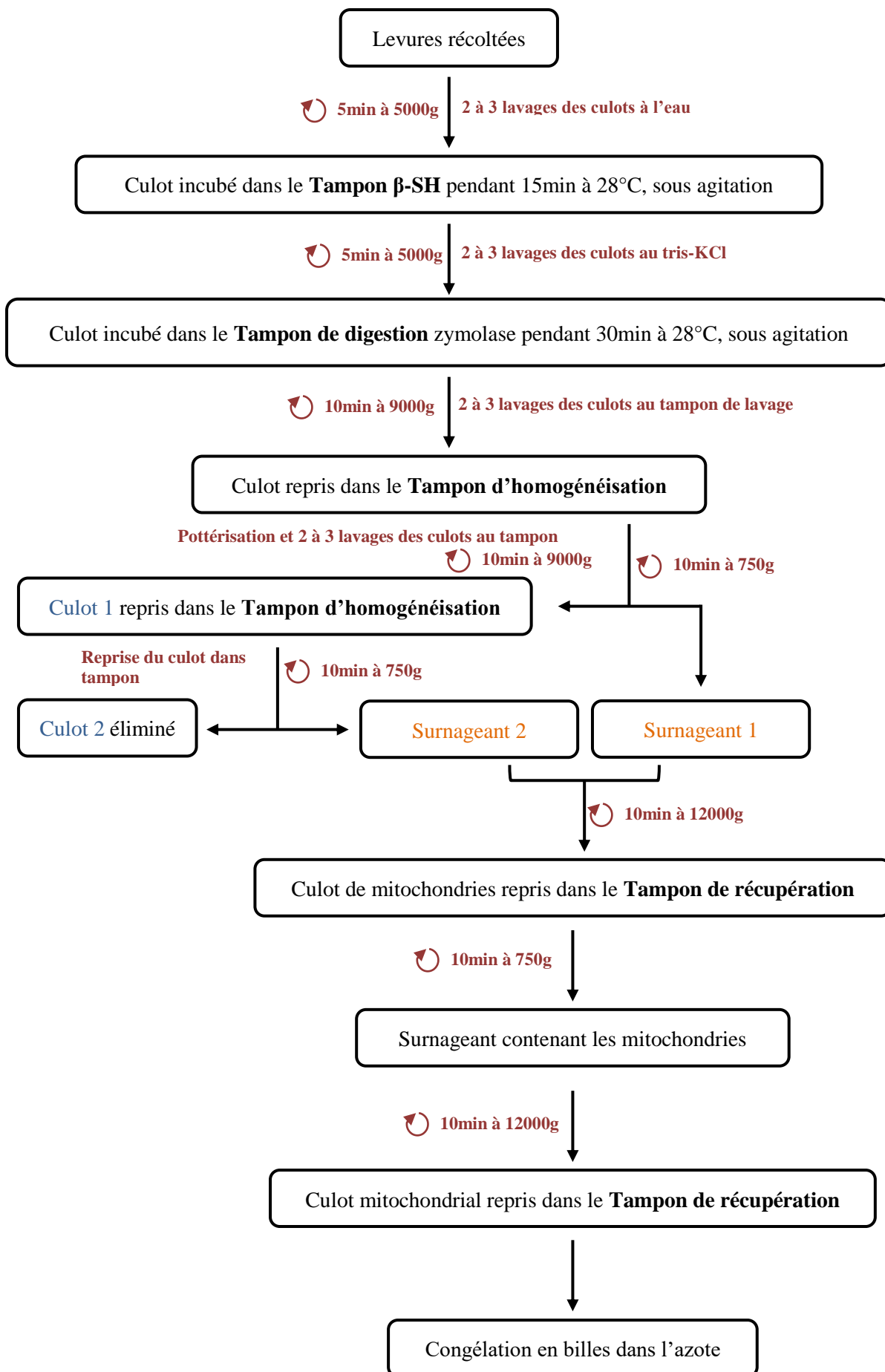


Figure 11. Schéma du protocole de l'isolation de mitochondries de levure

Après cette incubation, le tampon β -SH va être éliminé par le biais de centrifugations à 5000g durant 5 minutes dans du tampon de lavage KCl (*KCl 0,5M, Tris 10mM, pH 7 avec HCl*).

Une fois le tampon β -SH complètement éliminé, la paroi fragilisée va être digérée par la zymolyase. Pour ce faire, les levures sont placées à 28°C pendant 30 à 45 minutes dans le tampon de digestion (*Sorbitol déionisé 1,35M, EGTA 1mM, Phosphate Dimonosodique 0,2M pH 7,4*). Ce tampon est ajouté à raison de 10mL/g de poids sec, supplémenté par 20mg de zymoliase. La digestion est suivie par méthode optique à 600nm. Lorsque la paroi est digérée, des protoplastes sont obtenus. Ces derniers, contrairement aux levures possédant une paroi, vont éclater lorsqu'ils sont placés dans l'eau. À cette longueur d'onde, il est possible de suivre la diminution de la turbidité de la solution au cours de la digestion. Lorsque 90% des levures sont devenues des protoplastes, la digestion est arrêtée au froid. La zymolyase est ensuite éliminée par deux à trois lavages successifs dans le tampon de lavage protoplastes (*Sorbitol déionisé 0,75M, Mannitol déionisé 0,4M, Tris-Maléate 10mM, Tris-orthophosphate 10mM, BSA 0,1% pH6,8*).

Une fois la zymolyase éliminée, la membrane plasmique est fragilisée grâce à un choc osmotique modéré. Après cette étape de fragilisation, la membrane plasmique est rompue par pressions mécaniques exercées *via* la pottérisation. Pour ce faire, les protoplastes sont remis en suspension dans le tampon d'homogénéisation (*Mannitol déionisé 0,5M, EGTA 2mM, Tris-Maléate 10mM, Tris-orthophosphate 10mM, BSA 0,2%, pH 6,8*). Une fois remis en suspension dans ce tampon, les protoplastes concentrés vont être pottérisés une dizaine de fois, puis la pâte ainsi obtenue est diluée dans le tampon d'homogénéisation. Une première centrifugation de 10 minutes à 750g va permettre de faire tomber les plus gros débris cellulaires dans le **culot 1**. Le **surageant 1**, contenant les mitochondries extraites, ainsi obtenu sera quant à lui centrifugé 10 minutes à 12000g. Le **culot 1** qui contient les débris cellulaires mais aussi les mitochondries qui n'ont pas été extraites lors de la première pottérisation, subit une nouvelle série de pottérisation, et une autre série de centrifugations différentielles semblable à la première (obtention d'un **surageant 2** contenant les mitochondries extraites). Ceci permet de doubler le rendement d'isolation des mitochondries.

Les mitochondries ainsi obtenues à l'issue de la centrifugation des **surageants 1 et 2**, sont ensuite reprises dans le tampon de récupération (*Mannitol déionisé 0,6M, EGTA 2mM, Tris-Maléate 10mM, Tris-orthophosphate 5mM, pH 6,8*), puis centrifugées à 12000g durant 10 minutes. Cette ultime étape vise à éliminer au maximum la BSA contenu dans les deux tampons précédents. Afin de ne pas fausser par la BSA ajoutée le dosage protéique qui suivra l'isolation des mitochondries.

Les mitochondries sont ensuite homogénéisées afin d'être congelées dans l'azote liquide. Elles sont projetées à l'aide d'une seringue dans un bain d'azote liquide, puis les petites billes de mitochondries ainsi obtenues sont placées dans un tube de cryoconservation à -80°C et peuvent être conservées durant de nombreux mois.

Pour l'étude, le couplage des mitochondries et un dosage protéique sont effectués sur les mitochondries. Ainsi, toutes les mesures effectuées sur les mitochondries isolées seront rapportées au mg de protéine. Le couplage vise à vérifier l'intégrité de la membrane interne des mitochondries sans laquelle les activités de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase ne peuvent être couplées.

2.3.2 Mesure du flux de consommation d'oxygène par oxygraphie

2.3.2.1 Principe

Le flux de consommation d'oxygène par les cellules et les mitochondries isolées est mesuré par le système de l'électrode de Clark. Cette dernière est composée d'une anode en argent et d'une cathode en platine, baignant dans une solution de chlorure de potassium (KCl) demi-saturé. Cette électrode est séparée de la cuve de mesure par une membrane de téflon perméable à l'oxygène mais pas aux autres molécules ou ions. Ainsi l'oxygène peut librement diffuser entre la cuve l'électrolyte de l'électrode. La tension maintenue au niveau de l'électrode est de 0,7V.

A ce potentiel, l'électrode en platine va se polariser négativement et l'électrode en argent positivement. Comme illustré par la **Figure 12**, l'oxygène dissout dans la solution d'électrolyte va être réduit au niveau de l'électrode en platine d'abord en H_2O_2 puis en H_2O en acceptant $4e^-$.

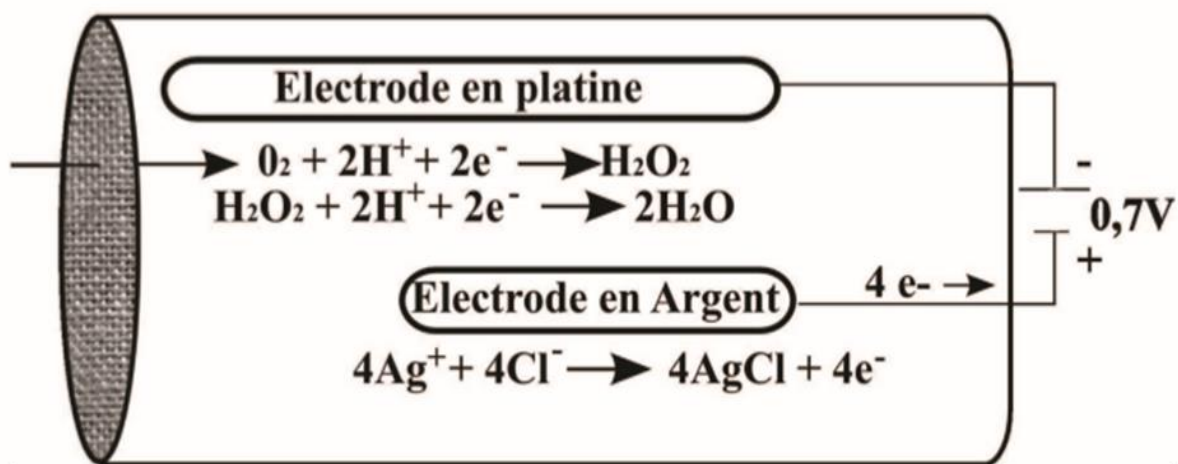


Figure 12. Illustration du fonctionnement de l'électrode de Clark

Cela entraîne une dépolarisation de la cathode générant un courant qui est proportionnel à la concentration d'oxygène dissout dans la cuve d'oxygraphie.

Pour les cellules, la mesure s'effectue directement à partir d'un prélèvement de cellules dans la culture. La vitesse de respiration est rapportée dans ces conditions au mg poids sec (mg DW). Quant aux mitochondries, elles sont mises en suspension dans un tampon respiration (*Mannitol désionisé 0,65M ; EGTA 0,36mM ; Tris-maléate 10mM ; Tris-orthophosphate 5mM ; pH 6,8*) et le substrat respiratoire est ajouté directement dans la cuve. Un tracé est alors enregistré donnant l'état stationnaire de vitesse de consommation d'oxygène en fonction du temps. La vitesse de respiration est ici rapportée au mg DW, pour les cellules entières, ou au mg de protéines mitochondriales, pour les mitochondries isolées.

La quantité d'oxygène est mesurée par un enregistreur associé à l'électrode de Clark. Sur cet enregistreur la concentration d'oxygène est exprimée en pourcentage (unité arbitraire) et le 100% correspondant dans ces conditions à 420natO/mL. Ces conditions sont une cuve thermostatée à 28°C et dans laquelle le milieu ou tampon de respiration est sous agitation (750rpm).

2.3.2.2 Respiration sur cellules entières

2.3.2.2.1 Respiration endogène

La respiration endogène des cellules entières est mesurée par l'utilisation du système de l'électrode de Clark (présenté ci-dessus). Un volume de 1mL, prélevé directement de la culture cellulaire, est mis dans la cuve de mesure. Après quelques minutes d'enregistrement de l'appareil, on obtient un tracé déterminant la concentration de l'O₂ consommé exprimée en pourcentage par unité de temps.

Le calcul de la vitesse de respiration se fait par l'application des formules suivantes :

$$JO_2 = \frac{n \cdot 420}{\text{mg poids sec/UDO}} \text{ en natO/min/mgDW}$$

Où n est le pourcentage de la consommation de l'O₂ par minute

2.3.2.2.2 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 0,2mM du triéthylétain (TET). Cette concentration est celle généralement utilisée, cependant à chaque début de mesure, une titration est effectuée afin de connaître la concentration optimale à utiliser sur les cellules sans subir d'effets secondaires qui ne seraient pas dus à l'inhibition de l'ATP

synthase. Pour cela, après ajout de TET, les cellules sont découplées par ajout du CCCP (2.3.2.2.3 et **Figure 13**). Ainsi, si le CCCP induit une respiration découplée identique à celle obtenue en absence de TET alors la concentration de TET ajouté n'induit pas d'effets secondaires sur la chaîne respiratoire mais agit uniquement sur l'ATP synthase.

En effet, tout comme l'oligomycine, le triéthylétain est un inhibiteur de l'ATP synthase, il agit sur le domaine F₀ de l'ATP synthase où il se fixe de façon non covalente le site de liaison en inhibant ainsi le passage des protons vers la matrice mitochondriale (Cain and Griffiths, 1977). L'intérêt de cet inhibiteur, dans la mesure de la respiration sur cellule entière, est qu'il peut passer rapidement la paroi des levures contrairement à l'oligomycine qui étant très hydrophobe passe très lentement et reste en majorité piégé dans la paroi et les membranes (données expérimentales).

2.3.2.2.3 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 cyanure m-chloro-phenyl hydrazone (CCCP). Le CCCP est un découplant des oxydations phosphorylantes (Heytler, 1963), il agit au niveau de la membrane mitochondriale interne en augmentant sa perméabilité aux protons. Cette molécule présente la particularité d'augmenter artificiellement la fuite de protons à travers la membrane interne mitochondriale et ce de façon proportionnelle à la concentration ajoutée (Heytler, 1963; Benz and McLaughlin, 1983; Kasianowicz et al., 1984). Cette molécule va capter un proton dans l'espace intermembranaire, sa forme acide va alors traverser la membrane dans le sens de son gradient de concentration puis va libérer le proton dans la matrice. La forme anionique va retraverser la membrane selon le potentiel électrique, pour de nouveau capter un proton (**Figure 13**). Ceci entraîne une dissipation de la différence du potentiel électrochimique de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (Rokitskaya et al., 2013).

Dans la cuve de mesure contenant les cellules, 100mM d'éthanol sont introduits puis après stabilisation du flux, 2 μ M de CCCP sont ajoutés. Cette concentration est celle généralement utilisée, cependant à chaque début de mesure, une titration est effectuée afin de connaître la concentration optimale à utiliser sur les cellules sans observer une inhibition de la respiration due à une concentration trop élevée du découplant. L'intérêt de l'ajout d'éthanol dans la cuve est d'éviter tout contrôle cinétique en amont de la chaîne respiratoire.

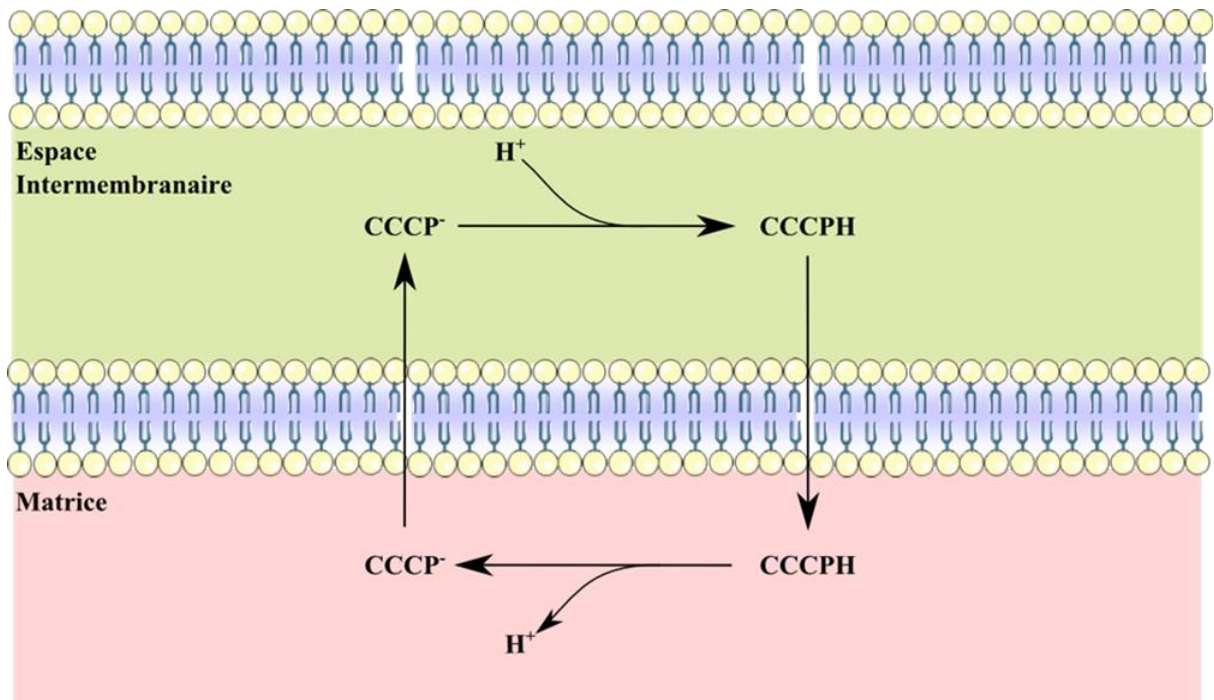


Figure 13. Illustration du fonctionnement du CCCP au niveau de la mitochondrie

2.3.2.3 Respiration sur mitochondries isolées

La respiration sur mitochondries isolées est effectuée après un dosage au biuret des protéines. Les mitochondries testées sont celles des souches *K. lactis*, *C. utilis* et *S. cerevisiae* (W303).

La respiration est effectuée telle que décrit précédemment. Plusieurs substrats ou inhibiteurs sont testés ensemble ou séparément :

Tableau V : Liste des substrats utilisés pour les respirations sur mitochondries isolées.

Substrats	Concentrations finales	Effet	Solvant
<i>NADH</i>	2,5mM		Tris-HCl pH7
<i>ADP</i>	1mM		Tris-HCl pH7
<i>Pyruvate</i>	5mM		Tris-HCl pH7
<i>Malate</i>	5mM		Tris-HCl pH7
<i>Glutamate</i>	5mM		Tris-HCl pH7
<i>Succinate</i>	5mM		Tris-HCl pH7
<i>G3P</i>	5mM		Tris-HCl pH7
<i>EtOH absolu</i>	100mM		
<i>Cytochrome C</i>	50µM		Eau
<i>CCCP</i>	0,1µM	Découplant	Méthanol HPLC

Tableau VI : Liste des inhibiteurs utilisés pour les respirations sur mitochondries isolées.

<i>Inhibiteurs</i>	Concentrations finales	Effet	Solvant
<i>Oligomycine</i>	10µg/mL	Inhibiteur ATP synthase	Méthanol
<i>Roténone</i>	1µmol/mg prot	Inhibiteur complexe I	Méthanol
<i>Piericidine A</i>	100pmol/mg prot	Inhibiteur complexe I	Méthanol

2.3.3 Quantification des cytochromes sur cellules entières

Les cytochromes sont des hémoprotéines qui constituent une partie de la chaîne respiratoire mitochondriale et participent aux transports d'électrons au sein de cette dernière afin qu'elle remplisse sa fonction d'oxydation des substrats respiratoires.

Un cytochrome est constitué d'une fraction protéique (apoprotéine) à l'intérieur de laquelle est accroché de façon covalente un hème (cofacteur). L'hème est une porphyrine, au centre duquel on trouve un atome de fer. Les propriétés d'oxydo-réduction du fer permet au cofacteur de passer de façon réversible d'un état ferrique à un état ferreux, et ainsi permet la fonction de transporteur d'électrons du cytochrome. La partie apoprotéine détermine et confère des potentiels redox différents à chaque classe de cytochromes rendant ainsi le transfert des électrons possibles entre cytochromes.

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

- Cytochromes c et c1
- Cytochromes b1 et b2
- Cytochromes a et a3

En fonction de l'environnement protéique et du 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 (Chance, 1952; Chance and Williams, 1955). 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 (forme qui absorbe) et celui de l'état oxydé (forme sans propriété spectrale particulière) permet la quantification de ce composé. L'avantage majeur de l'utilisation de cette technique

est de s'affranchir des variations de turbidité des solutions en effectuant des spectres différentiels.

- Les cytochromes c et c1 présentent un pic d'absorption à environ 550nm et un point isobestique à 540nm. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est de $18000\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- Les cytochromes b1 et b2 ont leur pic d'absorption à environ 561nm et le point isobestique à 575nm. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est de $18000\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.
- Les cytochromes a et a3 ont leur pic d'absorption à environ 604nm et le point isobestique à 630nm. Le coefficient d'extinction molaire (ϵ) est de $14000\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Environ 100 UDO de cellules sont prélevées de la culture cellulaire et lavées à l'eau, puis resuspendues dans 2mL d'eau. Par la suite, les cellules sont réparties dans deux cuves en quartz à raison de 1mL dans chaque cuve (soit environ 50 UDO/cuve) et les cuves sont placées dans un spectrophotomètre à double faisceaux. Un spectre de ligne de base entre 500 et 650nm est réalisé.

En seconde étape, le contenu de la cuve de référence est oxydé avec du peroxyde d'hydrogène (8,8mM), tandis que le contenu de l'autre cuve est réduit avec quelques grains de dithionite de sodium. Un deuxième spectre d'absorbance entre 500 et 650nm est réalisé 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 :

$$\text{Cytochrome} = \frac{(\text{DO}(\text{absp}) - \text{DO}(\text{iso})) \cdot V}{\epsilon \cdot \text{mg poids sec/UDO}} \text{ en pmol/mg poids sec}$$

Où :

- DO(absp) : La DO du pic d'absorption ;
- DO(iso) : L'absorbance du point isobestique ;
- V : Volume de l'échantillon de mesure ($\text{L}\cdot 10^{-3}$)

Pour la souche *Candida utilis*, la mesure n'a pas été faite sur 50UDO/cuve mais sur 25UDO/cuve. En effet, cette souche ayant une plus grande quantité de mitochondries, il est possible d'obtenir des spectres convenables avec deux fois moins de matériel.

2.3.4 Mesure d'activité de facteurs de transcription par le système de gène rapporteur β -galactosidase

2.3.4.1 Principe

Une des méthodes les plus utilisées dans la littérature pour évaluer l'activité de facteur de transcription est d'utiliser un système dit de « gène rapporteur ». Ce dernier repose principalement sur une fusion entre une région promotrice connue pour être régulée par le facteur de transcription d'intérêt et la région codante du gène d'une protéine à activité enzymatique facilement mesurable. Ainsi, l'activité enzymatique mesurée est censée « rapporter » l'activité du facteur de transcription. Les systèmes les plus répandus sont ceux utilisant l'activité de la β -galactosidase (β -gal) d'*Escherichia coli* ou la luciférase. Dans ce travail, les gènes rapporteurs utilisés codent pour l'activité β -gal.

La β -gal est une enzyme à l'activité de type hydrolase qui hydrolyse les β -galactosides comme le lactose en monosaccharides. Dans ce système, un analogue de substrat est utilisé : l'O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) dont l'hydrolyse produira du galactose et surtout l'orthonitrophénol (ONP). Ce dernier est un composé dont l'absorbance est mesurable à 420nm. L'ONPG n'étant pas perméant aux cellules, il est nécessaire de rendre accessible la β -gal à son substrat. Différentes méthodes existent et impliquent soit une extraction protéique ou encore une perméabilisation des cellules. Pour la perméabilisation, ils existent également différentes méthodes notamment celles qui impliquent l'utilisation de chloroforme/SDS ou encore de toluène. La méthode utilisée ici est celle décrite par Fred Kippert (Kippert, 1995) et fait appel à un détergent : le lauryl sarcosinate de sodium (LaurylSS). Cette méthode permet de ne pas inhiber l'activité β -Gal comme le ferait par exemple le DodécylSulfate de Sodium (SDS).

2.3.4.2 Protocole

Un culot de cellules issu d'une culture préalablement effectuée est resuspendu dans 100 μ L d'eau afin de pouvoir quantifier les cellules (A_{600}). À cette resuspension 500 μ L de tampon de lyse (LaurylSS 0,02% ; DTT 0,1mM ; KCl 1mM ; Mg2SO4 0,1mM ; Phosphate de sodium 10mM ; pH 7) sont ajoutés. Un échantillon « blanc » est aussi préparé en utilisant le tampon de lyse seul. Après une incubation 30 minutes à 30°C pour laisser opérer la lyse, 3mM d'ONPG sont ajoutés en prenant le soin de noter le temps de démarrage (**T0**). Dès le début de l'apparition d'une coloration jaunâtre, la réaction est arrêtée par l'ajout de 400 μ l d'une solution de Na₂CO₃ à 1,5M. Cela va précipiter les protéines par augmentation du pH et arrêter toute réaction enzymatique. Le temps d'arrêt doit aussi être noté (**Tn**). Après une centrifugation à 14000g durant 1 minute afin d'éliminer les protéines et les débris cellulaires, la lecture de

l'absorbance à 420nm du surnageant est effectuée (A_{420}). L'activité (en unité arbitraire) est calculée en appliquant la formule suivante :

$$\text{Activité} = \frac{A_{420}}{A_{600} \cdot \text{Durée de réaction} \cdot V_{\text{cell}}} * 1000$$

Où : $V_{\text{cell}} = 100 \times 10^{-3} \text{ mL}$ et les durées sont en minutes

2.3.5 Dosage d'activités enzymatiques

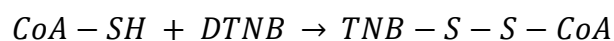
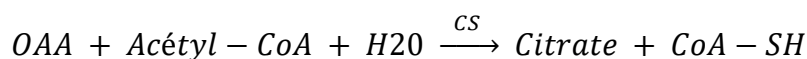
Les cultures cellulaires sont centrifugées à 2500g durant 5 minutes à 4°C, puis les culots cellulaires ainsi obtenus sont lavés à l'eau avant une seconde centrifugation dans les mêmes conditions. Les culots sont alors resuspendus dans 500µL de Tris-HCl 50mM pH 7,5. Les cellules subissent ensuite une lyse mécanique par Fast Prep, cinq cycles de 20 secondes à 4m/s. Entre chaque cycle, les cellules sont conservées dans la glace afin de limiter la dégradation protéique.

Les lysats sont ensuite dosés afin de connaître la concentration protéique contenue dans chaque échantillon à doser (voir 2.4.2.2.)

2.3.5.1 Citrate Synthase (CS)

2.3.5.1.1 Principe

L'activité citrate synthase est déterminée *via* le suivi de l'oxydation du 5,5'-dithiobis(2-acide nitrobenzoic) (DTNB) par le CoA, produit par la citrate synthase à partir de l'acétyl-CoA et l'Oxaloacétate (OAA). La réaction est la suivante :



La formation de ce dernier produit est détectée à 412nm et la vitesse d'apparition, lue en absorbance/min, détermine l'activité de l'enzyme. Elle peut être calculée par l'utilisation de la loi de Beer-Lambert où le coefficient d'extinction utilisé, celui du TNBSSCoA, est $\epsilon = 13600 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ et sera alors donnée en µmol/min/mg de protéine.

2.3.5.1.2 Protocole

Dans une cuve de spectrophotométrie contenant 1mL de Tampon Tris-HCl (Tris 50mM ; pH 7,5 ; Acétyl-CoA 0,1mM ; DTNB 0,2mM ; OAA 0,5mM ; Triton 100X 0,05%), 10µL de lysat sont ajoutés et l'apparition du TNBSSCoA est suivie pendant quelques minutes à 28°C. Il est systématiquement vérifié que la vitesse d'apparition du composé est directement proportionnelle à l'ajout de protéine en doublant la concentration de protéines ajoutées initialement.

2.3.5.2 Cytochrome c Oxydase (COX)

2.3.5.2.1 Principe

Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome c, son activité est donc évaluée par la vitesse de disparition du cytochrome c réduit. Ce composé absorbe à 550nm ainsi sa disparition, lue en absorbance/min, peut être suivie par spectrophotométrie. L'activité COX peut alors être calculée par l'utilisation de la loi Beer-Lambert où le coefficient d'extinction du cytochrome réduit est $\epsilon = 18500\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et sera alors donnée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine.

Pour cela, l'activité de cette enzyme est mesurée dans une solution contenant 100% de cytochrome c réduit.

2.3.5.2.2 Protocole

Dans un Tampon phosphate (*PiK 50mM ; pH 7,5*), 100 μM de cytochrome c sont ajoutés. Dans un premier temps, 1mL de cette solution est entièrement oxydée par ajout de quelques grains de ferricyanure de potassium. Le suivi par spectrophotométrie ne se faisant que sur la forme réduite du cytochrome c, cela permet de connaître la valeur minimale d'absorbance jusqu'à laquelle l'activité de la COX peut être mesurée. Dans un second temps, 1mL de la solution tampon est entièrement réduite par ajout en excès de dithionite de sodium. À partir de cette solution réduite, la solution initiale de cytochrome c va être progressivement réduite, suivie par spectrophotométrie, par ajout d'un petit volume de la solution 100% réduite dans la solution initiale. Cela va permettre d'obtenir une solution de cytochrome c quasiment à 100% réduite sans être en excès de dithionite de sodium. En effet, si, lors du dosage, ce composé est en excès, il va réduire au fur et à mesure le cytochrome c oxydé par la COX. L'activité enzymatique ne sera alors jamais linéaire et ne pourra pas être dosée correctement.

Une fois la solution préparée, 10 μL de lysat sont ajoutés à 1mL de tampon phosphate 100% cytochrome c réduit et la disparition du cytochrome c réduit est suivie pendant quelques minutes à 28°C. Il est systématiquement vérifié que la vitesse d'apparition du composé est proportionnelle à la concentration de protéines ajoutées en doublant la concentration de protéines ajoutées initialement. Enfin, 5mM de Cyanure de potassium, un inhibiteur spécifique du complexe IV, sont ajoutés afin de s'assurer que la diminution d'absorbance observée est bien due à l'activité du complexe IV.

2.3.5.3 Hexokinase (HXK)

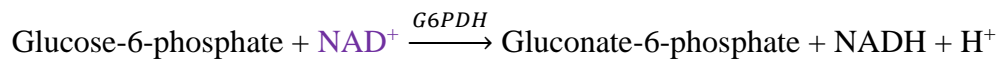
2.3.5.3.1 Principe

Les hexokinases sont les premières enzymes de la glycolyse. Le principe de ce dosage d'activité repose sur le couplage de deux réactions enzymatiques.

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



La seconde réaction catalysée par la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PDH), issue de leuconostoc, consiste en la transformation du produit de la première réaction (G6P) en gluconate-6-phosphate, selon la réaction suivante :



L'activité HXK est mesurée par la vitesse d'apparition du NADH. Ce composé absorbe à 340nm ainsi son apparition, lue en absorbance/min, peut être suivie par spectrophotométrie. L'activité HXK peut alors être calculée par l'utilisation de la loi Beer-Lambert où le coefficient d'extinction du NADH réduit est $\epsilon = 6300\text{M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ et sera exprimée en $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de protéine.

2.3.5.3.2 Protocole

Dans une cuve de spectrophotométrie contenant 1mL de Tampon Tris-HCl (*Tris* 50mM ; pH 7,5 ; *Acétyl-CoA* 0,1mM ; *DTNB* 0,2mM ; *OAA* 0,5mM ; *Triton 100X* 0,05%), 2mM de NAD^+ , 0,5U de G6PDH, 10mM de glucose, 1,5mM d'ATP et 1,5mM de Mg_2Cl_2 , 10 μL de lysat sont ajoutés et l'apparition du NADH est suivie pendant quelques minutes à 28°C. Il est systématiquement vérifié que l'apparition du composé est directement proportionnelle à l'ajout de protéine en doublant la concentration de protéines ajoutées initialement.

2.3.6 Dosage glucose

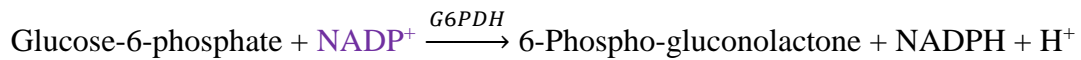
2.3.6.1 Principe

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 (HXK) consiste en la transformation du glucose en glucose 6-phosphate (G6P), selon la réaction suivante :



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



La réduction d'un NADP⁺ en NADPH étant stœchiométrique 1:1 avec la quantité de glucose, le suivi de l'apparition de NADPH *via* la mesure de l'absorbance à 340nm (longueur d'onde à laquelle ce composé absorbe) ainsi que l'application de la loi de Beer-Lambert permettent la quantification du glucose.

2.3.6.2 Protocole

A partir de la culture, 1mL est récupéré et est centrifugé à 16000g durant 1 minute. Le surnageant est récupéré et chauffé à 80°C pendant 5 minutes. Cette étape consiste à dénaturer les protéines libérées des cellules mortes/éclatées afin d'empêcher toute réaction enzymatique contaminante.

Pour le dosage, une préparation de blanc et des échantillons est réalisée selon le **Tableau VII** :

Tableau VII : Composition du mélange réactionnel pour le dosage du glucose.

	Blanc	Echantillon
<i>Eau distillée</i>	950µL	900µL
<i>Tampon</i>	25µL	25µL
<i>Substrats</i>	25µL	25µL
<i>Dilution de l'échantillon</i>	-	50µL

Le tampon et les substrats sont les solutions **S1** et **S2** respectivement, fournies par le kit dont les compositions données sont pour **S1** (*Tampon pH 7,6, Azoture de sodium (0.02 % w/v)*) et pour **S2** (*NADP⁺ et ATP (concentrations précises non fournies)*). Une dilution au dixième des échantillons est réalisée dans de l'eau avant dosage, le dosage est effectué sur ces dilutions. Cette dilution permet d'effectuer la mesure dans la gamme étalon.

Une première lecture de la DO est effectuée à 340nm, notée **A1**. Puis, 5µL de la solution enzymatique (*HXX/G6PDH*) fournie par le kit sont ajoutés aux mélanges. Un suivi de l'évolution de la DO à 340nm est alors effectué jusqu'à stabilisation de la valeur de cette dernière, notée **A2**.

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

$$\text{Glucose} = \frac{A_2 - A_1}{\epsilon \cdot l} * Fd \text{ en mM}$$

Où le facteur de dilution, $Fd = \text{dilution}_{(\text{cuve})} \times \text{dilution}_{(\text{échantillon})} \times 10^3$ et où le coefficient d'absorption molaire du NADPH, $\epsilon = 6300 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3.7 Dosage glycérol

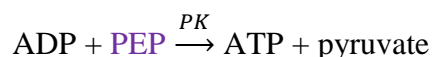
2.3.7.1 Principe

Le dosage du glycérol est effectué par l'utilisation du Kit « Glycerol Assay Kit » de Megazyme. Le principe de dosage repose sur le couplage entre trois réactions enzymatiques.

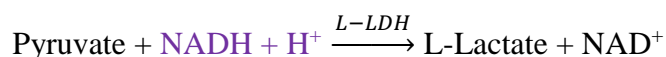
La première réaction catalysée par la glycérokinase (GK) consiste en la transformation du glycérol en L-glycérol-3-phosphate (G3P), selon la réaction suivante :



La deuxième réaction catalysée par la pyruvate kinase (PK) consiste en la transformation du phosphoénolpyruvate (PEP) en pyruvate à l'aide du produit de la première réaction (ADP), selon la réaction suivant :



La dernière réaction catalysée par la L-lactate déshydrogénase (L-LDH) consiste en la transformation du pyruvate issu de la réaction précédente en lactate, ceci entraînant une disparition du NADH dans le mélange, selon la réaction suivant :



L'oxydation d'un NADH étant stœchiométrique 1:1 avec la quantité de glycérol, le suivi de la disparition du NADH suivi *via* sa mesure d'absorbance à 340nm ainsi que l'application de la loi de Beer-Lambert permettent la quantification du glycérol.

2.3.7.2 Protocole

A partir de la culture, 1mL est récupéré et est centrifugé à 16000g durant 1 minute. Le surnageant est récupéré et chauffé à 80°C pendant 5 minutes. Cette étape consiste à dénaturer les protéines libérées des cellules mortes/éclatées afin d'empêcher toute réaction enzymatique contaminante.

Pour le dosage, une préparation de blanc et des échantillons est réalisé selon le **Tableau VIII**:

Tableau VIII : Composition du mélange réactionnel pour le dosage du glycérol.

	Blanc	Echantillon
<i>Eau distillée</i>	840µL	790µL
<i>Tampon</i>	100µL	100µL
<i>Enzymes 2 et 3</i>	5µL	10µL
<i>Substrats</i>	50µL	50µL
<i>Echantillon</i>	-	50µL

Le tampon et les solutions contenant les enzymes des réactions 2 et 3 ainsi que les substrats sont les solutions **S1**, **S2** et **S3** respectivement, fournies par le kit dont les compositions données sont pour **S1** (*Tampon pH 7,4, Azoture de sodium (0.02 % w/v)*), pour **S2** (*PK et L-LDH (concentrations précises non fournies)*) et pour **S3** (*ATP, PEP et NADH (concentrations précises non fournies)*).

Une première lecture de la DO est effectuée à 340nm, notée **A1**. Puis, 5µL de la solution contenant la première enzyme (*GK*) fournie par le kit sont ajoutés aux mélanges. Un suivi de l'évolution de la DO à 340nm est alors effectué jusqu'à stabilisation de la valeur de cette dernière, notée **A2**.

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

$$\text{Glycérol} = \frac{A_1 - A_2}{\epsilon \cdot l} * Fd \text{ en mM}$$

Où le facteur de dilution, $Fd = \text{dilution}_{(\text{cuve})} \times 10^3$ et où le coefficient d'absorption molaire du NADPH, $\epsilon = 6300 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.3.8 Dosage éthanol

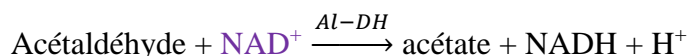
2.3.8.1 Principe

La concentration dans le milieu est suivie par un dosage reposant sur un couplage de deux réactions.

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



La deuxième réaction catalysée par l'aldéhyde déshydrogénase (Al-DH) consiste en la transformation de l'acétaldéhyde en acétate, selon la réaction suivant :



La première réaction étant réversible la deuxième est obligatoire de pouvoir quantifier le NADH. Ce composé est quantifiée *via* la mesure de l'absorbance à 340nm et l'application de la loi de Beer-Lambert. Il y a apparition de deux NADH pour une mole d'éthanol oxydée.

2.3.8.2 Protocole

Un millilitre de culture est récupéré dans un tube froid et est centrifugé à 16000g durant 1 minute. Le surnageant est récupéré dans un nouveau tube froid et mis en présence de 7% final de PCA froid. Ici, le PCA permet une précipitation des potentielles protéines contenues dans le surnageant. En effet, l'éthanol étant un alcool volatile, chauffer le surnageant pourrait induire l'évaporation de l'alcool à doser. Après homogénéisation par vortex, une seconde centrifugation est effectuée dans les mêmes conditions que la précédente. Le surnageant est récupéré dans un tube étanche et froid et est remis à pH 7 avec un tampon KOMO (KOH 2M ; MOPS 0,5M).

Pour le dosage, une préparation de blanc et des échantillons est réalisé selon le **Tableau IX**:

Tableau IX : Composition du mélange réactionnel pour le dosage de l'éthanol.

	Blanc	Echantillon
<i>Tampon</i>	950µL	930µL
<i>ADH</i>	20µL	20µL
<i>Al-DH</i>	20µL	20µL
<i>NAD⁺</i>	10µL	10µL
<i>Echantillon</i>	-	20µL

Le dosage est effectué dans un Tampon de phosphate de potassium (PiK 50mM, pH 9). Pour les enzymes, l'alcool déshydrogénase est à 60U et l'aldéhyde déshydrogénase est à 0,3U. Le NAD⁺ est à 2mM. La concentration de NADH est calculée à partir de la différence entre l'absorbance finale de la cuve « blanc » (**A0**) et l'absorbance finale de l'échantillon (**Af**).

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

$$\text{Ethanol} = \frac{A_f - A_0}{\epsilon \cdot l} * Fd \text{ en mM}$$

Où le facteur de dilution, $Fd = \text{Dilution}_{(\text{cuve})} \times \text{Dilution}_{(\text{échantillon})} \times 10^3$, et où le coefficient d'absorption molaire du NADH, $\epsilon = 6300 \text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La $\text{Dilution}_{(\text{échantillon})}$ représente le volume final de l'échantillon c'est-à-dire le millilitre de surnageant auquel a été ajouté le volume de PCA.

2.3.9 Purification de protéines sur colonne « Glutathion sepharose »

Une préculture de bactéries transformées avec le plasmide exprimant la protéine d'intérêt fusionnée à la Glutathion-S-Transférase (GST) est diluée à environ 0,4UDO dans du milieu LB contenant de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et est incubée à 37°C. Lorsque la densité optique a atteint environ 0,8UDO, 1mM d'Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) est ajouté afin d'induire l'expression de la protéine de fusion. La température est alors abaissée à 30°C afin de permettre une meilleure solubilité de la protéine exprimée tout en réduisant les activités protéolytiques (Smith, 2000). Après 3 heures d'incubation, les bactéries sont récoltées par une centrifugation de 10 minutes à 5000g et à 4°C) puis les culots sont lavés dans du tampon GST (HEPES 25mM, pH 7,7 ; KCl 50mM ; Glycérol 10% (p/v) ; EDTA 0,5mM) en effectuant le même cycle de centrifugation. Le culot est ensuite resuspendu dans le tampon GST, à raison de 1/50ème du volume initial de culture, supplémenté avec 10mM de β -mercaptoéthanol et 1mM de PMSF (PhenylMethylSulfonyl Fluoride). Les cellules sont fragilisées en effectuant trois cycles de congélation dans de l'azote liquide et de décongélation à température ambiante. La lyse est effectuée par sonication dans la glace (Branson Sonifier® 450 ; trois cycles de 30 secondes espacés de 30 secondes). Après une centrifugation de 15 minutes à 16000g pour éliminer les débris, le surnageant est mis en contact avec 1mL de billes glutathion-sépharose (GE Healthcare) qui ont été au préalable lavées trois fois avec 10mL de tampon GST. Il s'agit d'une purification selon le principe d'affinité car la GST va se fixer aux billes en interagissant avec son substrat, le glutathion réduit. Après une incubation sous agitation durant 1h30 à 4°C, les billes sont récoltées par une centrifugation de 3 minutes à 500g et lavées trois fois avec du tampon GST. L'éluion s'effectue en incubant les billes 10 minutes avec 1mL de glutathion réduit à 10mM préparée dans du tampon GST. Après une centrifugation de 5 minutes à 500g, le surnageant qui contient la protéine fusionnée à la GST et le glutathion est récupéré.

Une dialyse est alors effectuée suivant deux incubations successives. L'objectif est d'éliminer le glutathion de la solution. Le surnageant est placé dans un boudin de dialyse de 1cm de largeur avec des pores de 10kDa. La protéine de fusion a une taille estimée à environ 63kDa. Le boudin a été préalablement étanchéifié après un lavage au phosphate de potassium chaud et un lavage à l'EDTA à 0,5mM. Entre chaque bain, le boudin est rincé à l'eau. Une fois le surnageant enfermé dans le boudin étanche, le montage est ensuite placé dans un litre de Tampon phosphate à 0,1M de PiK pH 7 à 4°C sur la nuit et sous agitation. Le lendemain le tampon est changé et à nouveau le montage est incubé 2 heures dans 1L de tampon phosphate préparé de manière similaire à la veille.

2.3.10 Test d'interaction Hémine-Hap4p *in vitro*

2.3.10.1 Principe

Les hémoprotéines sont caractérisables par les propriétés spectrophotométriques de leur molécule d'hème (Smith and Williams, 1970). La molécule d'hème présente différents pics d'absorptions notamment un situé aux alentours de 390-400nm appelé « bande de Soret » (Soret, 1883; Smith and Williams, 1970). Une expérience fréquemment effectuée *in vitro* afin d'analyser l'interaction entre une protéine et l'hème consiste en l'analyse du spectre de l'hème en présence de la protéine en question (Zhang and Guarente, 1995; Qi et al., 1999; Suzuki et al., 2004).

2.3.10.2 Protocole

L'hémine (hème oxydé : Fe³⁺) est préparée extemporanément à une concentration de 1mM dans une solution d'hydroxyde de sodium à 0,1M et est protégée de la lumière.

Dans un premier temps, l'hémine est ajoutée à différentes concentrations dans du Tampon phosphate de potassium 0,1M, pH 7, à température ambiante, et les spectres sont enregistrés par spectrophotomètre (Safas monaco). Durant la titration et entre chaque ajout d'hémine de 0.025-15µM), une incubation de 10 minutes est respectée avant la lecture de spectre. Puis, une concentration de 100nM de protéine recombinante GST-Hap4(330-554) est incubée dans le même tampon et la titration hémine est réalisée à nouveau en présence de la protéine dans les mêmes conditions que précédemment. L'incubation de 10 minutes permet alors de laisser l'interaction entre l'hémine et la protéine se faire si celle-ci est lente. La différence de spectres entre la titration en présence ou en absence de la protéine à concentration constante reflète l'interaction entre la GST-Hap4(330-554) et l'hémine et la différence de l'absorbance de l'hémine seul. Après l'obtention de ces résultats, les données obtenues ont été regroupées dans un graphique afin de déterminer la courbe décrivant l'interaction entre les deux molécules. Cette courbe répond à l'équation suivante :

$$Y = \frac{B_{\max} * X}{(K_d + X)}$$

Où B_{\max} est l'interaction maximale entre hémine et la GST-Hap4(330-554) et où K_d est la constante d'affinité.

2.4 Techniques d'analyse de protéines (Figure 14)

2.4.1 Extraction protéique

La technique utilisée est une lyse en conditions alcalines et réductrice telle que décrite par Kuchler et son équipe (Egner et al., 1995). Pour cela, 50 μ L d'un mélange NaOH 1,85M et β -mercaptoéthanol 7,5% (v/v) sont ajoutés à un culot d'environ 0,5UDO. Après une incubation 10 minutes dans la glace, une précipitation acide des protéines par agrégation de ces dernières est réalisée par l'ajout de 50 μ L de TCA 50% (w/v). Après une nouvelle incubation de 10 minutes dans la glace, une centrifugation de 10 minutes à 16000g est effectuée, le surnageant est éliminé et le culot protéique est repris dans 25 μ L d'une solution contenant 10% de SDS et du Tampon de charge (*Tris-HCl 60mM pH 6,8 ; SDS 2% ; glycérol 5% (w/v) ; β -mercaptoéthanol 2% (v/v) ; bleu de bromophenol 0,02%*). Tout ce processus vise à 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 β -mercaptoéthanol qui est un agent réducteur qui va réduire les ponts disulfures présents dans la structure des protéines. L'ajout du tampon de charge permet une remise à pH des échantillons suite à la précipitation protéique en solution acide.

2.4.2 Dosage protéique

2.4.2.1 Par la méthode du Biuret

Après isolation des mitochondries de levures un dosage des protéines est effectué en suivant la méthode du Biuret.

2.4.2.1.1 Principe

La méthode du Biuret permet d'obtenir un dosage rapide des protéines. En milieu alcalin, les ions cuivre Cu^{2+} réagissent avec les liaisons peptidiques des protéines et forment un complexe avec une coloration violette qui peut être mesurée par spectrophotométrie. L'intensité de la coloration du complexe Cu-protéine est proportionnelle à la concentration en protéine. Cette technique développée par David et ses associés (Gornall et al., 1949) est très adaptée au

dosage protéique et présente l'avantage principal d'utiliser les liaisons peptidiques et donc de ne pas être dépendante de la composition en acides aminés des protéines.

2.4.2.1.2 Protocole

A partir des mitochondries isolées, 5 μ L sont solubilisés dans 200 μ L de cholate de sodium 4% (p/v). Après avoir été vortexé, le mélange est incubé 10 minutes à température ambiante. Puis, du NaOH à 10% est ajouté, qsp 3mL ainsi que 300 μ L de sulfate de cuivre à 1% (m/v). Dans cette solution alcaline, les ions cuivre vont réagir avec les liaisons peptidiques des protéines pour former un complexe violet absorbant à 540nm. Après une incubation de 15 minutes, 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 bœuf (BSA) de 0 à 50 μ g/ μ L.

2.4.2.2 Par l'utilisation du kit DC™ assay de chez BioRad®

2.4.2.2.1 Principe

Sur lysat total, le dosage protéique a été effectué *via* l'utilisation du kit DC™ Protein assay de BioRad. Ce système repose sur le même principe que le dosage de Lowry, c'est-à-dire une réaction entre les protéines, une solution alcaline de tartrate de cuivre et le réactif de Folin. La réaction de ce réactif par les protéines traitées au cuivre donne une coloration bleue dont l'absorbance peut être lue à 750nm.

2.4.2.2.2 Protocole

A partir de cellules lysées aux billes de verre ou *via* la méthode d'extraction de protéine, 5 μ L de lysat est ajouté à 250 μ L de réactif cuivré du kit. Le mélange est vortexé puis 2mL de la seconde solution du kit contenant le réactif de Folin sont ajoutés avant de vortexé à nouveau le mélange. Après une incubation de 15 minutes à température ambiante, la coloration est lue à la longueur d'onde énoncée précédemment. Les absorbances sont comparées à une gamme étalon réalisée de quantités connues de BSA de 0 à 50 μ g/ μ L.

2.4.3 SDS-PAGE

L'électrophorèse repose sur le transport de molécules sous l'effet d'un champ électrique. Différents facteurs peuvent ainsi influencer ce processus notamment : les facteurs électriques, le tampon utilisé pour la migration, la nature des échantillons et le support de migration. Pour le PAGE (ou polyacrylamide gel electrophoresis), 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. Sous l'effet du champ électrique, la migration de l'échantillon protéique va principalement reposer sur sa charge nette, son poids moléculaire. Cependant, comme précédemment mentionné, nos extraits protéiques ont été mis 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 leur poids moléculaire suite au tamisage moléculaire imposé par le système réticulé du gel d'acrylamide. Les gels utilisés ici sont dits de type discontinu car présentant deux parties :

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

Le gel de stacking sert à concentrer les protéines en une bande fine afin que ces dernières arrivent au même moment dans la partie de running ou de séparation où le pourcentage d'acrylamide est plus élevé et va donc influencer la séparation des protéines. 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 décrite par le système de Laemmli (Laemmli, 1970) (*Tris 2,5mM pH 8,3 ; Glycine 19mM ; SDS 0,01% (p/v)*). La migration s'effectue à voltage constant de 160 à 200V. 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 à analyser.

2.4.4 Immunodétection des protéines : Western-blots

Cette technique consiste en la révélation de protéines en faisant appel à des anticorps dirigés contre la protéine d'intérêt. Un transfert de type électrophorétique sur une membrane de nitrocellulose 0,2 microns est réalisé sur les protéines qui ont été séparées au préalable par SDS-PAGE. Le type de transfert utilisé est dit liquide. Pour cela, le montage suivant est réalisé : côté de l'anode de l'appareil de transfert sont placées une éponge et deux feuilles de papier Whatman préalablement incubés dans un Tampon de transfert (*Tris 2,5mM pH 8,3 ; Glycine 19mM ; éthanol 20% (v/v)*). Par-dessus, la membrane nitrocellulose et le gel d'acrylamide sont respectivement ajoutés. Enfin, deux papiers Whatman et une éponge préalablement incubés dans le même tampon que précédemment qui seront elles en contact avec la cathode de la cuve de transfert. Cette cuve est intégralement remplie avec le tampon de transfert et un courant de 350mA durant 1 heure est appliqué afin de transférer les protéines sur la membrane sous l'effet

du champ électrique généré. L'efficacité du transfert peut être contrôlé en faisant réagir pendant au moins 5 minutes la membrane avec une Solution de rouge ponceau (*Ponceau S 0,1% (p/v)* ; *Acide acétique 20% (p/v)*) qui est un colorant qui interagit avec les résidus amines et les régions non-polaires des protéines.

Dès lors, la saturation des sites aspécifiques de la membrane est réalisée par incubation pendant au moins 1 heure à température ambiante dans 5% (p/v) de lait (sans matières grasses) préparé du Tampon Tris Buffered Saline Tween (TBST : *Tris 20mM* ; *NaCl 137mM* ; *Tween-20 0,05% (v/v)* ; *pH 8*). La membrane est ensuite incubée au moins 2 heures à température ambiante, ou sur la nuit à 4°C, avec l'anticorps primaire qui va reconnaître la protéine d'intérêt. Après un cycle de lavages dans du TBST (au moins trois fois 5 minutes) qui vise à enlever l'excès d'anticorps primaire, faiblement fixé ou de façon peu spécifique, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire qui est dirigé contre le fragment constant de l'anticorps primaire, ce fragment étant spécifique à chaque espèce. Un second cycle de lavage dans le TBST identique au précédent est ensuite effectué. L'anticorps secondaire étant couplé à une

Extraction protéique

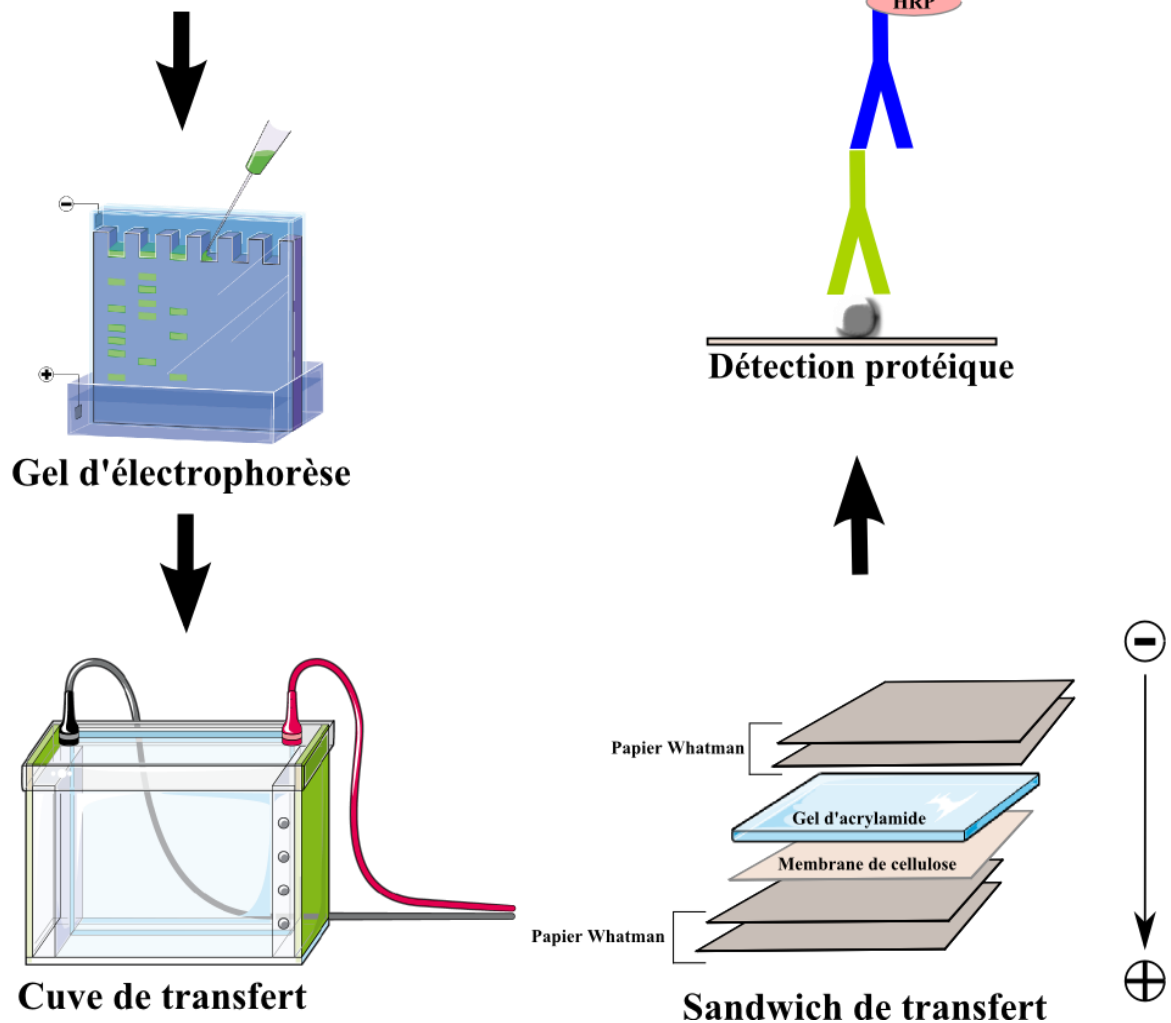


Figure 14. Illustration des différentes étapes des techniques d'analyse des protéines

péroxydase, les complexes anticorps-antigènes peuvent être alors révélés grâce au système ECL plus Western Blottings Detections System (GE Healthcare, Amersham™).

Le **Tableau X** présente les anticorps utilisés au cours ce travail de thèse. Toutes les incubations ont été effectuées dans une Solution TBST-lait 5% (p/v).

Tableau X : Listes des anticorps primaires et secondaires utilisés

Cible	Antigène	Hôte	Dilution	Source
Anticorps Primaire				
Hap4p	Fusion GST-Hap4(330-554) purifiée dans la bactérie	Lapin	1/100 000	Anticorps produits par Eurogentec
Hap2p		Lapin	1/50 000	Anticorps donné par B. Guiard
Hap3p		Lapin	1/10 000	Anticorps donné par B. Guiard
Hap5p		Lapin	1/20 000	Anticorps donné par B. Guiard
Porine	Protéine native (purifiée)	Souris	1/50 000	Invitrogen
PGK-1	Peptide de PGK-1	Souris	1/100 000	Invitrogen
Anticorps Secondaire				
Anti immunoglobulines de lapin	Immunoglobuline		1/10 000	Jackson ImmunoResearch
Anti Immunoglobulines de souris	Immunoglobuline		1/10 000	Jackson ImmunoResearch

2.4.5 Suivi du turn-over de Hap4p

2.4.5.1 Principe

Pour quantifier le temps de demi-vie de Hap4p, un suivi de la quantité de la protéine est effectué en présence d'un inhibiteur de la synthèse protéique, le cycloheximide (CHX). Après l'ajout de cette molécule à 0,4mg/mL dans la culture, la synthèse protéique est arrêtée et la

vitesse de disparition du pool protéique permet de se rendre compte de la vitesse de dégradation des protéines et donc de leur stabilité.

2.4.5.2 Protocole

Avant l'ajout du CHX, 1mL de la culture est centrifugé à 4°C et 16000g durant 1 minute et le surnageant est éliminé. Ce point correspond alors au **T0**, comprenant une quantité endogène de la protéine. Puis, le CHX est ajouté à la culture. Un culot est alors réalisé, de la même manière que pour T0, 3 minutes (**T3**) et 7 minutes (**T7**) après l'ajout de la molécule. À partir de ces culots, une extraction protéique et un Western Blot sont effectués.

2.4.6 Co-précipitation avec l'hémine

A partir des cultures, 80 UDO sont récupérées et centrifugées à 4°C durant 5 minutes à 2500g. Le culot est ensuite remis en suspension dans un Tampon de lyse (*Tris 50mM ; NaCl 100mM ; EDTA 5mM ; glycérol 5% ; PMSF 1mM ; pH 7,5 ; tablette de cocktail anti-protéase* (cOmplete, Roche Applied Science)). Le culot ainsi resuspendu subit alors quatre cycles de 20s à 4m/s au FastPrep™. Pour la co-précipitation, 50µL de billes hémine-agarose 50% (v/v) (Sigma-Aldrich, Type I salin suspension) ou d'agarose seul sont ensuite ajoutés au lysat. Le mélange de co-précipitation est incubé 2 heures à 4°C. Après l'incubation, le surnageant est éliminé et les billes sont lavées trois fois avec le tampon de lyse et les protéines accrochées aux billes sont ensuite éluées dans le tampon de charge évoqué dans la partie « **SDS-PAGE** ». Les contrôles, notés inputs sur les figures, sont des lysats qui n'ont pas été incubés avec les billes d'agarose et dont les protéines ont été précipitées dans 35% de TCA. Après une centrifugation, ces protéines sont reprises dans le même tampon de charge et l'ensemble des échantillons sont déposés sur un gel précoulé Nupage 4-12% Bis-Tris Plus Gels (Invitrogen) afin de séparer les protéines. La migration est réalisée à voltage constant (200V) durant environ 1 heure et est suivie par un transfert sur membrane de nitrocellulose et une détection protéique identiques à ce qui a été décrit précédemment.

2.4.7 Gel Natif et Activité in gel

2.4.7.1 Migration des gels natifs

Le développement du gel natif (Schagger et al., 1994) a permis d'étudier l'organisation supramoléculaire du système des OXPHOS. Cette technique permet de solubiliser par l'intermédiaire de détergent non ionique, tel que la digitonine, les complexes protéiques des membranes lipidiques, sans les dénaturer et en conservant leurs activités enzymatiques. Une fois les protéines solubilisées, l'électrophorèse permet de séparer les protéines et les complexes protéiques suivant leurs tailles, leurs formes et leurs charges. Le gel d'acrylamide, quant à lui, aide à séparer et à augmenter la résolution de séparation entre les protéines de charges proches.

Il a également le rôle de tamis moléculaire. En effet, les gros complexes, notamment ceux de la chaîne respiratoire, vont être bloqués dans la maille du gel d'acrylamide, alors que les plus petits complexes ou protéines vont pouvoir être élués du gel suivant les conditions de migration.

Les mitochondries isolées de cœur ou de levures sont resuspendues dans un tampon d'extraction digitonine (*HEPES (30mM)* ; *potassium acetate (150 mM)* ; *Glycerol (12%)* ; *acide 6-aminocaproic (2mM)* ; *EDTA disodic (2mM)* ; *cocktail d'inhibiteurs de protéases (ROCHE)* ; *pH 7,4*), contenant 6g/g de digitonine pour les mitochondries (Merck ; 300410 - 5GM). Le mélange est vortexé 1 heure à 4°C. Cette étape permet d'extraire et solubiliser les complexes protéines des membranes lipidiques. À la suite de cette incubation, les protéines sont centrifugées à 30 000g pendant 10 minutes à 4°C afin de culoter les membranes qui n'ont pas été solubilisées. Le type de gel natif utilisé est un LBN-PAGE (Light Blue Native Poly Acrylamide Gel) (Wittig et al., 2007). Dans ce protocole, la quantité de Coomassie Brilliant Blue du tampon de charge des échantillons et du tampon cathode (Thermo Fisher Scientific ; BN2002) est diminuée par rapport à un BN-Page classique (Schagger et al., 1994; Schägger and Pfeiffer, 2000). Le surnageant est prélevé et est mélangé avec un tampon de charge (0,02% [p/v] Coomassie Brilliant Blue G-250). Ce tampon permet d'ajouter des charges aux protéines sans les dénaturer. Les échantillons sont déposés sur des gels Invitrogen™ Gels de protéines Bis-Tris Novex™ NativePAGE™ qui sont des gels gradients de 4-16% d'acrylamide. Le tampon de migration se compose d'un tampon cathode (Thermo Fisher ; BN2002 ; 0,002% de *Coomassie Brilliant Blue G-250*) et de NativePAGE™Running Buffer (Thermo Fisher Scientific ; BN2001 ; *50mM BisTris 50mM Tricine pH 6,8*). Les gels migrent à un ampérage constant de 10mA à 4°C durant 18 heures. Lorsque le front de migration atteint la moitié du gel, le tampon de migration est changé pour un tampon de migration sans tampon cathode, afin de diluer le bleu de Coomassie présent dans le gel natif.

Comme décrit plus haut, le gel natif joue le rôle de tamis moléculaire où les plus gros complexes vont s'arrêter et être piégé dans la maille. Une migration de 18 heures est considérée comme une sur-migration dans laquelle seules les protéines pouvant être retenues dans la maille d'acrylamide sont présentes. La quantité de bleu de Coomassie peut être problématique lors de la détection des protéines étudiées car le bleu peut affecter l'activité des protéines et donc en rendre inutilisable la détection par activité enzymatique de certaines protéines dans le gel.

2.4.7.2 Révélation de l'activité enzymatique dans le gel

Une fois les complexes de la chaîne respiratoire séparés par gel natif, les complexe I et complexe IV ainsi que l'ATP synthase sont révélés en utilisant l'activité enzymatique de ces protéines. Pour cela, des colorants sont utilisés. Ces colorants précipitent et changent de couleur

lorsqu'ils sont réduits. La réduction de ces composés permet, grâce aux activités enzymatiques des complexes, de les détecter dans le gel.

2.4.7.2.1 Activité du complexe I

L'une de ces molécules est le 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium ou iodonitrotetrazolium qui une fois réduite forme du iodonitrotetrazolium formazan (INT). L'INT est utilisé pour révéler l'activité du complexe I. Le gel est incubé dans une solution de KH_2PO_4 (50mM ; pH 7,4) contenant 400 μM NADH et 0,5mg/mL d'INT sous agitation constante à température ambiante, jusqu'à l'apparition de bandes rouges traduisant la présence de complexe I. Ce procédé permet également de détecter l'activité des autres NADH déshydrogénases. La surmigration limite ainsi la présence de ces petits complexes dans le gel.

2.4.7.2.2 Activité du complexe IV

Pour l'activité du complexe IV, le colorant utilisé est le diaminobenzidine (DAB) qui, lorsqu'il est réduit, forme un précipité marron. Le complexe IV est détecté grâce à une solution contenant du tampon RB (Succrose (120mM) ; KCl (50mM) ; Tris-HCl (20mM) ; KH_2PO_4 (4mM) ; MgCl_2 (2mM) ; pH 7,4), 1mg/mL de DAB et 0,5mg/mL de cytochrome c. Le gel est incubé sous agitation constante à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes marrons traduisant la présence de COX. L'apparition de ces bandes peut prendre quelques heures. L'activité de la COX peut être accélérée par l'ajout de cytochrome c, cependant cet ajout induit une coloration non spécifique du gel.

2.4.7.2.3 Activité de l'ATP synthase

L'ATP synthase est détectée par l'intermédiaire de l'activité ATP hydrolase du complexe. La détection est réalisée *via* à un tampon aqueux (MgSO_4 (5mM) ; glycine (50mM) ; triton X100 (1mg/ml) ; acétate de plomb (1,5mM) ; l'ATP (4mM) ; pH 8,4). Le gel est incubé sous agitation constante à 37°C jusqu'à l'apparition de bandes blanches traduisant la présence d'ATPase synthase. L'activité de l'ATP synthase nécessite une extrême précaution sur la présence de phosphate dans le tampon ou sur les outils utilisées car ils vont induire une précipitation de l'acétate de plomb et donc *in fine* une coloration aspécifique sur le gel.

2.5 Technique de microscopie

2.5.1 Microscopie électronique

Les cellules sont récupérées à hauteur de 100UDO puis sont centrifugées à 4°C et 5000g durant 5 minutes. Un lavage à l'eau est réalisé avant une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions.



La suite du protocole a été réalisée par Bénédicte Salin et Corinne Blancard. Les culots cellulaires ont été placés sur une grille de cuivre EM (400mesh) recouverte de Formvar, un film plastique qui permet de stabiliser le culot cellulaire. Chaque culot a été rapidement immergé dans du propane liquide pré-refroidi et maintenu à -180°C dans l'azote liquide. Les culots sont ensuite transférés dans une solution pré-refroidie de tétraoxyde d'osmonium à 4% dans de l'acétone et placés à -82°C pendant 72 heures (substitution). Ils sont ensuite réchauffés progressivement pour les ramener à température ambiante. Cette étape est suivie de trois lavages en acétone puis d'une imprégnation progressive en résine araldite (époxyrésine, Fluka). Les échantillons sont ensuite inclus dans des gélules sur lames de verre et polymérisés trois jours à 48°C . Des coupes ultrafines ont été réalisées à l'aide d'un ultramicrotome et contrastées avec du citrate de plomb avant d'être observées au microscope électronique Hitachi 7650.

2.5.2 Microscopie épifluorescente

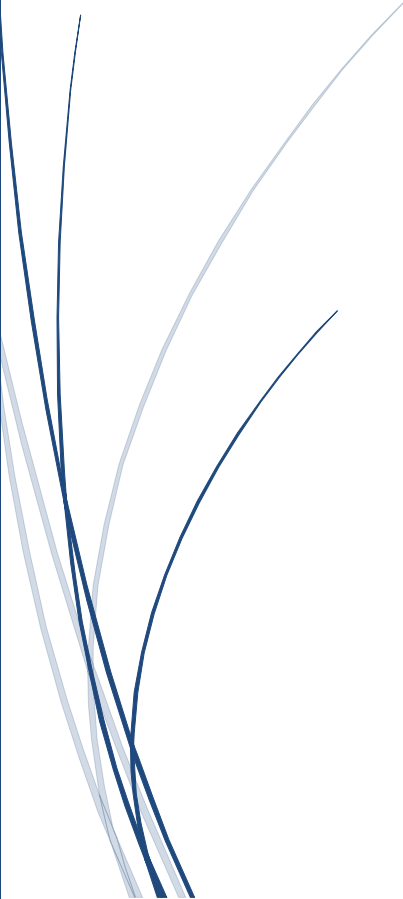
A partir de cultures transformées avec le plasmide pVT100U-mtGFP (voir **Tableau II**), 900 μL de culture sont ajoutées à 100 μL de paraformaldehyde à 37%. Après une incubation de 8 minutes à température ambiante, les échantillons sont centrifugés à 6000g durant 1 minute et les culots sont lavés dans 1mL de PBS, avant une nouvelle centrifugation dans les mêmes conditions. Une nouvelle fois les culots sont resuspendus dans du PBS. Les cellules sont observées *via* un microscope inversé entièrement automatisé (Olympus) en utilisant un objectif Plan-Apochromat avec une ouverture de x100, 1,4. Des empilements d'images de fluorescence ont alors été collectés automatiquement à un intervalle Z de 0,2 μm . La déconvolution de chaque série d'empilements a été automatiquement calculée par les deux plugins de ImageJ : PSFgenerator et DeconvolutionLab. Pour obtenir une image en trois dimensions, la déconvolution a été traitée avec le logiciel Chimera (University of California, San Francisco).

2.6 Analyse Statistique

Les résultats sont tous exprimés en moyenne \pm S.E.M. Toutes les analyses statistiques ont été réalisées après l'analyse des variances de tous les résultats. Pour ce faire, le logiciel Prism (GraphPad, San Diego, CA) a été utilisé. Pour la p-value, $p = 0.05$ a été considérée comme étant significatif et les significativités sont représentées sur les figures de la manière suivante : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$ et **** : $p < 0,0001$.



Chapitre 3 Etude du rôle de
l'hème sur la biogenèse
mitochondriale *via* Hap4p



3.1 Introduction

3.1.1 Généralités sur l'hème

3.1.1.1 La voie de biosynthèse de l'hème

L'hème est une molécule constituée d'un macrocycle de type porphyrine qui forme un complexe avec un atome de fer situé au cœur de la molécule. Quatre liaisons de coordination entre les atomes d'azote de la porphyrine et l'atome de fer permettent d'établir ce complexe (**Figure 15**). Chez les eucaryotes, la biosynthèse de l'hème se déroule en huit étapes. Seules la première et la dernière étapes se déroulent au niveau de la matrice mitochondriale (**Figure 16**) (Shemin et al., 1955; Labbe-Bois et al., 1980; Franken et al., 2011). La première réaction catalysée par l'aminolévulinate synthase permet la formation du premier précurseur de l'hème, le δ -aminolévulinate (ALA), à partir du succinyl-CoA et de la glycine. Cette première étape a lieu dans la matrice mitochondriale, puis l'ALA, ainsi formé, est transporté dans le cytosol où les réactions enzymatiques suivantes ont lieu. Le transporteur de l'ALA à travers la membrane mitochondriale n'est à ce jour pas connu. Les diverses réactions de condensation, qui suivent la sortie de l'ALA, conduiront à la formation de la protoporphyrine IX qui sera alors transportée dans la matrice mitochondriale pour l'ultime étape de la biosynthèse : l'insertion d'un ion ferreux (Fe^{2+}) dans le noyau porphyrique, catalysée par la ferrochélatase (Ajioka et al., 2006; Franken et al., 2011).

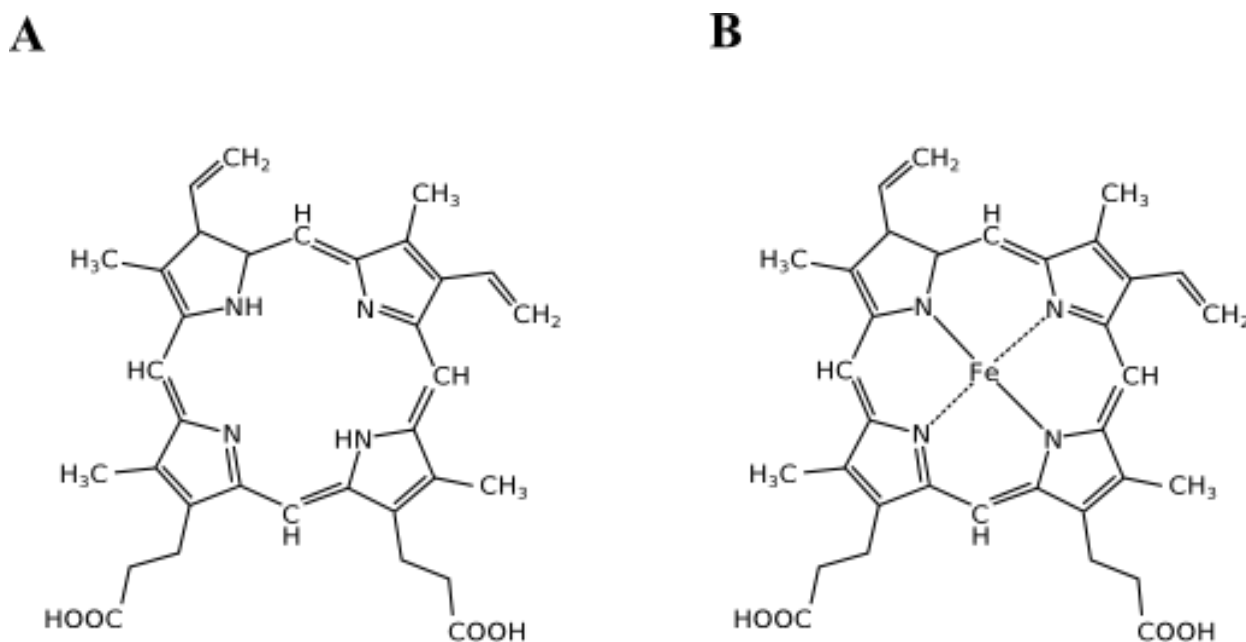


Figure 15. Structures de la protoporphyrine IX et du (proto)hème

A. La protoporphyrine IX, précurseur de l'hème. **B.** La molécule d'hème est formée après fixation du fer par le noyau porphyrique.

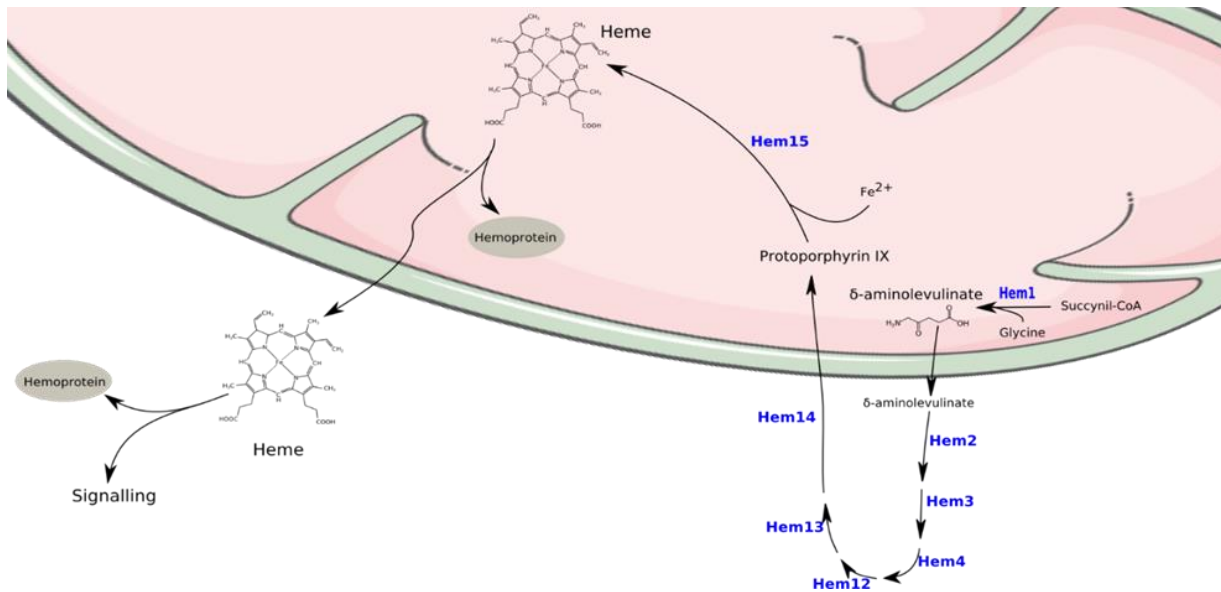


Figure 16. Voie de biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes

Hem1 : Aminolévulinate synthase ; Hem2 : Aminolévulinate déshydratase ; Hem3 : Porphobilinogène désaminase ; Hem4 : Uroporphyrinogène III synthase ; Hem12 : Uroporphyrinogène décarboxylase ; Hem13 : Coproporphyrinogène oxydase ; Hem14 : Protoporphyrinogène oxydase ; Hem15 : Ferrochélatase.

3.1.1.2 L'hème et la signalisation cellulaire

Il existe différents types d'hèmes dont les plus connus sont les hèmes dits de type a, b et c. L'hème formé par la ferrochélatase est un hème de type b, aussi appelé protohème. Il s'agit du type d'hème le plus répandu dans la cellule. Les hèmes de type c, que l'on retrouve par exemple au niveau du cytochrome c, et les hèmes de type a, que l'on retrouve au niveau de la cytochrome c oxydase (COX), au niveau de la membrane interne mitochondriale, dérivent de ce dernier. Généralement l'hème est intégré à des hémoprotéines, soit au sein de la mitochondrie, comme il a été énoncé ci-dessus, soit dans le cytosol. L'hème est une molécule aux fonctions multiples et importantes pour la cellule. Parmi ces fonctions, le transfert des électrons au niveau de certains complexes de la chaîne respiratoire *via* la formation des cytochromes (voir 1.1.3.1) ou encore la défense contre les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont bien connues (pour revue (Nicholls, 2012)) . Le transport de l'oxygène par des protéines telles que la myoglobine et l'hémoglobine, deux hémoprotéines, est également bien décrit dans la littérature (pour revue (Wagner, 2008; Gell, 2018)).

Ses fonctions sont essentiellement liées à ses propriétés redox. En effet, le fer de la molécule d'hème peut osciller entre différents états redox (la plupart du temps, ferreux (Fe^{2+}) ou ferrique (Fe^{3+})) et donc servir à différentes réactions de transfert d'électrons. De plus, le fer coordonné au noyau porphyrinique peut établir deux liaisons de coordination supplémentaires.

Ces dernières peuvent ainsi être établies avec des molécules telles que le dioxygène ou encore le monoxyde d'azote mais également avec certains résidus d'acides aminés comme l'histidine et la cystéine, le plus généralement (Peisach et al., 1963). Cette capacité d'interaction avec ces résidus lui confère également des propriétés de cofacteur protéique (Zhang and Hach, 1999). L'hème est, aussi, une molécule majeure de signalisation de la cellule. En effet, lorsqu'elle n'est pas intégrée aux hémoprotéines, et est alors dite labile, elle a la possibilité de pouvoir interagir avec d'autres protéines permettant leur activation ou leur inhibition, par exemple. Le **Tableau XI** présente une liste non-exhaustive de protéines régulées par l'hème. Il a été mis en évidence que la molécule d'hème, sous sa forme labile, exerce des régulations diverses et variées telles que l'activité et la localisation de facteurs de transcription, la synthèse de métabolites ou encore la maturation des ARNm. Enfin, bien que la molécule d'hème à l'état labile puisse être toxique à haute concentration pour les cellules (Kumar and Bandyopadhyay, 2005; Hanna et al., 2018), il est intéressant de noter que cette molécule est également connue pour être à l'origine d'une boucle d'autorégulation, en se fixant sur l'aminolévulinate synthase, chez certaines espèces (Lathrop and Timko, 1993; Gonzalez-Dominguez et al., 2001; Munakatah et al., 2004). L'hème labile peut alors induire une inhibition sur la synthèse globale du pool hémique.

3.1.2 Le complexe HAP et l'hème

3.1.2.1 Historique

Le lien entre l'hème et la régulation de l'expression de protéines mitochondriales chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* a été étudié depuis plusieurs années. Cette hypothèse résultait du fait que des souches déficientes pour la synthèse d'hème n'exprimaient pas ou peu de protéines constituant la chaîne respiratoire mitochondriale (Jayaraman et al., 1971; Ross and Schatz, 1975; Saltzgeber-Müller and Schatz, 1978; Matner and Sherman, 1982).

L'étude de la régulation de l'expression du gène du cytochrome c par l'hème et la source de carbone a permis d'identifier les gènes *hap1*, *hap2* et *hap3* (Guarente et al., 1984). Comme décrit dans le **Tableau XI**, la protéine Hap1p est un facteur de transcription régulé par la concentration en hème. En effet, l'équipe de Guarente a pu mettre en évidence que lorsque *S. cerevisiae* est incubée avec des concentrations croissantes d'hème, la quantité de la forme active de Hap1p augmente. En absence d'hème, un complexe de haut poids moléculaire s'associe à Hap1p au niveau de son site de liaison à l'ADN empêchant alors son rôle sur l'expression des gènes cibles. Lorsque la quantité d'hème augmente, ce complexe se dissocie progressivement de Hap1p laissant la place à une protéine chaperonne et ce nouveau complexe lié à l'hème s'homodimérise et ainsi prend sa forme active (**Figure 17**) (Zhang et al., 1993; Zhang and Guarente, 1994; Lan et al., 2004). Une autre étude a pu mettre en évidence que

lorsque la synthèse d'hème est augmentée par ajout de précurseur de l'hème en extracellulaire, l'expression des cibles de Hap1p augmente (Hickman and Winston, 2007). Dans les deux cas, l'hème sous sa forme labile interagit avec Hap1p afin de permettre son activation (Pfeifer et al., 1987).

Bien que faisant partie de la même famille de protéines que les autres protéines Hap, Hap1p ne participe pas à la formation du complexe HAP. Il a d'ailleurs pu être montré que Hap1p ne contrôle que très peu de gènes liés au métabolisme mitochondrial en comparaison avec le complexe HAP (constitué des protéines Hap2p, Hap3p, Hap4p et Hap5p) si bien que son absence n'entraîne pas de défaut de croissance sur substrat respiratoire (Schneider and Guarente, 1991; Schuller, 2003). En normoxie, Hap1p est, entre autre, un facteur de transcription pour un répresseur d'une isoforme d'une sous-unité de la COX, COX5b ce qui ne semble pas induire de modification de l'activité de la COX (Deckert et al., 1995; Bourens et al., 2013). La fonction de Hap1p a été montrée comme n'étant essentielle qu'en conditions anaérobies (Chantrel et al., 1998). Dans des conditions hypoxiques, ce facteur a un rôle significatif non pas comme activateur, mais comme répresseur. L'activité répressive de Hap1p contrôle plusieurs gènes, dont trois gènes ERG nécessaires à la biosynthèse de l'ergostérol (Hickman and Winston, 2007).

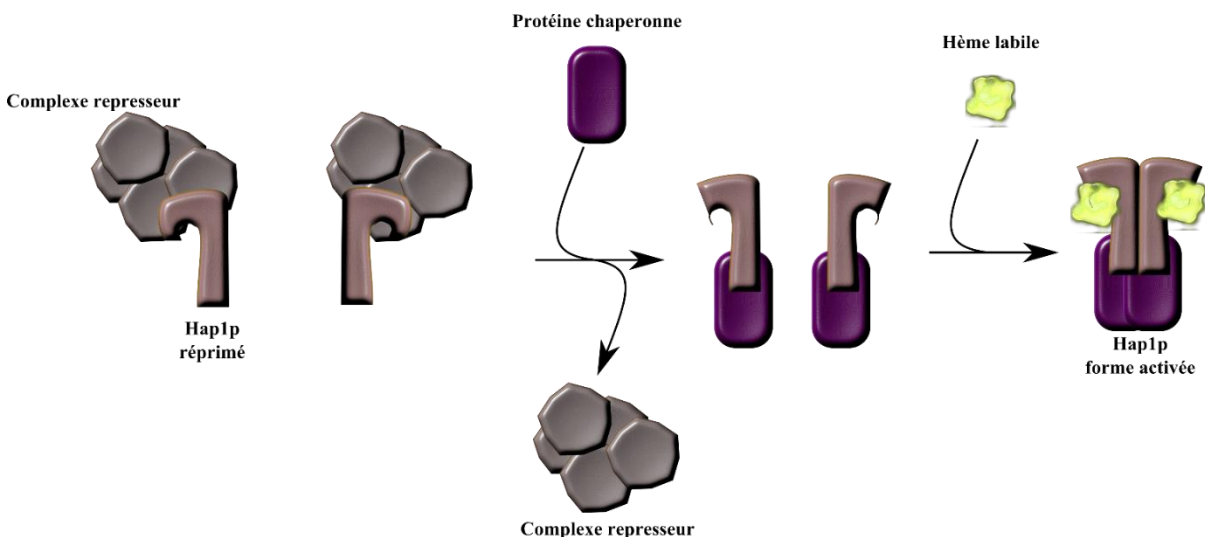


Figure 17. Activation de Hap1p

Hap1p est réprimée constitutivement par l'association d'un complexe de haut poids moléculaire (Lan et al., 2004). L'association avec une protéine chaperonne permet la dissociation avec ce complexe represseur et facilite alors la liaison avec la forme labile de l'hème. Hap1p s'homodimérise après la fixation de l'hème permettant alors sa fixation sur les promoteurs cibles (Zhang et al., 1993 ; Zhang and Guarente, 1994).

Tableau XI. Liste non exhaustive de protéines régulées par l'hème labile

Protéines	« Espèces »	Effet de l'hème	Références
<i>Aminolévulinate synthase (ALAS1-mamm ; K1HEM1 – K. lactis)</i>	Mammifères, <i>Kluyveromyces lactis</i>	Inhibition de l'import de la protéine dans la mitochondrie	(Lathrop and Timko, 1993; Gonzalez-Dominguez et al., 2001; Munakatah et al., 2004)
<i>Heme-Regulated Initiation factor eiF2α Kinase (HRI)</i>	Mammifères	Inhibition de la synthèse des globines	(Chen et al., 1989; Inuzuka et al., 2004; Chen, 2007)
<i>Heme activator protein 1 (Hap1p)</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Activité transcriptionnelle	(Fytlovich et al., 1993; Zhang and Guarente, 1994; Hickman and Winston, 2007)
<i>BTB and CNC homology 1 (Bach1)</i>	Mammifères	Export nucléaire, dégradation	(Suzuki et al., 2004; Zenke-Kawasaki et al., 2007)
<i>FixLs</i>	Rhizobiums	Activité kinase dépendant du "sensing" de l'oxygène	(David et al., 1988; Gilles-Gonzalez et al., 1991)
<i>Guanylate cyclase soluble (sCG)</i>	Mammifères	Signalisation par le radical ·NO	(Ignarro et al., 1982; Wedel et al., 1994; Friebe and Koesling, 2003)
<i>Iron Response Regulator (IRR)</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum ; Rhizobium laguminosarum</i>	Dégradation, liaison à l'ADN (sous dépendance du fer)	(Qi et al., 1999; Yang et al., 2005; Singleton et al., 2010)
<i>Carbon monoxide oxidation system transcription Regulator (CooA)</i>	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Activité transcriptionnelle dépendant du CO	(Shelver et al., 1995, 1997; Nakajima et al., 2001)
<i>Iron regulatory protein 2 (IRP2)</i>	Mammifère (certains types cellulaires)	Dégradation de IRP2	(Samaniegos et al., 1994; Guo et al., 1995; Ishikawa et al., 2005)
<i>Arginyl-tRNA Synthetase (ArgRS)</i>	<i>Homo Sapiens</i>	Oligomérisation	(Yang et al., 2010)

3.1.2.2 Hème, régulateur de l'activité du complexe HAP ?

Cependant, si le lien entre Hap1p et la forme labile de l'hème est très bien décrit, le rôle de l'hème sur les autres membres de la famille protéique reste à démontrer malgré l'acronyme de ce groupe : HAP pour Heme Activator Protein. La régulation du complexe HAP par l'hème labile a toujours été suggérée mais n'a jamais été clairement démontrée. Le complexe HAP est considéré comme étant essentiellement régulé par l'induction sur substrat respiratoire de l'expression de la protéine Hap4p et il est même parfois défini comme « Heme-indépendant » (Liu and Butow, 2006). Pourtant des gènes autres que celui du cytochrome c, par exemple des sous-unités de la cytochrome c oxydase, ont été décrits comme dépendant du complexe HAP de façon hème et/ou carbone source-dépendante (Schneider and Guarente, 1991; Betina et al., 1995; Kwast et al., 1998).

Durant sa thèse dans notre laboratoire, Edgar Yoboue avait déjà commencé à étudier l'impact de l'hème sur la biogenèse mitochondriale en s'intéressant aux fonctions redox de cette molécule dans la souche de *S. cerevisiae* $\Delta tpk3$ (Yoboue, 2011). Cette souche présente une production très importante de ROS mitochondriaux. Ce stress oxydatif est à l'origine d'un défaut au niveau de la prolifération et de la respiration cellulaire mais également d'une diminution globale du contenu mitochondrial et associé à une diminution de la quantité relative d'Hap4p dans cette souche (Chevtzoff et al., 2010). Suite à ces résultats, il a utilisé le mutant $\Delta tpk3$ comme modèle d'étude de l'effet de l'hème sur le complexe HAP notamment parce qu'il présente un défaut de biogenèse mitochondriale qui est lié à la protéine Hap4p. Son hypothèse était que la molécule d'hème pourrait être un des intermédiaires de la régulation de la protéine Hap4p par le stress oxydant c'est-à-dire que l'état redox de la molécule d'hème pouvait réguler certaines propriétés de Hap4p. Il avait pu constater que l'ajout d'ALA dans le milieu de culture du mutant $\Delta tpk3$ induisait un retour à un phénotype semblable à celui présent chez la souche sauvage. L'ALA induisait également, dans ce cas, une augmentation de la quantité de cytochromes et de Hap4p. Ces résultats laissaient supposer l'existence d'un rôle de l'hème sur Hap4p que ce soit de manière directe ou indirecte. Enfin, récemment, il a pu être mis en évidence que l'hème était un facteur limitant dans la transcription du gène *HAP4* sur des cellules $\Delta hem1$, souche dans laquelle l'aminolévulinate synthase (Hem1p) a été délétée (Zhang et al., 2017). Cependant, ces expériences ont été faites sur des cellules cultivées en milieu glucose dans lequel de l'ALA ou de l'hémine, forme oxydée de l'hème, sont ajoutés afin d'augmenter la concentration d'hème intracellulaire. Dans de telles conditions, la synthèse de Hap4p est connue pour être hautement réprimée. Les résultats de l'étude de Vancura et ses collaborateurs pourraient donc découler d'un mécanisme contrant une répression due au glucose et non une régulation exercée par l'hème directement sur la voie de synthèse d'Hap4p, cette sous-unité

étant la seule sous unité sensible à la source de carbone (Forsburg and Guarente, 1989; Derisi et al., 1997; Brons et al., 2002; Rolland et al., 2002; McNabb and Pinto, 2005). Dans la même étude, dans un milieu non fermentescible et sans répression du métabolisme oxydatif par le glucose, en galactose, ni l'hémine ni l'ALA, supplémentés à forte concentration, n'induisent une régulation de la transcription du gène *HAP4* après augmentation de la quantité d'hème intracellulaire (Zhang et al., 2017). Ainsi, les résultats de l'équipe de Vancura laissent envisager une régulation de la biogenèse mitochondriale par l'hème, mais leurs conditions de culture ne permettent pas d'établir clairement ce lien entre le complexe HAP et cette molécule.

3.1.3 Problématique

La question du rôle de l'hème sur ce complexe et en particulier sur la sous-unité régulatrice Hap4p est donc au cœur de cette partie de mon travail. Les premiers résultats du laboratoire mettent en évidence une augmentation de la quantité d'Hap4p dans un contexte de fort stress oxydant *via* une augmentation de la biosynthèse d'hème. L'objectif était donc ici de déterminer si l'hème pouvait être à l'origine d'une régulation de la biogenèse mitochondriale et ce par une régulation sur le complexe HAP, chef d'orchestre de cette biogénèse. Dans ce contexte, la seconde question qui s'impose est si cette régulation serait due à la fraction labile de l'hème. En effet, étant donnée qu'il est déjà connu que la forme labile de l'hème agit sur la régulation de la protéine Hap1p, il est possible d'émettre l'hypothèse qu'elle agit également sur celle d'un membre de la même famille protéique.

3.2 Mise au point des conditions de culture

3.2.1 Conditions de culture

Pour répondre au mieux à cette problématique, j'ai utilisé une souche mutée de *S. cerevisiae*. La mutation porte sur la première enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, Hem1p. Cette protéine ayant été délétée, souche $\Delta hem1$, il m'était alors possible d'initier la synthèse de l'hème *via* l'ajout dans le milieu d'ALA extracellulaire. Il est à noter que pour cette souche lorsque le milieu n'est pas supplémenté en ALA, il n'y a pas de prolifération cellulaire (**Figure 18**). En effet, en milieu purement respiratoire, la formation de chaînes respiratoires fonctionnelles est nécessaire or l'hème étant un composé primordial des cytochromes, sa biosynthèse est essentielle à la prolifération cellulaire.

Le milieu utilisé pour l'ensemble des expériences est un milieu minimum contenant 0,2% de lactate. Ce milieu est purement respiratoire c'est-à-dire que le système des oxydations phosphorylantes mitochondriales (OXPHOS) est obligatoire pour la prolifération cellulaire. L'activité du complexe HAP étant indispensable à la biogenèse mitochondriale chez les *S. cerevisiae*, elle est également à l'origine de la formation du système des OXPHOS. Dans de

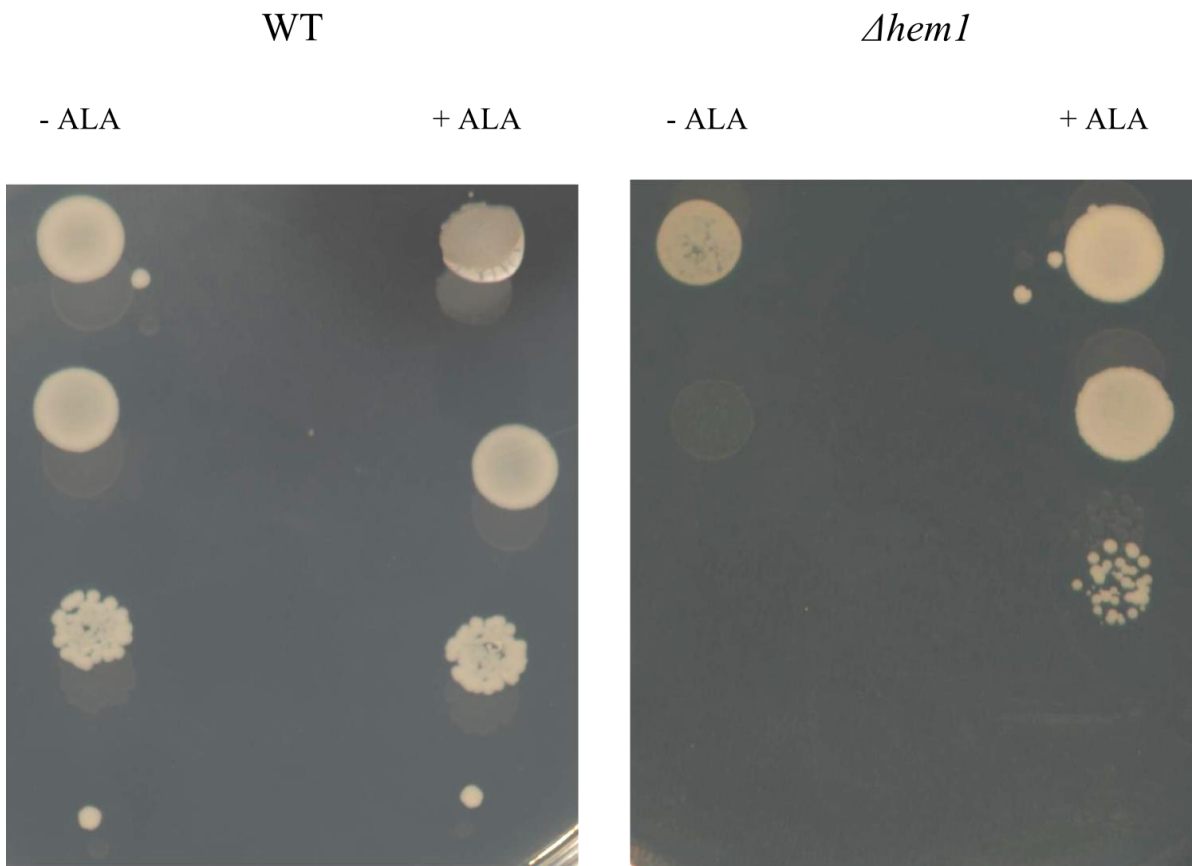


Figure 18. Dépendance de la souche *Δhem1* à l'ALA

Le test en goutte montre qu'en absence d'ALA, la souche *Δhem1* ne pousse pas, alors que la souche sauvage n'est pas affectée par la présence ou l'absence d'ALA. L'ALA est ajouté à 100 μ g/mL pour les conditions +ALA. Le premier dépôt pousse systématiquement du fait de la faible dilution subit par les cellules cultivées alors en présence d'ALA.

telles conditions, aucune répression du métabolisme oxydatif n'est mise en place. Le complexe de transcription HAP est actif et le compartiment mitochondrial est bien différencié.

L'ALA a été ajouté à différentes concentrations afin de pouvoir vérifier une possible titration de la concentration intracellulaire d'hème dans ces conditions. Les différentes concentrations d'ALA utilisées sont 5 μ g/mL, 10 μ g/mL, 25 μ g/mL et 100 μ g/mL. La plus faible concentration a été choisie par le fait qu'elle était la concentration minimale permettant un suivi de prolifération sur les 36 heures nécessaires aux expériences. La concentration la plus importante est celle qui permet de restaurer le phénotype WT pour la respiration et la prolifération. J'ai également essayé d'ajouter des concentrations plus importantes d'ALA. À des concentrations supérieures à 100 μ g/mL (300 μ g/mL et 1000 μ g/mL), le phénotype de prolifération et de respiration de la souche mutée est restauré comme le WT de manière comparable à la condition *Δhem1* supplémentée par 100 μ g/mL (données non montrées).

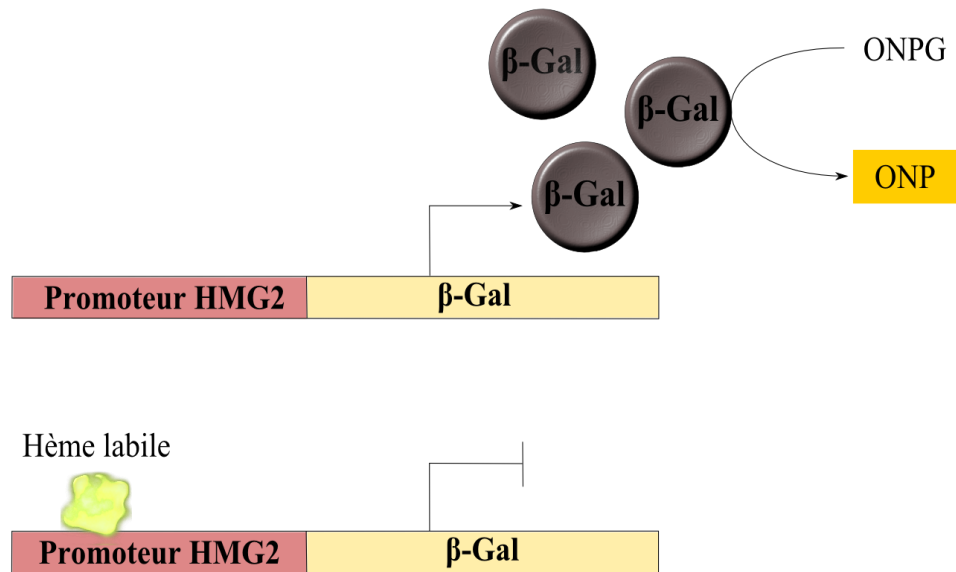
3.2.2 Titration de l'hème labile par l'ajout d'ALA

Dans un premier temps, il a fallu vérifier que l'ajout d'ALA pouvait induire une augmentation de la synthèse d'hème labile au sein des cellules et non seulement de la formation des hémoprotéines. Pour ce faire, j'ai utilisé un système de gène rapporteur afin de pouvoir mesurer la quantité relative d'hème libre dans les cellules. Ce gène rapporteur est ici constitué de la région promotrice du gène *HMG2* associée à la β -Gal. L'expression de ce gène est connue pour être inhibée par fixation d'hème labile sur cette région promotrice (Thorsness et al., 1989; Crisp et al., 2003). Dans ce contexte, une forte activité β -Gal signifierait une faible concentration d'hème labile dans les cellules. À l'inverse, une faible activité β -Gal détectée est associée à une forte concentration d'hème labile capable d'inhiber le promoteur et donc à une synthèse d'hème très active (**Figure 19A**).

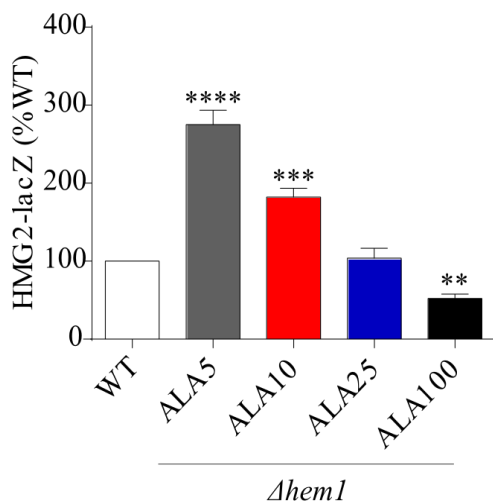
L'expérience réalisée dans les conditions énoncées précédemment a pu mettre en évidence une très forte activité β -Gal en présence de faibles concentrations d'ALA supplémenté (**Figure 19B**) : à 5 μ g/mL (ALA5) et 10 μ g/mL (ALA10), l'activité β -Gal est deux à trois fois plus importante que dans la souche contrôle (WT). Lorsque cette concentration d'ALA augmente, 25 μ g/mL (ALA25) et 100 μ g/mL (ALA100), l'activité β -Gal diminue jusqu'à revenir à des niveaux comparables à ceux observés dans les cellules WT, voire inférieurs. D'autre part, j'ai réalisé une expérience similaire dans laquelle une très forte concentration d'ALA, 1000 μ g/mL (ALA1000), a été ajoutée au milieu des cellules WT. L'objectif était de vérifier que la synthèse d'hème était à son maximum mais également que l'ajout d'ALA en extracellulaire n'induisait pas d'effet secondaire délétère. Il apparaît alors que, à cette concentration, l'activité du promoteur du gène *HMG2* est inférieure à celle mesurée dans les cellules WT, mais supérieure à celle mesurée dans les cellules $\Delta hem1$ à forte concentration d'ALA ajoutée (**Figure 19C**). Il est possible que cet ajout en fort excès d'ALA extracellulaire, augmente légèrement la synthèse d'hème dans les cellules contrôle. Cependant, comme dit précédemment, cette molécule étant toxique pour la cellule à forte concentration, sa synthèse est fortement régulée, par le rétrocontrôle de l'hème lui-même sur Hem1p par exemple. Cela pourrait expliquer la diminution observée à 1000 μ g/mL dans les cellules WT.

À partir de la mesure du gène rapporteur, ces résultats semblent montrer que (1) l'ALA extracellulaire ajouté dans le milieu est capable d'entrer dans la cellule et d'induire une synthèse d'hème ; (2) cette synthèse d'hème concerne également la formation d'un pool labile ; (3) la quantité d'hème labile produite est directement corrélée à la concentration d'ALA ajoutée dans le milieu.

A



B



C

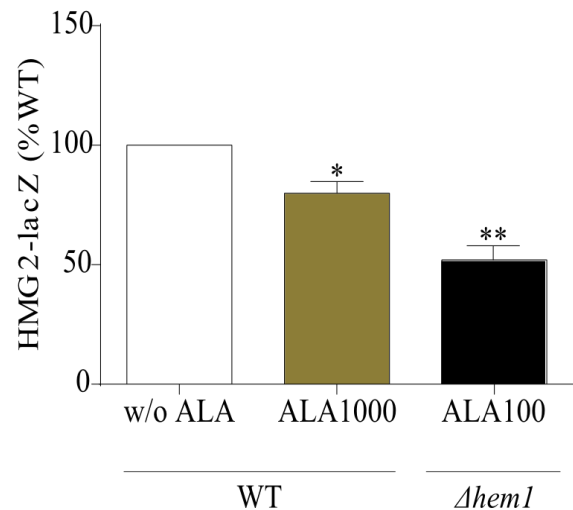


Figure 19. Evaluation du niveau d'hème labile grâce à l'activité du gène promoteur *HMG2-lacZ* à différentes concentrations d'ALA

A. Illustration de l'action de l'hème labile sur le promoteur du gène *HMG2*. **B.** Le milieu de culture, lactate 0,2%, des cellules *Δhem1* a été supplémenté par 5 μ g/mL (ALA5), 10 μ g/mL (ALA10), 25 μ g/mL (ALA25) ou 100 μ g/mL (ALA100) d'ALA. L'activité β -gal a été mesurée sur 5UDO et exprimée en pourcentage du WT. (n=6) **C.** Le milieu de culture, lactate 0,2%, des cellules WT a été ou non supplémenté par 1000 μ g/mL (ALA1000) d'ALA et celui des cellules *Δhem1* par 100 μ g/mL d'ALA. L'activité β -gal a été mesurée sur 5UDO et exprimée en pourcentage du WT. (n=3)

3.3 Le rôle de l'hème sur le pool global mitochondrial

3.3.1 Modification du métabolisme cellulaire

Lorsque les cellules sont ensemencées en milieu purement respiratoire, la respiration cellulaire associée à l'ATP synthase est le seul système permettant de convertir l'énergie nécessaire, sous la forme d'ATP, pour la prolifération et le maintien des fonctions cellulaires. La prolifération dépend donc exclusivement de l'activité mitochondriale. De plus, la formation du système des oxydations phosphorylantes mitochondriales nécessite la biosynthèse d'hème pour générer les cytochromes de la chaîne respiratoire, comme dit précédemment.

J'ai donc mesuré la respiration cellulaire sur la souche délétée pour le gène *HEM1*, notée *Δhem1*, en présence de concentrations croissantes d'ALA afin de vérifier si une quantité croissante d'hème avait une influence sur l'activité du système des OXPHOS. La **Figure 20A** montre une augmentation de la respiration spontanée des cellules en fonction de la concentration d'ALA ajouté au milieu. À faible concentration (ALA5) la vitesse de respiration est diminuée de moitié par rapport à l'activité mesurée dans les cellules WT et augmente progressivement en fonction de l'ALA ajouté au milieu jusqu'à obtenir des résultats non significativement différents de ceux obtenus dans les WT. En parallèle, j'ai mesuré la prolifération des cellules dans les différentes conditions durant 3 heures. Durant ce laps de temps, il est possible de remarquer que les différentes cultures de *Δhem1*, bien qu'elles aient été ensemencées à la même concentration, n'ont pas évoluées à la même vitesse (**Figure 20B**). À partir de ces suivis de prolifération, j'ai donc calculé les vitesses de prolifération (**Figure 20C**). Cette vitesse μ est calculée comme suit :

$$\mu = \frac{\ln(mgDW_{Tn}) - \ln(mgDW_{T0})}{n}$$

où, ici, $n = 3$ heures.

Il apparaît clairement que l'ajout d'ALA permet bel et bien une augmentation de la prolifération cellulaire au sein des cultures puisque de la même façon que pour la respiration, dans les cellules *Δhem1*, à faible concentration d'ALA (ALA5) la vitesse de prolifération est deux fois moins importante que dans les cellules WT et l'augmentation de la concentration d'ALA supplémentée induit une augmentation de cette vitesse de prolifération, jusqu'à retrouver un phénotype semblable celui observé dans les cellules WT à 100 μ g/mL.

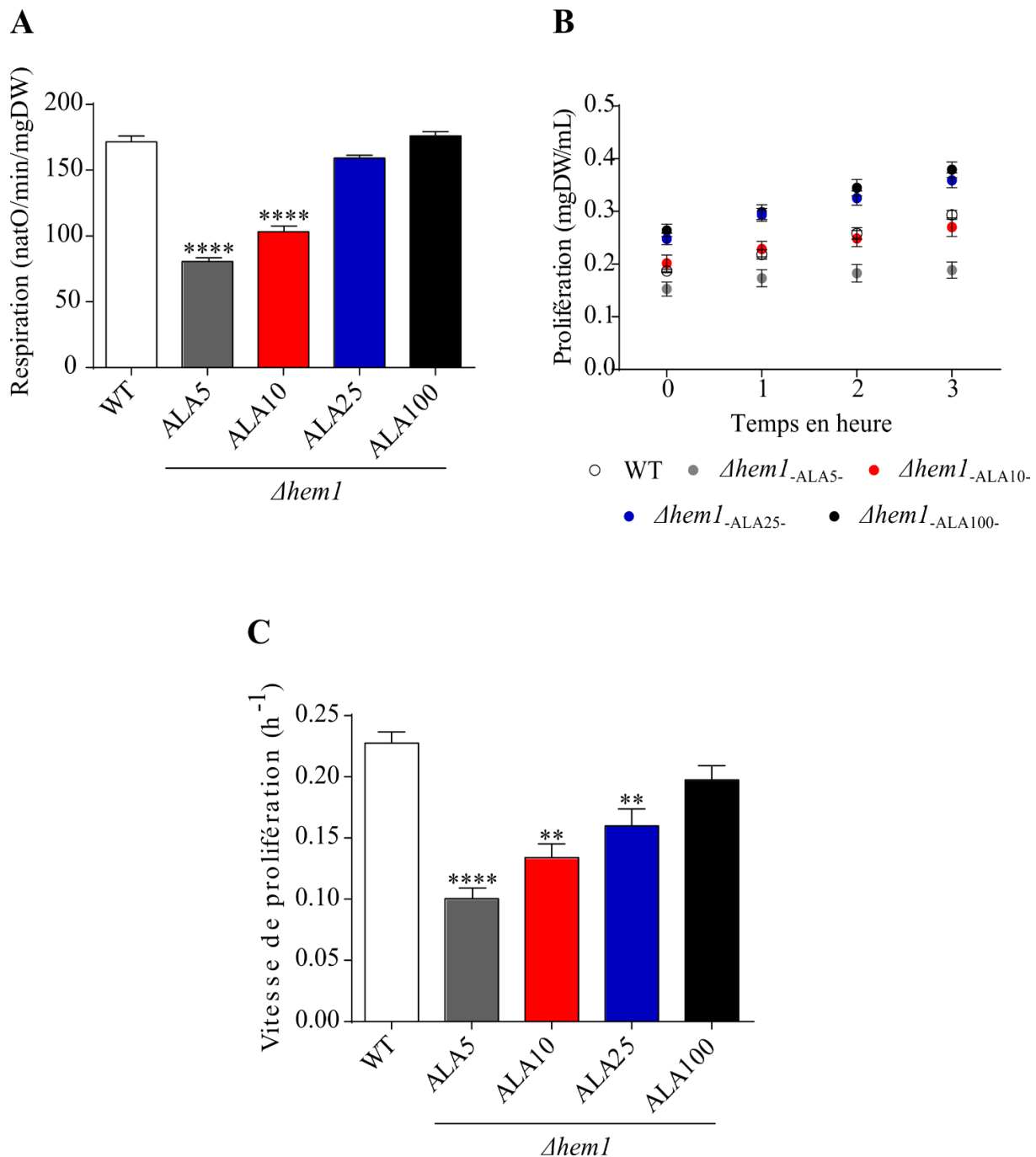


Figure 20. Effet de l'ajout d'ALA sur la prolifération et la respiration

L'ensemble des expériences est effectué sur 3 heures afin que les données soient toujours obtenues sur des cellules en phase exponentielle de croissance. Le milieu de culture, lactate 0,2%, des cellules $\Delta hem1$ a été supplémenté par 5 μ g/mL (ALA5), 10 μ g/mL (ALA10), 25 μ g/mL (ALA25) ou 100 μ g/mL (ALA100) d'ALA **A**. Les vitesses de respiration ont été mesurées quatre fois en 3 heures afin de s'assurer de l'état stationnaire des cellules puis moyennées afin d'obtenir une vitesse de respiration moyenne pour chaque condition. (n=10) **B**. Les courbes de prolifération sont obtenues après mesure de la DO, rapportée ici en poids secs (voir **Tableau IV**), toutes les heures durant 3 heures. (n=10) **C**. Les vitesses de prolifération sont obtenues à partir des courbes de croissance en suivant le calcul décrit ci-dessus. (n=10)

Précédemment au sein du laboratoire, il a pu être mis en évidence que dans un milieu purement respiratoire tel que celui utilisé ici, la prolifération cellulaire des levures était parfaitement proportionnelle à la vitesse de la respiration (Devin et al., 2006) (**Figure 21**). En effet, comme dit précédemment, dans ce milieu l'activité du système des OXPHOS est l'unique voie permettant la synthèse d'ATP et donc la conversion d'énergie alimentant les systèmes à l'origine de la prolifération cellulaire. En comparant les vitesses de respiration et de prolifération, il apparaît que, dans ces conditions, ces paramètres sont proportionnels entre eux, avec un coefficient de corrélation égal à $r^2 = 0,9928$ et suivant le même profil que dans l'étude citée précédemment (**Figure 21**). L'augmentation de la vitesse de prolifération suite à l'ajout d'ALA est bien due à celle de la respiration et *a fortiori* à l'augmentation de l'activité du système OXPHOS.

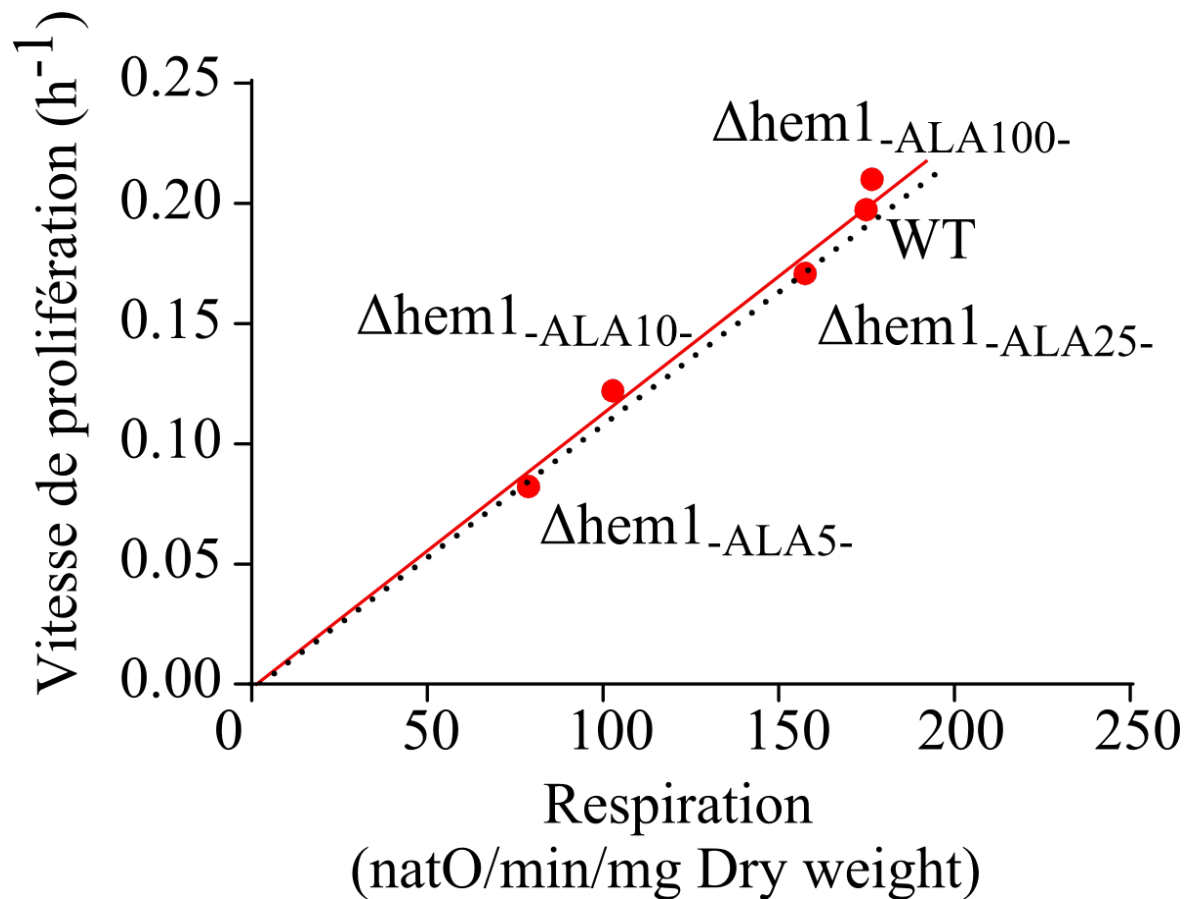


Figure 21. Relation entre la vitesse de prolifération et la vitesse de respiration en milieu non fermentescible

La courbe en pointillés noirs est issue de l'article Devin et al., 2006 montrant une relation de proportionnalité entre les vitesses de respiration et de prolifération en milieu purement respiratoire. La courbe rouge est issue des résultats de la figure précédente où chaque point représente pour une condition la relation entre les deux paramètres.

3.3.2 Modification de l'activité enzymatique mitochondriale

Ces premiers résultats ont donc pu mettre en évidence que l'activité du système des OXPHOS est régulée par l'ajout d'ALA dans le milieu et donc par l'augmentation de la quantité d'hème dans la cellule. Cette augmentation pourrait être due à deux choses, une régulation cinétique, d'une part, permettant une augmentation ou une diminution du flux de synthèse d'ATP en réponse à la modulation de la demande d'ATP. D'autre part, une régulation de la « quantité » de mitochondries au sein de la cellule (définie ici comme le nombre d'unités de la chaîne respiratoire mitochondriale) peut être à l'origine de cette augmentation. Ces deux hypothèses ont été discriminées. Dans un premier temps, j'ai étudié l'activité de deux enzymes, une membranaire et appartenant au système des OXPHOS, la COX, et la seconde matricielle et faisant partie du cycle de Krebs, la citrate synthase (CS) (**Figure 22**). En ce qui concerne la

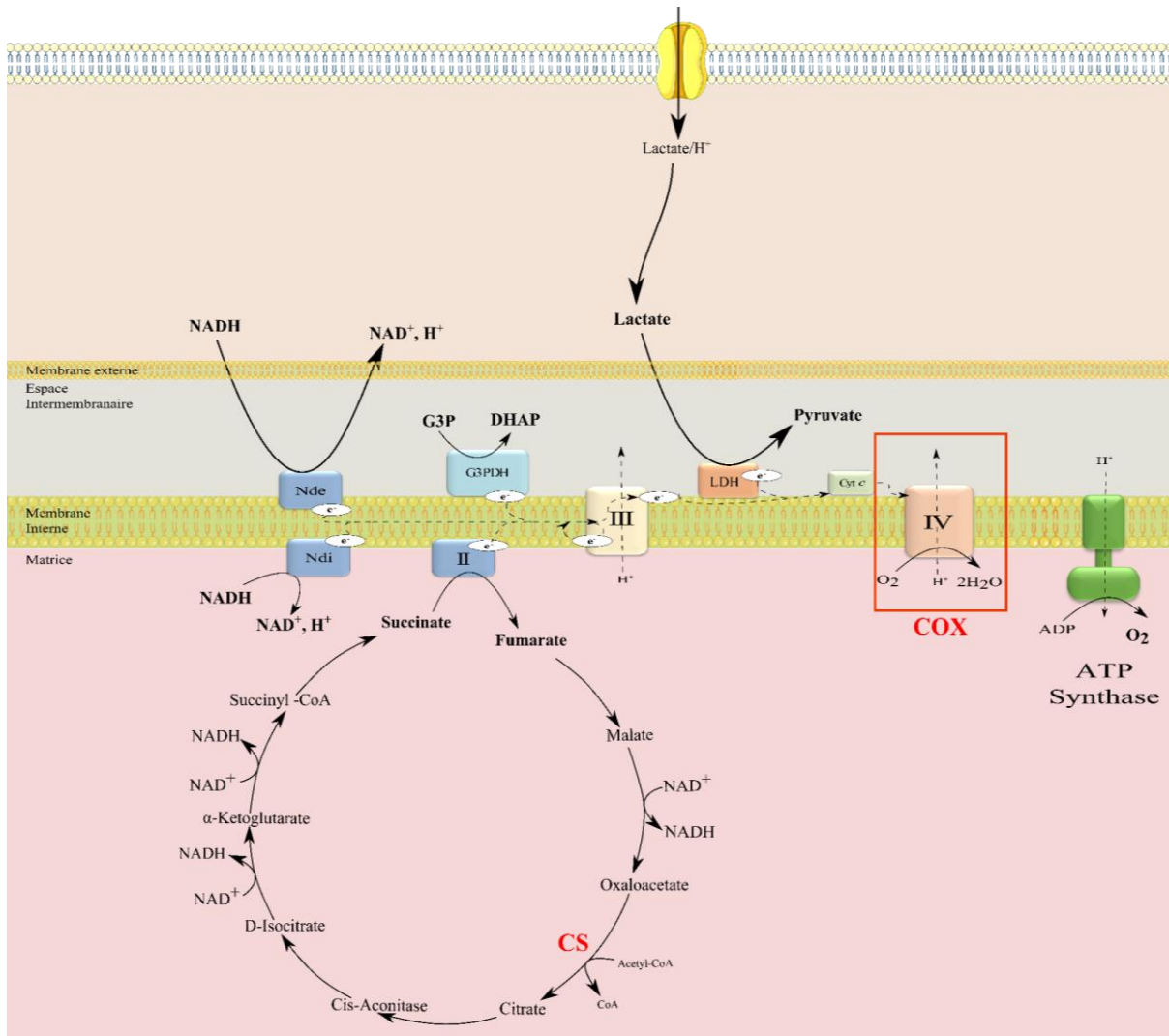


Figure 22. Illustration du système des OXPHOS et du cycle de Krebs

Nde : NADH déshydrogénase externe ; Ndi : NADH déshydrogénase interne ; II : Succinate déshydrogénase ; G3PDH : glycérol-3-phosphate déshydrogénase ; III : Cytochrome c réductase ; LDH : Lactate déshydrogénase ; Cyt c : Cytochrome c ; IV : Cytochrome c Oxydase (COX) ; CS : Citrate synthase.

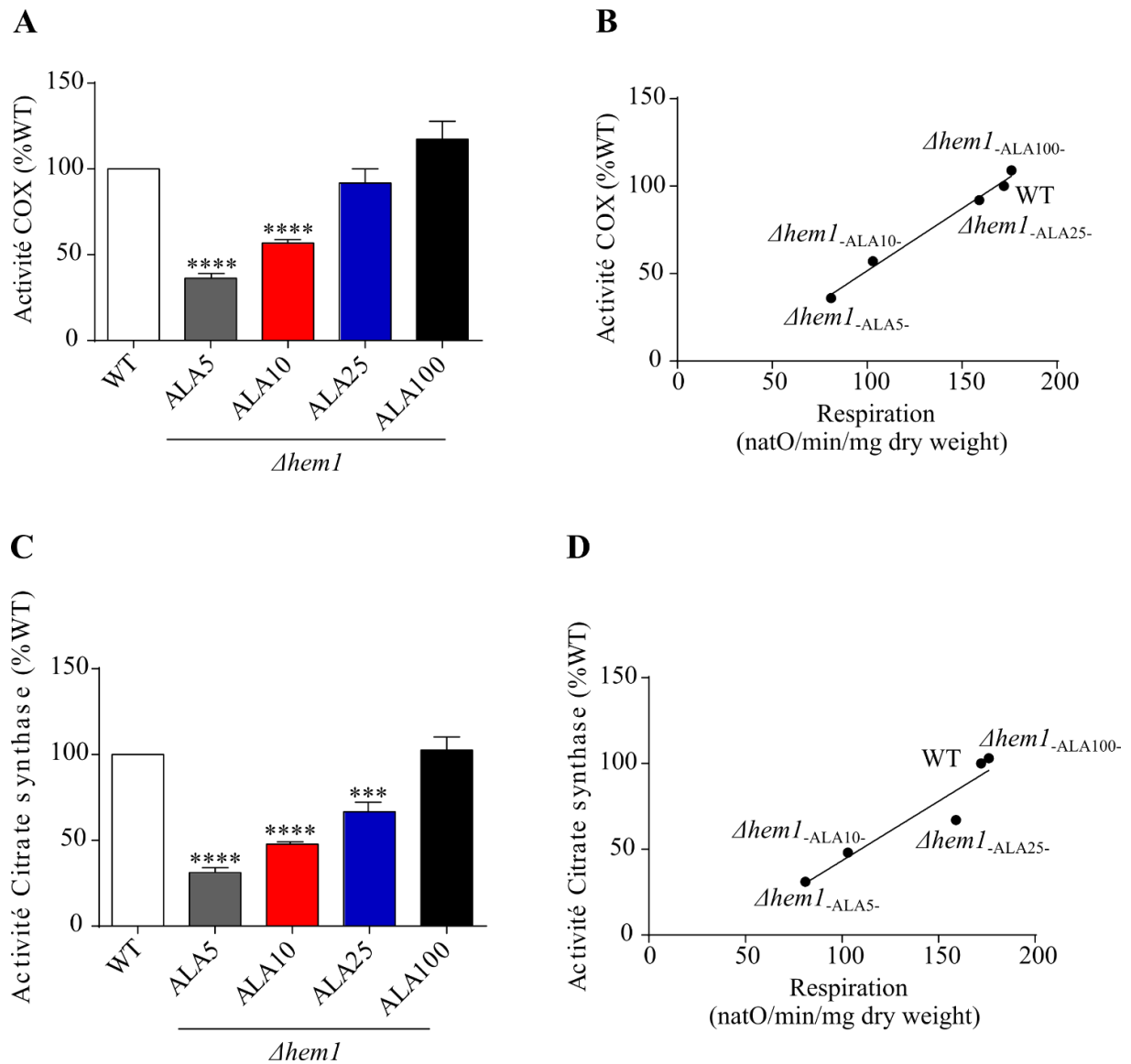


Figure 23. Effet de l'ajout d'ALA sur l'activité enzymatique mitochondriale

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 0,2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **A.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du WT pour chaque condition. (n=7) **B.** La courbe représente la relation entre les activités présentées en A et les vitesses de respiration présentées précédemment pour chaque condition (**Figure 20**). **C.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du WT pour chaque condition. (n=7) **D.** La courbe représente la relation entre les activités présentées en C et les vitesses de respiration présentées précédemment pour chaque condition (**Figure 20**).

COX, cette enzyme faisant partie du système des OXPHOS, il semble attendu que son activité soit également régulée par l'ajout d'ALA, au vu de mes premiers résultats. Dans un premier temps, j'ai donc étudié les conséquences d'un ajout croissant d'ALA sur l'activité de cette enzyme. La **Figure 23A** montre comme attendu une augmentation de l'activité de la COX via l'ajout d'ALA dans le milieu, semblable à celle obtenue pour la vitesse de respiration. En effet, la **Figure 23B** montre notamment que cette titration est proportionnelle à celle de la respiration, avec un coefficient de corrélation égale à $r^2 = 0,9905$. La citrate synthase, quant à elle, est une enzyme matricielle qui est très souvent utilisée comme un marqueur de la quantité de

mitochondries au sein des cellules (Mogensen et al., 2006; Rabøl et al., 2009; Larsen et al., 2012). Son activité est également diminuée de 70% par rapport aux cellules WT dans les cellules *Δhem1* supplémentées avec une faible concentration d'ALA (ALA5). De la même façon que pour la COX, l'augmentation de l'ajout d'ALA induit une augmentation de l'activité de cette enzyme jusqu'à obtenir une activité semblable à celle observable dans les cellules WT (**Figure 23C**). De plus, la **Figure 23D**, qui compare l'augmentation de l'activité de la CS à celle de la respiration, montre que ces deux fonctions sont proportionnelles entre elles avec un coefficient de corrélation de $r^2 = 0,9004$. Cependant, chez *S. cerevisiae*, il existe une citrate synthase extra-mitochondriale, située au niveau du peroxyosome (Rickey and Lewin, 1986; Lewin et al., 1990; Van Rossum et al., 2016). Ainsi, les résultats obtenus laissent à penser que la CS extra-mitochondriale n'est pas régulée dans ce contexte et que seule l'activité de la citrate synthase matricielle est augmentée par l'ajout d'ALA.

Ces résultats mettent en évidence le fait que l'ajout croissant d'ALA induit une augmentation de l'activité des enzymes mitochondriales mesurées tant au niveau membranaire que matriciel. De plus, les activités des deux enzymes étudiées sont proportionnelles à la vitesse de respiration, si cela semble attendu pour l'activité de la COX, en ce qui concerne la CS, ce résultat est plus surprenant. En effet, bien que le cycle de Krebs participe à fournir à la chaîne respiratoire des métabolites, la levure *S. cerevisiae* possède une NADH déshydrogénase externe permettant la réoxydation du NADH cytosolique indépendante donc des métabolites issus du cycle de Krebs (**Figure 22**). Il semble envisageable que ce ne soient pas seulement les activités mitochondriales qui augmentent avec la synthèse d'hème mais bien la quantité d'enzymes mitochondriales dans leur ensemble voire la quantité de mitochondries globale dans la cellule.

3.3.3 Modification de la quantité de mitochondries au sein des cellules

Afin de déterminer si la quantité de mitochondries était modifiée en fonction de la concentration d'ALA ajouté au milieu de culture, j'ai procédé de quatre façons différentes. En effet, la quantification des mitochondries est un sujet d'étude dans lequel le critère quantifiable est débattu, l'activité citrate synthase a été, par exemple, déjà citée. Les mitochondries ne sont pas des organites indépendants les uns des autres au sein du cytosol mais bel et bien un réseau dynamique et communiquant en permanence (Mcbride and Neuspiel, 2006; Cervený et al., 2007; Hoppins et al., 2007). Pour cette raison, j'ai utilisé plusieurs méthodes couramment publiées afin de renforcer cette conclusion : la quantification des cytochromes de la chaîne respiratoire, la quantification relative de la Porine, une protéine membranaire de la mitochondrie souvent utilisée pour le marquage mitochondrial en microscopie à fluorescence,

l'évaluation de l'état stationnaire de la respiration endogène et l'observation des mitochondries par différentes techniques de microscopie. Dans ce travail, une augmentation de la quantité de mitochondries au sein des cellules sera définie par une augmentation des unités de chaîne respiratoire.

La première méthode, la quantification des cytochromes mitochondriaux, permet de quantifier deux complexes de la chaîne respiratoire. En effet, ces cytochromes composent les complexes III et IV ainsi que le cytochrome c (**Figure 24A**) et en l'absence de ceux-ci, il ne peut y avoir d'activité de la chaîne. L'hypothèse est alors que si la quantité de chaînes respiratoires augmente alors la quantité de mitochondries augmente de la même manière. La **Figure 24B** montre que la quantité des cytochromes augmente par l'ajout d'ALA. De plus et de façon surprenante, ces résultats ont permis de mettre en évidence une différence de ratio b/cc1 entre les cytochromes des cellules WT et *Δhem1*. En effet, à 100μg/mL d'ALA, alors que leurs vitesses de respiration sont du même ordre, les cellules *Δhem1* présentent 40% de cytochromes cc1 en moins par rapport aux cellules WT. De même, le ratio (b/cc1) dans les cellules WT est d'environ 1/2, ce qui n'est pas le cas dans les cellules *Δhem1*. Il semblerait alors que, les cytochromes b et c1 ayant une stœchiométrie fixe, il y ait une différence de la quantité de cytochrome c entre les cellules WT et les cellules *Δhem1*. La quantité de cytochrome c a donc été calculée à partir des quantifications de la **Figure 24B**, le complexe III étant composé d'un cytochrome c et de deux cytochromes b (Eisenbach and Gutman, 1976; Yu et al., 1977). Il apparaît alors que la quantité de cytochrome c augmente dans la souche mutée suite à l'ajout de l'ALA mais également que même à la plus forte concentration cette quantité reste presque 40% plus faible que dans les cellules WT (**Figure 24C**). La quantité et donc la disponibilité du cytochrome c à recevoir les électrons arrivant du complexe III peut jouer sur l'activité de ce complexe. La **Figure 24D** montre qu'à faible concentration d'ALA ce ratio est nettement augmenté et donc que la proportion de b est plus importante que celle du cytochrome c, ce qui pourrait être à l'origine d'une diminution de l'activité du complexe III au sein de la chaîne respiratoire dans ces conditions. Finalement, malgré ces différences de phénotypes entre les deux souches, il semble clair que l'ajout croissant d'ALA dans le milieu induit une augmentation de la quantité de cytochromes au sein des cellules.

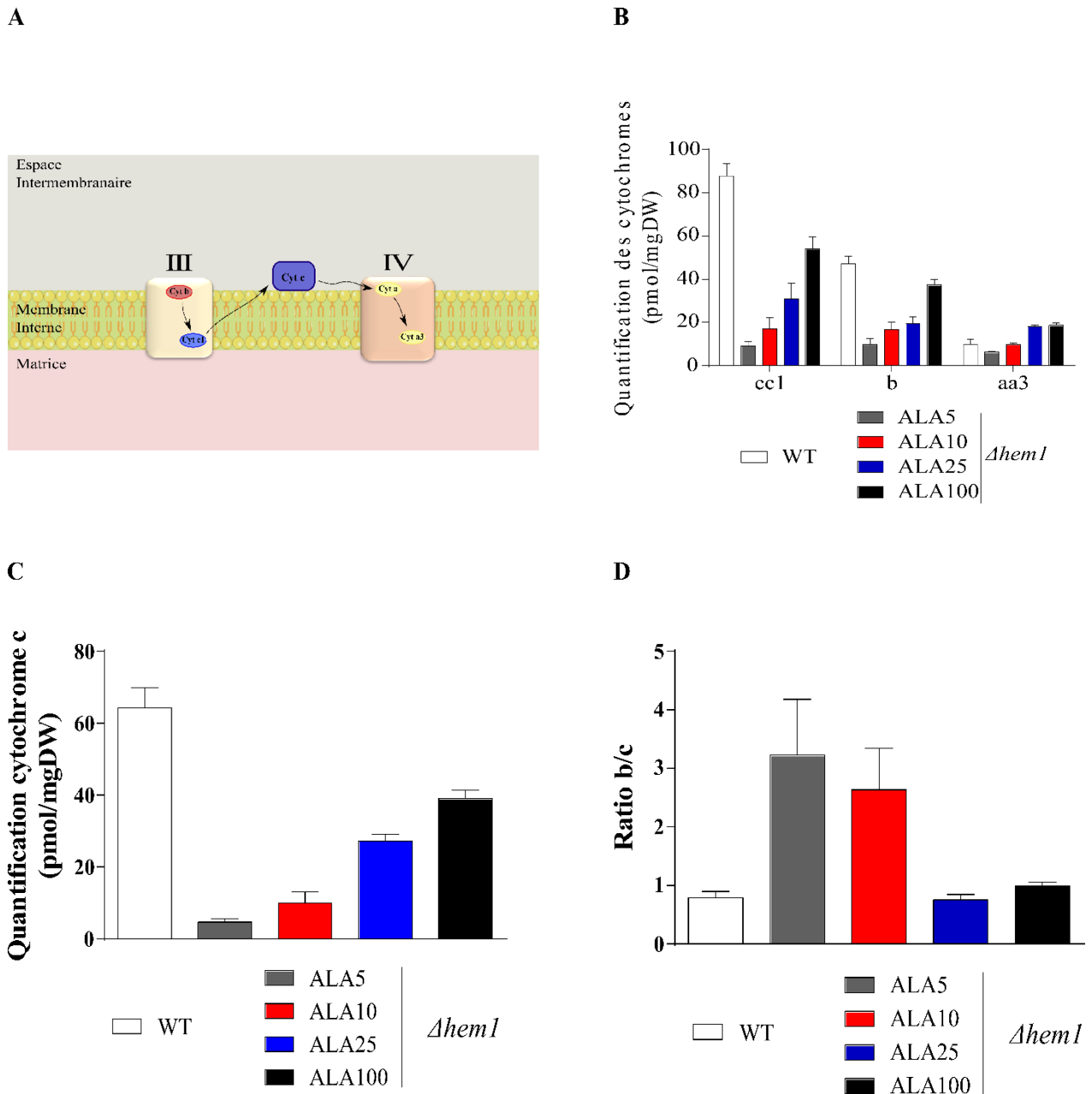


Figure 24. Effet de l'ajout de l'ALA sur la quantité de cytochromes mitochondriaux

A. Illustration de l'emplacement des différents cytochromes quantifiés dans les complexes de la chaîne respiratoire. Cyt : Cytochrome ; III : Cytochrome c réductase ; IV : Cytochromes c oxydase. **B.** Quantification des cytochromes par spectrophotométrie à double faisceau sur des cellules cultivées en lactate 0,2% et supplémentées de la même manière que précédemment. Les cytochromes c et c1 sont quantifiés par le même pic et ne sont donc pas individualisés, de même pour les cytochromes a et a3. (n=5) **C.** Quantification du cytochrome c à partir des mesures présentées en B (n=5) **D.** Ratio des cytochromes b par rapport aux cytochromes c, à partir des résultats présentés en B et en C (n=5)

Dans un deuxième temps, une quantification relative de la porine a été réalisée. Cette protéine est localisée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie et permet la formation de pores permettant la diffusion de molécules au travers de cette membrane. Cette protéine est très souvent utilisée comme marqueur mitochondrial. Ici, j'ai réalisé une immunodétection de cette protéine *via* la méthode du Western Blot. En effet, si la quantification des cytochromes est souvent utilisée, elle est ici « biaisée » par le fait que les cytochromes en tant qu'hémaprotéines sont dépendants de la quantité d'hème disponible et donc peuvent être dépendant de l'ajout croissant d'ALA. Ainsi une variation de la quantité de porine renforcerait la conclusion selon laquelle l'augmentation de la synthèse d'hème induit une augmentation de

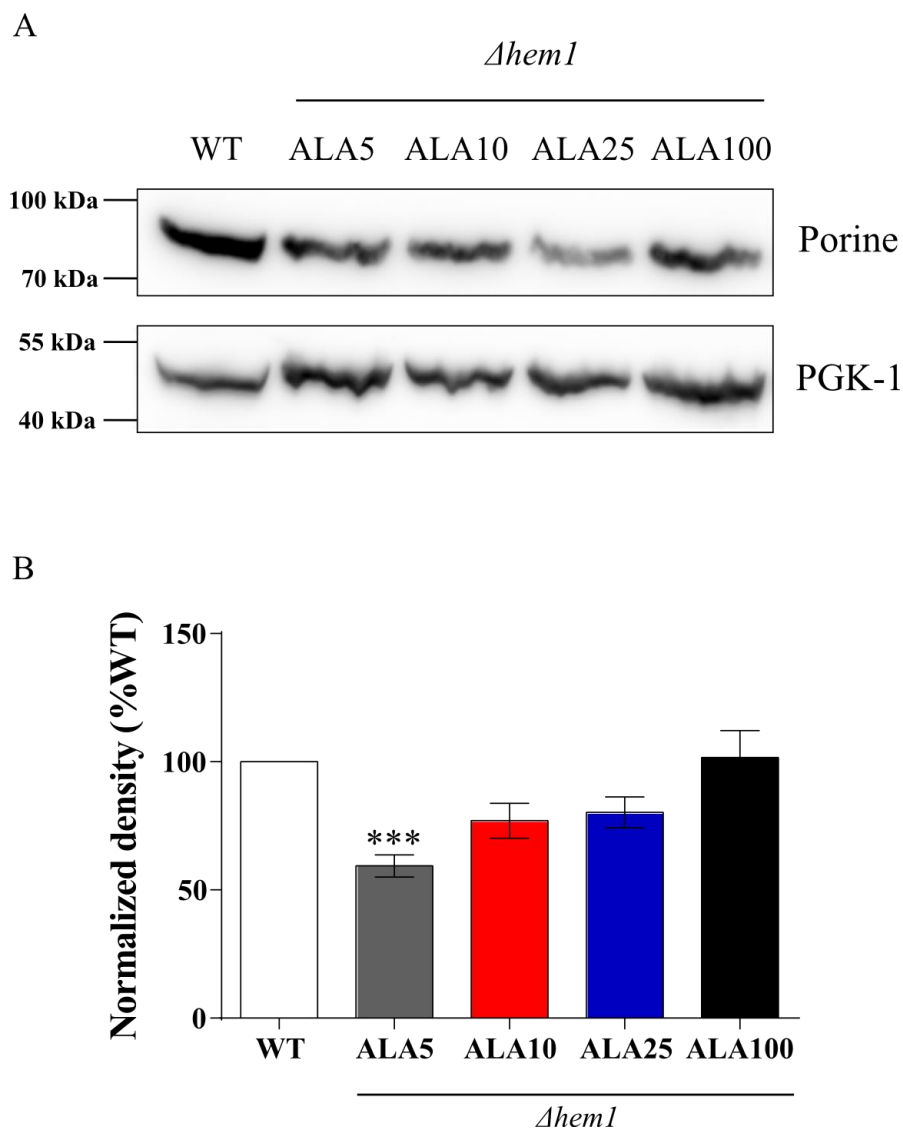


Figure 25. Effet de l'ajout de l'ALA sur la quantité relative de la porine

A. La quantité relative de la Porine est mise en évidence par western-blot effectué sur des extraits totaux de cellules prélevées à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre la Porine. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de la Porine est déterminé dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du WT. (n=7)

l'ensemble du contenu des mitochondries et donc de la quantité de mitochondries au sein des cellules. Les résultats montrent une augmentation de la porine en fonction de la concentration d'ALA dans le milieu de culture, bien que cette diminution soit moins importante que celle observée pour les cytochromes (**Figure 25**). Une augmentation de la porine étant totalement indépendante de la participation de l'hème à la formation des hémoprotéines, il semblerait que ce ne soit pas seulement les protéines entrant dans les voies métaboliques énergétiques qui

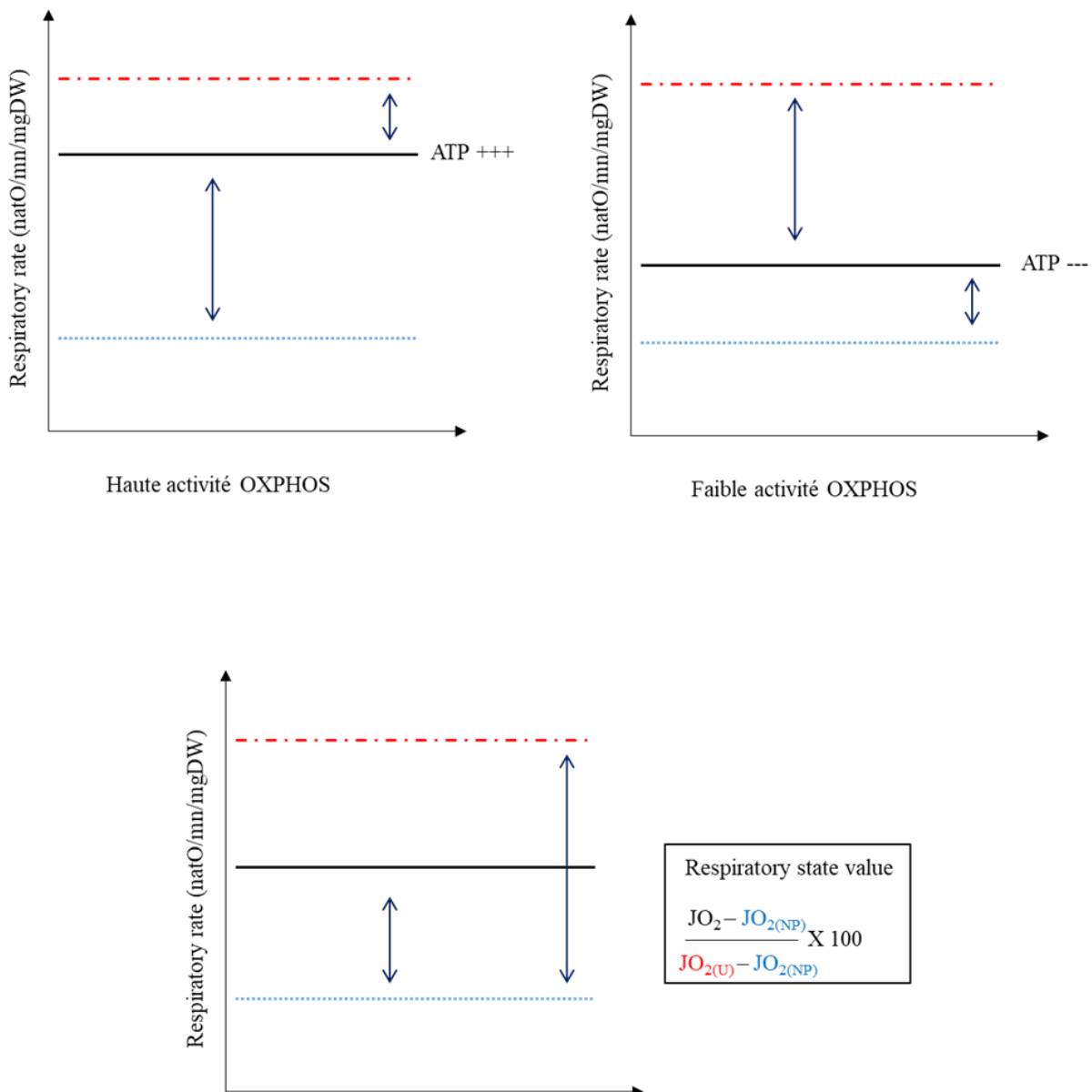


Figure 26. Illustration des changements de la RSV

La « respiratory state value » est un rapport dans lequel, la respiration endogène est comparée à la respiration non phosphorylante, considérée comme minimale, ici en pointillés bleus, et la respiration découplée, considérée comme maximale, ici en pointillés rouges. Il est admis que si la respiration endogène est très proche de celle à l'état découplé, la synthèse d'ATP est optimale. À l'inverse, si cette respiration endogène est proche de la respiration non phosphorylante, alors la chaîne respiratoire est freinée cinétiquement et cela induit une diminution de l'activité de l'ATP synthase. Ce rapport est calculé comme décrit dans la figure.

soient régulées mais bien tout le matériel mitochondrial qui augmente. Cela renforce l'hypothèse d'un rôle de l'hème dans ce processus.

J'ai ensuite voulu déterminer si l'activité des OXPHOS de chaque condition était comparable. En effet, mon hypothèse était que les augmentations de la vitesse de respiration et des activités enzymatiques mesurées suite à l'ajout de l'ALA n'étaient pas dues à une augmentation de l'activité mitochondriale mais bien à celle de la quantité de mitochondries. Pour cela, une évaluation de la vitesse de fonctionnement minimale et maximale de la chaîne respiratoire des cellules a été réalisée. 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 « respiratory state value » (RSV) (Yoboue et al., 2012) (**Figure 26**). Le flux respiratoire minimal (respiration non phosphorylante) et maximal (respiration découplée) ont été déterminés par l'utilisation respective de TEE et CCCP. La **Figure 27A** montre que chacun des trois états de la respiration, endogène, non phosphorylant et découplée, augmente progressivement lorsque la concentration d'ALA introduite dans le milieu augmente, jusqu'à obtenir des résultats similaires aux respirations mesurées dans les cellules WT. La détermination du RSV montre que l'activité des OXPHOS ne subit aucun changement d'état stationnaire (**Figure 27B**). En effet, on remarque que ce rapport est quasiment identique entre chaque condition. Ainsi, il apparaît que l'activité et les capacités du système des OXPHOS ne

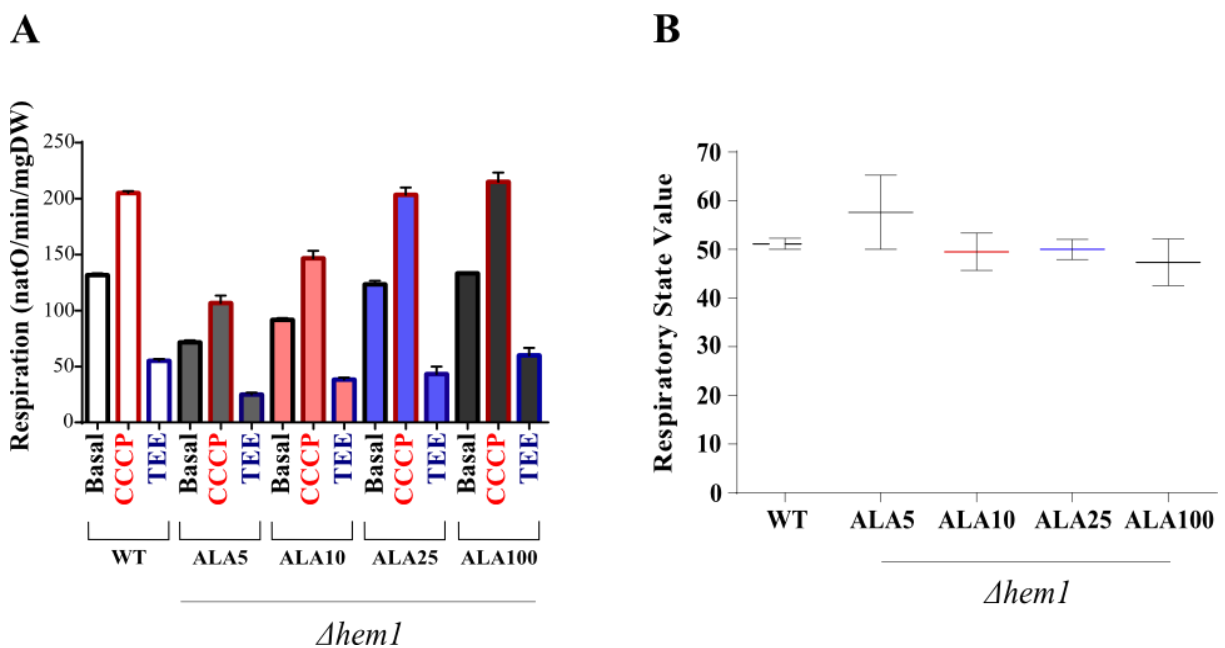


Figure 27. Effet de l'ajout d'ALA sur le RSV

Effectuée sur des cellules cultivées en milieu de culture, lactate 0,2%, supplémenté de la même façon que précédemment. **A.** Pour chaque condition, la respiration endogène (basal), découplée (CCCP) et non phosphorylante (TEE) est représentée. (n=3) **B.** Le RSV représenté pour chaque condition a été calculé à partir des données des vitesses de respiration présentées en **A.**

subit aucune modification. Il semble donc que les résultats obtenus précédemment soient dus à une augmentation de la quantité de mitochondrie.

Finalement, le pool mitochondrial a été étudié par deux techniques de microscopie. Dans un premier temps, par microscopie électronique l'évolution du diamètre des mitochondries suite à l'ajout d'ALA dans le milieu a été observée. Sur la **Figure 28A**, des coupes transversales de cellules représentatives de chaque condition sont visibles. L'ultrastructure des cellules délétées pour Hem1p est très proche de la condition WT, en revanche une augmentation du diamètre des mitochondries en fonction de la quantité d'ALA ajouté dans le milieu est notable. En utilisant le logiciel ImageJ, j'ai pu mesurer chaque section de mitochondries sur chaque image de cellule obtenue. La quantification est représentée **Figure 28B** et permet de mettre en évidence que le diamètre augmente effectivement en fonction de l'ALA ajouté au milieu. Ce résultat semble confirmer que les mitochondries n'ont pas subi de modifications structurelles qui pourraient induire une modification de leur activité mais qu'elles ont pu subir une augmentation de volume, due à une augmentation du matériel matriciel par exemple ainsi qu'une augmentation du matériel membranaire. En effet, sur les coupes, il n'a pas été possible d'observer une modulation du nombre de crêtes dans les différentes conditions, il est donc possible d'imaginer que dans cette situation, une augmentation du diamètre est un paramètre permettant la régulation du volume du compartiment.

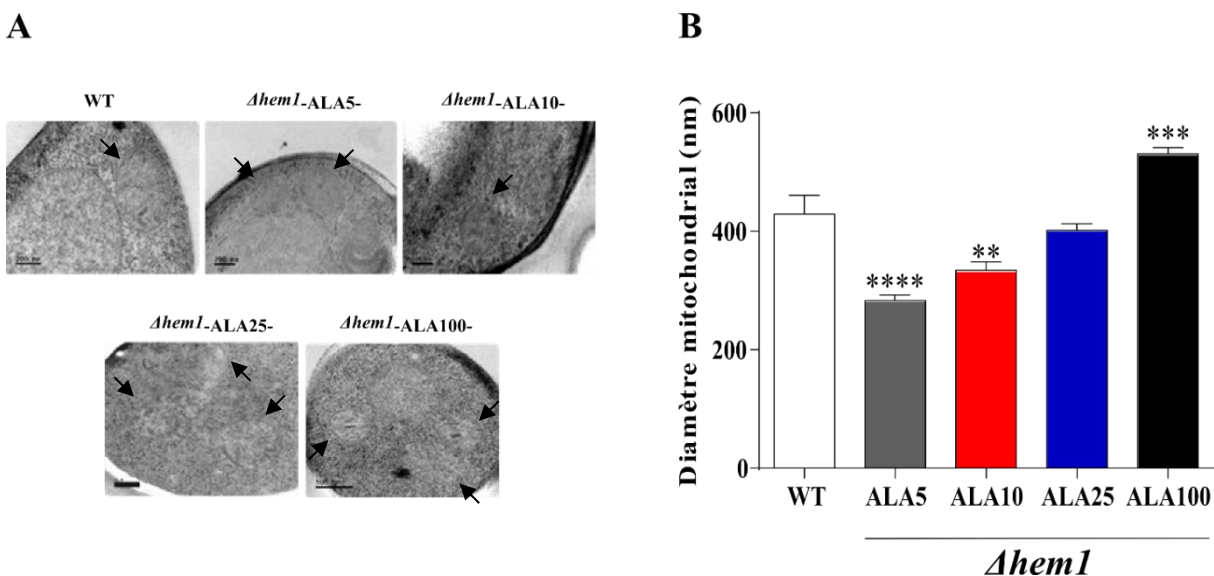


Figure 28. Effet de l'ajout d'ALA sur le diamètre mitochondrial

A. Observation au microscope électronique de l'ultrastructure des cellules pour chaque condition. Les mitochondries sont indiquées par des flèches. Chaque image est représentative de ce qui a été observé sur l'ensemble des sections de sa condition. Environ quinze images ont été prises par condition. **B.** À partir de l'ensemble des images obtenues par microscopie électronique, le diamètre des mitochondries visibles a été mesuré à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont une moyenne de toutes les sections mesurées pour chaque condition soit minimum dix-huit sections.

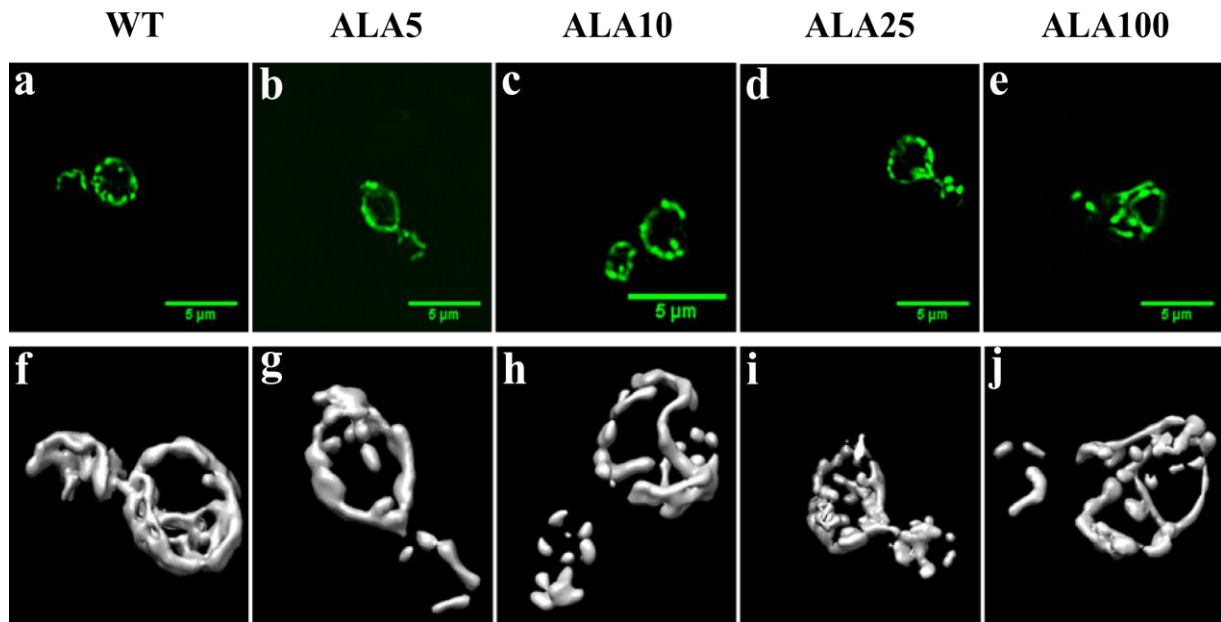
Δ hem1

Figure 29. Effet de l'ajout d'ALA sur la morphologie du réseau mitochondrial

De **a** à **e**, sont représentées les déconvolutions obtenues par microscopie à épifluorescence. Pour chaque condition, l'image représentée est représentative de ce qui a pu être observé sur l'ensemble des images récupérées. Au moins neuf images comprenant au moins trois cellules ont été analysées pour chaque condition. De **f** à **j**, sont montrées les représentations 3D, obtenues avec le logiciel Chimera, des déconvolutions présentes au-dessus.

Enfin, j'ai tenté d'observer le réseau mitochondrial par microscopie épifluorescente (**Figure 29**). Contrairement à ce qui était attendu, pour chacune des conditions, le réseau est bien différencié et est comparable au réseau observé dans les cellules WT. Cela peut s'expliquer soit par le fait que dans ces conditions la structure du réseau n'est régulée, soit par le fait que la résolution du microscope utilisé ne soit pas assez bonne pour observer une quelconque différence entre les réseaux des différentes cellules traitées.

Cependant, l'ensemble des résultats obtenus, (1) une augmentation de la vitesse de prolifération associée à une augmentation de la respiration, (2) une augmentation de l'activité enzymatique mitochondriale membranaire et matricielle proportionnelle à la vitesse de respiration, (3) une augmentation de la quantité de cytochromes au sein des cellules, (4) une augmentation de la quantité relative d'une protéine marqueur de la membrane externe des mitochondries, (5) un état stationnaire constant du système des OXPHOS et (6) une augmentation du diamètre des mitochondries, en présence d'une concentration croissante d'ALA ajouté au milieu, confirme l'hypothèse énoncée précédemment : l'augmentation de la quantité d'hème est à l'origine d'une augmentation de la quantité de mitochondries. Cette augmentation passe par une augmentation de tout le matériel mitochondrial et pas uniquement

des hémoprotéines, ainsi ces résultats corrélerent avec l'hypothèse dans laquelle l'hème ait un rôle à jouer dans la régulation de la biogenèse mitochondriale.

3.4 Le rôle de l'hème sur la biogenèse mitochondriale *via* le complexe HAP

L'augmentation de la quantité de mitochondries et avec lui de tout le contenu mitochondrial peut avoir deux origines : une augmentation de la biogenèse mitochondriale ou une diminution de la dégradation des mitochondries. Dans notre laboratoire, il a été précédemment montré que la dégradation mitochondriale n'était pas active dans un milieu tel que celui utilisé, c'est-à-dire purement respiratoire (Yoboue et al., 2014). Ainsi, une éventuelle régulation de la biogenèse mitochondriale a été étudiée.

Comme décrit précédemment, le complexe HAP est, chez la levure *S. cerevisiae*, l'acteur principal de cette biogénèse. Ainsi, si l'hème a un rôle dans la régulation de ce mécanisme, il est probable que cela passe par une régulation de ce complexe protéique et notamment par son régulateur Hap4p. Une étude de l'activité du complexe HAP a donc été réalisée afin de déterminer si la biogenèse mitochondriale était modifiée en fonction de l'ajout des différentes concentrations d'ALA dans le milieu.

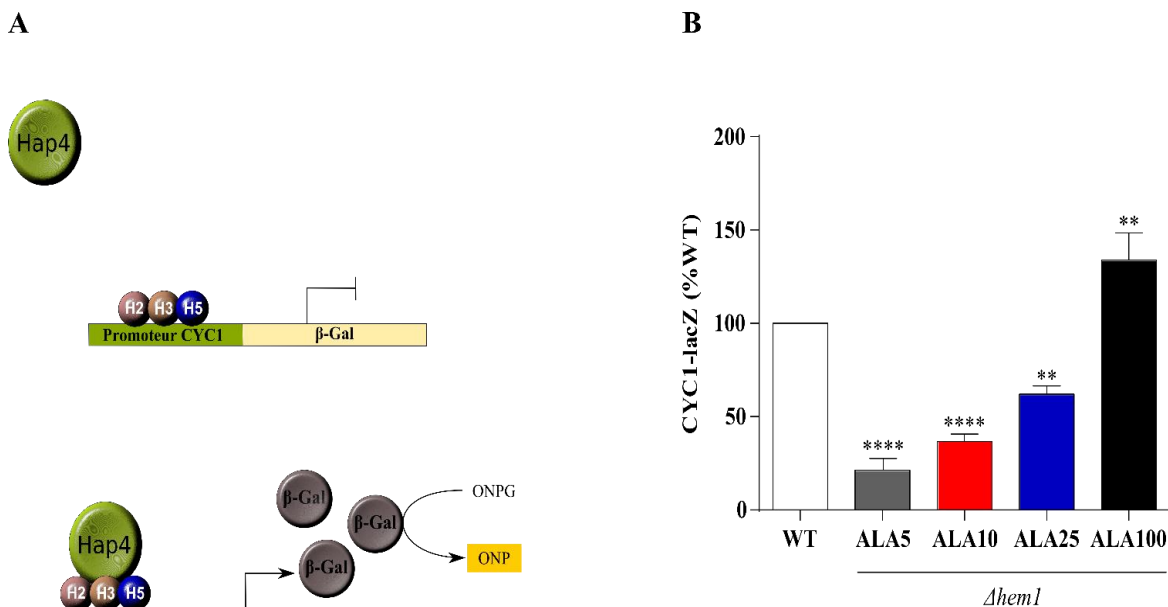


Figure 30. Effet de l'ajout d'ALA sur l'activité du complexe HAP

Effectuée sur des cellules cultivées en milieu de culture, lactate 0,2%, supplémenté de la même façon que précédemment. **A.** Illustration de l'action du complexe HAP sur le promoteur du gène *CYC1*. **B.** L'activité β -gal a été mesurée sur 1UDO et exprimée en pourcentage du WT. (n=5)

3.4.1 Régulation de l'activité du complexe HAP dans les cellules

Dans un premier temps, cette étude s'est concentrée sur l'activité du complexe. Il est connu pour avoir une fonction de facteur de transcription pour la plupart des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales chez *S. cerevisiae* tel que le gène *CYCI*, gène codant pour le cytochrome c. Pour étudier l'activité de ce complexe, l'activité du promoteur de son gène cible *CYCI* a donc été mesurée. Le niveau d'expression du gène dans les cellules révèle l'activité de ses facteurs de transcription. Pour suivre cette expression, j'ai eu recours à la méthode du gène rapporteur associant le promoteur du gène cible activé par le complexe HAP à la β -Gal (**Figure 30A**). Les résultats de la **Figure 30B** montrent qu'une augmentation de la concentration d'ALA ajouté au milieu induit une augmentation de l'activité du promoteur *CYCI* et donc de l'expression du gène. Cela montre que la transcription de *CYCI* augmente et donc que l'activité du complexe HAP aussi. Ainsi, l'augmentation de la quantité d'hème dans les cellules induit une augmentation de l'activité de HAP (**Figure 30A**).

3.4.2 Régulation de la quantité d'Hap4p dans la cellule

La protéine Hap4p est la sous-unité régulatrice du complexe HAP, c'est-à-dire que lorsqu'il s'associe aux autres membres du complexe, présents sur les promoteurs des gènes cibles, le complexe est activé (**Figure 30A**) (Forsburg and Guarente, 1989; Buschlen et al., 2003; McNabb and Pinto, 2005). Sa régulation est donc à l'origine de la régulation du complexe et son turn-over est très rapide, environ 7 minutes (Yoboue et al., 2012). Précédemment, il a pu être mis en évidence que lorsque la biogenèse mitochondriale était régulée, la quantité de Hap4p variait également. En effet, les études du laboratoire ont permis de mettre en évidence qu'une augmentation du stress oxydant induisait une diminution de la quantité de mitochondries mais aussi de l'activité du complexe HAP (Chevtzoff et al., 2010). De plus, une augmentation de l'ajout d'AMPc, induit une augmentation du contenu cellulaire en mitochondrie et de la quantité relative de Hap4p (Yoboue et al., 2012). Une étude de la quantité de Hap4p dans ces conditions a donc été effectuée. L'hypothèse est que la régulation de l'activité du complexe HAP observée serait induite par une régulation de Hap4p.

La quantité relative de Hap4p a donc été mesurée par immunodétection (**Figure 31A**) puis quantifiée : à faible concentration d'ALA, Hap4p est très faiblement détectée, moins de 25% de la quantité présente dans les cellules WT, cependant en augmentant la concentration d'ALA ajouté au milieu de culture, la quantité de cette protéine augmente notablement jusqu'à revenir à des quantités identiques voire supérieures à celle obtenue dans les cellules sauvages (**Figure 31B**). Cela confirme donc une influence de la quantité d'hème sur la quantité d'Hap4p dans les cellules.

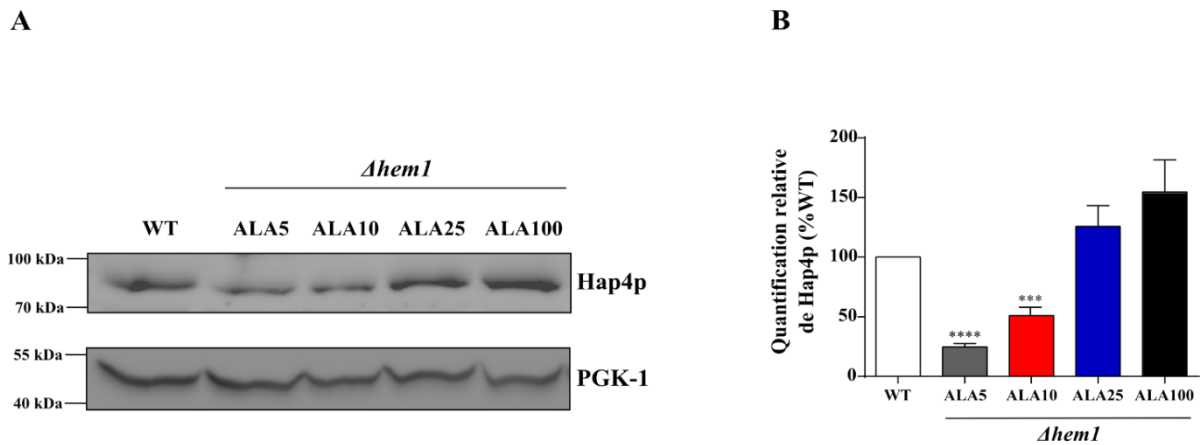


Figure 31. Effet de l'ajout d'ALA sur la quantité d'Hap4p

A. La quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du WT. (n=8)

Si l'hème permet une modulation de la quantité de cette protéine, cette régulation se fait soit par interaction directe, soit de façon indirecte par une régulation de sa voie de synthèse ou de dégradation par exemple. Dans ce cas, une surexpression de la protéine permettrait, même à faible quantité d'hème présent dans la cellule, un retour au phénotype WT. Afin de tester cette hypothèse, j'ai réalisé une transformation des cellules *Δhem1* en y intégrant un plasmide surexprimant Hap4p. Le milieu de ces cellules a ensuite été supplémenté à une faible concentration d'ALA, 5μg/mL. Dans ces conditions, les vitesses de respiration et de prolifération augmentent significativement par rapport à celles mesurées dans les simples mutants en présence de la même concentration d'ALA et tendent à se rapprocher des mesures obtenues dans les cellules WT (**Figure 32A et B**). Il est à noter qu'une précédente étude du laboratoire avait permis de montrer que la surexpression de Hap4p dans le WT entraînait une légère augmentation de la vitesse de respiration non significativement différente de la vitesse de respiration endogène (**Figure 32C**) (Chevtzoff et al., 2010). Ainsi en maintenant le pool d'Hap4p assez haut, et donc en maintenant la biogenèse mitochondriale, il est possible de réverser en partie le phénotype dû à la faible concentration d'hème dans la cellule. Cela suggère que la régulation d'Hap4p et donc de la biogenèse mitochondriale est à l'origine du phénotype observé précédemment (augmentation de la prolifération, de la vitesse de respiration et augmentation de l'activité du complexe HAP). De plus, le fait que la surexpression de Hap4p suffise pour augmenter la vitesse de respiration montre que l'ajout d'une faible concentration d'ALA n'est pas limitant pour la synthèse des cytochromes impliqués dans la formation

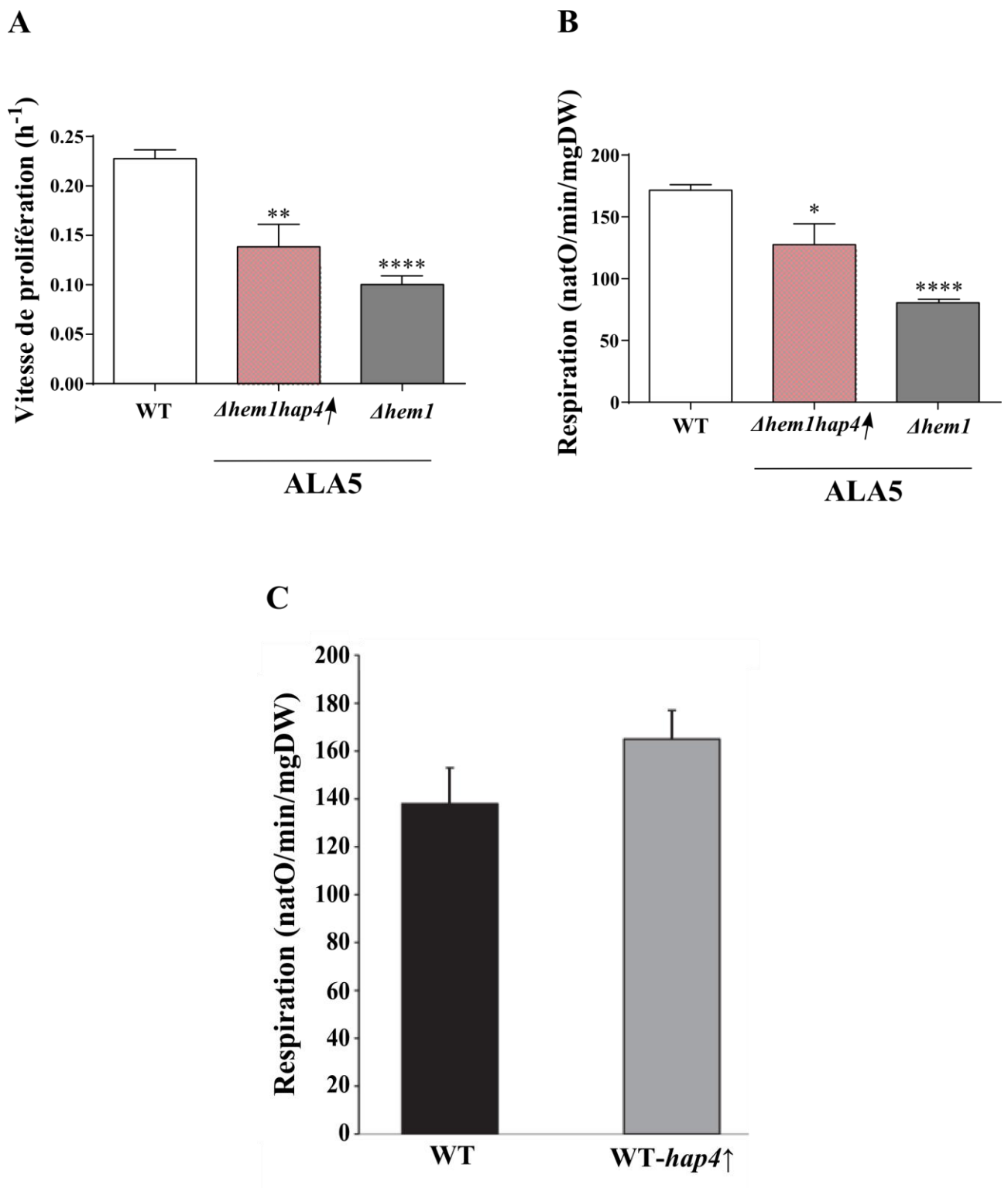


Figure 32. Effet de la surexpression de Hap4p en présence d'une faible concentration d'ALA ajouté sur la prolifération et la respiration

L'ensemble des expériences est effectué sur 3 heures afin que les données soient toujours obtenues sur des cellules en phase exponentielle de croissance. **A.** Les vitesses de prolifération sont obtenues à partir de courbes de croissance réalisées en parallèle. Ces courbes de prolifération sont obtenues après mesure de la DO, rapportée ici en poids secs (voir **Tableau IV**), toutes les heures durant 3 heures. Les vitesses de prolifération sont calculées en suivant le calcul décrit dans la partie **3.3.1**. (n=3) **B.** Les vitesses de respiration ont été mesurées quatre fois en 3 heures afin de s'assurer de l'état stationnaire des cellules puis moyennées afin d'obtenir une vitesse de respiration moyenne pour chaque condition. (n=3) **C.** Figure issue des résultats publiés par Chevtzoff et al., 2010. Comparaison de la vitesse de respiration WT en présence ou en absence de la surexpression du gène codant pour Hap4p.

d'unités de chaîne respiratoire fonctionnelle. Les résultats obtenus restent plus faibles que ceux obtenus dans les cellules WT, la surexpression n'est donc pas suffisante pour compenser la faible quantité d'hème présente dans les cellules.

L'ensemble de ces résultats confirment que l'augmentation de la quantité d'hème intracellulaire induit une augmentation de la quantité de Hap4p, sous-unité du complexe à l'origine de la biogenèse mitochondriale. De ce fait, la quantité d'hème intracellulaire semble être à l'origine d'une régulation de la biogenèse mitochondriale.

3.4.3 Indépendance de Hap1p dans la régulation du complexe

HAP

Comme mentionné précédemment, il est connu depuis longtemps que la forme labile de l'hème est à l'origine de l'activation de la protéine Hap1p (3.1.2.1). Un certain nombre d'études a d'ailleurs montré que Hap1p est l'élément à l'origine du contrôle de l'expression de plusieurs gènes codant pour des processus dépendant de l'hème et de l'oxygène (Schneider and Guarente, 1991; Zhang et al., 2017). De plus, récemment il a pu être mis en évidence que, dans certaines conditions, la protéine Hap1p était un facteur de transcription du gène *HAP4* (Zhang et al., 2017). Afin de s'assurer du lien hème/Hap4p, il était indispensable au préalable d'écarter l'éventualité d'un rôle de Hap1p sur la régulation de Hap4p.

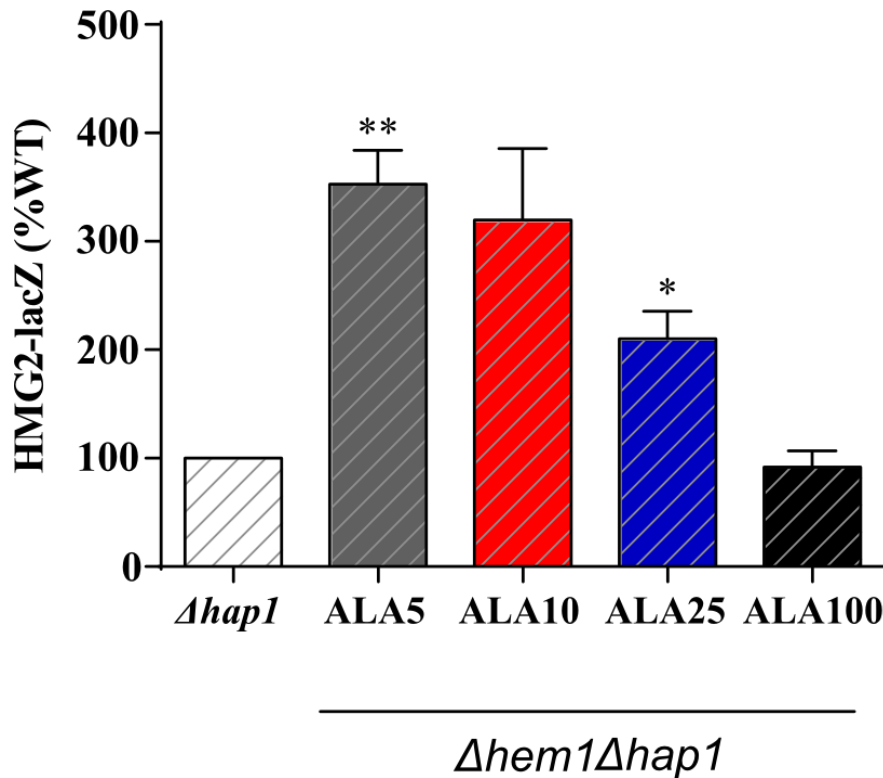


Figure 33. Effet de l'ajout d'ALA sur la quantité d'hème libre sur la souche *Δhem1Δhap1*

Le milieu de culture, lactate 0,2% (p/v), des cellules *Δhem1Δhap1* a été supplémenté par 5μg/mL (ALA5), 10μg/mL (ALA10), 25μg/mL (ALA25) ou 100μg/mL (ALA100) d'ALA. L'activité β-gal a été mesurée sur 5UDO et exprimée en pourcentage du WT. (n=6)

Pour vérifier cela, des constructions simple-mutant *Δhap1* et double-mutant *Δhem1Δhap1* ont donc été réalisés afin de pouvoir étudier l'influence de la protéine Hap1p sur les phénotypes précédemment mis en évidence. J'ai effectué sur ces souches toutes les analyses faites précédemment et ce dans les mêmes conditions, c'est-à-dire dans le même milieu et en présence des mêmes concentrations d'ALA. Dans un premier temps, il apparaît que l'absence de la protéine Hap1p ne modifie pas l'augmentation de la quantité d'hème labile induit par les différentes concentrations d'ALA (**Figure 33**). L'hème étant le régulateur de la protéine Hap1p et non l'inverse, ce résultat était attendu.

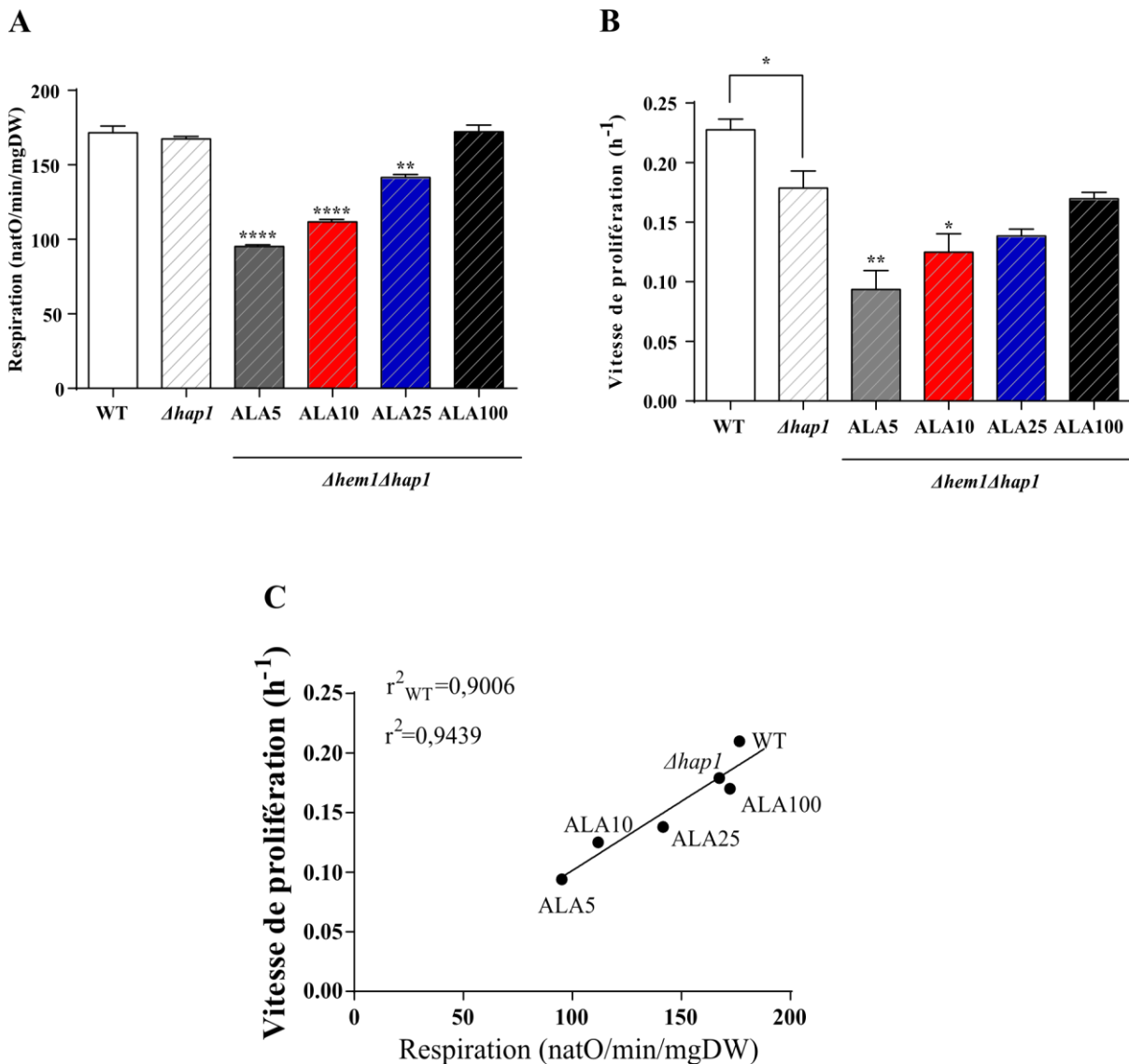


Figure 34. Effet de l'ajout d'ALA sur la vitesse de respiration et de prolifération dans les souches $\Delta hap1$

L'ensemble des expériences est effectué sur 3 heures afin que les données soient toujours obtenues sur des cellules en phase exponentielle de croissance. **A.** Les vitesses de respiration ont été mesurées quatre fois en 3 heures afin de s'assurer de l'état stationnaire des cellules puis moyennées afin d'obtenir une vitesse de respiration moyenne pour chaque condition. (n=8) **B.** Les vitesses de prolifération sont obtenues à partir de courbes de croissance réalisées en parallèle. Ces courbes de prolifération sont obtenues après mesure de la DO, rapportée ici en poids secs (voir **Tableau IV**), toutes les heures durant 3 heures. Les vitesses de prolifération sont calculées en suivant le calcul décrit dans la partie **3.3.1.** (n=8) **C.** La courbe représente la relation entre vitesse de respiration présentées en A et les vitesses de prolifération présentées en B pour chaque condition. Les conditions nommées ALA5, ALA10, ALA25 et ALA100 indiquent les concentrations ajoutées au milieu de culture des cellules $\Delta hem1\Delta hap1$.

En revanche, l'étude de la vitesse de la respiration a pu mettre en évidence que l'absence de Hap1p dans le simple-mutant n'induit aucune modification en comparaison avec la souche WT (**Figure 34A**). Sur le double-mutant, si à faible concentration d'ALA la respiration est 45% plus faible que dans la souche WT, l'ajout croissant d'ALA induit une augmentation de ce paramètre jusqu'à rétablir un phénotype semblable à la souche sauvage

(**Figure 34A**). Cependant et de façon surprenante, on remarque que si, en absence de Hap1p, l'ajout d'ALA induit toujours une augmentation de la vitesse de prolifération, celle du simple-mutant est légèrement plus basse que dans les cellules sauvages (**Figure 34B**). En revanche, dans ces mutants délétés pour le gène *hap1*, la vitesse de prolifération suit toujours une relation linéaire avec la vitesse de respiration avec un coefficient de corrélation égal à $r^2 = 0,9439$ lorsque seuls les résultats des mutants sont comparés et $r^2 = 0.9006$ lorsque les résultats du WT sont ajoutés, du fait de la différence de vitesse de prolifération entre le WT et la souche $\Delta hap1$ (**Figure 34C**). La **Figure 35A**, quant à elle, met en évidence une absence de différence significative des paramètres entre les cellules simple-mutant et les cellules WT et montre une augmentation de l'activité de la COX dans ces cellules double mutant par l'ALA. De plus, sur la **Figure 35B**, il est mis en évidence que l'activité COX suit dans ces conditions une relation linéaire avec la vitesse de respiration ($r^2 = 0,9215$). Enfin, la quantité relative de la porine semble également augmenter en fonction de la concentration d'ALA (**Figure 35C et D**). Ainsi, ces résultats montrent que l'absence de la protéine Hap1p modifie peu voire pas du tout le rôle de la quantité intracellulaire d'hème sur la quantité de mitochondries dans les cellules. Cela est confirmé par la **Figure 36**, qui met en évidence que l'absence de cette protéine n'empêche pas une augmentation de l'activité du promoteur CYC1 par l'ajout de concentrations croissantes d'ALA, donc de l'activité du complexe HAP et de la quantité relative de son régulateur Hap4p.

Pris ensemble, ces résultats montrent que la régulation de la biogenèse mitochondriale par l'hème, au travers de sa régulation sur Hap4p, n'est pas médiée par l'interaction Hap1p/hème.

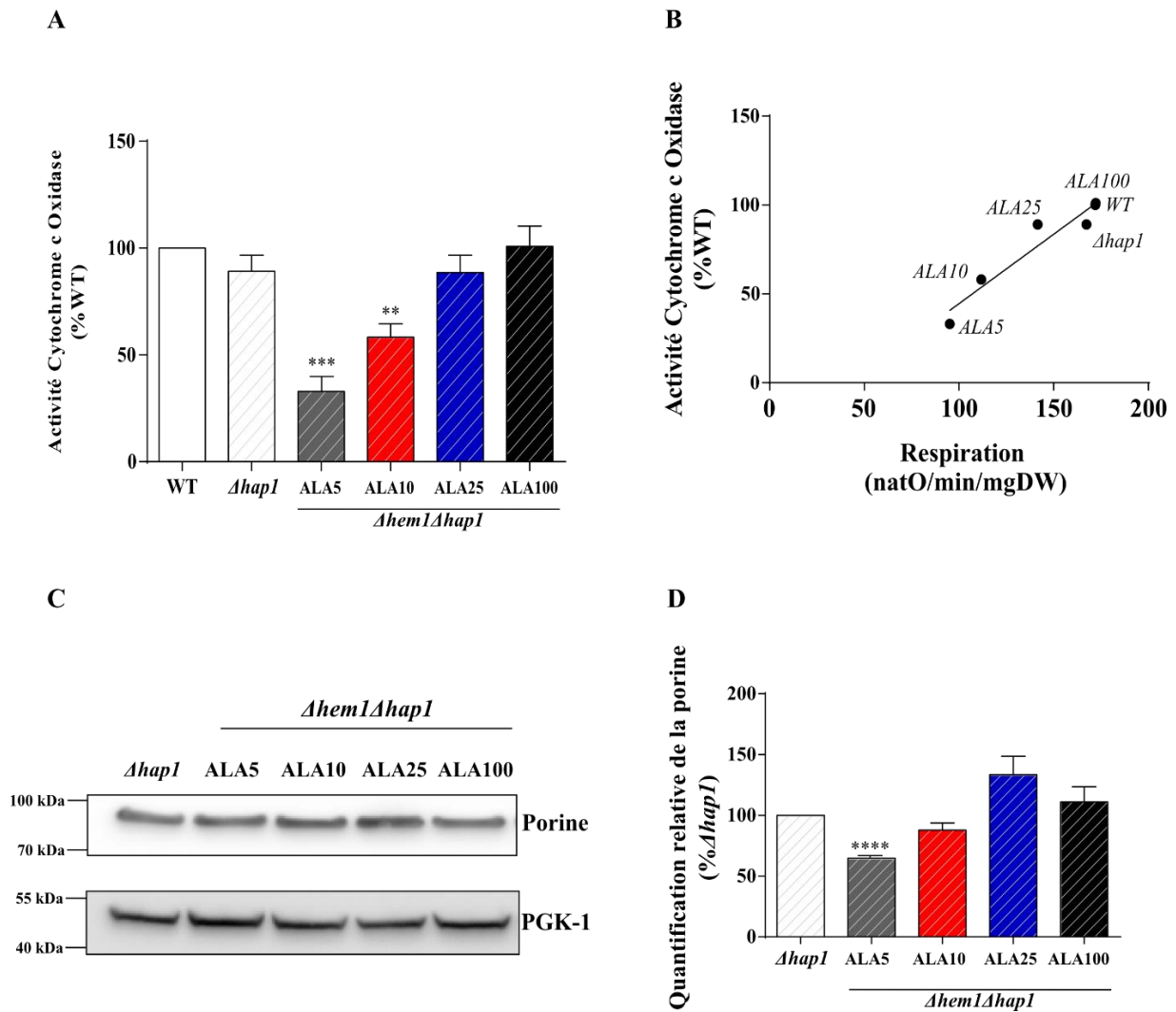


Figure 35. Effet de l'ajout d'ALA sur l'activité et la quantité de protéines mitochondriales dans les cellules $\Delta hap1$

A. L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du WT pour chaque condition. (n=6) **B.** La courbe représente la relation entre les activités présentées en A et les vitesses de respiration présentées précédemment (**Figure 34A**) pour chaque condition. Les conditions ALA5, 10, 25 et 100 sont les différentes concentrations d'ALA ajoutées sur les cellules $\Delta hem1 \Delta hap1$. **C.** La quantité relative de la protéine Porine est mise en évidence par western-blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre la Porine. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **D.** Le niveau relatif de la Porine est déterminé dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du simple mutant. (n=8)

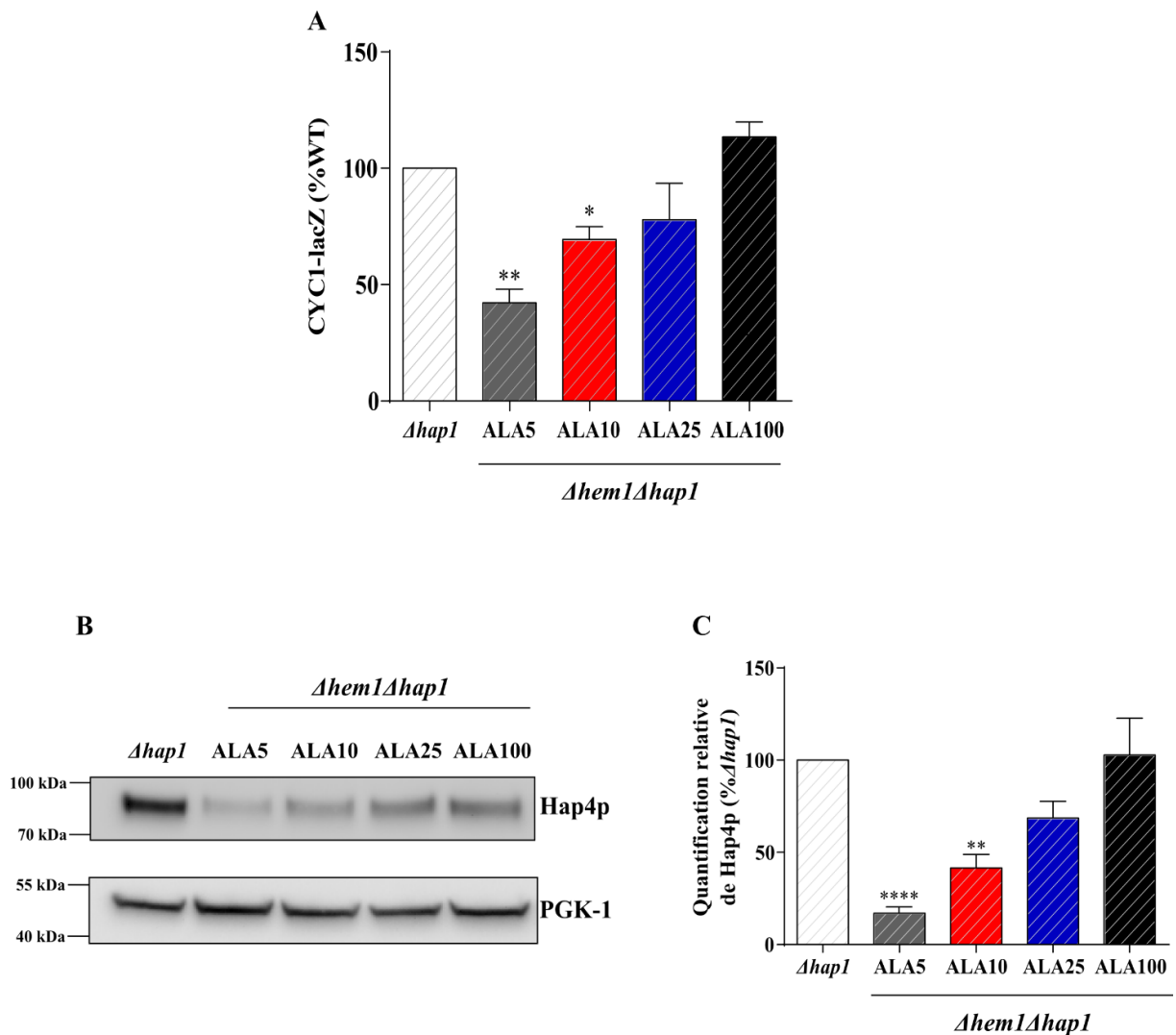


Figure 36. Effet de l'ajout d'ALA sur l'activité du complexe HAP et quantité d'Hap4p dans les cellules $\Delta hap1$

A. L'activité β -gal a été mesurée et exprimée en pourcentage du simple mutant. (n=6) **B.** La quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **C.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du simple mutant. (n=8)

3.4.4 Une interaction directe entre l'hème et Hap4p

Il est alors légitime de se demander si cette régulation est induite par un effet direct de la forme labile de l'hème sur Hap4p. La forme labile de l'hème active Hap1p par interaction directe avec cette dernière (Fytlovich et al., 1993; Zhang and Guarente, 1994; Hickman and Winston, 2007), il est donc envisageable que cette molécule puisse également interagir avec d'autres membres de cette famille protéique. Enfin, comme il a été mentionné dans la première partie de ce chapitre, l'hème est capable de se fixer sur des résidus histidines et cystéines de certaines protéines, or Hap4p possède un triplet d'histidines à proximité de son domaine d'activation (**Figure 37**) (Sybirna et al., 2005).

Durant sa thèse au sein de ce laboratoire, Edgar Yoboue avait déjà commencé à étudier cette possible interaction (Yoboue, 2011). Pour cela, il a étudié le spectre de la molécule d'hème. En effet, il a été mis en évidence que lorsqu'une molécule interagit avec l'hème, cela induit une modification de ces propriétés spectrales (Zhang and Guarente, 1995; Qi et al., 1999; Suzuki et al., 2004). Cette interaction a été étudiée sur une protéine de fusion comprenant un fragment de la protéine Hap4p recombiné avec la protéine GST afin de permettre la purification sur colonne glutathion-sépharose. En effet, la protéine Hap4p n'a pas pu être purifiée en entier, par ailleurs, à l'heure actuelle et à notre connaissance, il n'existe aucune étude dans laquelle cette protéine a pu être purifiée en entier. Cependant cette protéine de fusion comprenant les résidus 330 à 554, a déjà été étudiée (Neely et al., 2002) et héberge le triplet d'histidine présumé comme étant le site de fixation possible de l'hème. Le signal d'absorbance le plus fort dans la molécule d'hème est la bande de Soret (Soret, 1883; Smith and Williams, 1970). En fonction des ligands qui vont interagir avec la molécule d'hème, le profil du spectre va être modifié. C'est ce qu'a pu mettre en évidence Edgar Yoboue durant sa thèse (Yoboue, 2011). Le fragment a été mis en contact avec de la forme oxydée de l'hème, l'hémine et bien que ni le

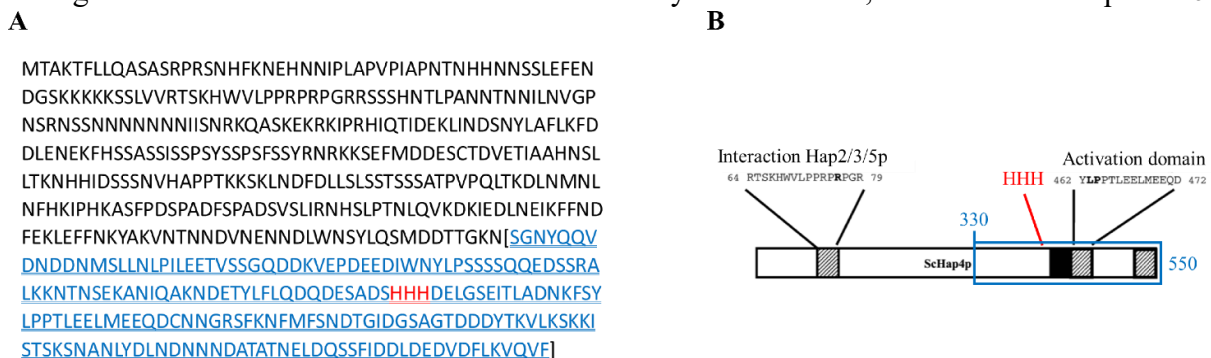


Figure 37. Séquence de la protéine Hap4p

A. Séquence Fasta de la protéine Hap4p issue du site UniProt. La partie purifiée et étudiée est mise en évidence en bleu et soulignée. Le triplet d'histidine, présumé comme site de fixation de l'hème, est mis en évidence en rouge. **B.** Illustration de la structure et des domaines protéique de Hap4p. La partie purifiée est encadré en bleu et le triplet d'histidine en rouge. Schéma modifié à partir de Sybirna et al. 2005.

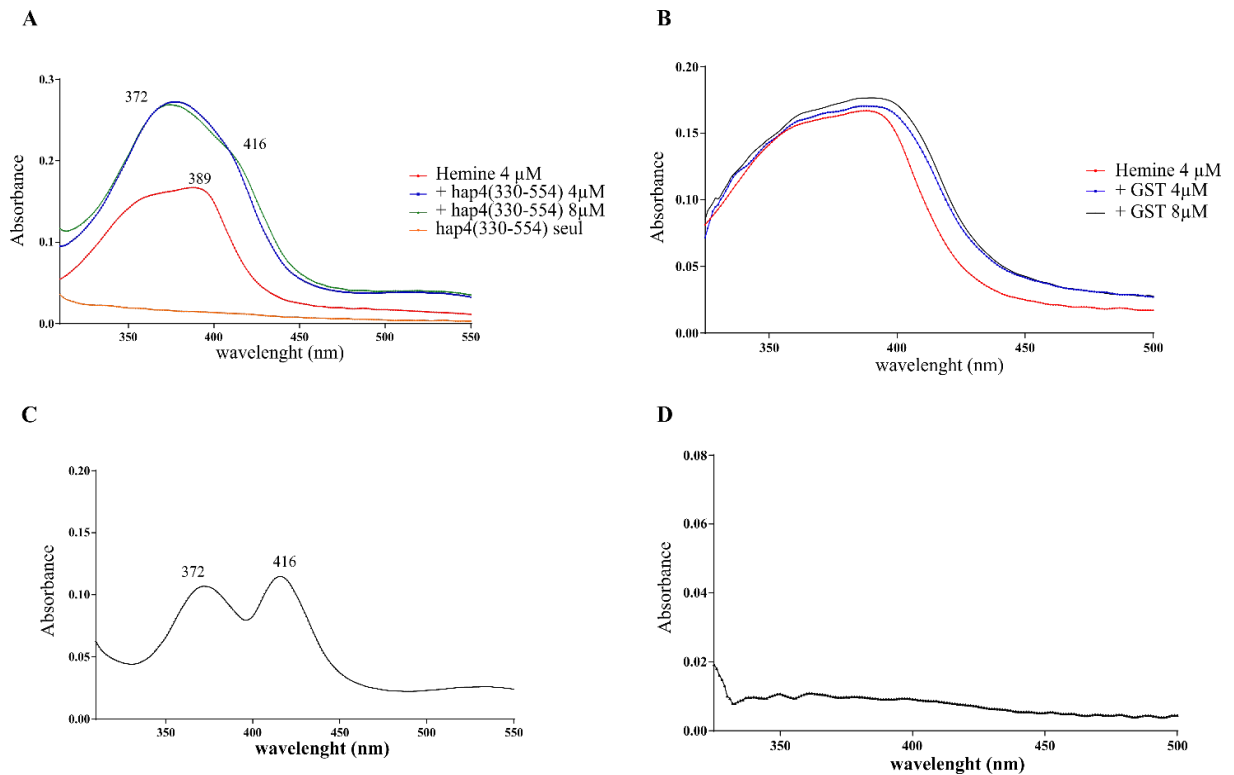


Figure 38. Effet de la protéine GST-Hap4(330-554) sur le spectre de l'hémine

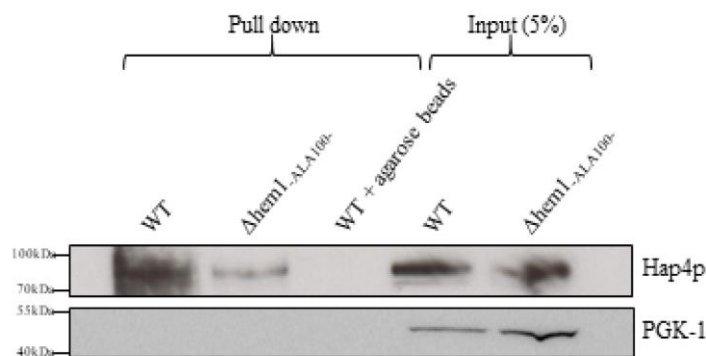
Figure issue de la thèse d'Edgar Yoboue. Les spectres d'absorption de l'hémine ont été enregistrés selon le principe décrit dans la section 2.3.10. Les chiffres au-dessus des spectres indiquent les longueurs d'onde auxquelles les pics et les épaulements sont observés. A. Spectres d'absorbance de l'hémine avant ou après incubation avec la protéine GST-Hap4(330-554). B. Spectres d'absorbance de l'hémine avant ou après incubation avec la protéine GST seule. C. Différentiel entre le spectre d'absorbance de l'hémine en présence de la protéine de fusion et le spectre de l'hémine seule. D. Différentiel entre le spectre d'absorbance de l'hémine en présence de la protéine GST et le spectre de l'hémine seule.

fragment d'Hap4p, ni la protéine GST n'absorbe, l'ajout de cette protéine de fusion entraîne un déplacement du pic d'absorption de l'hémine, à l'origine à 389nm, vers une longueur d'onde plus basse, 372nm. Il a pu également mettre en évidence l'apparition d'un épaulement à 416nm. Il a également vérifié que la GST seule n'induisait pas ce même décalage dans le spectre de l'hémine. Ses résultats sous-entendent donc une interaction directe entre le fragment purifié d'Hap4p et la forme oxydée de l'hème **Figure 38**.

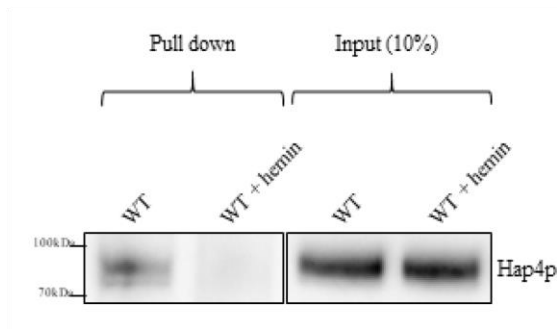
A partir de ce travail, je me suis employée à étayer ce résultat. Pour commencer, j'ai vérifié que la protéine en entier et dans sa conformation tertiaire était capable d'interagir avec la forme oxydée de l'hème de la même manière que la protéine de fusion. Pour cela, une lyse et une extraction protéique non dénaturantes ont été effectuées sur les cellules WT et *Δhem1* supplémentées par 100μg/mL d'ALA. Puis, une expérience de co-précipitation a été effectuée en présence de billes d'agarose sur lesquelles étaient fixées de l'hémine. La **Figure 39A** montre clairement que la protéine Hap4p a pu être précipitée avec l'hémine dans les deux souches et qui semble être de manière spécifique puisque la protéine contrôle n'est pas détectable dans le

précipité et que Hap4p n'est pas détectable dans le précipité des billes d'agarose ne comprenant pas l'hémine. Dans un deuxième temps, et pour conforter la première expérience, la co-précipitation a de nouveau été effectuée sur les cellules WT en pré-incubant les lysats avec de l'hémine libre. L'objectif était de savoir si l'hémine en se fixant à la protéine cible et ainsi en saturant les sites de fixation, induisait une diminution des protéines capables d'interagir avec les billes d'hémine. La **Figure 39B** montre effectivement que suite à cette pré-incubation la protéine n'est quasiment plus, voire plus du tout, détectable dans le précipita. Cela confirme les résultats *in vitro* montrant que l'hème et la protéine Hap4p sous sa forme native interagissent bien ensemble. Pour caractériser davantage cette interaction, des concentrations croissantes

A



B



C

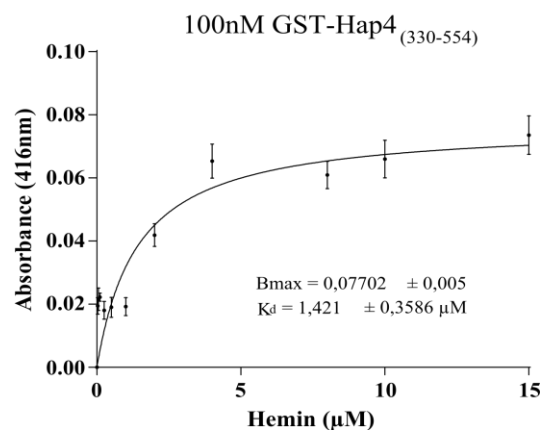


Figure 39. Etude de l'interaction hème et Hap4p

A. Co-précipitation entre un lysat total de cellules WT ou $\Delta hem1$ supplémentées par 100 μ g/mL d'ALA en présence de billes d'agarose et d'hémine. Puis le précipita est analysé par SDS-PAGE et Immunodétection. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Co-précipitation après une pré-incubation des lysats en présence de 100 μ g/mL d'hémine. Puis le précipita est analysé par SDS-PAGE et Immunodétection. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **C.** Différence entre les spectres d'absorption de la titration d'hémine en présence ou non de la GST-Hap4(330-554) à 100 nM. L'hémine est ajouté en concentrations croissantes (de 0 à 15 μ M). Les courbes ont été générées via l'ajustement à une équation décrivant un site de liaison unique.

d'hémine ont été mis en présence de la protéine de fusion déjà utilisé par Edgar Yoboue. L'interaction entre les deux molécules a été suivie par spectroscopie différentielle (**Figure 39C**). Un Kd apparent de $1,4\mu\text{M}$ a pu être mesuré. Bien que cela suggère une faible affinité entre les deux molécules, les recherches de Barrientos et son équipe ont mis en évidence un Kd du même ordre lors de leur étude sur Mss51, un activateur de traduction spécifique de l'ARNm COX1 et une protéine chaperonne de la COX, dans des conditions similaires (Soto et al., 2012). De plus, cette expérience est faite en conditions *in vitro* sur un fragment de protéine purifiée et fusionnée ajoutée à des concentrations similaires aux concentrations cellulaires. Il est donc possible que l'affinité entre ces deux molécules ait pu être modifiée par rapport à ce qui se passe *in vivo* où un processus de canalisation pourrait avoir lieu, impliquant une augmentation locale de la concentration du ligand et de la protéine. Dans ce contexte cellulaire, une affinité faible serait cohérente avec la forte proximité entre les deux molécules, ce qui serait en accord avec le Kd trouvé.

Pris ensemble, ces résultats mettent en évidence une interaction directe entre l'hème et Hap4p. Il est possible que cette interaction soit à l'origine de l'augmentation de la quantité d'Hap4p dans les cellules. Par conséquent, cette interaction pourrait mener à un processus de stabilisation de la protéine. La stabilité de la protéine a donc été étudiée en présence d'un inhibiteur de la traduction protéique, le cycloheximide (CHX). Dans ces conditions, la synthèse protéique n'étant plus possible, sa vitesse de dégradation peut être suivie par immunodétection. Le suivi du turn-over de Hap4p a été effectué sur 7 minutes, temps de sa demi-vie (Yoboue et al., 2012). Dans les cellules WT, la quantité relative de la protéine présente à T0 est effectivement diminuée de 15% en 3 minutes et de moitié en 7 minutes **Figure 40**. En comparaison, à faible concentration d'ALA ajouté au milieu (ALA5 et ALA10), en 3 minutes près de 60% d'Hap4p ont déjà disparu et 65 à 75% après 7 minutes par rapport à la quantité détectée à leur T0 respectif. Cela implique une stabilité très faible de la protéine Hap4p. En revanche, lorsque la concentration d'ALA ajouté augmente, ALA25 et ALA100, 3 minutes après l'ajout de CHX, 35 à 40% de la quantité relative mesurée à T0 a disparu et 55% après 7 minutes. À forte concentration d'ALA, la protéine est donc deux fois plus stable et son temps de demi-vie est semblable à celui observé dans les cellules WT.

Ces résultats mettent en évidence que l'interaction de l'hème et de Hap4p est à l'origine d'une augmentation de la stabilité de la protéine et donc de sa quantité dans les cellules. Cela induit une augmentation de l'activité du complexe HAP et donc une augmentation de la biogenèse mitochondriale.

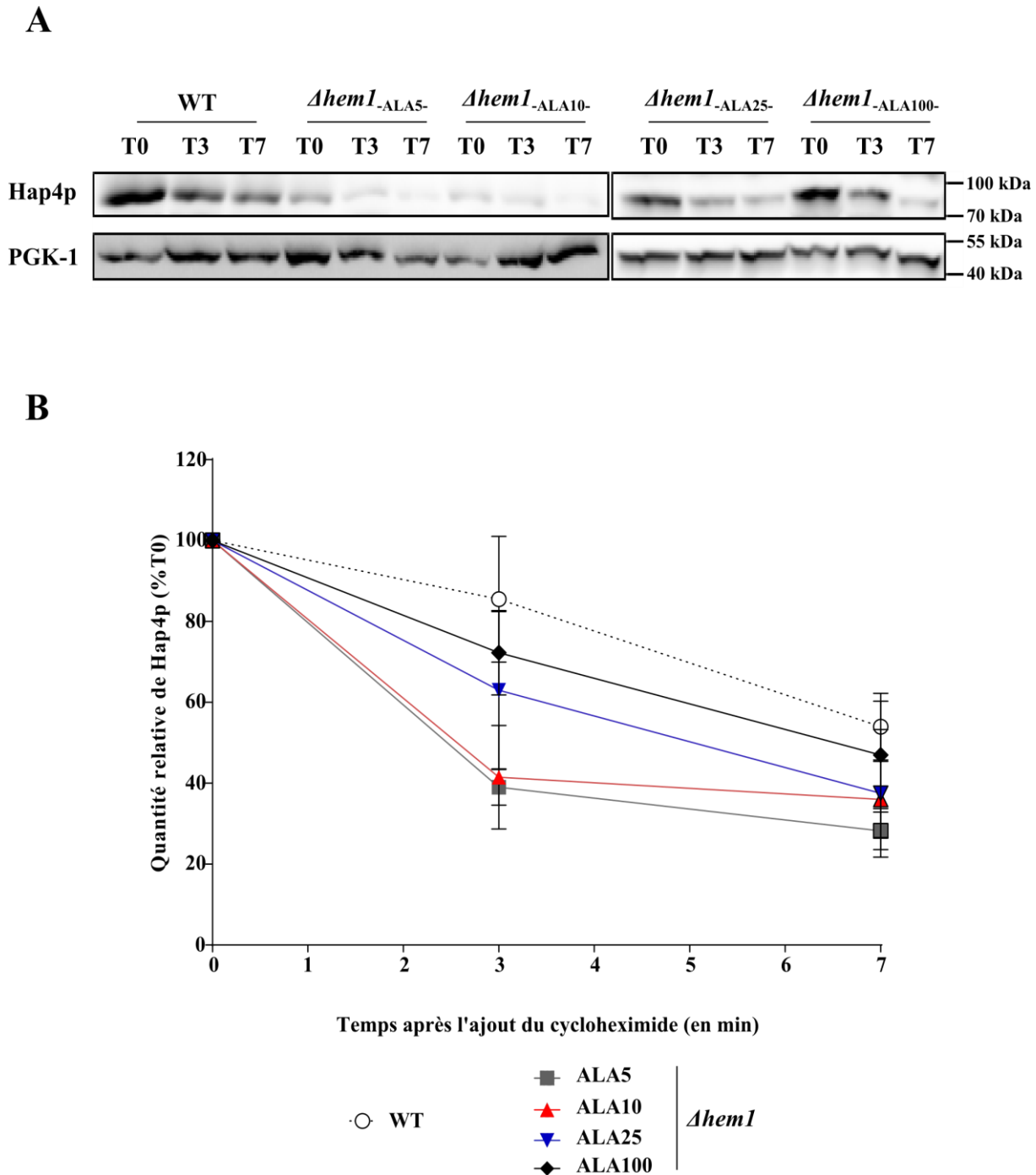


Figure 40. Effet de l'ajout d'ALA sur la stabilité de Hap4p

A. Après ajout du CHX, la quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** La dégradation relative au cours du temps de Hap4p est déterminée dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge puis à celle obtenue à T0. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=5)

3.5 Validation du rôle de l'hème sous sa forme labile

3.5.1 La deutéroporphyrine, un homologue non métabolisable de l'hème

Les précédents résultats montrent que l'hème sous sa forme labile, c'est-à-dire non-associée à la structure d'une hémoprotéine, a un rôle de régulateur de la stabilité de la protéine Hap4p. Cependant, dans les résultats présentés, s'il apparaît que la quantité globale de mitochondries augmente dans les cellules, une question s'est imposée. L'augmentation de la synthèse d'hème par l'ajout d'ALA, n'est-elle pas à l'origine de l'augmentation de la quantité de cytochromes mitochondriaux mesurée et cette augmentation ne participe-t-elle pas à la quantité de mitochondries croissante observée ?

Ainsi, afin de savoir si les résultats obtenus sont uniquement dus ou non à la régulation de la biogenèse mitochondriale par la forme labile de l'hème, un homologue non métabolisable de l'hème a été utilisé. Cet homologue est issu de la deutéroporphyrine IX (DP IX), homologue de la protoporphyrine IX. La DP IX présente une meilleure solubilité que la protoporphyrine IX et peut parfaitement se substituer à cette dernière en tant que substrat de la ferrochélatase (dernière réaction de la voie de biosynthèse, **Figure 16**) avec donc formation de deutérohème (ou deuteroproto)hème) (Guarente et al., 1984; Hon et al., 2003). Cette molécule est structurellement très proche de l'hème à la différence qu'elle ne possède pas les groupements vinyles remplacés ici par des hydrogènes (Paramaesvaran et al., 2003). L'absence de ces groupements induit des modifications dans le devenir de cette molécule par rapport à son homologue. En effet, il ne peut servir à la synthèse des cytochromes c ou a. L'hème de type c est formé par liaison covalente de l'hème avec l'apocytochrome c, or cette liaison covalente a lieu sur les groupements vinyles. En ce qui concerne l'hème de type a, il n'est pas lié de façon covalente mais un groupement farnésyl doit prendre la place d'un des deux groupements vinyles (Guarente et al., 1984; Schmalix et al., 1986). Ainsi cet analogue de l'hème ne peut pas être utilisé dans la formation des cytochromes et l'intégralité de ce deutérohème sera utilisée par la cellule comme un pool d'hème sous sa forme labile. L'utilisation de cette molécule permettra ainsi de discriminer la régulation de la biogenèse par la fraction labile de l'hème d'une augmentation de la formation de cytochromes par celle de la biosynthèse de l'hème.

3.5.2 Condition de culture et vérification du modèle

Afin de répondre à cette question, le milieu de culture des cellules *Δhem1* est supplémenté avec une faible concentration d'ALA, 5μg/mL, en présence ou non de deutéroporphyrine IX à 2,5μg/mL. Dans la mesure où la DP IX est non métabolisable, l'ajout d'ALA est obligatoire pour la prolifération cellulaire afin d'avoir une concentration minimale de cytochromes permettant le bon fonctionnement de la cellule. La concentration choisie de deutéroporphyrine est la même que celle utilisée par Guarente et son équipe dans leur étude montrant le rôle d'analogue de l'hème de la DP IX (Guarente et al., 1984). De plus, une titration avec des concentrations plus importantes (5 et 10μg/mL) de DP IX a été réalisée sur les cellules et aucune différence significative au niveau de la prolifération et de la respiration n'a pu être mise en évidence (données non présentées). Ainsi, cette concentration semble optimale dans nos conditions pour définir le rôle de l'hème labile sur la biogenèse mitochondriale.

Avant d'étudier le rôle de cette molécule sur les paramètres cellulaires précédemment mesurés, une mesure de l'activité du promoteur du gène *HMG2* a été réalisée afin de vérifier que l'ajout de DP IX dans le milieu entraînait bien un résultat similaire à la formation d'une forte concentration d'hème labile dans les cellules. La **Figure 41** met en évidence qu'en présence de la DP IX et malgré une faible concentration d'ALA ajoutée au milieu, l'activité de ce promoteur est bien plus faible que lorsque les 5μg/mL d'ALA sont ajoutés seuls. Cette activité est d'ailleurs similaire à celle observée dans les conditions des cellules WT.

Ainsi, l'ajout de cette molécule au milieu de culture induit bien une augmentation du pool d'hème labile et nos conditions de culture permettent bien de différencier les conséquences d'une augmentation de la quantité globale d'hème, *via* l'ajout de l'ALA, à celle de la quantité d'hème sous sa forme labile.

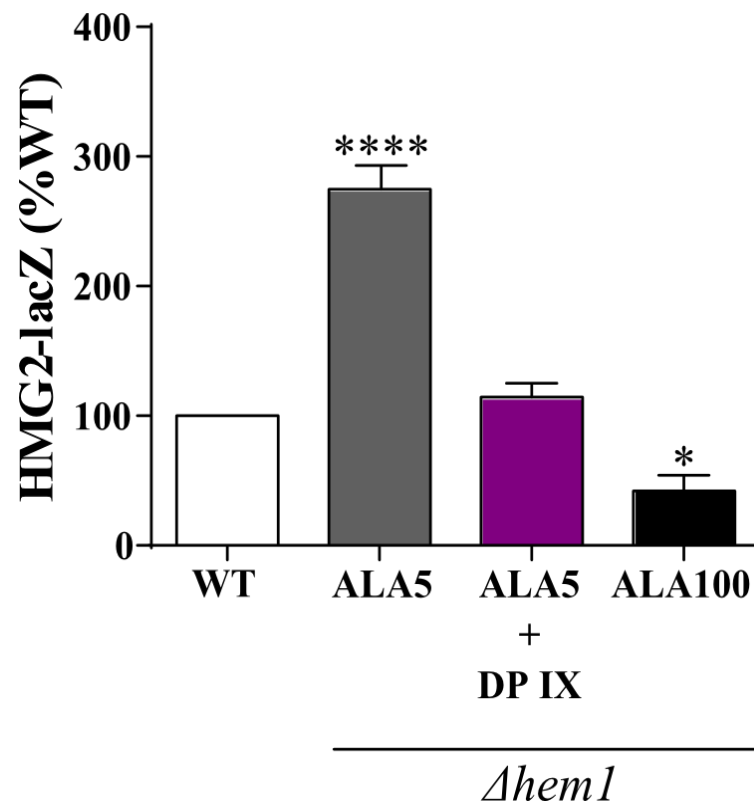


Figure 41. Effet de la DP IX sur l'activité du promoteur du gène *HMG2*

Effectuée sur des cellules cultivées en milieu de culture, lactate 0,2% (p/v). Le milieu de culture des cellules $\Delta hem1$ a été supplémenté par 100 μ g/mL (ALA100) d'ALA ou par 5 μ g/mL (ALA5) en présence ou non de 2,5 μ g/mL de DP IX (ALA5 + DP IX). L'activité β -gal a été mesurée sur 5UDO et exprimée en pourcentage du WT. (n=4)

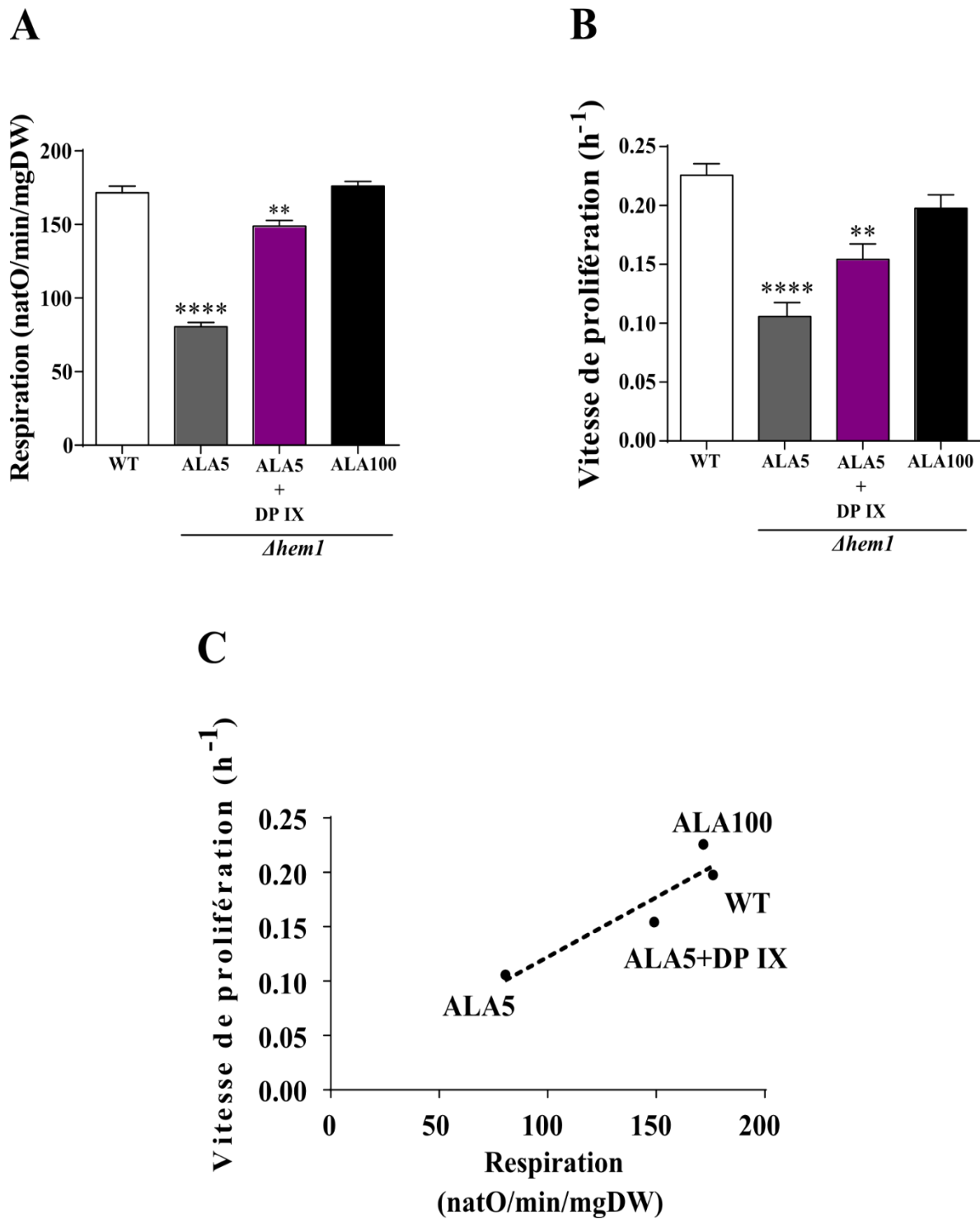


Figure 42. Effet de la DP IX sur la prolifération et respiration

L'ensemble des expériences est effectué sur 3 heures afin que les données soient toujours obtenues sur des cellules en phase exponentielle de croissance. **A.** Les vitesses de respiration ont été mesurées quatre fois en 3 heures afin de s'assurer de l'état stationnaire des cellules puis moyennées afin d'obtenir une vitesse de respiration moyenne pour chaque condition. (n=9) **B.** Les vitesses de prolifération sont obtenues à partir de courbes de croissance réalisées en parallèle. Ces courbes de prolifération sont obtenues après mesure de la DO, rapportée ici en poids secs (voir **Tableau IV**), toutes les heures durant 3 heures. Les vitesses de prolifération sont calculées en suivant le calcul décrit dans la partie **3.3.1**. (n=9) **C.** La courbe représente la relation entre vitesses de respiration présentées en A et les vitesses de prolifération présentées en B pour chaque condition. Les conditions nommées ALA5, ALA5 + DP IX, ALA100 indiquent les concentrations ajoutées au milieu de culture des cellules *Δhem1*.

3.5.3 La deutéroporphyrine IX induit une augmentation de la quantité de mitochondries

La quantité d'unité de chaînes respiratoires au sein des cellules *Δhem1* a été étudiée de la même façon que précédemment dans ces conditions et comparée aux mesures obtenues dans les cellules WT et dans les cellules *Δhem1* supplémentées par une forte concentration d'ALA (100μg/mL).

Les résultats montrent ainsi qu'en présence de DP IX, (1) la respiration et la vitesse de prolifération augmentent de manière significative par rapport aux mesures obtenues lors d'un ajout de 5μg/mL d'ALA seul (**Figure 42A et B**) ; (2) ces deux paramètres suivent une relation linéaire avec un coefficient de corrélation égal à $r^2 = 0,8562$ (**Figure 42C**) ; (3) les activités des enzymes mitochondriales COX et CS augmentent par rapport à la condition dans laquelle l'ALA est ajouté seul à faible concentration et sont quasiment semblables au phénotype sauvage ou au phénotype des *Δhem1* en présence d'une forte concentration d'ALA (**Figure 43A et C**) ; (4) l'activité de ces deux enzymes suit également une relation linéaire avec la respiration avec un coefficient de corrélation égal à $r^2 = 0,9944$ pour la COX et $r^2 = 0,9951$ pour la CS (**Figure 43B et D**) ; (5) le diamètre des mitochondries des cellules augmente par rapport à la condition ALA5 et est semblable à celui des mitochondries des cellules sauvages (**Figure 44**). En revanche et comme précédemment, aucune différence de la morphologie du réseau n'a pu être observée (**Figure 45**).

D'autre part et contrairement à l'étude précédente, je n'ai pas pu quantifier les cytochromes dans cette condition. Le problème venait du fait que la deutéroporphyrine IX, de la même manière que l'hème, est une molécule qui possède des propriétés spectrales. Même après avoir plusieurs fois lavé les culots cellulaires, le spectre obtenu lors de la quantification restait peu conclusif. Une étude sur mitochondries isolées pourrait peut-être être envisagée, cependant, elle nécessiterait une purification de chaque condition individuellement et la prolifération à faible concentration d'ALA étant limitée, le rendement pourrait ne pas être suffisant pour réaliser l'expérience.

Cette première partie met en évidence que l'ajout d'un analogue non métabolisable de la forme labile de l'hème induit une augmentation de la quantité de mitochondries dans les cellules.

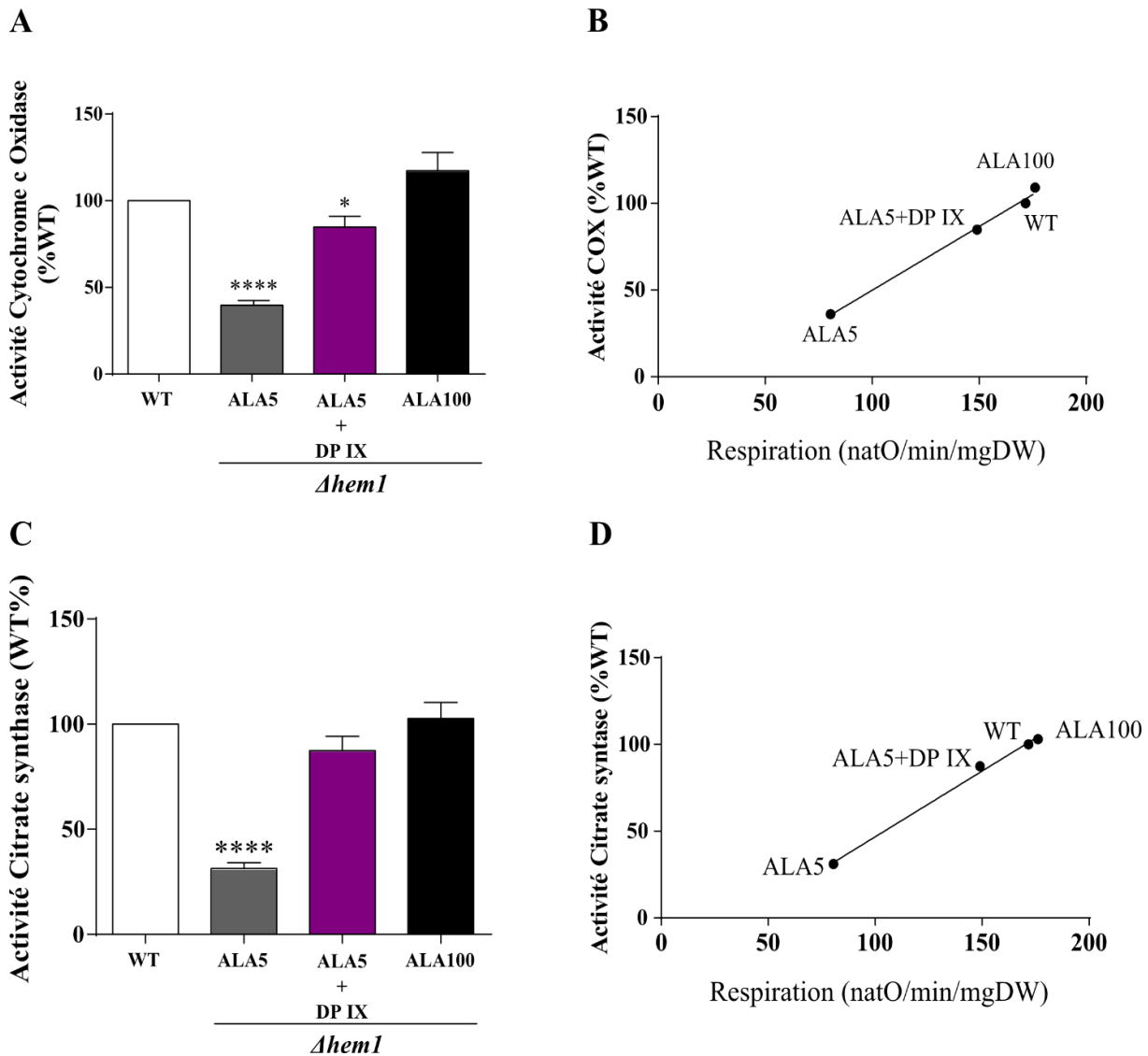


Figure 43. Effet de la DP IX sur l'activité des enzymes mitochondriales

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 0,2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **A.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du WT pour chaque condition. (n=8) **B.** La courbe représente la relation entre les activités présentées en A et les vitesses de respiration présentées précédemment **Figure 42A** pour chaque condition. **C.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du WT pour chaque condition. (n=7) **D.** La courbe représente la relation entre les activités présentées en C et les vitesses de respiration présentées précédemment **Figure 42A** pour chaque condition.

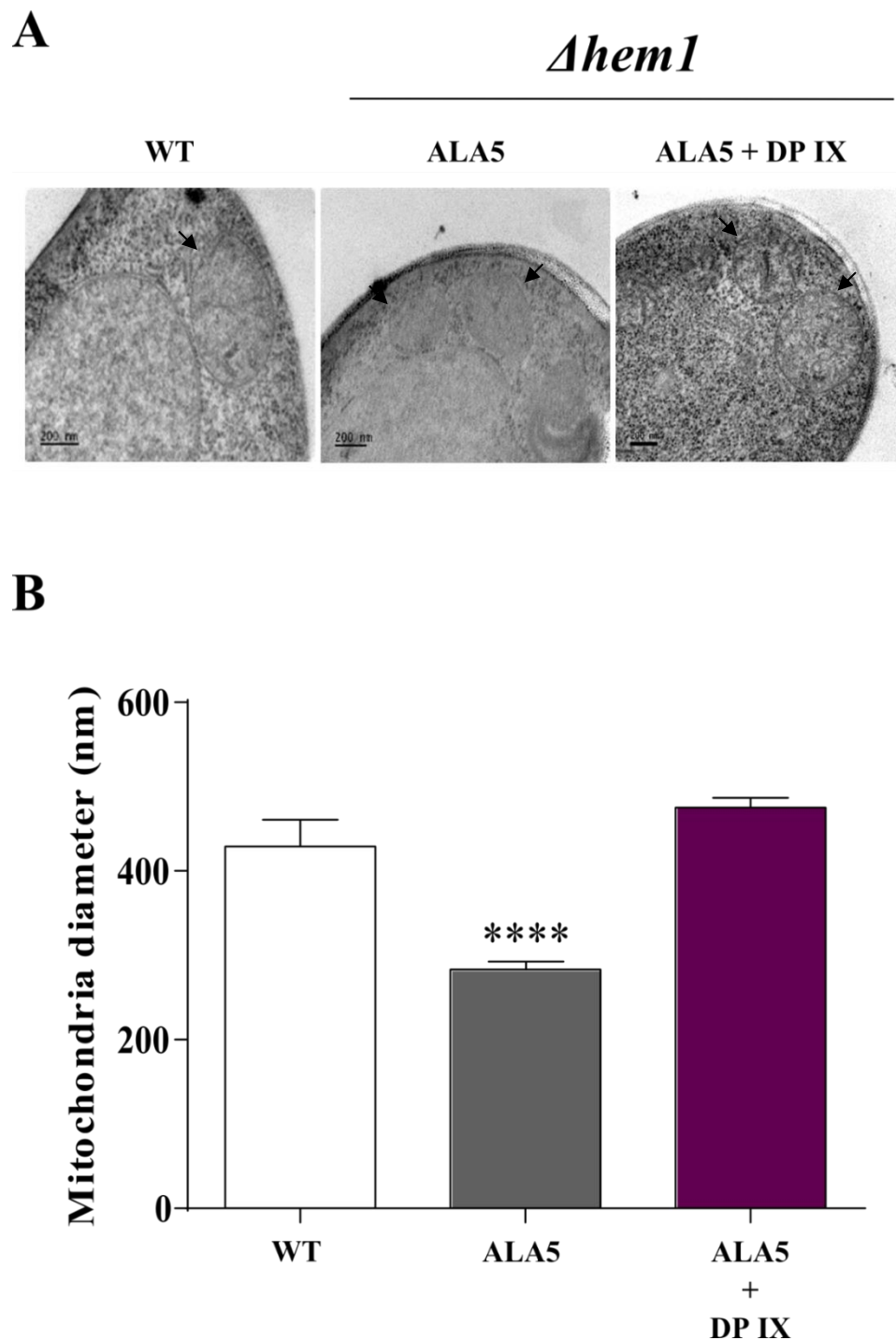


Figure 44. Effet de la DP IX sur le diamètre mitochondrial

A. Observation au microscope électronique de l'ultrastructure des cellules pour chaque condition. Les mitochondries sont indiquées par des flèches. Chaque image est représentative de ce qui a été observé sur l'ensemble des sections de sa condition. Environ quinze images ont été prises par condition. **B.** À partir de l'ensemble des images obtenues par microscopie électronique, le diamètre des mitochondries a été mesuré à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats sont une moyenne de toutes les sections mesurées pour chaque condition soit minimum dix-huit sections.

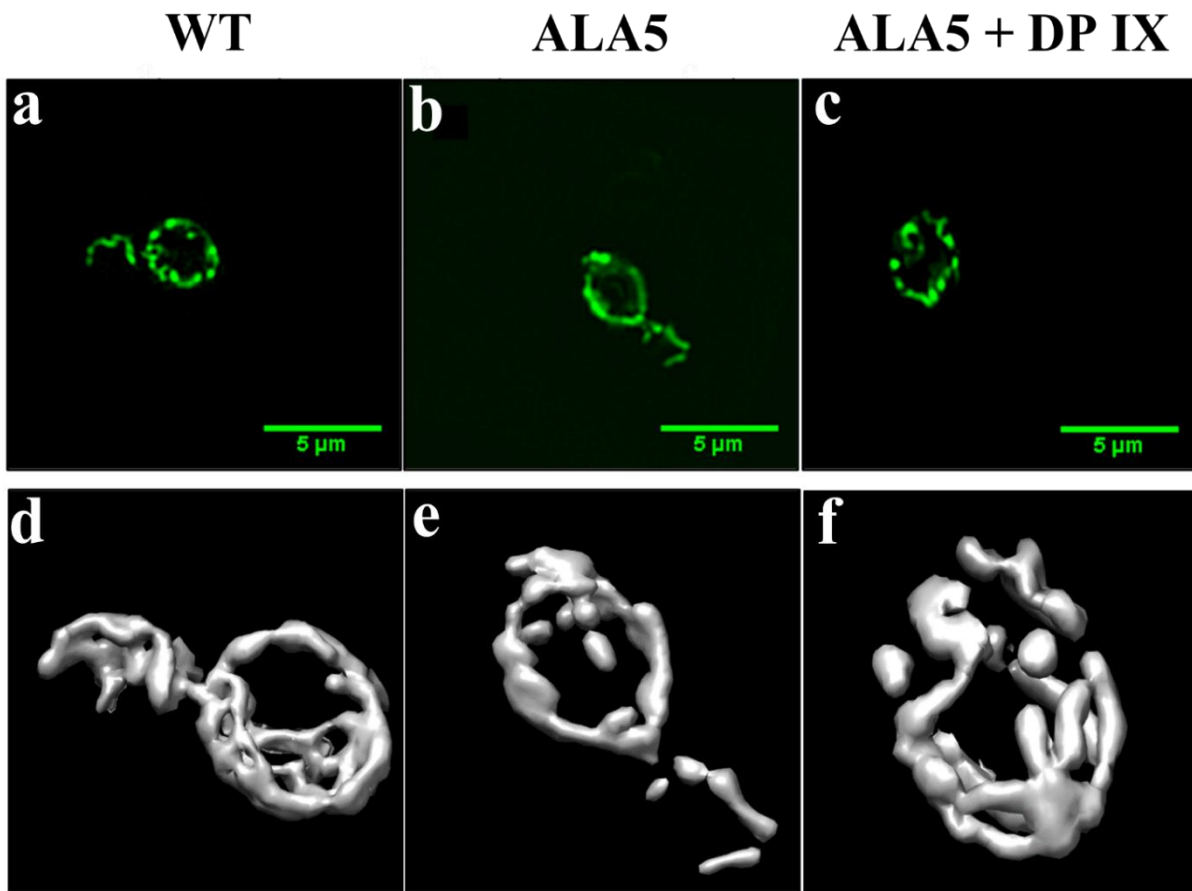
$\Delta hem1$ 

Figure 45. Effet de la DP IX sur la morphologie du réseau mitochondrial

De **a** à **c**, sont représentées les déconvolutions obtenues par microscopies à épifluorescence. Pour chaque condition, l'image représentée est représentative de ce qui a pu être observé sur l'ensemble des images récupérées. Au moins neuf images comprenant au moins trois cellules ont été analysées pour chaque condition. De **d** à **f**, sont montrées les représentations 3D, obtenues avec le logiciel Chimera, des déconvolutions présentes au-dessus.

3.5.4 La deutéroporphyrine IX induit une augmentation de la biogenèse mitochondriale

Le rôle de la DP IX sur le complexe HAP a ensuite été étudié de la même façon que précédemment. Il a pu être mis en évidence, que la présence de DP IX dans les cellules induisait une augmentation de l'activité du promoteur du gène *CYCI*, et donc, de l'activité du complexe HAP, par rapport à ce qui peut être observé dans les cellules supplémentées seulement avec une faible concentration d'ALA (**Figure 46A**). Cependant, cette activité, si elle est deux fois supérieure à celle de la condition ALA5, reste plus faible que celle observée dans les cellules WT. D'autre part, la quantité relative de Hap4p augmente après ajout de DP IX jusqu'à être

similaire à celle mesurée dans les cellules supplémentées avec une forte concentration d'ALA (Figure 46B et C). Cette augmentation est associée à une augmentation de la stabilité de la protéine (Figure 47).

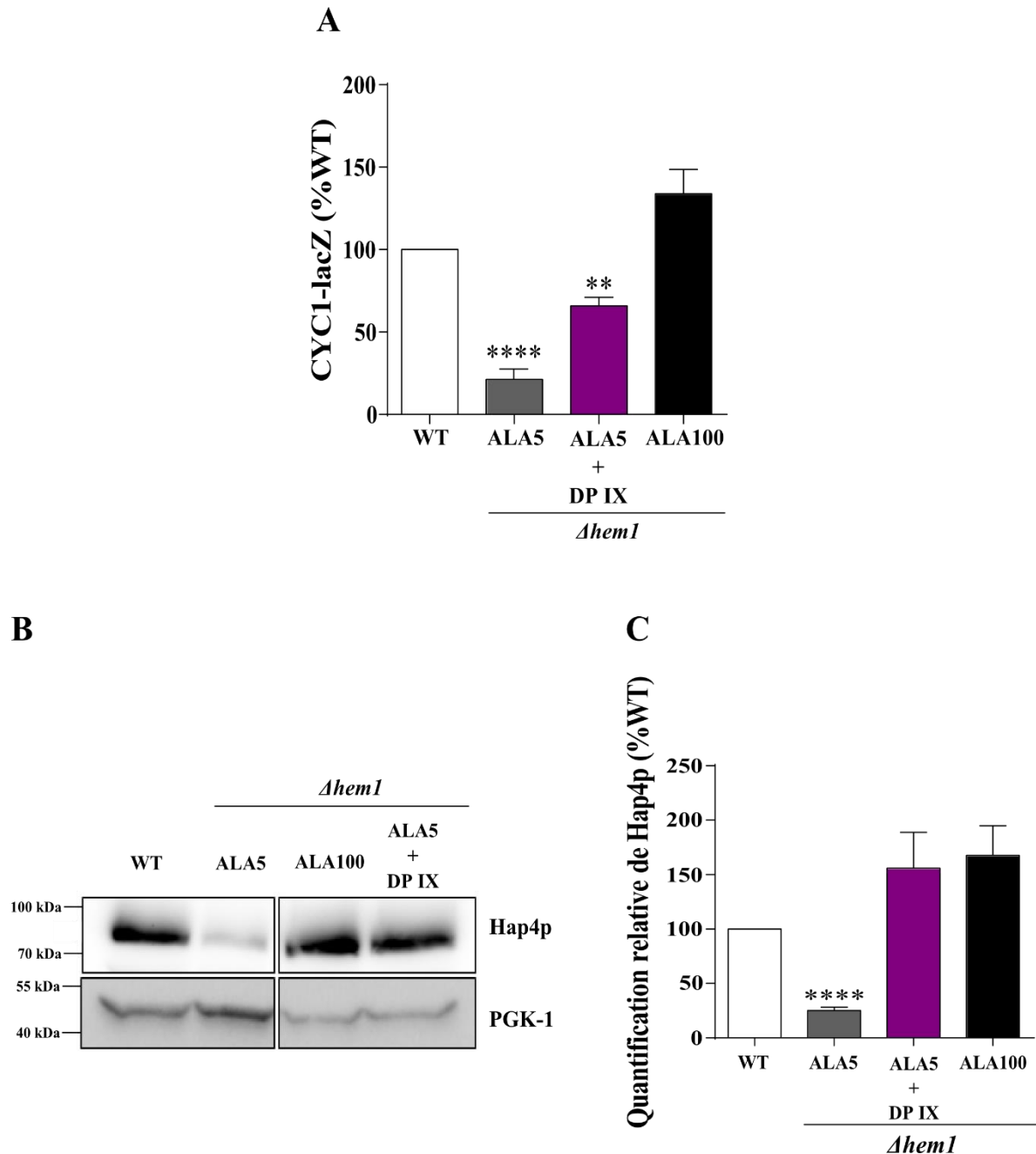


Figure 46. Effet de la DP IX sur l'activité du complexe HAP et sur la quantité d'Hap4p

A. L'activité β -gal a été mesurée sur 1UDO et exprimée en pourcentage du WT. (n=5) **B.** La quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **C.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du simple mutant. (n=7)

Pris ensemble, ces résultats montrent que l'ajout de deutéroporphyrine, à l'origine de la synthèse d'un homologue de l'hème labile, induit une augmentation de la quantité d'Hap4p via une augmentation de sa stabilité, de façon identique à l'ajout d'une forte concentration d'ALA sur les cellules *Δhem1*. L'augmentation de la stabilité de Hap4p est à l'origine d'une biogenèse mitochondriale accrue. Ces expériences montrent donc que les résultats obtenus sont dus uniquement à l'induction de la biogenèse mitochondriale et non à une augmentation et une accumulation de cytochromes formés suite à cet ajout d'ALA. Cela montre également que la concentration d'ALA minimale utilisée semble nécessaire et suffisante à la formation maximale de cytochromes utiles pour une activité optimale du système des OXPHOS. En effet, l'ajout de

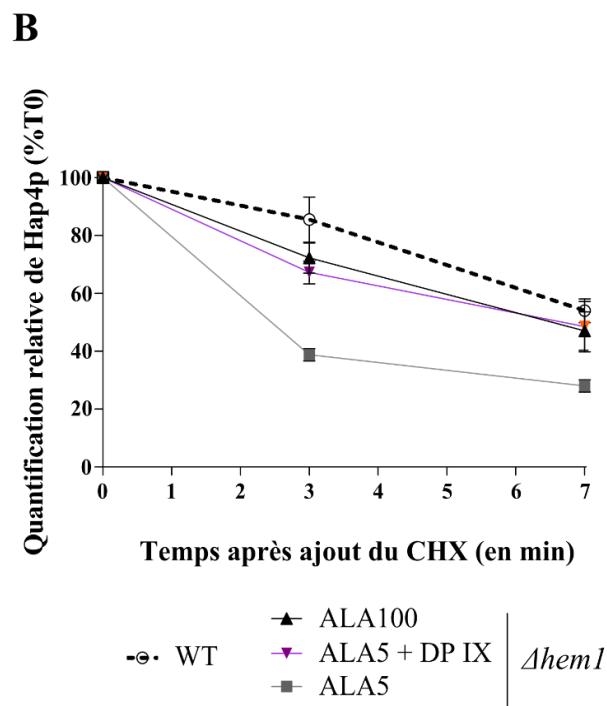
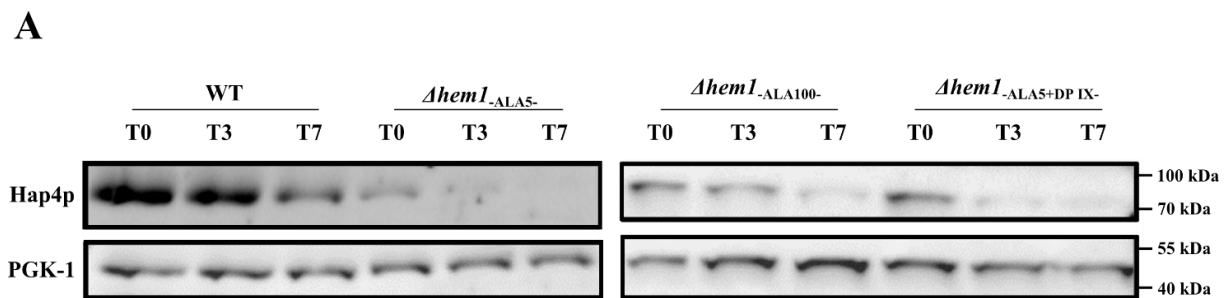


Figure 47. Effet de la DP IX sur la stabilité de Hap4p

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 0,2% (p/v). **A.** Après ajout du CHX, la quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** La dégradation relative au cours du temps de Hap4p est déterminée dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge puis à celle obtenue à T0. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=5)

DP IX à une faible concentration d'ALA induit une restauration du phénotype sauvage sur les vitesses de respiration et de prolifération.

3.6 Un effet synergique entre antioxydants et hème labile ?

3.6.1 Historique du questionnement

Comme dit précédemment, durant sa thèse, Edgar Yoboue a étudié le rôle du stress oxydatif sur la biogenèse mitochondriale *via* l'utilisation de la souche *Δtpk3* (Yoboue, 2011). Cette souche présente une production très importante de ROS mitochondriaux. Ce stress oxydatif est à l'origine d'un défaut au niveau de la prolifération et de la respiration cellulaire mais également d'une diminution globale du contenu mitochondrial associé à une diminution de la quantité relative d'Hap4p dans cette souche (Chevtzoff et al., 2010). Suite à ces résultats, il a pu mettre en évidence que l'ajout d'un antioxydant, le N-Acétyl-cystéine (NAC) entraînait une augmentation de la biogenèse mitochondriale. Ce résultat était dû à une augmentation de l'activité du complexe HAP et une augmentation de la quantité d'Hap4p dans ces cellules suite à l'ajout de NAC et à la suppression du stress oxydant (Chevtzoff et al., 2010; Yoboue, 2011).

D'autre part, les propriétés de la molécule d'hème et de ses précurseurs sont surtout associées à des propriétés pro-oxydantes (Ryter and Tyrrell, 2000). De plus, dans les résultats précédemment décrits, l'interaction directe entre l'hème et Hap4p a été mise en évidence *via* la forme oxydée de la molécule d'hème, l'hémine (voir 3.4.4). La régulation de la quantité de Hap4p par un anti-oxydant soulève la question du rôle de l'état redox de l'hème et interroge sur une possible interaction spécifique entre la protéine Hap4p et la forme oxydée de l'hème.

Au vu de ces deux études, il est alors possible d'émettre l'hypothèse que l'ajout des deux molécules pourrait induire un effet inverse. En effet, l'ajout de NAC pourrait être à l'origine d'une réduction de l'hème qui empêcherait ses activités pro-oxydantes voire son interaction avec Hap4p.

3.6.2 Conditions de culture

Les cellules sont cultivées dans les mêmes conditions que précédemment en présence de 5mM de NAC. Durant les premières expériences, il est apparu que la condition 5μg/mL et 10μg/mL d'ALA étaient quasiment les mêmes en présence de NAC. Une concentration inférieure d'ALA a donc remplacé la condition ALA5 : 1,5μg/mL d'ALA. Le NAC est ajouté en même temps que l'ALA, au moment de la culture.

En premier lieu, j'ai vérifié que l'ajout de NAC ne perturbait pas la formation d'hème sous sa forme labile, pour cela et comme dans les parties précédentes, l'activité du promoteur *HMG2* a été mesurée. La **Figure 48** met en évidence qu'il existe bel et bien une augmentation

de l'activité de ce promoteur dans ces conditions, avec une restauration du phénotype sauvage en présence de NAC, lorsque l'ALA est ajouté à forte concentration (ALA25 et 100) ou à faible concentration en présence de DP IX. Il est à noter qu'à 1,5µg/mL d'ALA en présence de NAC, l'activité est très importante, presque deux fois plus que lorsque l'ALA est ajouté seul au milieu à 5µg/mL, le promoteur devant être très peu inhibé par l'ajout de cette très faible concentration d'ALA. Ainsi, l'ajout de NAC n'empêche pas l'inhibition du promoteur *HMG2* par l'hème labile.

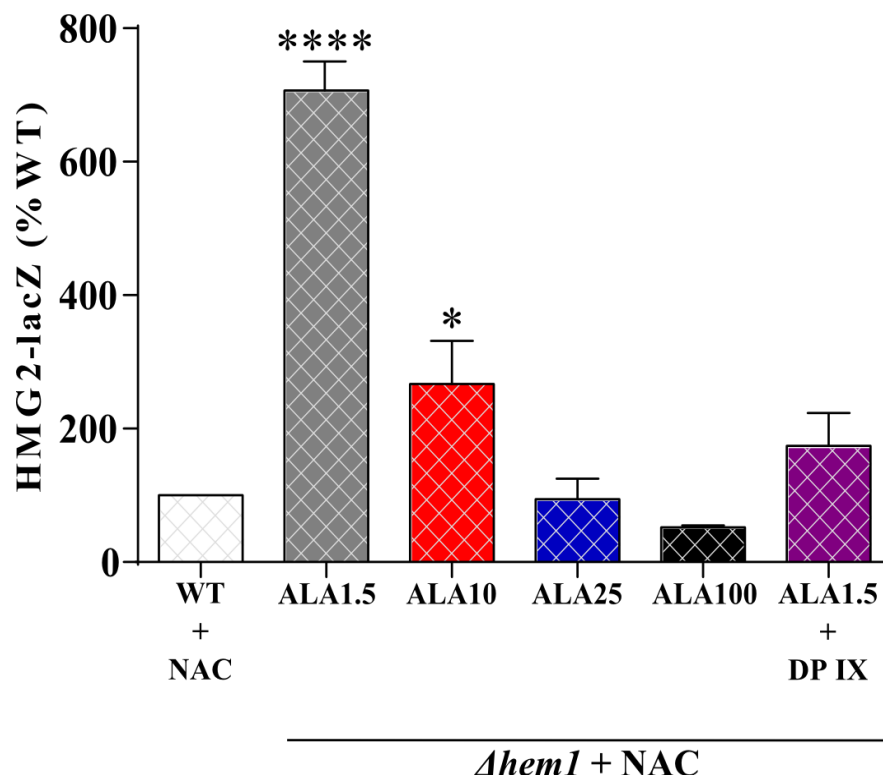


Figure 48. Effet de l'ajout du NAC sur l'activité du promoteur *HMG2*

Le milieu de culture des cellules WT et *Δhem1* a été supplémenté par 5mM de NAC, et pour les cellules *Δhem1* le milieu a été également supplémenté par 10µg/mL, 25µg/mL, 100µg/mL ou 1,5µg/mL d'ALA en présence ou non de 2,5µg/mL de DP IX (ALA1,5 + DP IX). L'activité β-gal a été mesurée sur 5UDO et exprimée en pourcentage du WT+NAC. (n=3)

3.6.3 Influence de l'anti oxydant sur la quantité de mitochondries

L'ajout de NAC dans le milieu de culture ne semble pas modifier la vitesse de respiration lorsqu'il est associé à une forte concentration d'ALA (**Figure 49A** et **Tableau XII**). En revanche, à faible concentration, les vitesses des respirations augmentent en présence de l'antioxydant : à 1,5µg/mL d'ALA, la respiration est plus rapide qu'à 5µg/mL d'ALA seul, et à 10µg/mL, elle passe d'environ 100natO/min/mgDW à environ 140natO/min/mgDW en présence de NAC (**Figure 49A** et **Tableau XII**). De plus, l'ajout de DP IX au milieu ne semble

pas modifier la vitesse de respiration en présence d'une faible concentration d'ALA contrairement à ce qui avait pu être montré en absence de NAC. En ce qui concerne la vitesse de prolifération, pour le WT, il apparaît qu'elle est plus faible en présence de NAC de même pour la condition 100 μ g/mL bien que dans une moindre mesure. Associée au fait qu'à 10 μ g/mL la vitesse soit plus importante en présence de NAC, ce résultat induit une absence de titration et une restauration du phénotype du WT en présence de NAC dès 10 μ g/mL ajouté (**Figure 49B**).

Lors de l'étude des activités des enzymes mitochondriales, il est apparu que l'ajout de NAC induisait une augmentation de l'activité de la COX et de la citrate synthase en fonction de la concentration d'ALA (**Figure 50A et B**). Ces activités restent également proportionnelles à la vitesse de respiration en présence de NAC avec un coefficient directeur égal à $r^2 = 0,9398$ pour l'activité COX et $r^2 = 0,919$ pour la citrate synthase (**Figure 50C et D**). Cependant, de la même façon que pour les deux paramètres précédents, l'ajout de DP IX ne semble pas permettre une augmentation de ces activités, associé à une faible concentration d'ALA. D'autre part, si la proportionnalité par rapport au WT est la même en présence ou en absence de NAC pour l'activité COX (**Tableau XIII**), en présence de NAC, l'activité citrate synthase est augmentée par rapport aux conditions ALA seul (**Tableau XIV**).

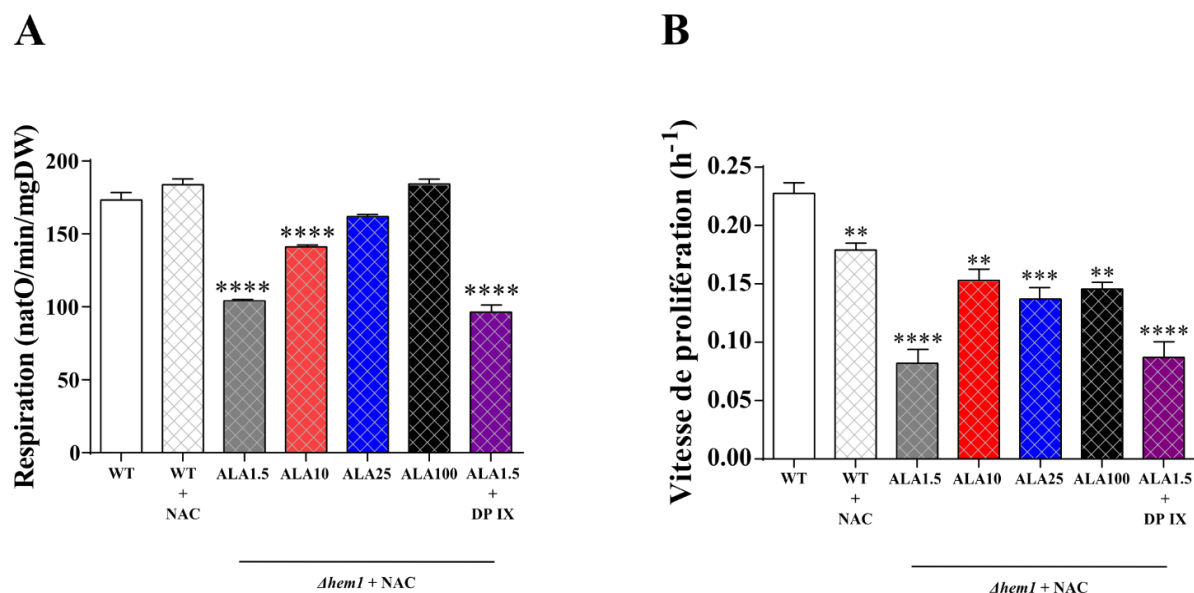


Figure 49. Effet de l'ajout du NAC sur la prolifération et la respiration

L'ensemble des expériences est effectué sur 3 heures afin que les données soient toujours obtenues sur des cellules en phase exponentielle de croissance. **A.** Les vitesses de respiration ont été mesurées quatre fois en 3 heures afin de s'assurer de l'état stationnaire des cellules puis moyennées afin d'obtenir une vitesse de respiration moyenne pour chaque condition. (n=6) **B.** Les vitesses de prolifération sont obtenues à partir de courbes de croissance réalisées en parallèle. Ces courbes de prolifération sont obtenues après mesure de la DO, rapportée ici en poids secs (voir **Tableau IV**), toutes les heures durant 3 heures. Les vitesses de prolifération sont calculées en suivant le calcul décrit dans la partie **3.3.1**. (n=6)

Tableau XII. Comparaison des flux de respiration des cellules WT et *Δhem1* à différentes concentrations d'ALA en présence (+) ou non (-) de NAC (± S.E.M)

	JO₂ en natO/min/mgDW	
	-NAC	+NAC
<i>WT</i>	171.6 (± 4.4)	183.4 (± 3.8)
<i>ALA5</i>	80.5 (± 2.9)	ND
<i>ALA1.5</i>	ND	104 (± 0.9)
<i>ALA10</i>	103.3 (± 4.3)	141 (± 1.5)
<i>ALA25</i>	159.3 (± 4.2)	161.9 (± 1.6)
<i>ALA100</i>	176.1 (± 3.1)	184.3 (± 3.4)
<i>ALA5 + DP IX</i>	149 (± 3.7)	ND
<i>ALA1.5 + DP IX</i>	ND	96.4 (± 4.8)

ND : non déterminé

Tableau XIII. Comparaison des activités COX des cellules WT et *Δhem1* à différentes concentrations d'ALA en présence (+) ou non (-) de NAC (%WT ± S.E.M)

	Activité Cytochrome c Oxydase	
	- NAC	+ NAC
<i>WT</i>	100	100
<i>ALA5</i>	36.3 (± 2.8)	ND
<i>ALA1.5</i>	ND	25.29 (± 4.8)
<i>ALA10</i>	56.85 (± 1.9)	62.82 (± 6.9)
<i>ALA25</i>	91.76 (± 8.3)	82.56 (± 3.7)
<i>ALA100</i>	117.3 (± 10.5)	82.23 (± 5.4)
<i>ALA5 + DP IX</i>	84.8 (± 6.3)	ND
<i>ALA1.5 + DP IX</i>	ND	5.68 (± 1.8)

ND : non déterminé

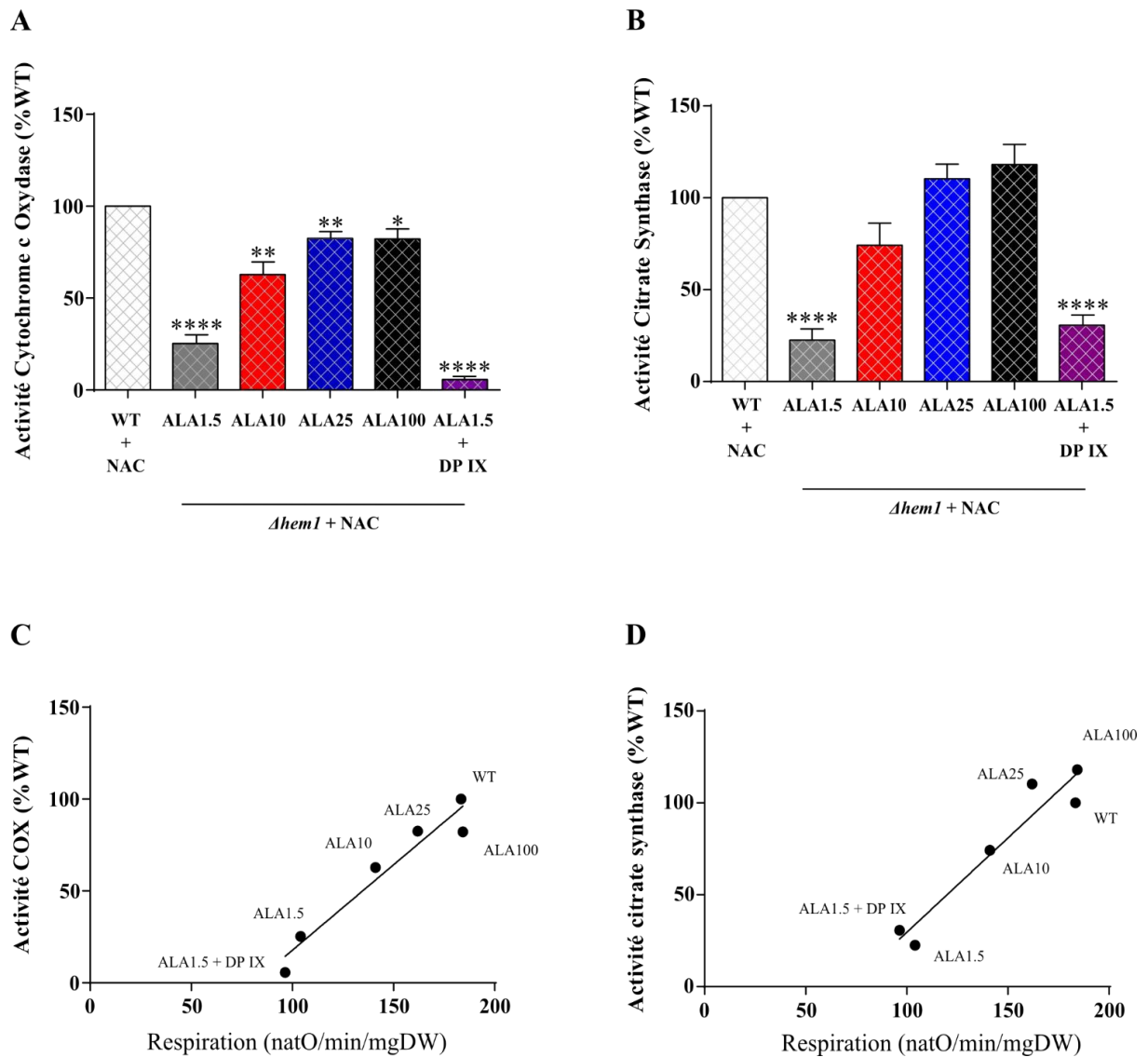


Figure 50. Effet de l'ajout du NAC sur les activités enzymatiques.

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 0,2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **A.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du WT pour chaque condition. (n=11) **B.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du WT pour chaque condition. (n=7)

Tableau XIV. Comparaison des activités citrate synthase des cellules WT et $\Delta hem1$ à différentes concentrations d'ALA en présence ou non de NAC (%WT \pm S.E.M)

	Activité Citrate Synthase	
	- NAC	+ NAC
<i>WT</i>	100	100
<i>ALA5</i>	31.21 (\pm 3.8)	ND
<i>ALA1.5</i>	ND	22.53 (\pm 6.2)
<i>ALA10</i>	47.76 (\pm 1.5)	74.19 (\pm 12)
<i>ALA25</i>	66.7 (\pm 5.5)	110.32 (\pm 7.9)
<i>ALA100</i>	102.74 (\pm 7.6)	118 (\pm 11.1)
<i>ALA5 + DP IX</i>	87.4 (\pm 6.7)	ND
<i>ALA1.5 + DP IX</i>	ND	30.64 (\pm 5.6)

ND : non déterminé

Pris tous ensemble ces premiers résultats tendent à montrer d'une part qu'à faible concentration d'ALA, l'ajout de NAC entraîne une augmentation de la vitesse de respiration et de l'activité des enzymes mitochondriales. En effet, une concentration de 1,5 μ g/mL induit des phénotypes comparables à ceux observés à 5 μ g/mL en l'absence de NAC. À forte concentration d'ALA, l'ajout de NAC ne semble pas modifier le phénotype des cellules. D'autre part, l'ajout de deutéroporphyrine IX ne semble avoir aucun effet après ajout du NAC. L'hypothèse est que l'ajout de NAC induise une réduction de l'hémoprotéine produite *via* la deutéroporphyrine et que cette hémoprotéine réduite ne puisse induire les phénotypes précédemment observés en absence de NAC.

3.6.4 Influence de l'anti oxydant sur la biogenèse mitochondriale

Dans un second temps, une étude sur le complexe HAP dans ces conditions a été réalisée afin de déterminer si le NAC et l'hème pouvaient avoir un effet synergique sur la régulation de Hap4p ou si la réduction de l'hème par le NAC induisait une diminution de la stabilité de la sous-unité régulatrice. Il apparaît que l'activité du complexe HAP augmente en fonction de la quantité d'ALA ajouté (**Figure 51A**). Dans son étude sur *Δtpk3*, le laboratoire a pu mettre en évidence que l'ajout de NAC dans le milieu ne modifie pas l'activité du complexe

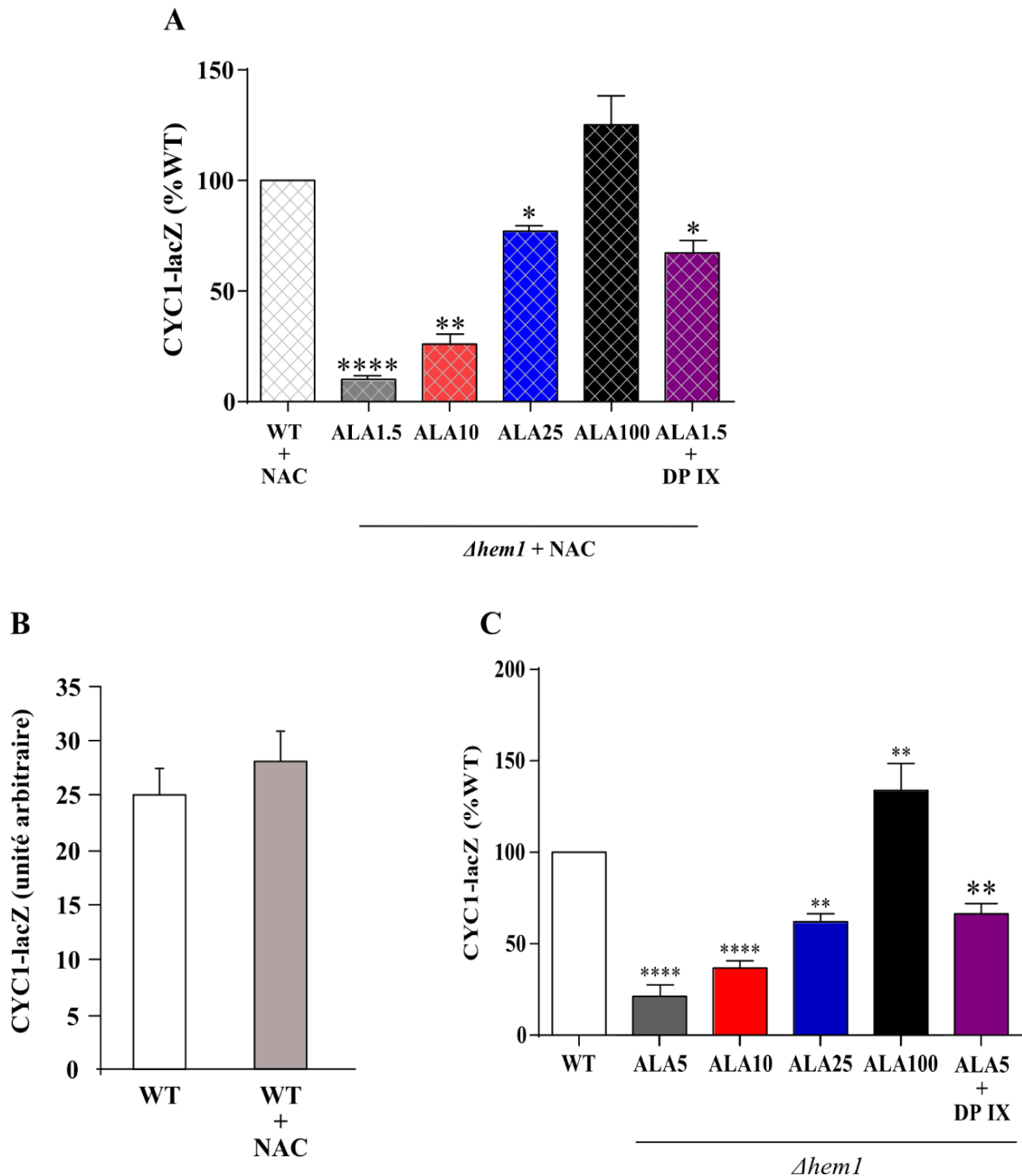


Figure 51. Effet de l'ajout du NAC sur l'activité du complexe HAP

A. L'activité β -gal a été mesurée sur IUDO et exprimée en pourcentage du WT en présence de NAC. (n=3) **B.** À partir des données de Chevtzoff *et al.*, 2010. **C.** Données issues des figures **29B** et **45A**. (n=5)

dans les cellules WT (**Figure 51B**). De ce fait, il est possible de comparer les activités du complexe dans les cellules *Δhem1* supplémentées par 10μg/mL, 25μg/mL ou 100μg/mL d'ALA en présence ou en absence de NAC en les comparant au phénotype observé dans le WT correspondant. L'ajout de NAC ne semble pas modifier l'augmentation de l'activité de HAP par rapport à celle obtenue en présence d'ALA seule (**Figure 51C**). En revanche, étonnamment, l'effet du DP IX semble maintenu en présence de NAC. J'ai vérifié que ce résultat n'était pas dû à une absorbance résultant du composé deutéroporphyrine en lui-même. Il est apparu qu'en l'absence d'ONPG, permettant la réaction observée, les cellules n'absorbent que très faiblement

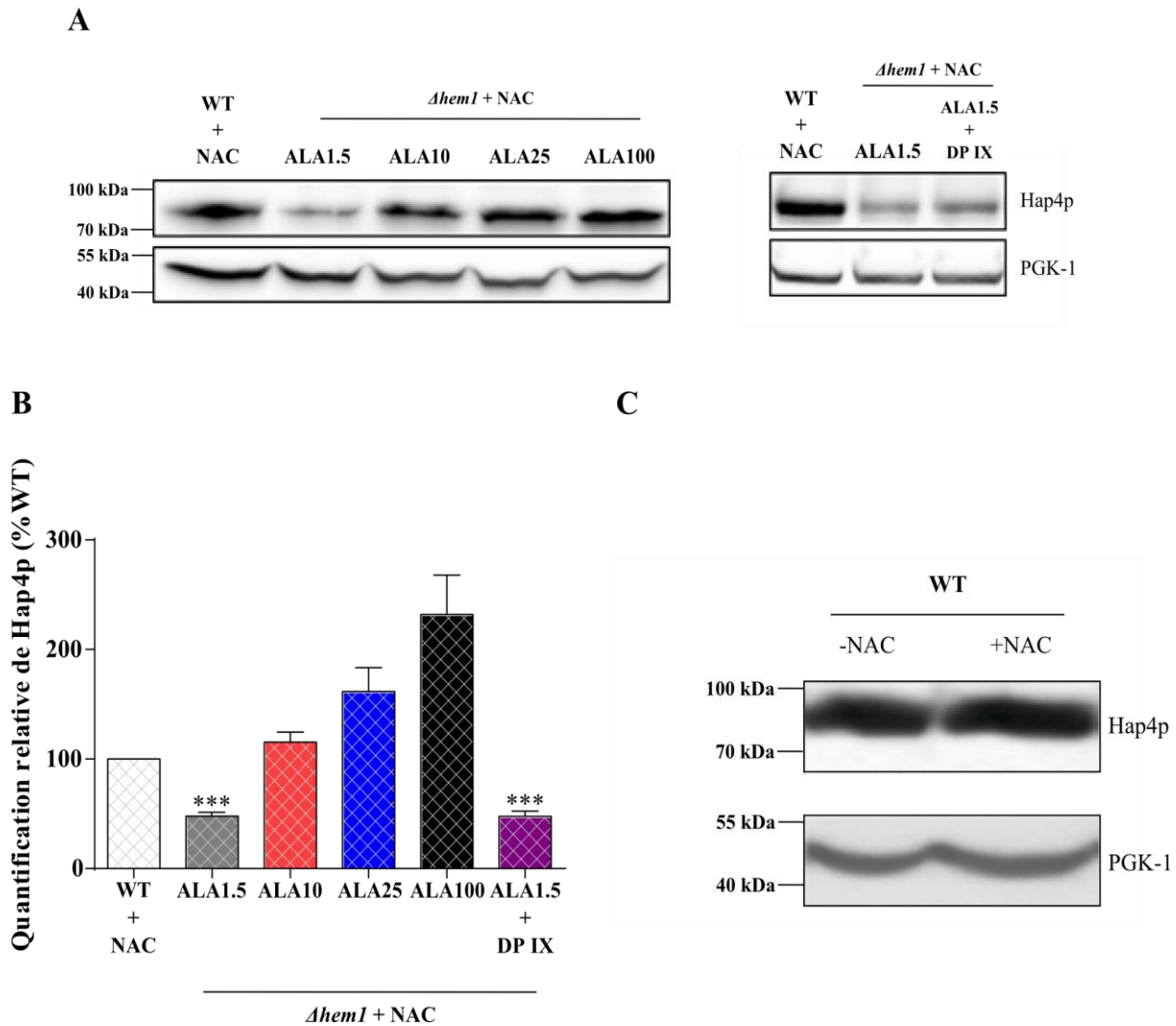


Figure 52. Effet de l'ajout du NAC sur l'activité du complexe HAP et la quantité relative de Hap4p

A. La quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot sur extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5SUDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du simple mutant. (n=5) **C.** À partir des données de la thèse de Yoboue.

(données non fournies). Le résultat observé ne semble donc pas venir d'un biais expérimental bien qu'il ne soit pas en adéquation avec les autres résultats.

La quantité relative de Hap4p est restaurée dès 10µg/mL (**Figure 52A et B**). Les données précédentes du laboratoire ont pu mettre en évidence que l'ajout de NAC au milieu ne modifiait pas la quantité de relative d'Hap4p dans les cellules WT (**Figure 52C**). Il est ainsi possible de comparer les quantités relatives de la protéine en présence ou en absence de NAC en les comparant au phénotype observé dans le WT correspondant pour les cellules supplémentées par 10µg/mL, 25µg/mL ou 100µg/mL d'ALA. L'ajout de NAC induit une augmentation de la quantité de Hap4p dans les cellules *Δhem1* (**Tableau XV**). L'ajout de DP IX, quant à lui, n'induit aucun changement de la quantité d'Hap4p à 1,5µg/mL (**Figure 52A et B et Tableau XV**).

Tableau XV. Quantité relative de Hap4p dans les cellules *Δhem1* à différentes concentration d'ALA en présence ou non de NAC (%WT ± S.E.M)

	Quantité relative Hap4p	
	-NAC	+NAC
<i>ALA5</i>	24.75 (± 2.8)	ND
<i>ALA1.5</i>	ND	47.8 (± 3.6)
<i>ALA10</i>	51.13 (± 7)	115.4 (± 9.3)
<i>ALA25</i>	125.75 (± 17.5)	161.6 (± 21.7)
<i>ALA100</i>	167.57 (± 27.4)	231.8 (± 36.1)
<i>ALA5 + DP IX</i>	155.86 (± 33)	ND
<i>ALA1.5 + DP IX</i>	ND	47.67 (± 4.8)

ND : non déterminé

En revanche, en ce qui concerne la stabilité de la protéine, les résultats semblent indiquer que ce paramètre varie peu. En effet, si 3 minutes après l'ajout du CHX, la protéine diminue au maximum de 40% pour la plupart des condition, diminution similaire à celle observable chez le WT en absence de NAC, à 7 minutes cette stabilité est toujours très faible pour toutes les conditions, diminution de 60% pour ALA1,5 et 10 et de 65 à 70% pour ALA25 et 100. Seule la condition supplémentée en DP IX induit une stabilité similaire aux cellules WT supplémentées avec le NAC à après 7 minutes (**Figure 53**). Ce résultat est surprenant car l'ajout de DP IX ne semble pas permettre d'augmenter la quantité relative d'Hap4p ni la majorité des

autres paramètres mesurés. Cependant, ce résultat associé au fait que l'ajout de deutéroporphyrine en présence de NAC induise une augmentation de l'activité du complexe HAP, pourrait montrer que, ici, la deutéroporphyrine IX a un effet similaire en présence ou en absence de NAC. Cela pourrait s'expliquer par le fait que l'ajout de DP IX induise une plus forte concentration d'homologue de l'hème labile que l'ajout d'ALA. Pourtant, les autres paramètres ne semblant pas être modifiés par l'ajout de DP IX, il est possible que le NAC agissent à d'autres niveaux sur cette voie de signalisation.

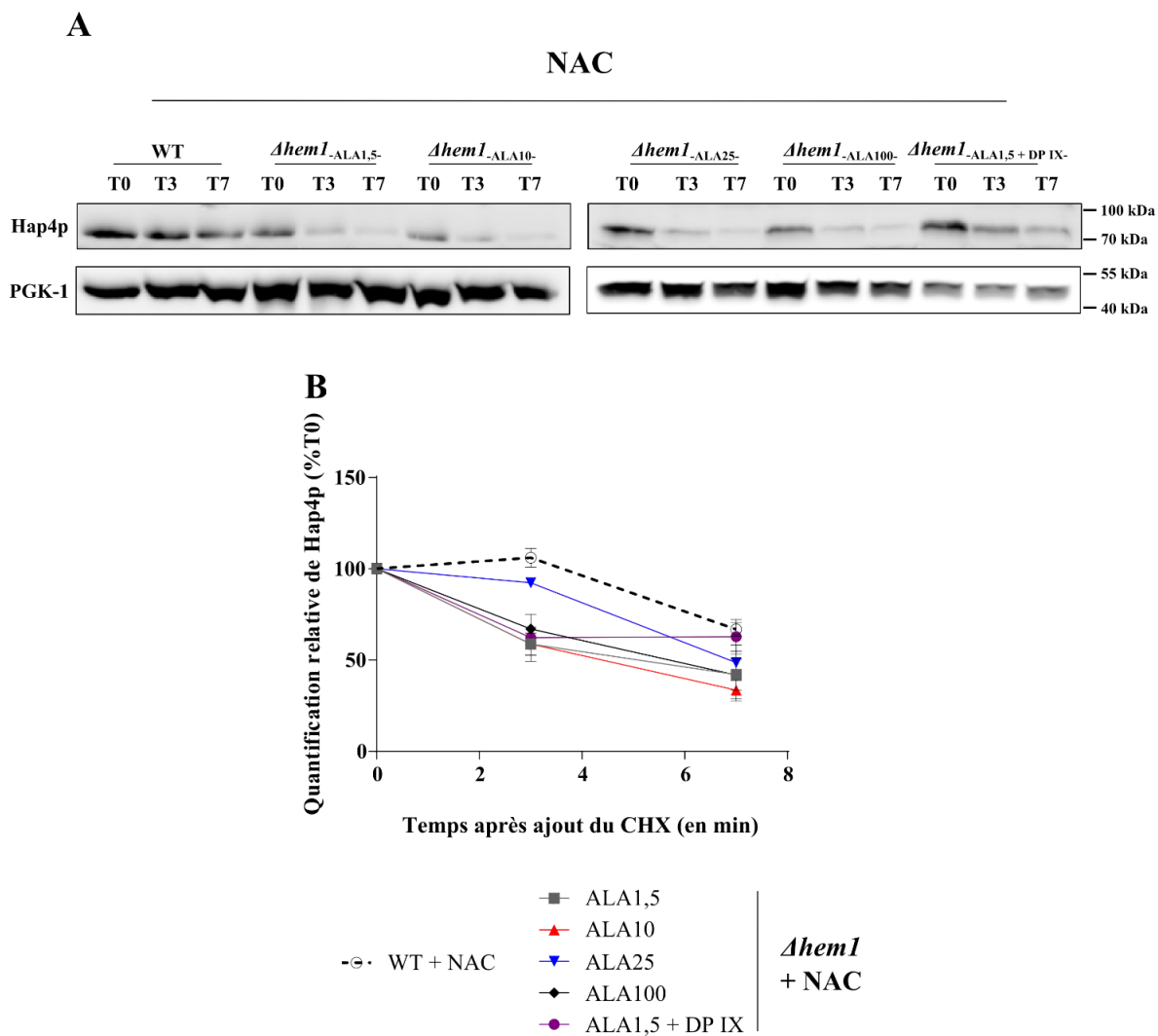


Figure 53. Effet de l'ajout du NAC sur la stabilité de Hap4p

A. Après ajout du CHX, la quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** La dégradation relative au cours du temps de Hap4p est déterminée dans les deux souches en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge puis à celle obtenue à T0. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=4)

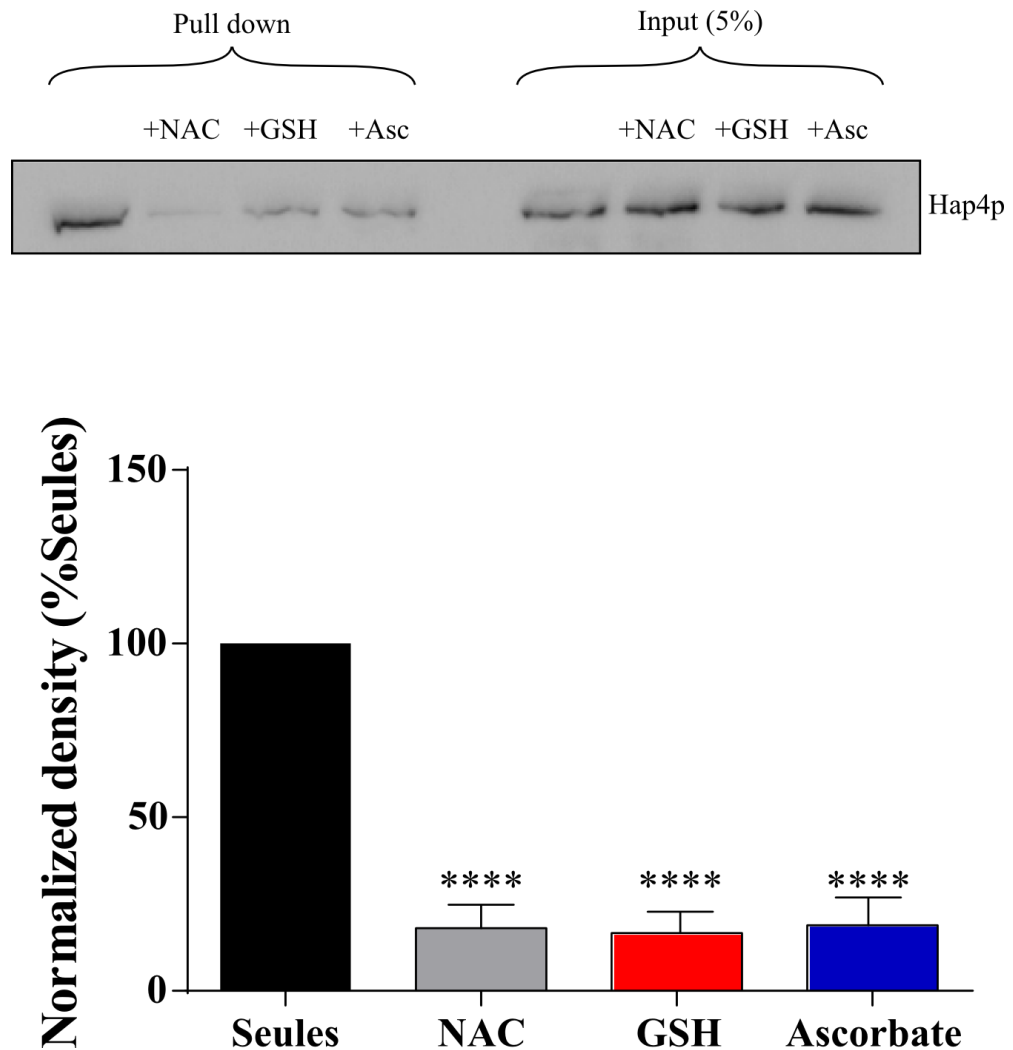




Figure 54. Effet des antioxydants sur l'interaction hémine/Hap4p

A. Co-précipitation après une pré-incubation des billes d'hémine en présence de 5mM de l'antioxydant correspondant. Puis le précipita est analysé par SDS-PAGE et Immunodétection. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les différentes conditions en la comparant à la quantité relative de la condition sans antioxydant. Le résultat est exprimé en pourcentage de cette condition. (n=2)

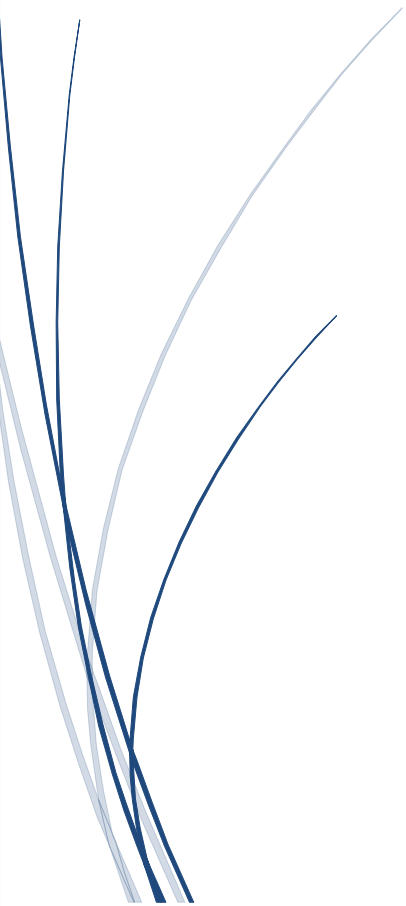
L'ensemble de ces résultats laissent à penser qu'il y ait deux effets séparés, suite à l'ajout des deux composés, sur la biogenèse mitochondriale dans les cellules *Ahem1*. En effet, il semble qu'à faible concentration d'ALA, le NAC augmente la biogenèse mitochondriale par rapport aux conditions d'ajout d'ALA seul. Cependant, à forte concentration d'ALA, le NAC a peu, voire pas d'effet, sur les paramètres observés excepté en ce qui concerne la quantité relative d'Hap4p. Le NAC semble alors induire une augmentation de la quantité d'Hap4p dans les cellules mais, ce, de façon indépendante à la régulation induite par l'hème. En effet, les résultats laissent à penser que le NAC induit une réduction de l'hème produit suite à l'ajout d'ALA. Cette réduction serait alors à l'origine d'une diminution de l'interaction entre l'hème et Hap4p. Ceci expliquerait l'absence d'un phénotype dû à l'ajout de deutéroporphyrine IX, non utilisable pour la formation des hémoprotéines et uniquement à l'origine des voies de signalisation

dépendante de l'hème, mais également l'absence d'une augmentation de la stabilité d'Hap4p due à l'interaction hème/Hap4p. Afin de vérifier cette hypothèse, une co-précipitation sur le lysat des cellules WT a été réalisée en présence de billes d'agarose sur lesquelles étaient fixées de l'hémine. Ces billes ont été au préalable incubées plusieurs en présence de différents antioxydants : du NAC, du glutathion réduit (GSH) ou de l'ascorbate. Après cette incubation, l'hémine doit être entièrement réduit. La **Figure 54** met en évidence qu'après une réduction de l'hème, la quantité d'Hap4p précipitée avec les billes et donc qui a pu interagir avec l'hème est très fortement réduite quel que soit l'antioxydant utilisé. Il semble donc que ce soit bel et bien la forme oxydée de l'hème qui est à l'origine de l'interaction avec Hap4p. Ainsi, l'ajout d'un antioxydant semble induire un effet inhibiteur sur la voie de signalisation de l'hème bien que cet ajout induise également une augmentation de Hap4p *via* l'impact que le stress oxydant peut avoir sur cette protéine (Chevtzoff et al., 2010; Yoboue, 2011).

Les résultats obtenus durant cette première étude ont permis de mettre en évidence l'existence d'une interaction entre l'hème sous sa forme labile oxydée et Hap4p, la sous-unité régulatrice du complexe HAP, à l'origine d'une augmentation de sa stabilité. Ainsi, cette voie de signalisation est à l'origine d'une augmentation de la biogenèse mitochondriale. En revanche, et bien que le NAC, par un contrôle redox, induit également une augmentation de cette biogenèse par une augmentation de la quantité d'Hap4p, son rôle d'antioxydant induit une diminution de l'interaction hème/Hap4p et donc de la stabilité de la protéine. Cela explique que l'effet du NAC soit visible à faible concentration d'ALA, lorsque la concentration d'hème produit est faible tout comme l'action de l'hème sur Hap4p. Dans ce contexte, le rôle du NAC sur l'hème est alors peu visible et donc seule l'augmentation de Hap4p par le NAC est remarquable. Il semble donc que la quantité de Hap4p soit, ici, régulée par deux voies de signalisation distinctes et pouvant avoir un impact l'une sur l'autre. L'hème en se liant à Hap4p augmente sa stabilité et donc réduit sa vitesse de dégradation. Cela conduit à une augmentation de sa quantité cellulaire. Le NAC semble également permettre une augmentation de la quantité globale de Hap4p mais sans augmentation notable de sa stabilité. Il est possible que la synthèse d'Hap4p augmente *via* une diminution du stress oxydant due à la présence du NAC, augmentant alors la quantité de Hap4p.



Chapitre 4 Etude de la
répression glucose sur la
biogenèse mitochondriale
via Hap4p



4.1 Introduction

4.1.1 Le cas de la cellule saine

Dans les cellules eucaryotes, des voies anaboliques et cataboliques sont à l'origine de la prolifération cellulaire. L'ATP est la molécule centrale dans les processus de conversion d'énergie et peut être synthétisée par deux types de réactions : la phosphorylation au niveau du substrat, qui est possible par la glycolyse et le cycle de Krebs, et la phosphorylation oxydative mitochondriale. Il est connu depuis longtemps que les cellules en prolifération sont principalement glycolytiques (O'Connor, 1950). Cependant, dans la plupart des cellules saines différenciées chez les mammifères, les mitochondries jouent un rôle dans la conversion énergétique, car elles synthétisent la majorité de l'ATP cellulaire (**Figure 55**). En effet, il est bien connu que le rendement énergétique de la phosphorylation oxydative et de la glycolyse est très différent, car lorsqu'un glucose est oxydé, la glycolyse génère deux molécules d'ATP, tandis que les mitochondries peuvent en générer au moins dix fois plus mais nécessitent de l'oxygène, l'accepteur final d'électrons de la chaîne respiratoire. Ainsi, en condition aérobie, c'est-à-dire en présence d'oxygène, la mitochondrie est le principal fournisseur d'ATP et le glucose est alors à l'origine d'un flux secondaire de synthèse d'ATP *via* la glycolyse (pour revue (Lunt and Vander Heiden, 2011)). Lorsque la concentration en oxygène diminue, la consommation du glucose et le flux glycolytique augmentent et la vitesse de respiration diminue. La glycolyse permet alors une synthèse rapide d'ATP permettant de compenser la diminution de la vitesse de la phosphorylation oxydative et donc devient la première source d'énergie de la cellule (Pfeiffer et al., 2001). Ce processus est associé à une augmentation de la fermentation et donc à une production d'acide lactique chez le mammifère permettant la réoxydation du NADH cytosolique (**Figure 56**).

Comme expliqué dans le chapitre précédent, les levures sont capables de proliférer en absence totale de glycolyse sur milieu dit purement respiratoire, tel que le lactate par exemple. La dégradation du substrat carboné se fait au niveau de la chaîne respiratoire et le système des OXPHOS est alors le fournisseur d'ATP. Dans de telles conditions, les cellules sont alors dépendantes de la présence d'oxygène (**Figure 56**).

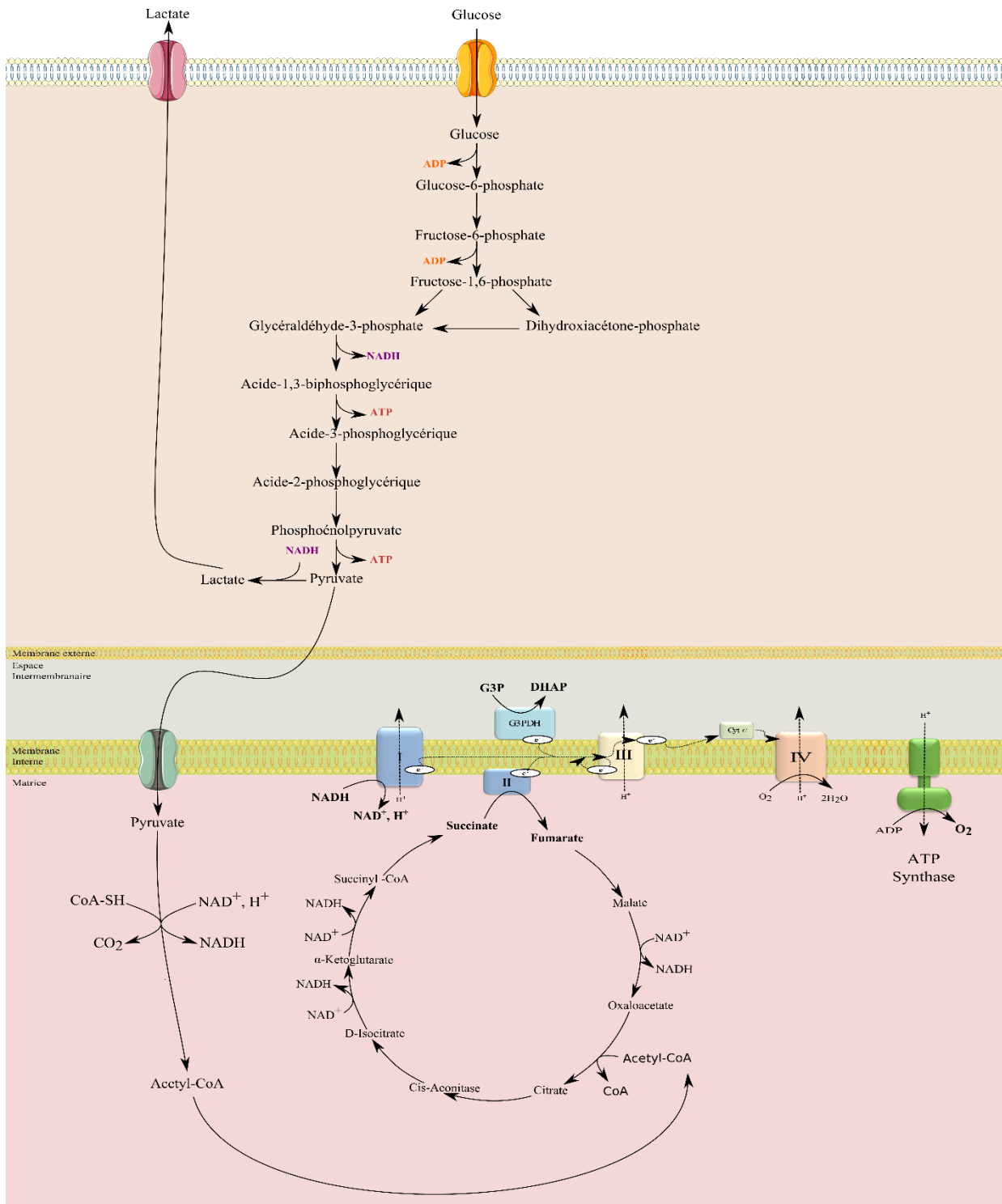


Figure 55. Illustration de la glycolyse, des OXPHOS et du cycle de Krebs des cellules de mammifères

I: NADH déshydrogénase ; II: Succinate déshydrogénase ; G3PDH: glycérol-3-phosphate déshydrogénase ; III: Cytochrome c réductase ; Cyt c: Cytochrome c ; IV: Cytochrome c Oxydase (COX).

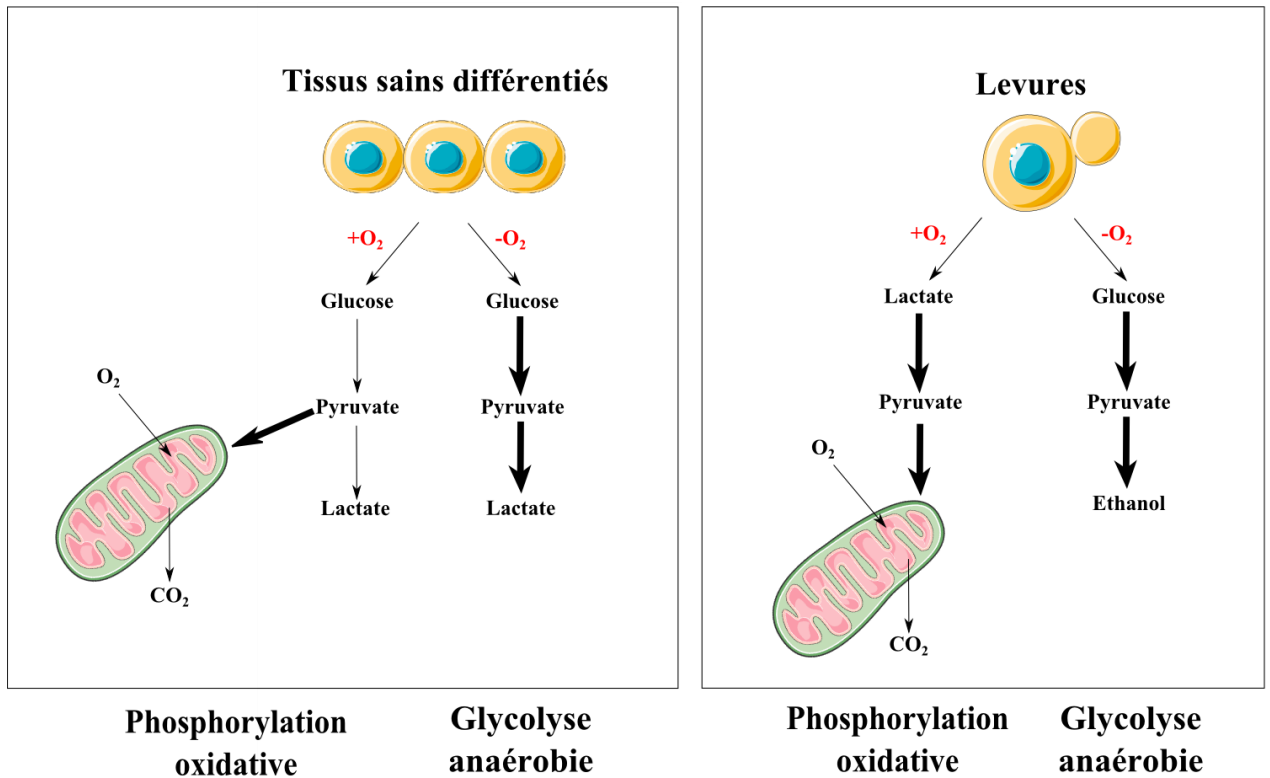


Figure 56. Illustration des différences entre l'oxydation phosphorylante et la glycolyse anaérobie

En présence d'oxygène, les cellules non prolifératives métabolisent le glucose en pyruvate *via* la glycolyse puis oxydent la majorité du pyruvate dans la mitochondrie en utilisant le système des OXPHOS. Quand la quantité d'oxygène est limitée ou absente, les cellules redirigent le flux glycolytique vers la fermentation et transforment le pyruvate en lactate. La levure agit de manière similaire suivant le milieu fourni, cependant la levure subit une fermentation alcoolique et non lactique et forme donc de l'éthanol à l'issue de cette voie. En absence d'oxygène, la levure a besoin d'un milieu fermentescible tel que le glucose pour sa survie, ne pouvant pas utiliser les voies mitochondriales pour la synthèse d'ATP et la réoxydation des substrats tel que le NADH.

4.1.2 Le glucose dans la cellule saine

Le glucose est le sucre simple le plus abondant de l'organisme et occupe une position centrale dans le métabolisme. Suite à son import au sein de la cellule, il a trois destinées majeures : il peut soit être oxydé en pyruvate par les enzymes de la glycolyse, soit oxydé par la voie des pentose phosphates pour donner du ribose-5-phosphate, précurseur des acides nucléiques, et du NADPH, ayant un pouvoir réducteur nécessaire aux réactions de biosynthèse, soit il peut servir de réserve énergétique sous la forme de polysaccharide, en amidon ou glycogène, par exemple.

4.1.2.1 Entrée du glucose dans la cellule

Chez les eucaryotes, le passage du glucose du milieu extracellulaire vers le cytoplasme n'est possible qu'à travers des structures glycoprotéiques incorporées dans la membrane

plasmique appelées perméases ou transporteurs du glucose, le glucose étant une molécule polaire hydrophile.

Dans les cellules humaines, quatorze isoformes de perméases de type GLUT ont été mises en évidence (Zhao, 2014). Parmi ces isoformes, seules cinq, les GLUT1 à GLUT5, ont été caractérisées dans le 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 présentes dans tous les tissus des mammifères, GLUT2 est essentiellement exprimée dans les hépatocytes, les cellules β des îlots de Langerhans et les cellules de la membrane basolatérale de l'intestin grêle (Thorens and Mueckler, 2010). GLUT4 est exprimée 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 (Burant et al., 1992; Thorens and Mueckler, 2010). 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 striés après GLUT4 (Stuart et al., 2006; Thorens and Mueckler, 2010).

Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le transport du glucose est assuré par des perméases de type HXT (hexose transporter). Il en existe dix-sept isoformes (Kruckeberg, 1996; Diderich et al., 1999; Leandro et al., 2009). Ces transporteurs membranaires permettent préférentiellement l'entrée du glucose (Boles and Hollenberg, 1997), mais peuvent également transporter le fructose et le mannose (Bisson et al., 1993). 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).

Les HXT sont divisés en 3 catégories distinctes en fonction de leurs affinités pour le glucose : les HXT à faible affinité avec un K_m de 40 à 100mM qui comptent HXT1 et HXT3 par exemple, les HXT à affinité modérée avec un K_m de 10 à 15mM, HXT4 par exemple et les HXT à haute affinité avec un K_m de 1 à 3mM, comme HXT6 et HXT7 (Reifenberger et al., 1997). Le transporteur HXT2, quant à lui, peut exister sous deux conformations : avec une affinité élevée (K_m de 2mM) et avec une affinité modérée (K_m 10mM), en fonction de la

concentration du glucose dans l'environnement (Reifenberger et al., 1997; Diderich et al., 2001). Les HXT5, HXT6 et HXT7 sont principalement exprimés dans des conditions de stress suite à un appauvrissement en glucose (Gancedo, 1998; Diderich et al., 1999; Verwaal et al., 2002; Klockow et al., 2008).

Le transport se produit avec une faible affinité dans les cellules cultivées dans des milieux riches en glucose. Un transporteur supplémentaire de haute affinité est exprimé dans les cellules cultivées dans des milieux contenant des concentrations d'hexose limitantes (Coons et al., 1995; Gamo et al., 1995). Ainsi, la levure s'adapte à la concentration d'hexoses dans son environnement en exprimant un système de transport qui a une affinité au substrat appropriée à ces conditions (Kruckeberg, 1996).

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 milieu extracellulaire vers le cytosol. Ce gradient de concentration est maintenu, par la transformation immédiate du glucose en glucose-6-phosphate (G6P). Cette étape de phosphorylation est primordiale : elle empêche le glucose de ressortir vers l'extérieur et elle permet aussi d'engager plusieurs voies métaboliques, telle que la glycolyse.

4.1.2.2 Rôle du glucose dans la prolifération cellulaire

Chez les organismes unicellulaires, la prolifération et la croissance cellulaire sont directement influencées par les conditions environnementales. La disponibilité en nutriments dans l'environnement est à l'origine du processus de prolifération permettant la prolifération et la production de biomasse. Chez les mammifères, et du fait de la pluricellularité de l'organisme, l'abondance en nutriments n'est pas le seul facteur dont dépend le mécanisme de prolifération. Cependant, le glucose reste un élément clef dans la mise en place de la division cellulaire. En effet, la duplication du contenu cellulaire durant la division de la cellule implique un besoin important en ATP et en précurseur de biomolécules telles que les nucléotides, les acides aminés et les lipides. Ainsi, une carence en nutriments, tel que le glucose, provoque un ralentissement, voire un arrêt, de cette division. Une quantité suffisante de molécules énergétiques et d'intermédiaires métaboliques est donc nécessaire pour soutenir les voies anaboliques et permettre la prolifération cellulaire ainsi que l'augmentation de la biomasse.

Dans ces conditions de prolifération, le glucose occupe un rôle essentiel (**Figure 57**). Comme dit précédemment, il permet la production rapide d'ATP *via* la glycolyse, d'une part, et permet l'alimentation en substrats de la chaîne respiratoire par la production de pyruvate d'autre part. Il est également source d'intermédiaires métaboliques nécessaires à la synthèse de biomolécules, tels que les ribosomes et le NADPH par les voies des pentoses phosphates (Tong

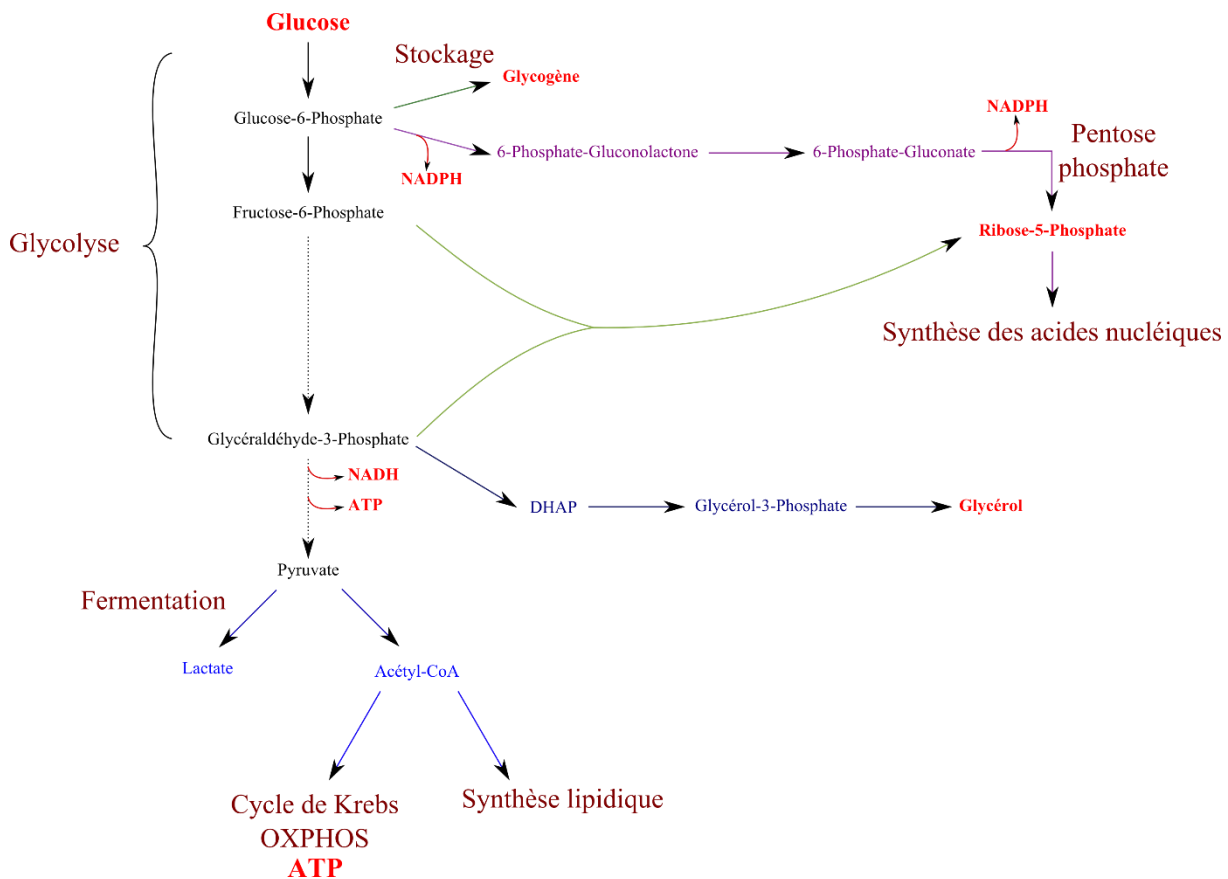


Figure 57. Le devenir du glucose

Le glucose est métabolisé à travers la glycolyse et permet de former du pyruvate mais également des molécules de stockage, il peut également servir à la formation du glycérol ou la synthèse des acides nucléiques ou des lipides.

et al., 2009), les acides aminés non essentiels (Locasale et al., 2013) ou le citrate pour la synthèse lipidique *via* le pyruvate ou encore le 3-Phosphoglycérate et le glycérol par la DHAP (pour revue (Deberardinis et al., 2008)). Cependant, l'essentiel du flux glycolytique est utilisé afin d'alimenter les voies mitochondriales de synthèse d'ATP.

4.1.3 Rôle répresseur du glucose

Ainsi, bien qu'en conditions aérobies les mitochondries *via* le système des oxydations phosphorylantes soient les producteurs principaux d'ATP, il semble que dans des tissus dans lesquels les cellules prolifèrent, le glucose et la mise en place d'une glycolyse soutenue sont essentiel pour le métabolisme et le maintien de la prolifération cellulaire, sans que l'on sache réellement pourquoi. Cette glycolyse est alors qualifiée d'aérobie. Le lien entre la vitesse de prolifération et la glycolyse a beaucoup été étudiée et s'expliquerait par les exigences métaboliques pour la prolifération au-delà de l'ATP, y compris pour la synthèse de nucléotides liée à la voie des pentoses phosphates, la génération d'acides aminés pour la synthèse des protéines et la production de lipides pour la formation de membranes (Vander Heiden et al., 2009; Lunt and Vander Heiden, 2011; Jones and Bianchi, 2015). Ce mécanisme s'accompagne alors d'une importante excrétion de lactate, produit fermentaire issu de la glycolyse (Figure

58). En effet, dans ce contexte de forte induction de la glycolyse, le pyruvate ainsi formé est principalement transformé en lactate (environ 90% du pyruvate formé) au lieu d'être transformé dans la mitochondrie (Lunt and Vander Heiden, 2011; Dienel and Cruz, 2016). La vitesse de respiration mitochondriale diminue alors en parallèle de l'augmentation du flux glycolytique.

La glycolyse aérobie est donc impliquée dans le métabolisme des cellules en prolifération et semble essentielle au maintien de ce phénotype. Ce comportement a pu être également mis en évidence dans les cellules cancéreuses où la vitesse de prolifération est un élément clef à la tumorigénèse. Cette glycolyse aérobie, décrite dans les années 50 par Otto Warburg, s'appelle alors effet Warburg.

Cette glycolyse aérobie est également présente chez les espèces unicellulaires telles que la levure. La souche *S. cerevisiae* doit pouvoir adapter son métabolisme afin de répondre à sa demande énergétique dans le but de survivre (**Figure 58**). Dans un environnement riche en glucose, la fermentation est la principale voie métabolique du carbone et du métabolisme énergétique. Chez la levure, la fermentation est alcoolique et permet donc une production d'éthanol. En revanche, lorsqu'une source de carbone non fermentescible, tel que le lactate, est présente, la phosphorylation oxydative est la principale voie de production d'énergie (Gancedo, 1998).

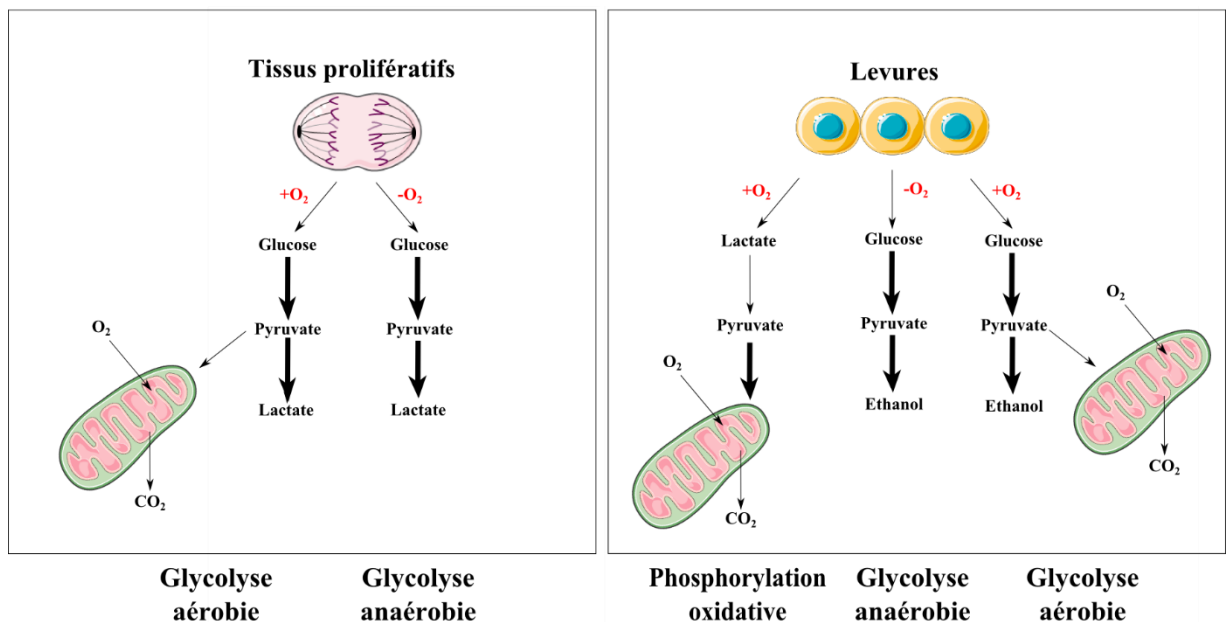


Figure 58. Illustration des différences entre la glycolyse aérobie et anaérobie

Les cellules en prolifération favorisent la voie glycolytique/fermentaire en présence ou non d'oxygène. Ce phénomène est appelé glycolyse aérobie. Ce mécanisme existe aussi chez la levure en présence de glucose. Malgré la présence d'oxygène, l'utilisation du glucose chez la levure entraîne une favorisation de la voie glycolytique/fermentaire au détriment des voies mitochondriales de réoxydation du NADH et de synthèse d'ATP. Le métabolisme observé est alors proche de celui induit par une absence d'oxygène.

Le glucose est la source de carbone consommée préférentiellement par la levure, quelle que soit la présence d'oxygène ou d'autres sources de carbone non fermentescibles. Les levures ayant un métabolisme fermentaire ont une prolifération plus rapide que celles utilisant le système des oxydations phosphorylantes (Rolland et al., 2002). Si du glucose est ajouté pendant la prolifération aérobie des levures, une répression de la respiration est immédiatement mise en place. Ce phénomène est appelé effet Crabtree, c'est une répression à court terme. À long terme, la présence de glucose dans le milieu entraîne, une mise en place de la glycolyse en même temps que la production d'éthanol augmente (Van Urk et al., 1990). Il apparait alors un métabolisme semblable à celui initié dans les cellules de mammifères par la glycolyse aérobie. Cette dernière implique la diminution des protéines liées au métabolisme gluconéogène et oxydatif et l'augmentation de la transcription des enzymes glycolytiques et des transporteurs de glucose (Thevelein, 1994; Gancedo, 1998; Santangelo, 2006; Christen and Sauer, 2011; Lunt and Vander Heiden, 2011).

4.1.4 L'effet Warburg

Chez les cellules cancéreuses et même si elles ont un accès à une concentration normale d'oxygène *via* la circulation sanguine (Warburg, 1956b; Semenza et al., 2001; Gatenby and Gillies, 2004), l'utilisation des voies mitochondriales, voies les plus avantageuses énergétiquement, est souvent diminuée (Warburg, 1956b, 1956a). Cela se traduit alors par une augmentation de la consommation de glucose et une mise en place préférentielle de la glycolyse, compensant la perte énergétique due à la diminution de l'activité des OXPHOS

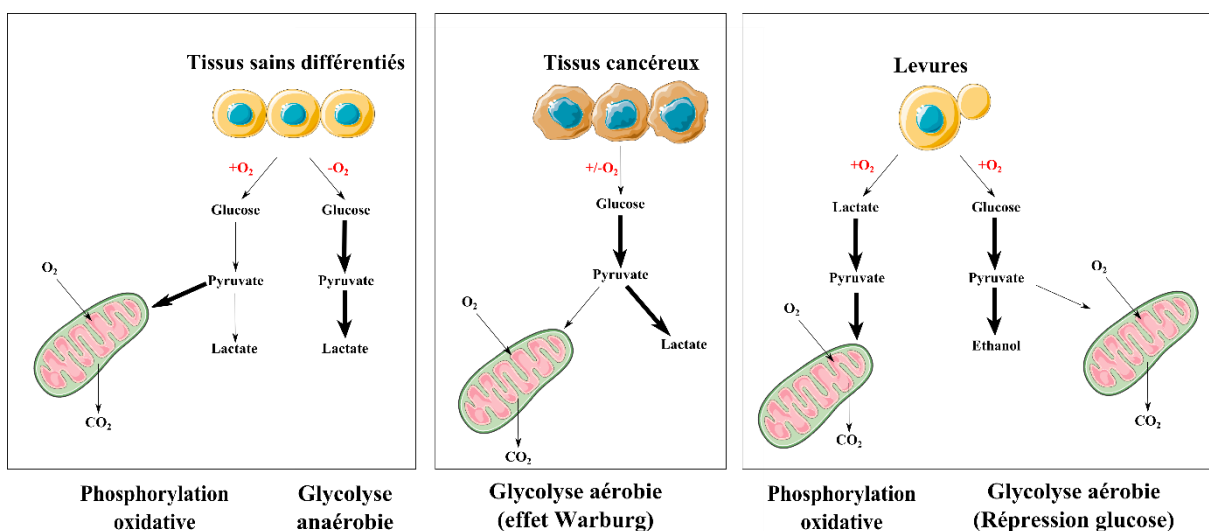


Figure 59. Illustration de l'effet Warburg

Tout comme les cellules en prolifération ou les levures, les cellules cancéreuses mettent aussi en place la glycolyse aérobie, c'est-à-dire qu'elles favorisent la voie glycolytique/fermentaire par rapport aux voies mitochondriales quelque soit la concentration d'oxygène à leur disposition.

(Liberti and Locasale, 2016). Dans ces cellules, la prolifération est très active, ce qui peut expliquer le besoin de cette glycolyse aérobie (Hanahan and Weinberg, 2011).

Ce phénomène présent dans la plupart des cancers a été mis en évidence dès le début du XXe siècle par Otto Warburg : une consommation accrue de glucose entraînant une augmentation du flux glycolytique et fermentaire et induisant une diminution de la vitesse de respiration, associé à un pouvoir prolifératif plus important (Warburg, 1956b, 1956a; Wu and Zhao, 2013). Dans ce contexte, la glycolyse aérobie a été nommée effet Warburg et le remodelage métabolique se déroulant entre les voies mitochondriales et la voie glycolytique-fermentaire s'est posée comme origine de la tumorigénèse (Warburg, 1956b) (**Figure 59**). Il est, aujourd'hui, encore considéré comme un marqueur clef de cette tumorigénèse (Hanahan and Weinberg, 2011).

Cependant, il est aujourd'hui connu que les mutations subies *via* des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs sont supposés être à l'origine de la tumorigénèse et l'effet Warburg est considéré comme étant une des nombreuses conséquences de la transformation cellulaire ayant lieu durant le développement de la tumeur (pour revue (Weinhouse, 1976; Grandér, 1998; Hsu and Sabatini, 2008; Vander Heiden et al., 2009; Hanahan and Weinberg, 2011)). Il est alors possible de se demander si la mise en place de la glycolyse aérobie est importante pour le maintien du phénotype cancéreux ou juste un effet secondaire dû à la tumeur. Ce mécanisme peut effectivement conférer des avantages à la cellule tumorale. Il a souvent été décrit que l'inhibition de la respiration cellulaire provoquée par la mise en place de l'effet Warburg permettrait de se préparer à l'hypoxie que subit une tumeur en grossissant. Cependant, la mise en place de cet effet se déroulant bien avant que les cellules ne subissent cette hypoxie et étant conservée même chez les cellules en culture en hyperoxie, cette explication ne semble pas satisfaisante (Deberardinis et al., 2008; Jones and Thompson, 2009; Semenza, 2010). L'effet Warburg semble, néanmoins, avoir de nombreux avantages pour le cancer. Il permet, d'une part, l'augmentation de la consommation de glucose, mais également la formation de précurseurs utilisables pour la prolifération cellulaire, déjà cités précédemment (Vander Heiden et al., 2009; Liberti and Locasale, 2016). L'augmentation de la sécrétion du lactate semble également être bénéfique pour le microenvironnement tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011). En effet, il a pu être mis en évidence que l'excrétion du lactate avait de nombreux avantages pour la tumeur comme une réduction de la réponse immunitaire (Brand et al., 2016), un recrutement des macrophages associés aux tumeurs (TAM) (Colegio et al., 2015; Liu et al., 2017) ou un rôle pro-angiogénique *via* les TAM (Porporato et al., 2012; Ruan and Kazlauskas, 2013; Wenes et al., 2016). Il a également été mis en évidence que le lactate excrété pouvait être pris en charge par d'autres sous populations d'une même tumeur afin de former du pyruvate

dans ces cellules, le lactate devient alors un substrat carboné pour les cellules tumorales (Sonveaux et al., 2008). Par ailleurs, la mise en place de la glycolyse aérobie est permise par l'activation de nombreux oncogènes associés à la perte de suppresseurs de tumeur tels que RAS ou Akt ou encore Myc (Dang, 2012; DeBerardinis and Chandel, 2016; Pavlova, N.N.; Thompson, 2016).

4.1.5 Influence sur le réseau mitochondrial

Le pool mitochondrial a de nombreux rôles au sein des différentes voies métaboliques tant dans la survie et la mort cellulaire – régulation de la famille BCL2 et contrôle de l'apoptose *via* le relargage du cytochrome c (Cory and Adams, 2002) - que dans la réponse aux demandes énergétiques de la cellule – système des oxydations phosphorylantes : synthèse d'ATP et réoxydation du NADH - et dans le stress oxydatif –génération de ROS (Sena and Chandel, 2013).

De ce fait, les mitochondries sont une cible privilégiée lors de la mise en place du cancer (Zong et al., 2016; Vyas et al., 2017). Il a pu être observé que dans de nombreux cancers, des défauts fonctionnels s'accumulaient dans les mitochondries. Warburg a proposé plus tard que les mitochondries dysfonctionnelles sont à l'origine de la glycolyse aérobie (Warburg, 1956b). La première conséquence de ces défauts mitochondriaux est une diminution de l'activité de phosphorylation oxydative (Warburg, 1956a). L'augmentation du flux glycolytique et de la fermentation concomitante à la diminution de la phosphorylation oxydative compenserait la diminution de la synthèse d'ATP par le système des OXPHOS ainsi que l'oxydation du NADH par fermentation. L'effet Warburg serait alors une alternative utilisée par la cellule cancéreuse pour garantir sa survie suite à un dysfonctionnement irréversible des fonctions mitochondriales. Cependant, il a été démontré que cette diminution peut également être liée à une diminution de la quantité cellulaire de mitochondries, et ce, sans défaut mitochondrial. Dans leur étude sur une lignée cellulaire du cancer du sein, Wallace et son équipe ont montré qu'une augmentation de la biogenèse mitochondriale diminuait la prolifération cellulaire et augmentait la sensibilité aux médicaments, grâce à une augmentation de l'activité des OXPHOS (Skildum et al., 2011). D'autre part, l'équipe de Head a montré que dans les cellules ayant mis en place un effet Warburg, l'addition de mitochondries non dysfonctionnelles induit une diminution du flux glycolytique ainsi que de la prolifération cellulaire ce qui renforce l'idée qu'une diminution de la phosphorylation oxydative est à l'origine du remodelage métabolique de l'effet Warburg (Jiang et al., 2015). Il a pu être également montré qu'en l'absence de fermentation, une diminution de la prolifération des cellules tumorales ainsi qu'une augmentation de la phosphorylation oxydative pouvaient être mises en évidence (Fantin et al., 2006). D'autre part, de plus en plus d'études soumettent l'hypothèse que le remodelage métabolique et la mise en

place du flux glycolytique/fermentation ne serait pas tant à l'origine de la formation rapide et importante d'ATP mais plutôt d'un maintien de l'équilibre redox cellulaire (Locasale and Cantley, 2011). Néanmoins, de nombreuses preuves remettent en question le paradigme de la cellule cancéreuse purement « glycolytique » (Moreno-Sanchez et al., 2007). Certaines lignées cellulaires de gliome, d'hépatome et de cancer du sein possèdent des mitochondries fonctionnelles et obtiennent leur ATP principalement par phosphorylation oxydative (Martin et al., 1998; Guppy et al., 2002; Pasdois et al., 2003; Rodríguez-Enríquez et al., 2006).

4.1.6 Problématique

Ainsi, si l'effet Warburg n'est pas à l'origine du cancer, il semble quand même être un élément central de son métabolisme et semble étroitement lié à une régulation du pool mitochondrial. Durant cette partie de ma thèse, je me suis donc intéressée aux mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet Warburg. Cette étude a donc nécessité l'observation d'une cinétique de mise en place de ce phénomène dans un premier temps mais également à essayer de réverser cet effet afin de pouvoir en étudier les conséquences métaboliques.

Afin d'étudier cette problématique, nous avons utilisé un modèle levure, *Saccharomyces cerevisiae*. Ce modèle est intéressant pour plusieurs raisons. D'une part, la répression du métabolisme oxydatif glucose dépendante présente chez la levure est identique à la reprogrammation métabolique due à l'effet Warburg dans les cellules cancéreuses. En effet, la levure subit alors une glycolyse aérobie induisant une diminution de la vitesse de respiration, augmentation de la voie fermentaire ainsi qu'une augmentation de la vitesse de prolifération. La répression glucose de la levure est d'ailleurs régulée par des protéines homologues aux oncogènes chez le mammifère, tels que RAS et Sch9p, homologue de la protéine Akt chez la levure (Guaragnella et al., 2014). De plus, la plupart des cellules mammifères permettant l'étude de l'effet Warburg sont cultivées dans des conditions hyperglycémiques (22,5mM de glucose) et hyperoxiques (à 21% d'O₂). Ce sont deux paramètres cruciaux lors de l'étude du métabolisme énergétique cellulaire, le glucose étant à l'origine de la glycolyse et l'oxygène étant l'accepteur final d'électrons dans la chaîne respiratoire. Dans ces cellules, la modification métabolique est, de plus, déjà en place, ce qui ne permet pas alors une étude des mécanismes moléculaires à l'origine de cet effet. L'utilisation de la levure, qui peut être étudiée dans un milieu non fermentescible où la glycolyse n'est pas présente, a comme avantage de permettre l'étude de la mise en place de ce remodelage métabolique par l'ajout de glucose extemporanément et donc de pouvoir étudier les mécanismes d'induction de l'effet Warburg.

Pour plus de clarté, durant la suite du manuscrit, la glycolyse aérobie sera indistinctement assimilée à l'effet Warburg.

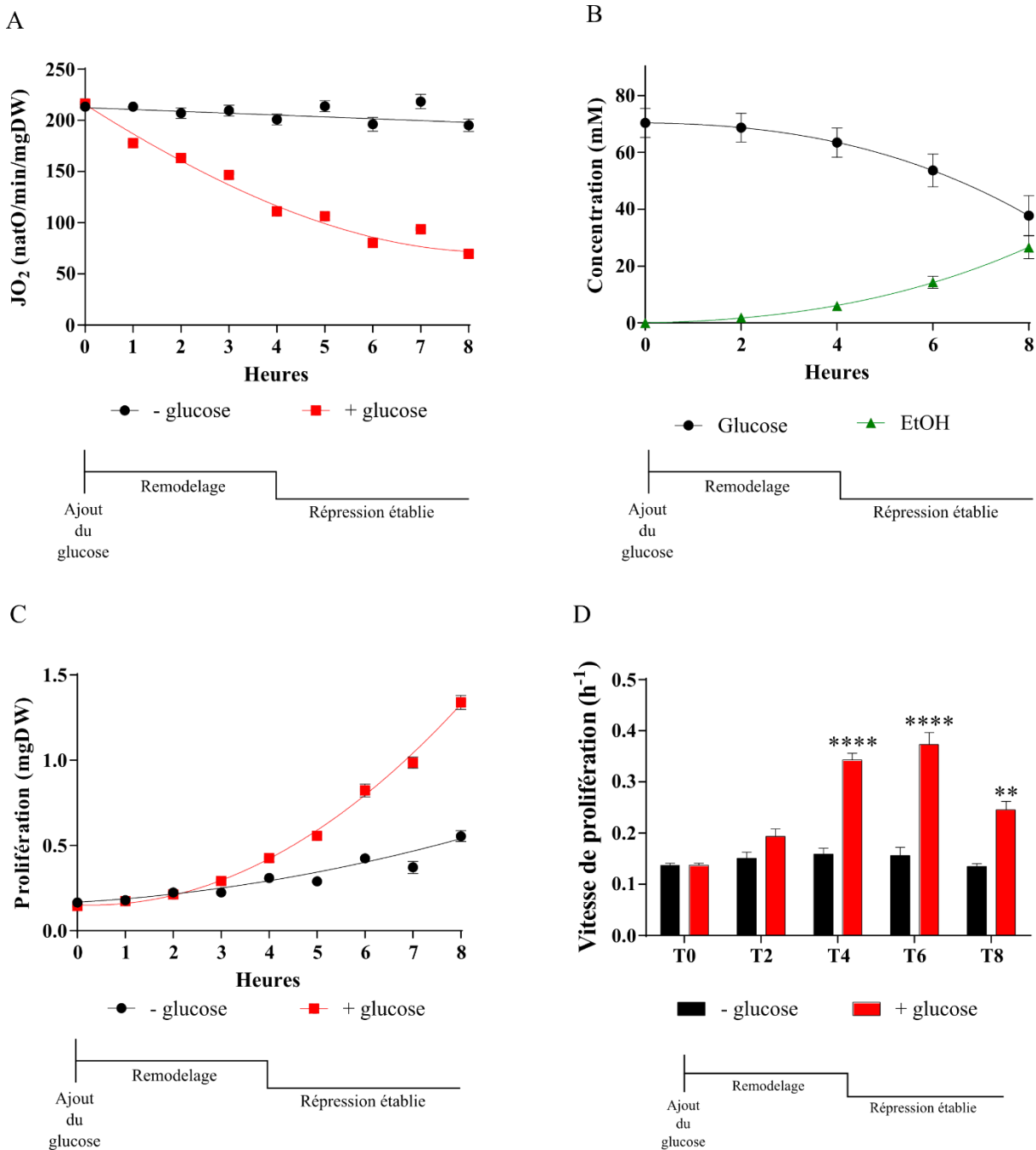


Figure 60. Effet de l'ajout du glucose sur les trois paramètres de l'effet Warburg

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en présence ou non de glucose. (n=12) **B.** La consommation de glucose et la production d'éthanol (EtOH) sont suivies sur 8 heures en présence. (n=8) **C.** La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en présence ou non de glucose. (n=12) **D.** Les vitesses de prolifération sont obtenues à partir des courbes de croissance en suivant le calcul décrit dans la section 3.3.1. Ils sont calculés toutes les deux heures et le T0 représente une moyenne des vitesses en absence de glucose. (n=12)

4.2 Conditions de culture

Pour toutes les souches étudiées, les cultures ont été effectuées dans un milieu non-fermentescible, lactate 2% ou glycérol 2%. Au début de l'expérience, du glucose est ajouté à la concentration indiquée suivant l'expérience réalisée. Un suivi de la prolifération et de la vitesse de respiration est effectué sur 8 heures pour chaque expérience.

4.3 *S. cerevisiae* en tant que modèle Warburg

Durant sa thèse, Nouredine Hammad a mis en évidence que l'ajout de glucose dans un milieu non fermentescible induisait chez la levure *S. cerevisiae* une diminution de la vitesse de respiration en parallèle d'une induction de la glycolyse et de la fermentation (Hammad, 2018) (**Figure 60A et B**). Cette modification du métabolisme s'accompagnait d'une augmentation de la vitesse de prolifération, résultats que j'ai pu reproduire dans les mêmes conditions (**Figure 60C et D**). Ces modifications métaboliques, induites par une répression glucose sur le long terme, sont celles qui définissent l'effet Warburg (Warburg, 1956a, 1956b). Il semble donc que la levure *S. cerevisiae* soit un bon modèle permettant d'étudier la mise en place de l'effet Warburg.

Le métabolisme semble être progressivement modifié durant les quatre premières heures et stationnaire durant les quatre dernières heures. Ce phénomène est particulièrement visible lors de l'étude du temps de génération de la souche (**Figure 60D**). Ces modifications demandent un réel remodelage génétique telle que la synthèse des protéines de la glycolyse et de la fermentation ainsi que de l'ensemble des autres acteurs de la dégradation du glucose et de la répression mitochondriale. Le temps de la mise en place de ce processus métabolique est le même que le temps de génération de la souche en absence de glucose (**Figure 60D**). Après l'ajout de glucose, progressivement, ce temps de génération diminue lors de l'induction du remodelage génétique (**Figure 60D**). Il semble donc que c'est lors de la première génération que les modifications s'amorcent permettant l'apparition de l'effet Warburg.

Afin de confirmer les résultats obtenus lors de l'étude de la consommation du glucose et la production d'éthanol, j'ai effectué un dosage d'activité des hexokinases (HXK), première enzyme de la glycolyse. La **Figure 61A** montre qu'en absence de glucose, l'activité HXK est faible durant les huit heures. Après l'ajout de glucose, cette activité augmente jusqu'à dix fois plus qu'en absence de glucose. L'ensemble de ses résultats confirme que l'ajout de glucose est à l'origine d'une augmentation de la glycolyse. L'éthanol n'étant pas le seul devenir du glucose au sein de la cellule, un dosage de la concentration de glycérol a également été réalisé afin de

vérifier les différentes voies de consommation du glucose. Il semble que le glycérol soit produit en faible quantité par rapport à l'éthanol, environ 27mM à 8h pour moins de 3mM de glycérol formés (**Figure 61B** et **Figure 60B**). La moitié du glucose consommé est donc transformé en éthanol. Il est à noter qu'en absence de glucose, l'éthanol et le glycérol ne sont pas détectables dans les cellules durant les 8 heures de suivi. Il apparait donc que le glucose est préférentiellement dirigé vers la voie glycolyse/fermentaire plutôt que vers les autres voies de synthèse bien que la prolifération cellulaire augmente et que ces produits soient essentiels à la prolifération (**Figure 57**). La synthèse de nucléotides ou de lipides n'est pas le devenir principal du glucose et ne semble pas limitante pour induire une prolifération cellulaire accrue et ainsi la question de l'avantage du remodelage métabolique dans un contexte de cellules cancéreuses se pose. En effet, la voie mitochondriale reste la plus avantageuse énergétiquement et est pourtant défavorisée voire inhibée au profit de la voie fermentaire.

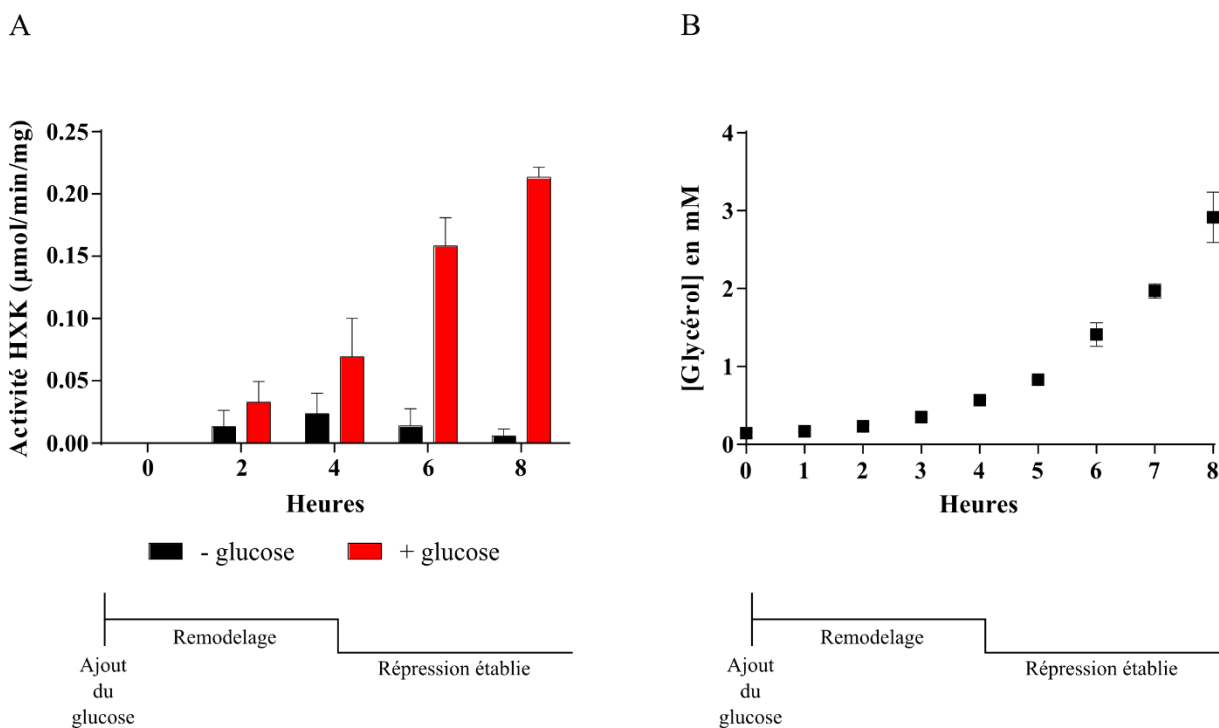


Figure 61. Effet du glucose sur l'activité HXK et la production de glycérol

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **A.** L'activité de l'hexokinase a été mesurée par spectrophotométrie et est rapportée à la quantité de protéine en mg. (n=3) **B.** Production du glycérol au cours des 8 heures après l'ajout de glucose. (n=11)

4.4 Origine du remodelage métabolique et en particulier de la diminution de respiration

4.4.1 Effet de l'ajout du glucose sur la consommation du lactate

Les résultats précédents ont mis en évidence que l'ajout du glucose est à l'origine d'une diminution de la vitesse de respiration. La cause de cette diminution a été étudiée. Afin de s'assurer que l'ajout du glucose n'avait pas pour conséquence une diminution de la prise en charges des substrats dans la chaîne respiratoire, par un contrôle cinétique de l'entrée des substrats par exemple, la respiration LDH dépendante a été étudiée. Cela pourrait expliquer la diminution de la vitesse de la respiration et ne serait pas due à une modification du système des OXPHOS en lui-même. Pour cela la vitesse de respiration a été mesurée en présence ou non d'Antimycine A, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire (Potter and Reif, 1952; Reif and Potter, 1953; Rigoulet et al., 2011). En effet, la levure *S. cerevisiae* possède deux lactate déshydrogénases (LDH) au sein de sa chaîne respiratoire, capable de transformer le lactate en pyruvate (Lodi and Ferrero, 1993; Lodi et al., 1999; Mourier et al., 2008). Cette transformation libère deux électrons qui vont être transmis à la COX *via* le cytochrome c (Lodi and Ferrero, 1993; Mourier et al., 2008). Lorsque le complexe III est inhibé, la LDH devient alors le seul fournisseur d'électrons du complexe IV (**Figure 62A**). Dans ces conditions, la consommation d'oxygène est alors dépendante d'une consommation de lactate par la cellule. Il est alors possible de vérifier si une modification de la répartition des flux d'entrée au niveau de la chaîne respiratoire (déshydrogénases en amont du complexe III et LDH), suite à l'ajout de glucose, est à l'origine de la diminution de la vitesse de respiration.

La **Figure 62** met en évidence que lorsque les levures sont cultivées uniquement dans un milieu lactate, la respiration après ajout d'Antimycine A, consommation d'oxygène purement due à l'activité de la LDH, représente 30% de la consommation totale d'oxygène (**Figure 62B et D**). En revanche, dans un milieu ne contenant que du glucose, la LDH n'ayant pas de substrats, la respiration après ajout d'Antimycine A est nulle (données non montrées). Lors de l'ajout de glucose sur un milieu lactate, et bien que le glucose induise une diminution de la respiration (**Figure 62B**), il apparaît que la consommation d'oxygène due à la LDH soit la même qu'auparavant proportionnellement à la consommation d'oxygène totale par la mitochondrie (**Figure 62D**). Ces résultats indiquent, d'une part, que l'ajout de glucose ne modifie pas l'activité de la LDH mitochondriale. D'autre part, l'ensemble de ces résultats semblent montrer que ce n'est pas la disponibilité en substrats de la chaîne respiratoire qui limite la respiration mais l'activité de cette chaîne.

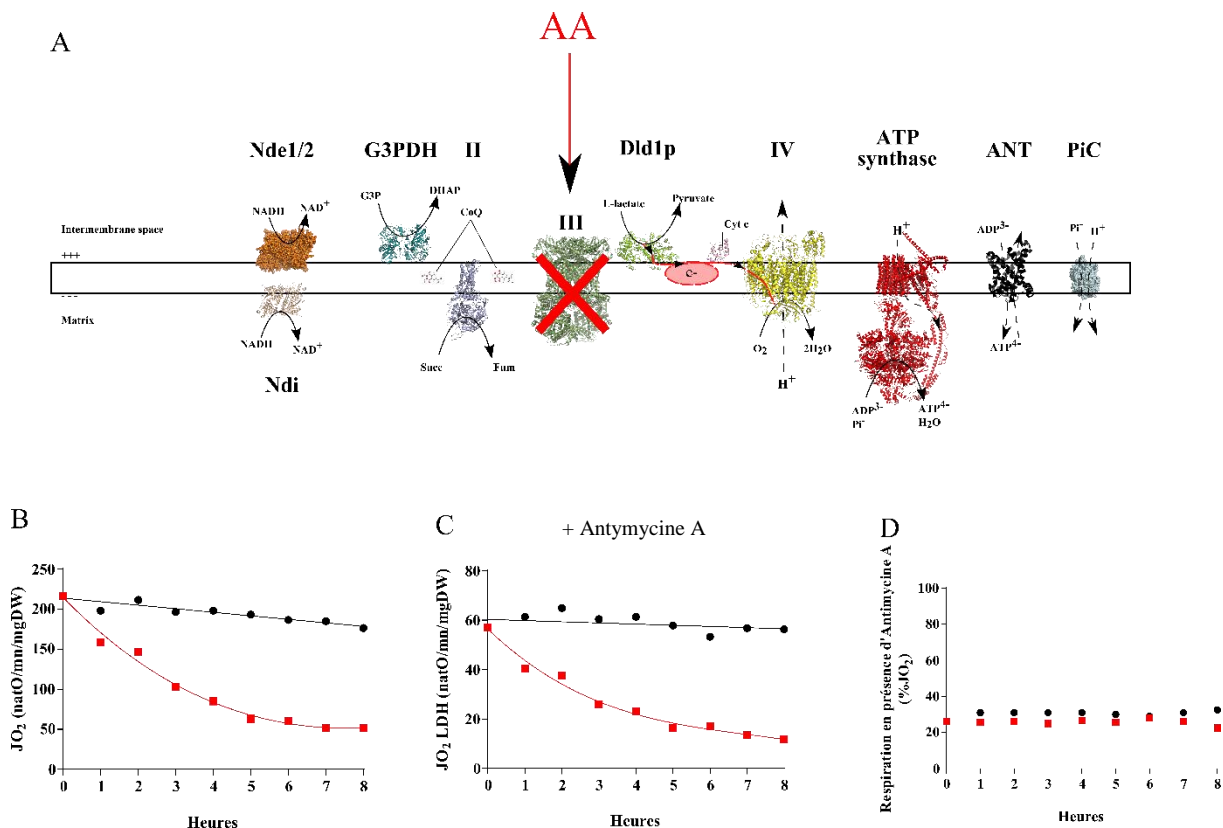


Figure 62. Effet de l'antimycine A sur la respiration en présence de différents milieux

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** Illustration du transfert d'électrons à la COX en présence d'antimycine. **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en milieu lactate en présence ■ ou non ● de glucose. (n=2) **C.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en présence d'antimycine A, en milieu lactate en présence ■ ou non ● de glucose. Ces vitesses de respiration sont notées JO₂ LDH. (n=2) **D.** Calcul de JO₂ LDH en pourcentage de JO₂ en milieu lactate en présence ■ ou non ● de glucose.

4.4.2 Effet Warburg chez *S. cerevisiae* : diminution de la quantité ou de la qualité mitochondriale ?

Les premiers résultats ont donc amené à se questionner sur l'effet du glucose sur les mitochondries. Dans l'introduction de cette partie, il a déjà été fait mention que l'effet Warburg été lié à une diminution de l'activité mitochondriale (4.1.5). Cette diminution a d'abord été imputée à des dysfonctions mitochondriales accumulées au cours du processus tumoral. Cependant, il a pu être mis plus tard en évidence qu'une régulation de la quantité de mitochondrie pouvait également être à l'origine de cette diminution d'activité (Jiang et al., 2015).

Le modèle levure permettant de suivre le mécanisme de mise en place de l'effet Warburg dans la cellule permet aussi de voir l'influence que ce changement métabolique peut entraîner sur l'ensemble des mitochondries. J'ai donc étudié l'activité du réseau mitochondrial et ai

également quantifié le contenu mitochondrial afin de savoir si dans ce cas le glucose agit sur l'un ou l'autre de ces mécanismes, voire sur les deux.

Afin de vérifier l'impact de l'ajout du glucose sur l'activité mitochondriale dans les levures, une évaluation de la vitesse de fonctionnement minimale et maximale de la chaîne respiratoire des cellules a été réalisée. Comme vu précédemment, 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 « respiratory state value » (RSV) (**Figure 26**). Le flux respiratoire minimal (respiration non phosphorylante) et maximal (respiration découplée) ont été déterminés par l'utilisation respective de TEE et CCCP, de la même manière que dans le chapitre précédent (**3.3.3**). La **Figure 63** montre que chacun des trois états de la respiration, endogène, non phosphorylant et découplée, est stable durant toute la cinétique en absence de glucose (**Figure 63A**) et diminue après l'ajout du glucose (**Figure 63B**). Ainsi, les respirations découplée et non phosphorylante sont également impactées par l'ajout du glucose. En revanche, la détermination du RSV à chaque heure montre que l'activité des OXPHOS ne subit aucun changement d'état stationnaire (**Figure 63C**). En effet, on remarque que ce rapport est quasiment identique en présence ou en absence de glucose et ce durant l'ensemble du suivi. Ainsi, il apparaît que l'état stationnaire de phosphorylation et les capacités du système des OXPHOS ne subit aucune modification.

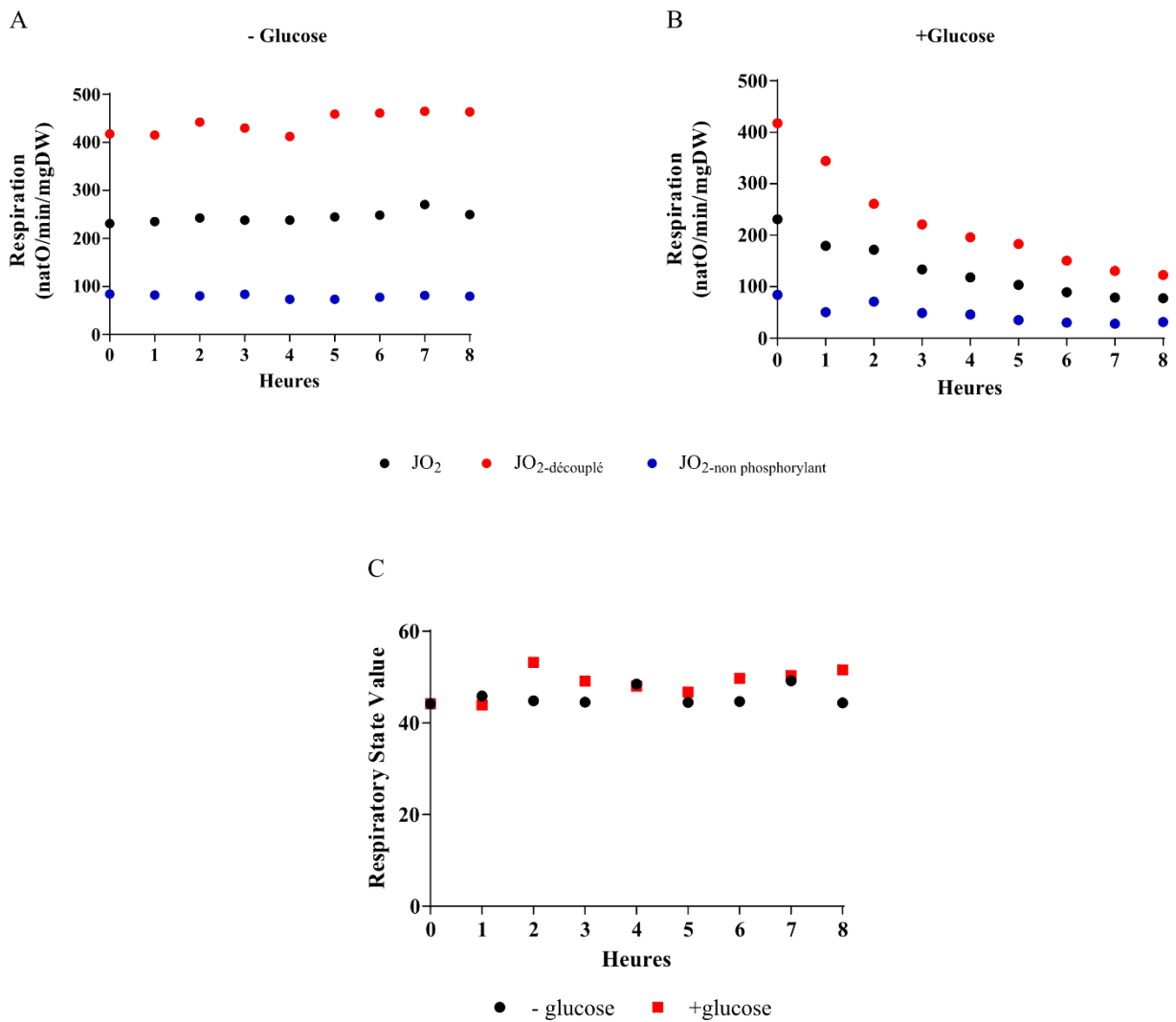


Figure 63. Effet du glucose sur le RSV

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** Vitesse de respiration endogène (JO₂), en présence de CCCP (JO₂-découplé) ou en présence de TEE (JO₂-non phosphorylante) en milieu lactate. (n=2) **B.** Vitesse de respiration endogène (JO₂), en présence de CCCP (JO₂-découplé) ou en présence de TEE (JO₂-non phosphorylante), en milieu lactate supplémenté par 60mM de glucose. (n=2) **C.** Le RSV représenté pour chaque condition a été calculé à partir des données des vitesses de respiration présentées en **A** et **B**.

D'autre part, les cytochromes ont été quantifiés dans les levures cultivées en présence ou en absence de glucose. La **Figure 64A** met en évidence qu'en absence de glucose la quantité de cytochrome est stable dans le temps. En revanche, après l'ajout du glucose et donc de

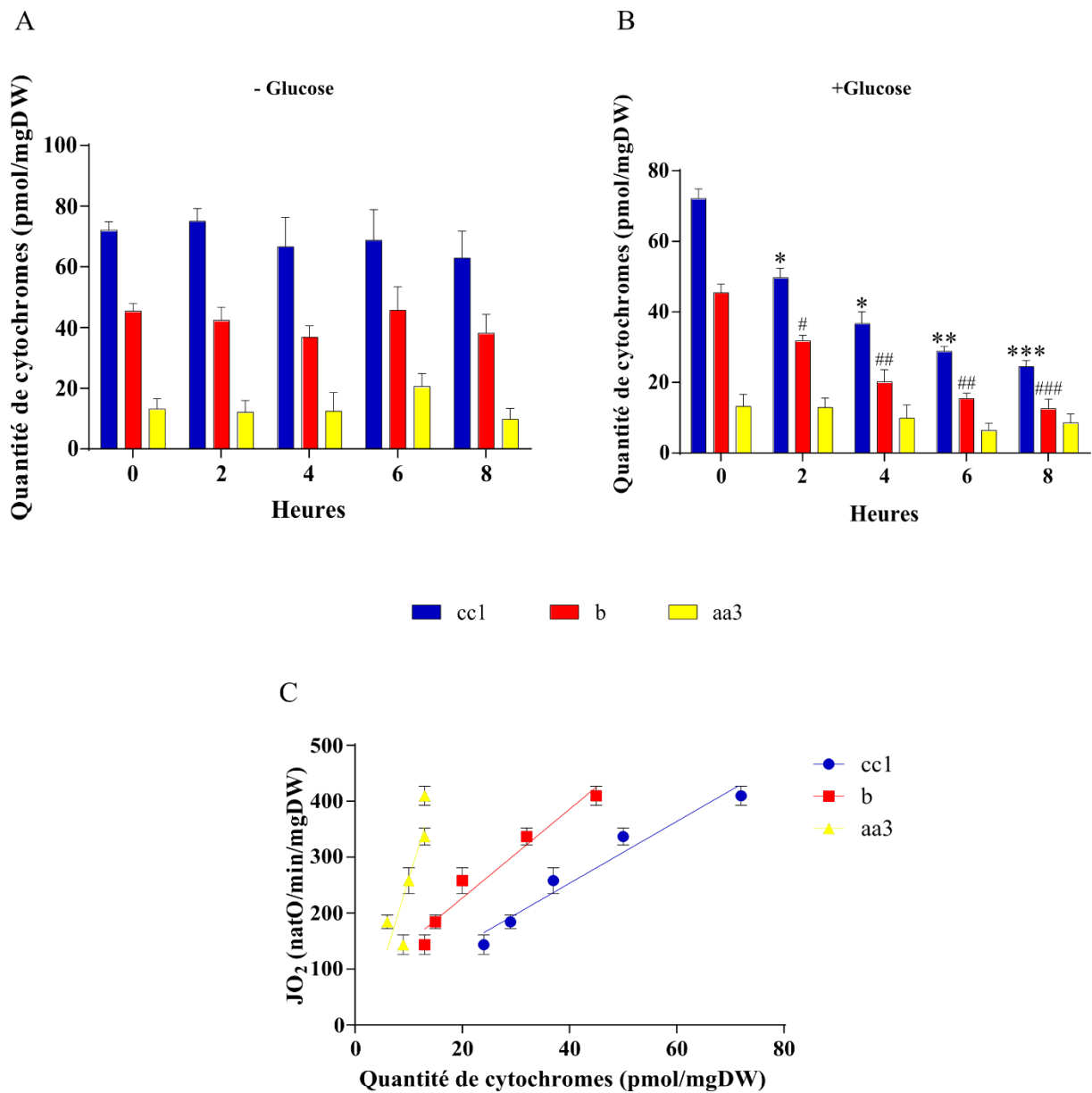


Figure 64. Effet du glucose sur la quantité de cytochromes mitochondriaux

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** Quantification à partir de culots cellulaires issus de culture en milieu lactate. Quantification des cytochromes par spectrophotométrie à double faisceau. Les cytochromes c et c1 sont quantifiés par le même pic et ne sont donc pas individualisés, de même pour les cytochromes a et a3. (n=3) **B.** Quantification à partir de culots cellulaires issus de culture en milieu lactate supplémenté par 60mM de glucose. Quantification des cytochromes par spectrophotométrie à double faisceau. Les cytochromes c et c1 sont quantifiés par le même pic et ne sont donc pas individualisés, de même pour les cytochromes a et a3. * représente la p value des mesures de cc1, # de b et \$ de aa3. (n=4) **C.** Les courbes représentent la relation entre les quantités de cytochromes présentées en B et la vitesse de respiration en présence de glucose présentée précédemment **Figure 60A.**

l'induction de l'effet Warburg, la quantité globale des cytochromes mitochondriaux diminue (**Figure 64B**). Les cytochromes faisant partie intégrante des complexes de la chaîne respiratoire (**Figure 24B**), cette quantité a été comparée à la vitesse de respiration. Il apparaît que la diminution de la quantité de cytochromes est proportionnelle à la diminution de la vitesse de respiration après ajout du glucose (**Figure 64C**). Ce résultat montre que la diminution de la consommation de l'oxygène est due à une diminution de la quantité d'unités de chaîne respiratoire dans les cellules.

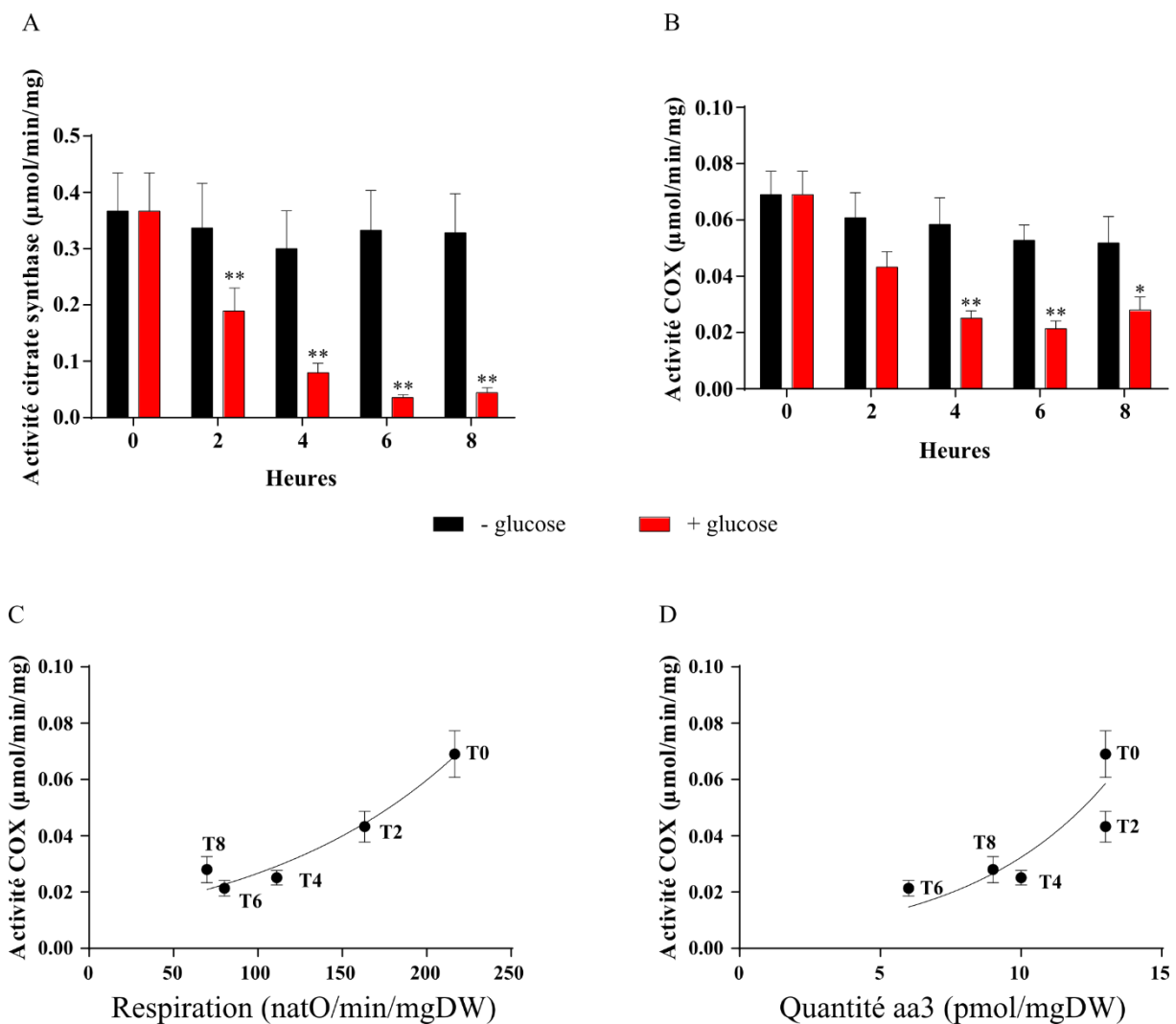


Figure 65. Effet du glucose sur les activités enzymatiques mitochondriales

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **A.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=6) **B.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=5) **C.** La courbe représente la relation entre l'activité COX en présence de glucose présentée en **B** et la vitesse de respiration en présence de glucose présentées **Figure 60A**. **D.** La courbe représente la relation entre l'activité COX présentée en **B** et la quantité de cytochromes aa3 en présence de glucose présentées **Figure 64B**.

De plus, ce résultat est confirmé par la quantification de l'activité des enzymes mitochondriales, CS et COX. En effet, il apparaît que l'ajout de glucose dans le milieu induit une diminution de l'activité de ces deux enzymes, stable en absence de glucose (**Figure 65A et B**). Cependant, et comme déjà évoqué précédemment, chez *S. cerevisiae*, il existe une citrate synthase extra-mitochondriale, située au niveau du peroxyosome (Rickey and Lewin, 1986; Lewin et al., 1990; Van Rossum et al., 2016). Cette citrate synthase est réprimée par le glucose (Rickey and Lewin, 1986). L'ajout du glucose peut donc induire une répression sur les deux citrate synthases simultanément, ce qui expliquerait la diminution de plus de 90% pour la citrate synthase lorsque l'activité de la COX est au maximum diminuée de 60 à 65%. En revanche, si les diminutions de la respiration et des cytochromes sont proportionnelles entre elles, en comparant l'activité COX avec la respiration ou la quantité de cytochrome aa3, composant du complexe IV, il apparaît que la diminution de cette activité n'est pas parfaitement proportionnelle avec ces deux paramètres (**Figure 65C et D**). Il doit donc y avoir une régulation cinétique de l'activité enzymatique de la COX en plus de la régulation de sa quantité.

Enfin, une quantification relative de la porine a été réalisée. Après ajout du glucose, la quantité de porine semble diminuer progressivement durant les quatre premières heures jusqu'à une perte de 50% environ (**Figure 66**).

L'ensemble de ces résultats montrent que (1) l'état stationnaire de la respiration endogène est inchangé après ajout du glucose ; (2) l'ensemble des cytochromes mitochondriaux diminue de façon proportionnelle à la vitesse de respiration, ce qui suggère une diminution du

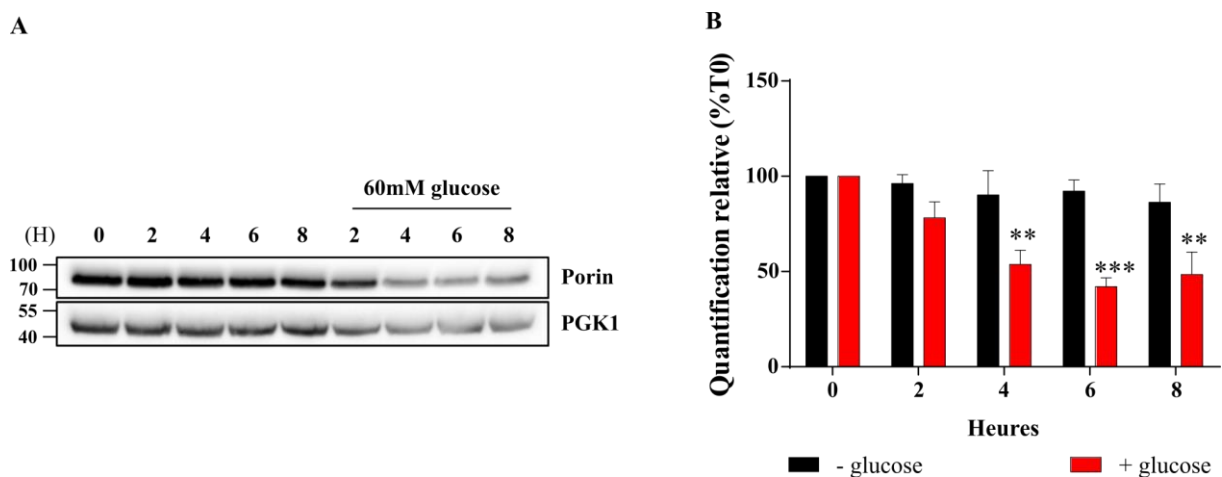


Figure 66. Effet du glucose sur la quantité relative de Porine

A. La quantité relative de la Porine est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre la Porine. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de la Porine est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=5)

nombre d'unité de chaîne respiratoire ; (3) les activités enzymatiques de la citrate synthase, enzyme matricielle, et de la COX, complexe IV de la chaîne respiratoire, diminuent ; (4) la quantité relative de la porine, protéine souvent utilisée comme marqueur mitochondrial, diminue. Les résultats obtenus précédemment sont donc bien dus à une diminution de la quantité de mitochondries au sein des cellules.

4.4.3 Le glucose à l'origine d'une répression de la biogenèse mitochondriale

La diminution de la quantité de mitochondrie dans les cellules peut-être la résultante de deux phénomènes, une augmentation de la dégradation du compartiment (mitophagie) et/ou une diminution de la biogenèse de ce compartiment. Dans des précédents travaux, le laboratoire a pu mettre en évidence qu'une augmentation de la dégradation mitochondriale était à exclure dans nos conditions. En effet, aucune mitophagie ne semble être induite après ajout du glucose (**Figure 67**). La biogenèse mitochondriale a donc été étudiée et en particulier Hap4p, la sous-unité régulatrice du complexe HAP, chef d'orchestre de la biogenèse mitochondriale chez *S. cerevisiae*.

Il a pu être montré que le gène *HAP4* est le seul gène du complexe dont l'expression est régulée par la source de carbone. En effet, il a été montré depuis longtemps que *HAP4* n'était exprimé qu'en présence d'un milieu non fermentescible (Forsburg and Guarente, 1989; Brons et al., 2002). Dans un milieu ne contenant que du glucose, ce gène n'est donc pas exprimé et la biogenèse mitochondriale ne peut pas avoir lieu jusqu'à la disparition du glucose, lorsque la

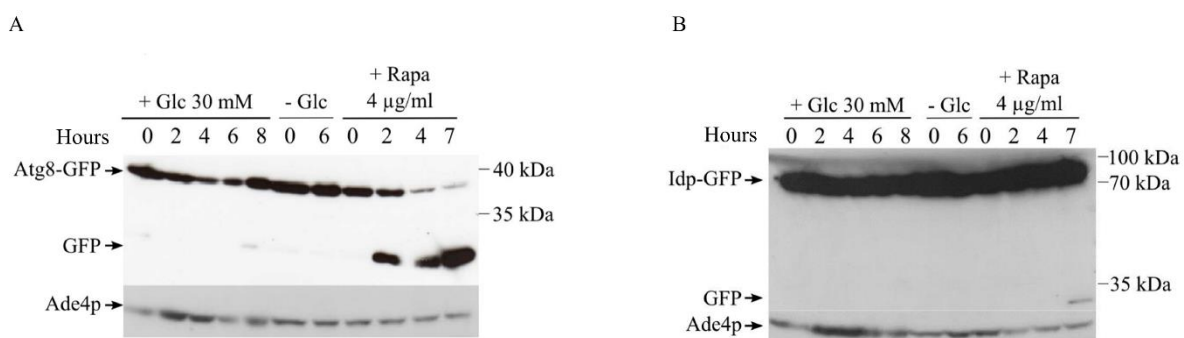


Figure 67. Effet du glucose sur l'induction du processus d'autophagie et/ou de la mitophagie

Résultats issus du rapport de Master 2 de Alexis Mougeolle, la quantité de protéine déposée correspond à celle extraite à partir de $1,6 \times 10^6$ cellules. La protéine Ade4p est utilisée comme contrôle de charge **A**. L'induction de l'autophagie est suivie via la dégradation de la protéine Atg8-GFP. Elle est mise en évidence par Western Blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la GFP seule (environ 25kDa) par l'utilisation des anticorps dirigés contre la GFP. **B**. L'induction de la mitophagie est suivie via la dégradation de la protéine Idp-GFP. Elle est mise en évidence par Western Blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la GFP seule (environ 25kDa) par l'utilisation des anticorps dirigés contre la GFP.

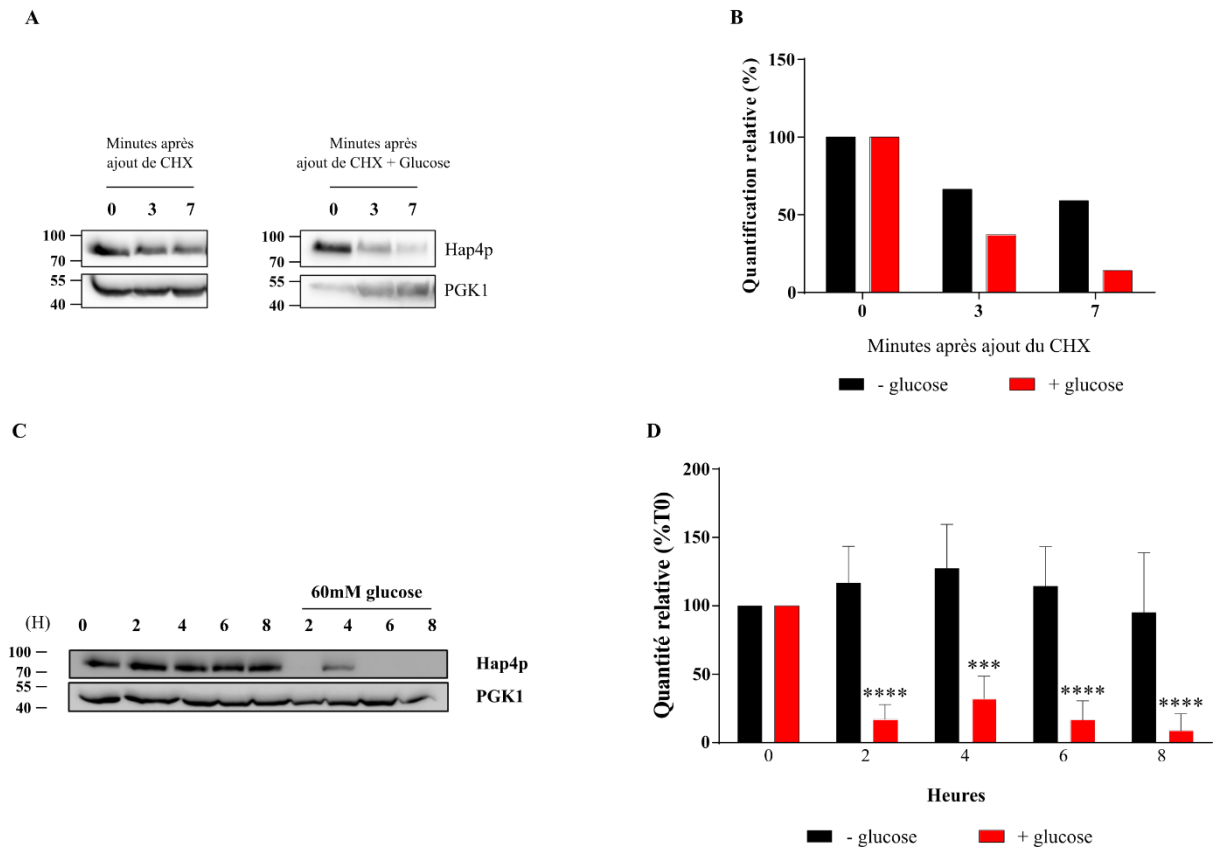


Figure 68. Effet du glucose sur la stabilité et la quantité de Hap4p

A. Après ajout du CHX, la quantité relative de la protéine Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=2) **C.** La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **D.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=14)

prolifération reprend sur le glycérol et l'éthanol alors produits. La présence d'un site de fixation de Mig1p, un répresseur transcriptionnel impliqué dans la répression par le glucose, au niveau de son promoteur suggère que la répression catabolique de *HAP4* se fait *via* Mig1p (Johnston, 1999; Rolland et al., 2002). L'influence du glucose sur la biogenèse mitochondriale, après son ajout au milieu lactate, a été étudiée par suivi de la quantité de Hap4p au cours du temps, ainsi que par sa stabilité durant les 7 minutes estimées de demi-vie de la protéine. Pour cela, les cellules ont été incubées en présence de CHX, inhibiteur de la synthèse protéique. En absence de glucose, la quantité de Hap4p diminue de moitié en 7 minutes alors qu'en présence de glucose, dès 3 minutes après l'incubation en présence de CHX, la quantité est diminuée de plus de 50% et après 7 minutes de plus de 75% (**Figure 68A et B**). Le glucose a donc un rôle

répresseur sur l'expression de la protéine mais également induit une diminution de sa stabilité et ceci de façon très rapide. Cette répression du glucose sur Hap4p est maintenue tout au long du suivi puisque sur le long terme la protéine reste très faiblement exprimée dans les cellules

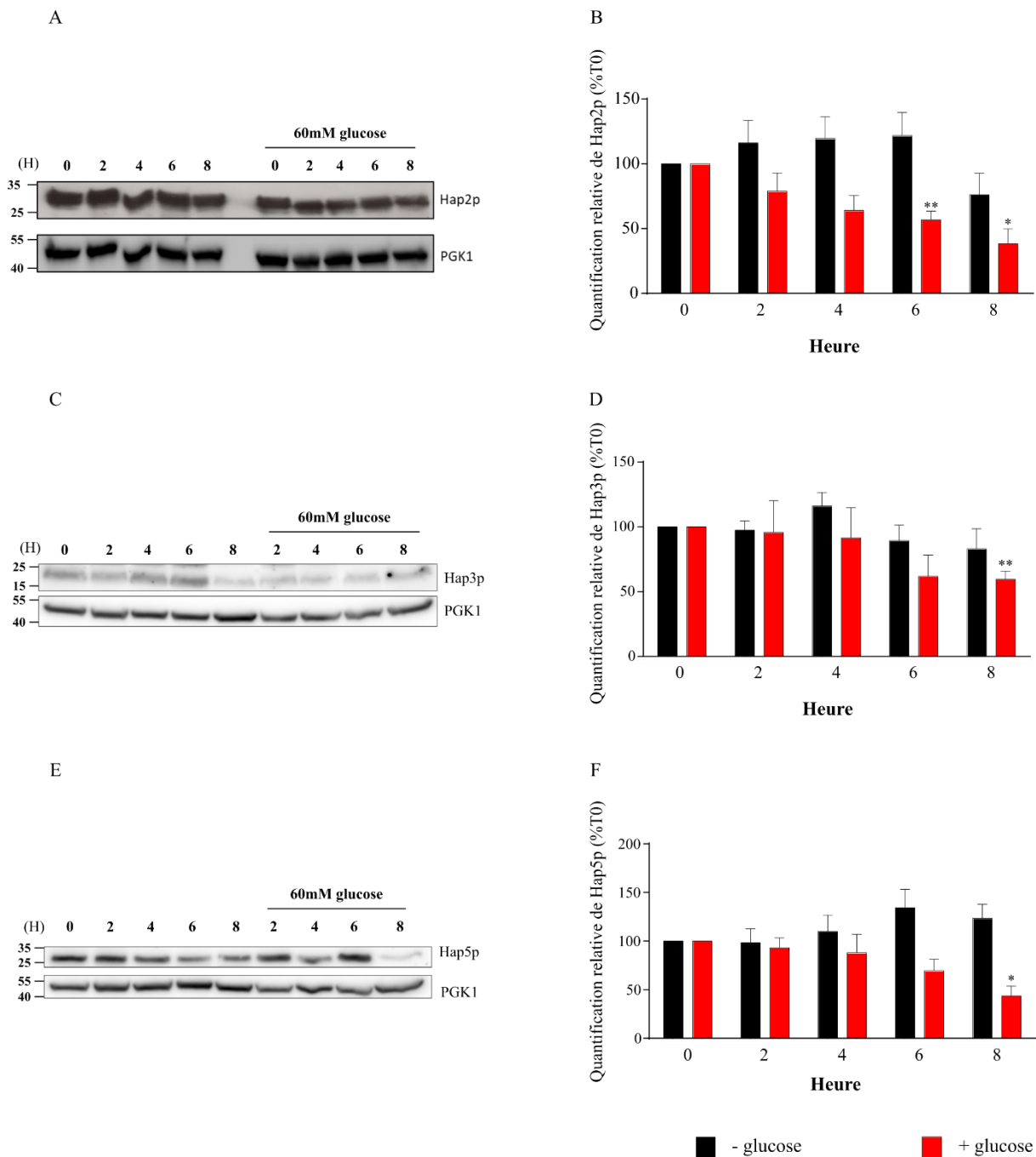


Figure 69. Effet du glucose sur la quantité des sous-unités du complexe HAP

Pour chaque sous-unité du complexe HAP : **A., C. et E.** La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap2p, Hap3p ou Hap5p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B., D. et F.** Le niveau relatif de Hap2p, Hap3p ou Hap5p est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=5) pour Hap2p ; (n=3) pour Hap3p et (n=5) pour Hap5p.

voire pas du tout détectable (**Figure 68C et D**). Il est, cependant, à noter que la quantité de la protéine semble réaugmenter 4 heures après l'ajout du glucose avant de rediminuer. Toutefois, cette réaugmentation reste nettement plus faible que la quantité initiale dans les cellules (moins de 50% qu'auparavant) **Figure 68D**. Dans un second temps, j'ai observé l'impact de l'ajout du glucose sur les autres membres du complexe HAP : Hap2p, Hap3p et Hap5p. Ces protéines sont décrites comme étant constitutivement exprimées (Derisi et al., 1997; McNabb and Pinto, 2005) et constitutivement présentes sur les gènes cibles, seule la présence ou non de Hap4p régulant l'activité du complexe (McNabb and Pinto, 2005). Pourtant, la **Figure 69** montre que tant pour Hap2p que pour Hap5p, dès 4 heures après l'ajout du glucose, une diminution de la quantité relative des protéines est observable et que celle-ci est maintenue pendant tout le reste du suivi (**Figure 69B et F**). En ce qui concerne Hap3p, la diminution n'est observable qu'après 6 heures de suivi (**Figure 69D**). Il semble donc que l'ensemble du complexe soit impacté par la répression causée par le glucose. Cependant, ces premières données ne permettent pas de préciser si cette diminution des membres, définis comme constitutifs, est due directement à l'ajout du glucose ou est une conséquence à l'absence prolongée de leur régulateur. Des expériences préliminaires ont été réalisées sur une souche pour laquelle *HAP4* est délétée. Cette souche ne peut donc survivre qu'en milieu fermentescible et dans ces conditions la quantité relative de Hap2p détectée était 50% plus faible que celle mesurée dans la souche WT en absence de glucose et Hap5p était, quant à elle, diminué de 80% (résultats non montrés). Ces résultats pourraient indiquer que l'absence de Hap4p sur le long terme induit une diminution des autres membres du complexe qui ne peut alors plus être activé.

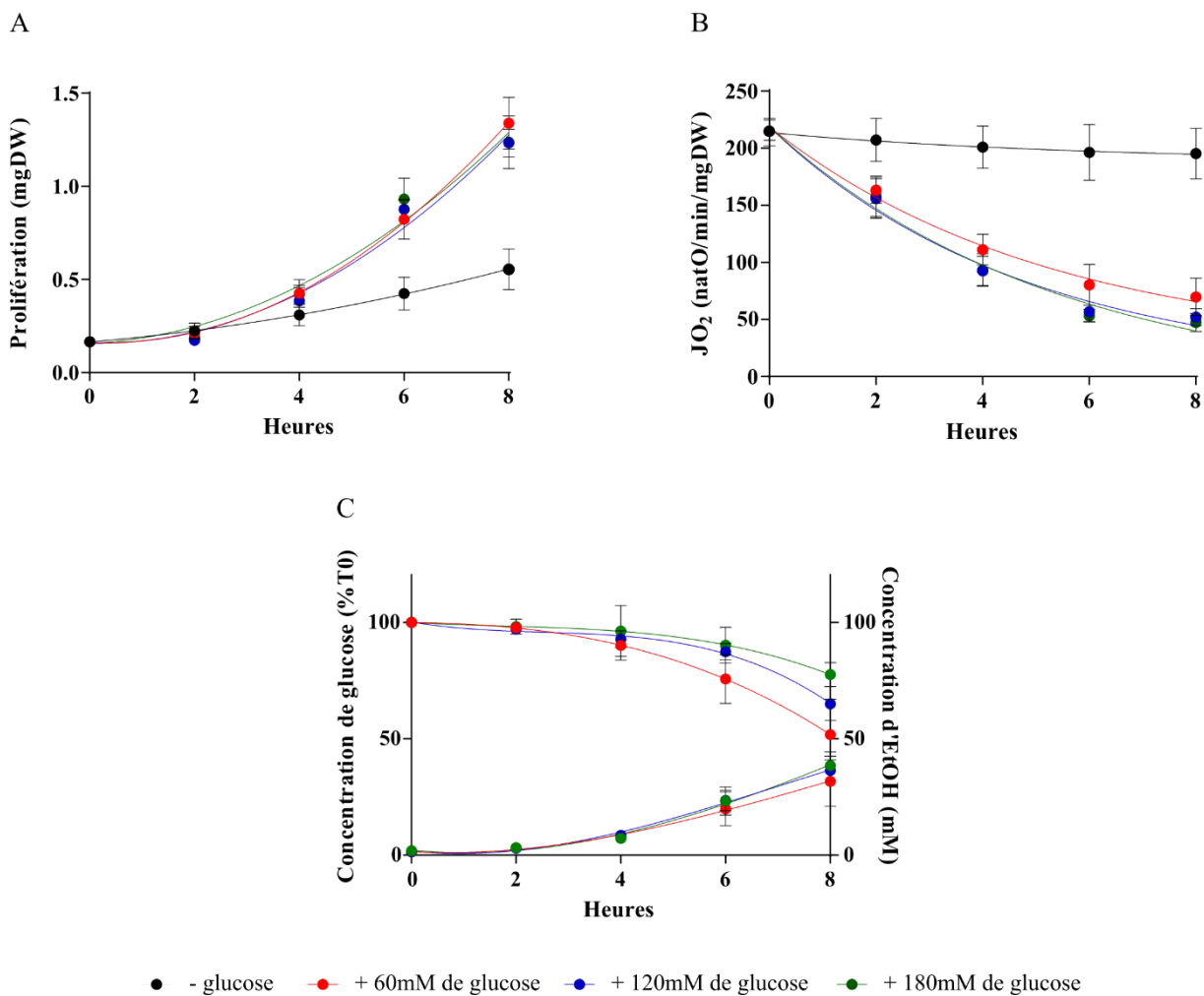


Figure 70. Effet de différentes concentrations de glucose sur les trois paramètres de l'effet Warburg

A. La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM, 120mM ou 180mM de glucose. (n=8) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM, 120mM ou 180mM de glucose. (n=8) **C.** La consommation de glucose et la production d'éthanol (EtOH) sont suivies sur 8 heures en présence de 60mM, 120mM ou 180mM de glucose. Les pourcentages présentés pour la consommation du glucose ont été calculées à partir des concentrations obtenues et référencées dans le **Tableau XVI**. (n=4)

Afin de vérifier que la concentration utilisée induisait bien un effet Warburg complet qui n'était pas limité pour la production d'éthanol, l'augmentation de la vitesse de prolifération ou l'inhibition de la vitesse de respiration, la quantité de glucose ajoutée habituellement, 60mM, a été doublée et triplée. La **Figure 70A et B** met en évidence que, quelle que soit la concentration de glucose ajoutée, les remodelages métaboliques sont les mêmes et la consommation du glucose au cours des 8 heures de suivi est comparable entre les trois conditions (**Figure 70C et Tableau XVI**).

Tableau XVI. Concentration de glucose en mM dosée dans les cultures (\pm S.E.M)

	Concentration de glucose (en mM)		
<i>T0</i>	70,38 (\pm 5,1)	128,63 (\pm 2,7)	166,46 (\pm 4)
<i>T2</i>	68,76 (\pm 5)	124,99 (\pm 2,8)	163,4 (\pm 2,4)
<i>T4</i>	63,49 (\pm 5,1)	119,39 (\pm 2,6)	159,83 (\pm 6,2)
<i>T6</i>	53,66 (\pm 5,8)	112,44 (\pm 2,24)	149,83 (\pm 2,9)
<i>T8</i>	37,77 (\pm 7)	83,67 (\pm 4,9)	129,03 (\pm 2,5)

Cette augmentation de la concentration de glucose ajoutée avait également pour but de déterminer si la réapparition de Hap4p à 4 heures était due à une diminution de la concentration du glucose dans le milieu. Cette concentration toujours supérieure à 30mM n'est pas censée permettre une réaugmentation de la protéine. Cependant, afin de le vérifier, un suivi de la quantité relative de la protéine a été effectuée dans ces conditions. Il apparaît que, pour chaque concentration de glucose ajoutée, la quantité de Hap4p dans les cellules varient de façon équivalente et à 4 heures la protéine est détectable (**Figure 71A et B**). Les résultats montrent donc que la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae* n'est pas dépendant de la concentration de glucose à partir du moment où elle est suffisante pour induire l'initiation de ce remodelage métabolique. Cela est confirmé par la **Figure 71 (C et D)** montrant que la porine est également impactée de façon similaire dans les trois conditions.

L'ensemble de ces résultats indiquent donc une répression de la biogenèse mitochondriale via celle de Hap4p dès lors que la concentration de glucose présente dans le milieu est susceptible de permettre la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*. Aucune concentration plus faible n'a été testée afin de définir la concentration minimale de glucose nécessaire au remodelage métabolique car au cours des 8 heures de suivi, les cellules consomment entre 30 et 40mM de glucose. Ainsi, une concentration plus faible que les 60mM utilisés pourrait être entièrement consommée avant la fin du suivi.

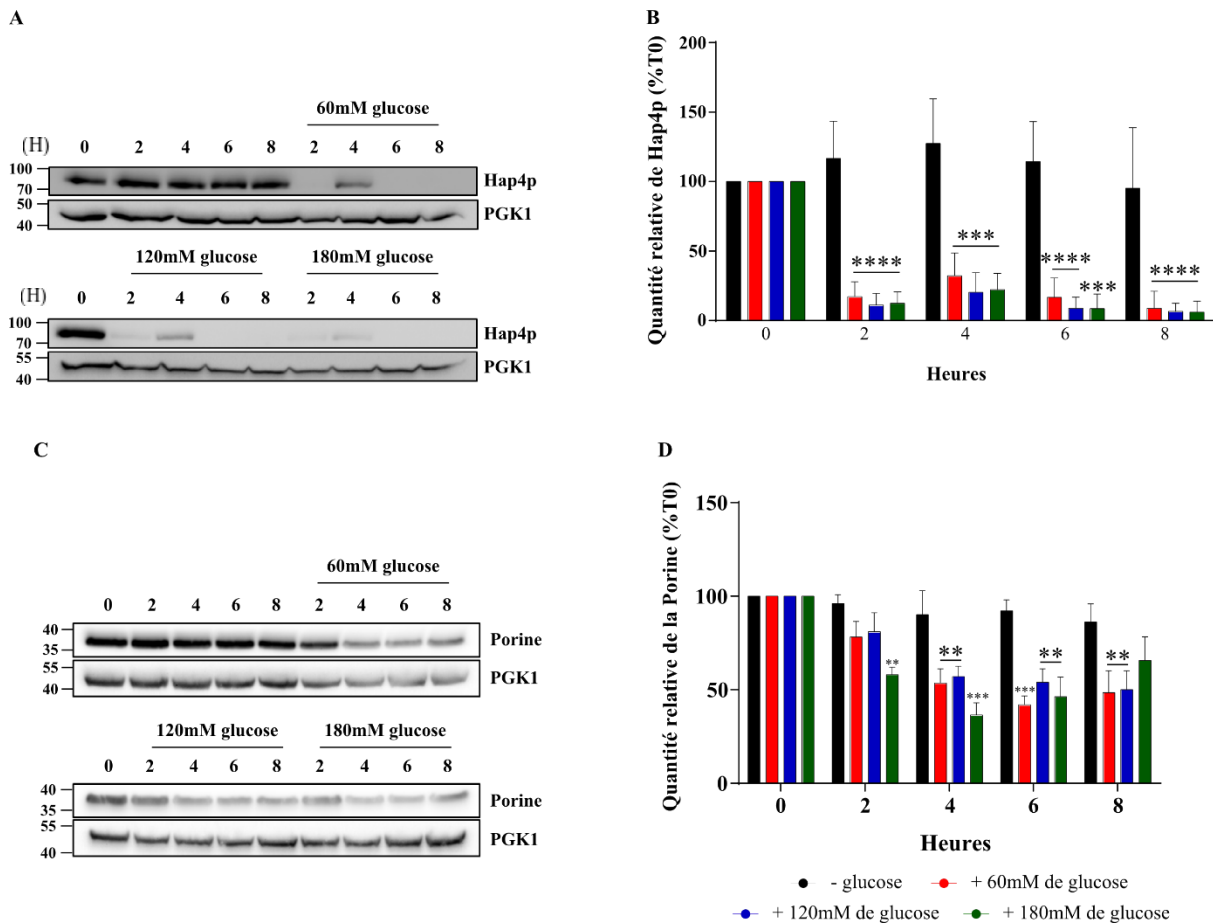


Figure 71. Effet de différentes concentrations de glucose sur la quantité relative de Hap4p et de la Porine

A. La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UD0 et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=5) **C.** La quantité relative de la Porine est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UD0 et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre la Porine. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **D.** Le niveau relatif de la Porine est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=5)

4.5 Le remodelage métabolique n'est pas nécessaire à l'augmentation de la prolifération

Les premiers résultats obtenus m'ont menée à considérer la diminution de la biogenèse mitochondriale comme un élément central de la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*. Afin de vérifier cela, une étude sur des souches mutées spécifiquement sur la voie de l'expression de Hap4p a été réalisée. En effet, un maintien de l'expression de la protéine,

malgré la répression exercée par le glucose, pourrait être à l'origine d'un ralentissement de la mise en place de l'effet Warburg dans les cellules, voire d'une inhibition de cette mise en place.

4.5.1 Effet de la surexpression de Hap4p sur l'effet Warburg

Pour cette étude, une souche surexprimant Hap4p a été utilisée. Le gène de surexpression *HAP4* est dirigé sous le contrôle d'un promoteur *tetO* (Gari et al., 1997). Dans un tel système, la transcription du gène d'intérêt est mise sous le contrôle d'éléments régulateurs nommés tetO qui sont normalement impliqués dans la résistance à la tétracycline chez la bactérie *Escherichia coli*. Chez ce micro-organisme, en absence de tétracycline, ou un analogue plus stable tel que la doxycycline (DOX), ces motifs tetO fixent normalement une protéine dénommée tetR qui réprime l'expression des gènes de résistance à la tétracycline (Ramos et al., 2005). Dans le système utilisé chez la levure, le plasmide code pour une protéine de fusion entre le domaine de liaison de la protéine tetR et une protéine à domaine activateur de transcription (**Figure 72**). Ainsi, en absence d'antibiotique, cette protéine de fusion va se fixer sur la région promotrice et induire l'expression des gènes sous sa dépendance. En présence d'antibiotiques, il n'y a plus de fixation de la protéine de fusion aux motifs tetO à la suite d'une interaction entre l'antibiotique et la protéine tetR, et donc plus d'expression de la protéine d'intérêt. Il est défini comme un système tet-off. Ce système permet donc une surexpression par dérégulation du contrôle transcriptionnel du gène de la protéine d'intérêt et a été associé au gène *HAP4* et inséré dans des cellules délétées pour le gène endogène codant pour Hap4p. Cette souche surexprimant alors Hap4p, nommée $\Delta hap4\uparrow$, a été utilisée afin de pouvoir étudier la cinétique de mise en place de l'effet Warburg dans un contexte où la quantité de Hap4p serait maintenue malgré l'ajout de glucose dans le milieu. Ainsi, dans un premier temps, une vérification de ce maintien a été effectué par immunodétection. La **Figure 73** montre que l'ajout de glucose n'induit pas une diminution de la quantité de Hap4p avant 8 heures de suivi dans cette souche.

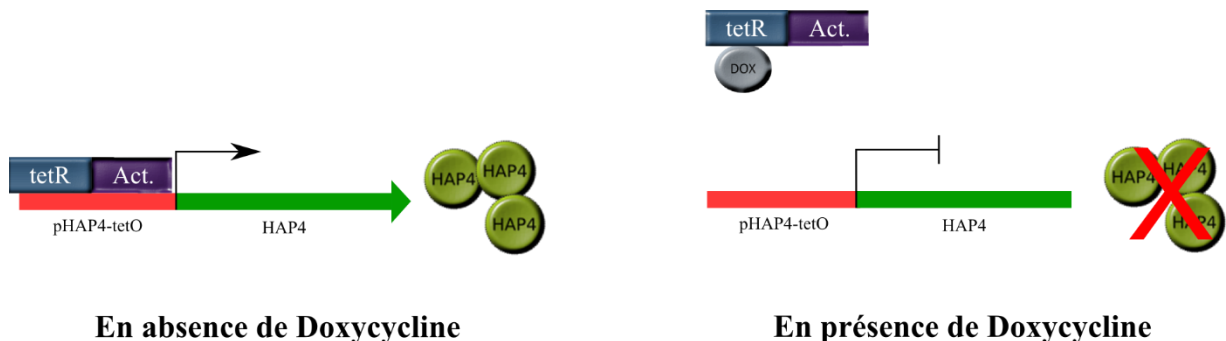


Figure 72. Illustration du système d'expression génique tet-off régulé par la doxycycline.

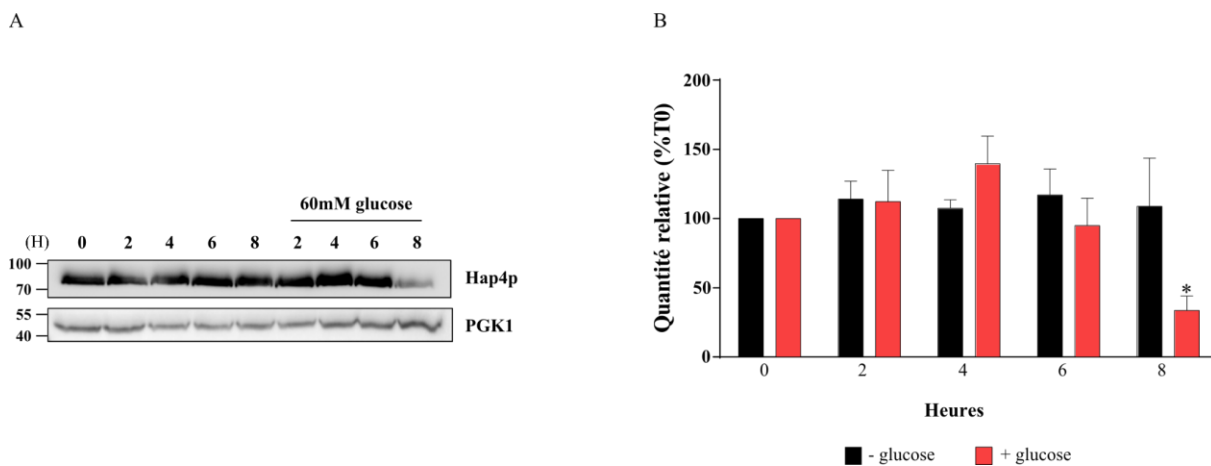


Figure 73. Effet du glucose sur la surexpression de Hap4p

A. La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=4)

Un suivi des principaux paramètres de l'effet Warburg a ensuite été réalisé. La souche $\Delta hap4\uparrow$ présente une respiration endogène plus importante que la souche WT alors que leur vitesse de prolifération est sensiblement la même (**Figure 74A et B**). L'ajout de glucose induit une augmentation de la prolifération cellulaire identique à celle observée chez la souche sauvage (**Figure 74A**). En revanche, l'inhibition de la vitesse de respiration est initiée beaucoup plus tardivement dans la souche surexprimée : après 4 heures, lorsque l'inhibition est observable dès 2 heures après l'ajout de glucose dans les cellules WT (**Figure 74B**). Ainsi, après 8 heures de suivi, l'inhibition de la respiration est de moins de 45% de la respiration initiale pour 70% dans les cellules WT (**Figure 74B**). Cette diminution de la vitesse de respiration pourrait être due à un retard de l'impact de l'ajout du glucose, par rapport à la souche WT, sur la vitesse de respiration. En effet, durant les quatre dernières heures, la diminution de la vitesse de respiration de la souche $\Delta hap4\uparrow$ est équivalente à la celle de la souche WT durant les quatre premières heures. De précédents résultats du laboratoire avaient pu mettre en évidence que l'ajout de glucose dans le milieu de culture de cette souche entraînait une consommation du glucose ainsi qu'une production d'éthanol semblable à celles observées dans la souche WT (Hammad, 2018) (**Figure 74C**). Ainsi, l'ajout du glucose sur cette souche enclenche bien la mise en place d'une glycolyse fonctionnelle. Le suivi de l'activité HXK montre une activité endogène bien plus importante que dans la souche sauvage en absence de glucose et cette activité a tendance à augmenter après ajout du glucose, bien que de façon non significative (**Figure 74D**). Les protéines HXK ont donc une activité plus importante chez la souche $\Delta hap4\uparrow$

ou sont non fonctionnelles en absence de glucose chez les cellules WT. Comme dit précédemment, la souche $\Delta hap4$ est délétée pour le gène *HAP4* et donc ne peut pas initier la biogenèse mitochondriale. Cette souche est donc glycolyse dépendante avant l'ajout

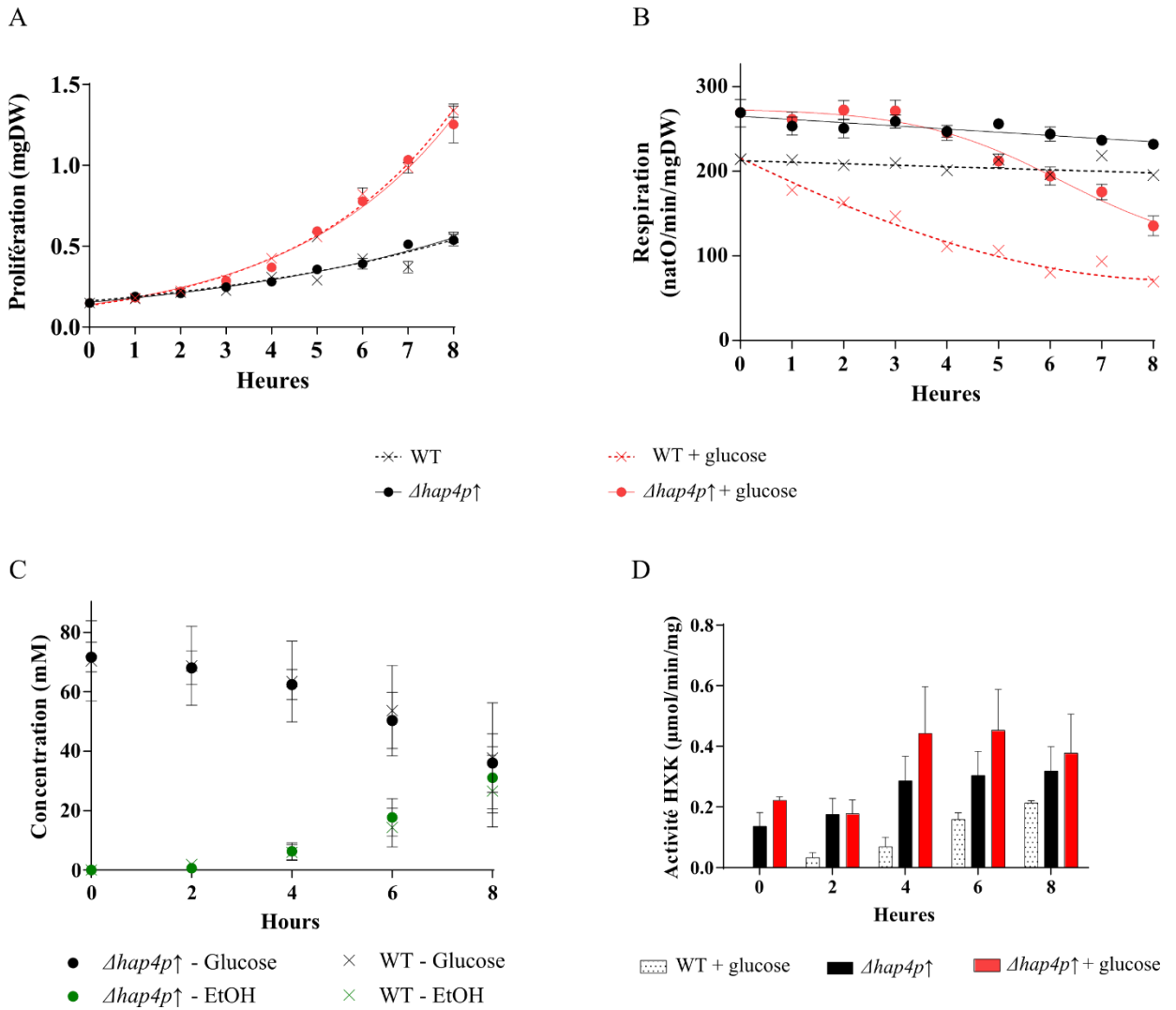


Figure 74. Effet du glucose sur les trois paramètres de l'effet Warburg dans les cellules $\Delta hap4\uparrow$

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. (n=4) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. (n=4) **C.** Consommation de glucose et production d'éthanol (EtOH) en mM. Résultats issus de la thèse de Nouredine Hammad. **D.** L'activité de l'hexokinase a été mesurée par spectrophotométrie et est rapportée à la quantité de protéine en mg. (n=3)

du gène surexprimant *HAP4*, une expression endogène plus importante des protéines de la glycolyse ne semble donc pas impossible.

Il semble donc que la surexpression de Hap4p puisse limiter la diminution de la vitesse de la respiration sans affecter la mise en place de la glycolyse ni l'augmentation de la prolifération suite à l'ajout de glucose. Ce premier résultat va à l'encontre du dogme énoncé par Warburg en 1956 qui décrivait l'effet comme un remodelage métabolique menant à une augmentation de la prolifération (Warburg, 1956a, 1956b). En effet, ici, l'augmentation de la prolifération a lieu en absence d'un véritable remodelage métabolique, l'inhibition de la respiration étant moitié moins importante que dans la souche sauvage. En fait, le pool mitochondrial semble pouvoir être maintenu dans ces conditions. Nouredine Hammad a mis en évidence que dans les cellules $\Delta hap4\uparrow$, la quantité de cytochromes n'était que faiblement diminuée suite à l'ajout de glucose par rapport à ce qui était observé dans les cellules WT (Hammad, 2018) (**Figure 75A**). D'autre part, l'activité des enzymes mitochondriales semble également peu affectée (**Figure 75B et C**) : l'activité COX ne subit aucune modification significative après l'ajout de glucose et l'activité citrate synthase semble légèrement diminuée, cependant et comme dit précédemment, cette activité n'est pas uniquement due à la citrate synthase mitochondriale et la citrate synthase peroxisomale est connue pour être réprimée en absence de glucose (Rickey and Lewin, 1986; Lewin et al., 1990). Associés au maintien de la quantité de Hap4p, ces résultats mettent en évidence un maintien partiel du pool mitochondrial *via* la biogenèse mitochondriale en présence de glucose. Il n'y a donc qu'un remodelage métabolique partiel, puisque qu'il n'y a pas de diminution de la vitesse de respiration, bien qu'il y ait une augmentation de la glycolyse et de la fermentation. Cependant, les résultats montrent qu'après l'ajout du glucose, la vitesse de prolifération augmente. Il y a donc une décorrélation, dans ce contexte, entre les trois paramètres à l'origine de l'effet Warburg, le remodelage métabolique ne semble, ici, pas être à l'origine de l'augmentation de la vitesse de prolifération.

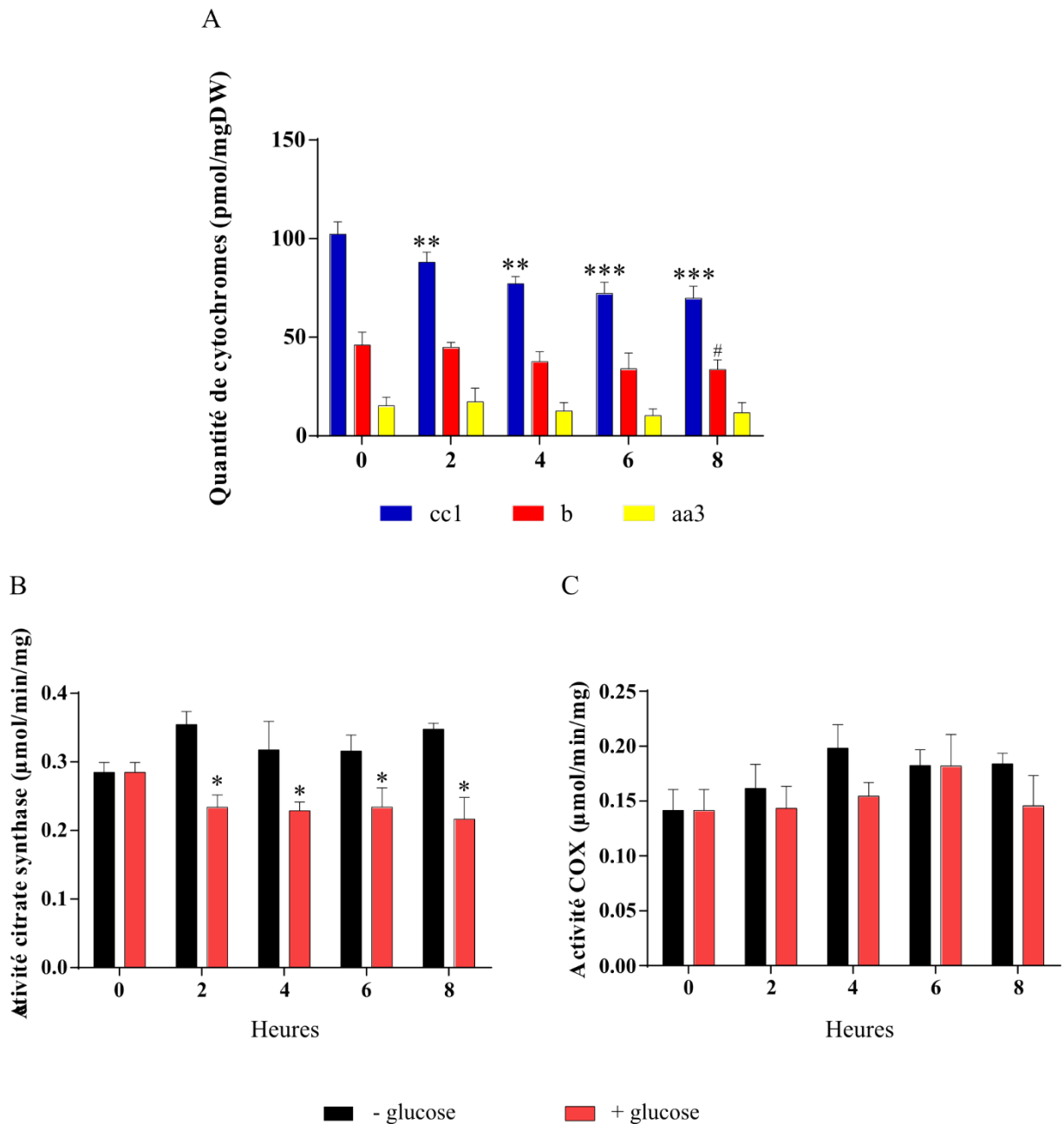


Figure 75. Effet du glucose sur les activités enzymatiques dans les cellules $\Delta hap4\uparrow$

A. Quantification des cytochromes mitochondriaux. * représente la p value des mesures de cc1, # de b et \$ de aa3. Résultats issus de la thèse de Noureddine Hammad. **B** et **C.** Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **B.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=3) **C.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=3)

4.5.2 Effet de la délétion de Hxk2p sur l'induction de l'effet Warburg

Chez *S. cerevisiae*, la prise en charge et la dégradation des hexoses tels que le glucose ou le fructose par exemple, par les différentes voies, et notamment par la glycolyse, est assuré

par trois isoformes d'hexokinase : l'hexokinase I (Hxk1p), l'hexokinase II (Hxk2p) et la glucokinase (Gancedo et al., 1977; Herrero et al., 1995; Moreno and Herrero, 2002). 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 (Muratsubaki and Katsume, 1979; Herrero et al., 1995). Mis à part le galactose, Hxk2p est exclusivement exprimée dans des conditions de prolifération sur substrat fermentescible, alors que les deux autres sont principalement exprimées dans des conditions de prolifération sur substrat non-fermentescible ou sur galactose, milieu respiro-fermentaire (Herrero et al., 1995; Moreno and Herrero, 2002). Dans des conditions de défauts d'expression d'Hxk2p, la phosphorylation du glucose est principalement assurée par Hxk1p. En effet, lors de la prolifération en milieu glucose, il a été montré que les cellules $\Delta h x k 2$ présentaient un taux de transcription élevé du gène *HXK1*, qui code pour Hxk1p (Rodriguez et al., 2001; Moreno et al., 2005)

Dans la littérature, la protéine Hxk2p est décrite comme ayant deux rôles : un rôle catalytique de kinase et un rôle de régulateur de la transcription. Lors de la répression glucose, Hxk2p est décrite comme fortement impliquée dans la régulation de l'expression des gènes codant pour les transporteurs de glucose HXT (Petit et al., 2000). En effet, en milieu glucose, il a été montré que la délétion de Hxk2p modifiait significativement le profil d'expression des différentes isoformes d'HXT à l'origine d'une variation du flux de consommation de glucose. Cela met 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 (Elbing et al., 2004). D'autre part, Hxk2p catalyse la première réaction permettant le recrutement du glucose dans les différentes voies métaboliques notamment la glycolyse. Elle est la protéine appartenant à la voie de dégradation du glucose la plus exprimée au cours de la prolifération sur glucose (Muratsubaki and Katsume, 1979; Herrero et al., 1995; Rodriguez et al., 2001; Moreno and Herrero, 2002). Sa fonction de kinase semble permettre à cette protéine de procurer aux cellules de *S. cerevisiae* une capacité plus importante de phosphorylation des hexoses. En effet, il a été montré que *in-vitro* l'activité de phosphorylation de glucose des cellules *S. cerevisiae* diminue d'environ 50%, en absence de Hxk2p (Walsh et al., 1991). Enfin, des études ont mis en évidence que la répression de l'expression de *HAP4* par Mig1p serait dépendante de la présence de Hxk2p (Rolland et al., 2002; Ahuatzi et al., 2004).

L'étude de la délétion de *HXK2* a plusieurs intérêts du fait de la double fonction de Hxk2p. Cette protéine joue un rôle clef dans les mécanismes moléculaires de la répression glucose à travers ses deux fonctions distinctes (Peláez et al., 2010). Elle est impliquée dans le métabolisme énergétique des cellules de *S. cerevisiae* en présence de glucose, par sa fonction kinase (Herrero et al., 1995), et dans la coordination de la répression et de l'expression de

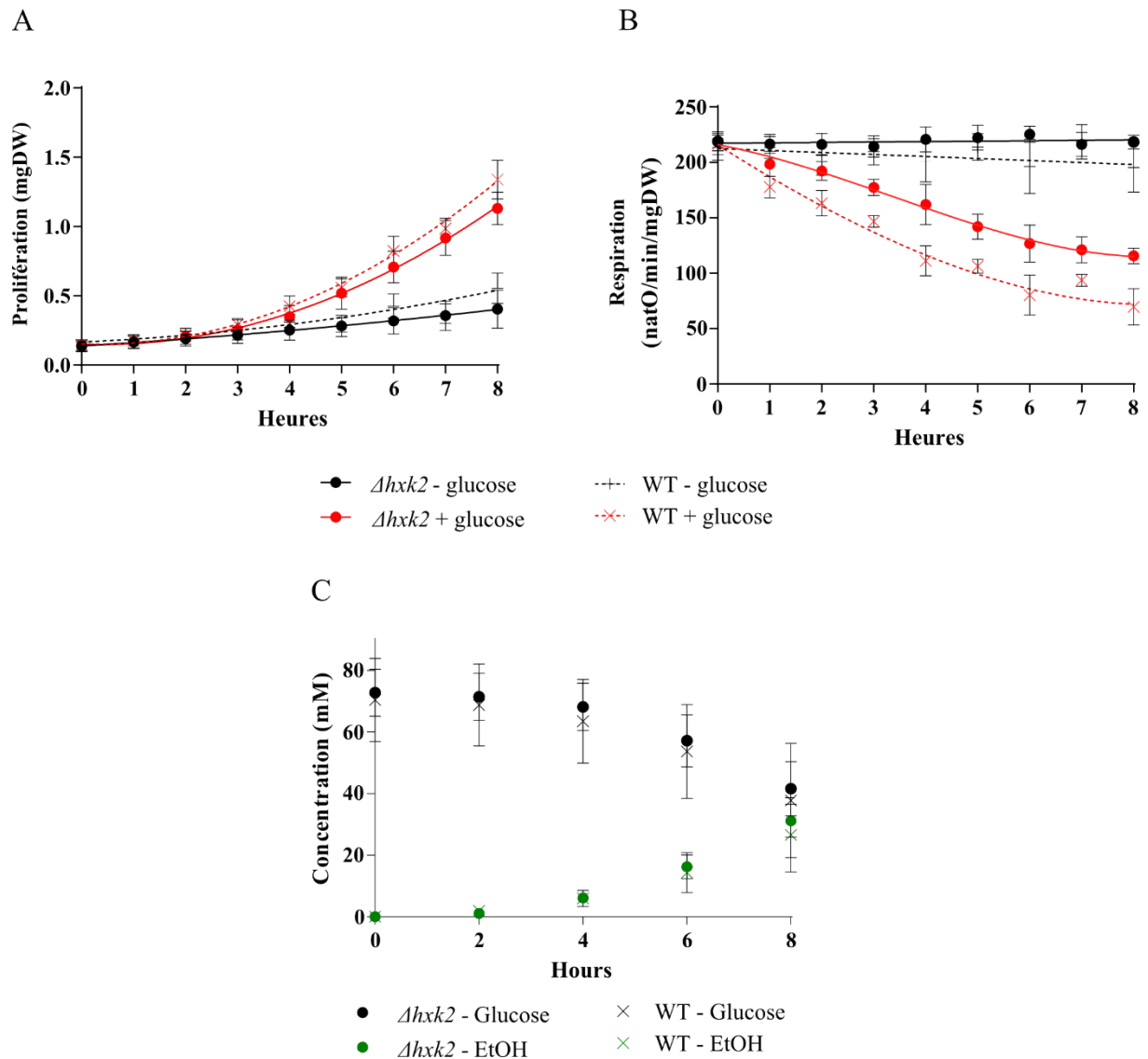


Figure 76. Effet de la délétion de *HXK2* sur les paramètres de l'effet Warburg. (issu de la thèse de Noureddine Hammad)

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** Etude de la vitesse de prolifération dans les cellules WT et $\Delta hxk2$ en présence ou en absence de glucose. **B.** Etude de la vitesse de respiration dans les cellules WT et $\Delta hxk2$ en présence ou en absence de glucose. **C.** Consommation du glucose et production d'éthanol (EtOH) dans les cellules WT et $\Delta hxk2$.

nombreux gènes, lors du processus de la répression catabolique, de par sa fonction de facteur de transcription (Peláez et al., 2010).

Précédemment les travaux du laboratoire ont montré que, seule, la délétion de Hxk2p entraînait un phénotype proche des cellules WT en présence de glucose tant au niveau de la vitesse de respiration que de la vitesse de prolifération (**Figure 76A et B**). En effet, même si la vitesse de la respiration semble moins diminuer dans la souche $\Delta hxk2$, après 8 heures la respiration est inhibée à 50% dans cette souche. La consommation de glucose et la production d'éthanol sont comparables entre les deux souches (**Figure 76C**). Ces résultats indiquent que les autres hexokinases remplissent la fonction de phosphorylation du glucose en absence de

Hxk2p. Ce qui est confirmé par l'activité HXK qui, en présence de glucose, augmente au cours du temps et atteint des niveaux nettement supérieurs à celle mesurée dans les cellules WT (**Figure 61A**) montrant que les isoformes de Hxk2p sont fortement actives **Figure 77A**. Ainsi, l'absence d'expression du gène de Hxk2p ne semble pas empêcher la mise en place de l'effet Warburg. De plus, le contenu mitochondrial est diminué après ajout du glucose comme observé dans les cellules WT en présence de glucose. Cependant, si la quantité de cytochromes des deux souches est comparable durant les quatre premières heures, elle diminue plus lentement les dernières heures, ce qui est cohérent avec la respiration légèrement plus importante de la souche *Δhvk2* (**Tableau XVII**). De même, les activités enzymatiques de la CS et de la COX sont légèrement plus élevées que celles mesurées dans les cellules WT (**Figure 77B et C et Figure 65A et B**). Malgré cela, les activités enzymatiques et la quantité de cytochromes diminuent fortement après l'ajout de glucose. Ce qui permet de dire que l'absence de Hxk2p n'empêche pas la répression métabolique due au glucose et la mise en place d'un effet Warburg dans cette souche.

Tableau XVII. Comparaison de la quantité de cytochromes mitochondriaux dans les souches WT et *Δhvk2* (± S.E.M)

	WT			<i>Δhvk2</i>		
	cc1	b	aa3	cc1	b	aa3
<i>T0</i>	72 (± 2,7)	45 (± 2,4)	13 (± 3,4)	74 (± 1,5)	37 (± 3)	12 (± 1,9)
<i>T2</i>	50 (± 2,7)	32 (± 1,3)	13 (± 2,7)	57 (± 0,2)	28 (± 1,9)	6 (± 0,4)
<i>T4</i>	37 (± 3,4)	20 (± 3,4)	10 (± 3,7)	50 (± 2,1)	22 (± 2)	7 (± 0,3)
<i>T6</i>	29 (± 1,3)	15 (± 1,6)	6 (± 2)	46 (± 1,5)	21 (± 2,2)	7 (± 0,8)
<i>T8</i>	25 (± 1,7)	13 (± 2,6)	9 (± 2,5)	42 (± 1,8)	21 (± 2,7)	6 (± 1,2)

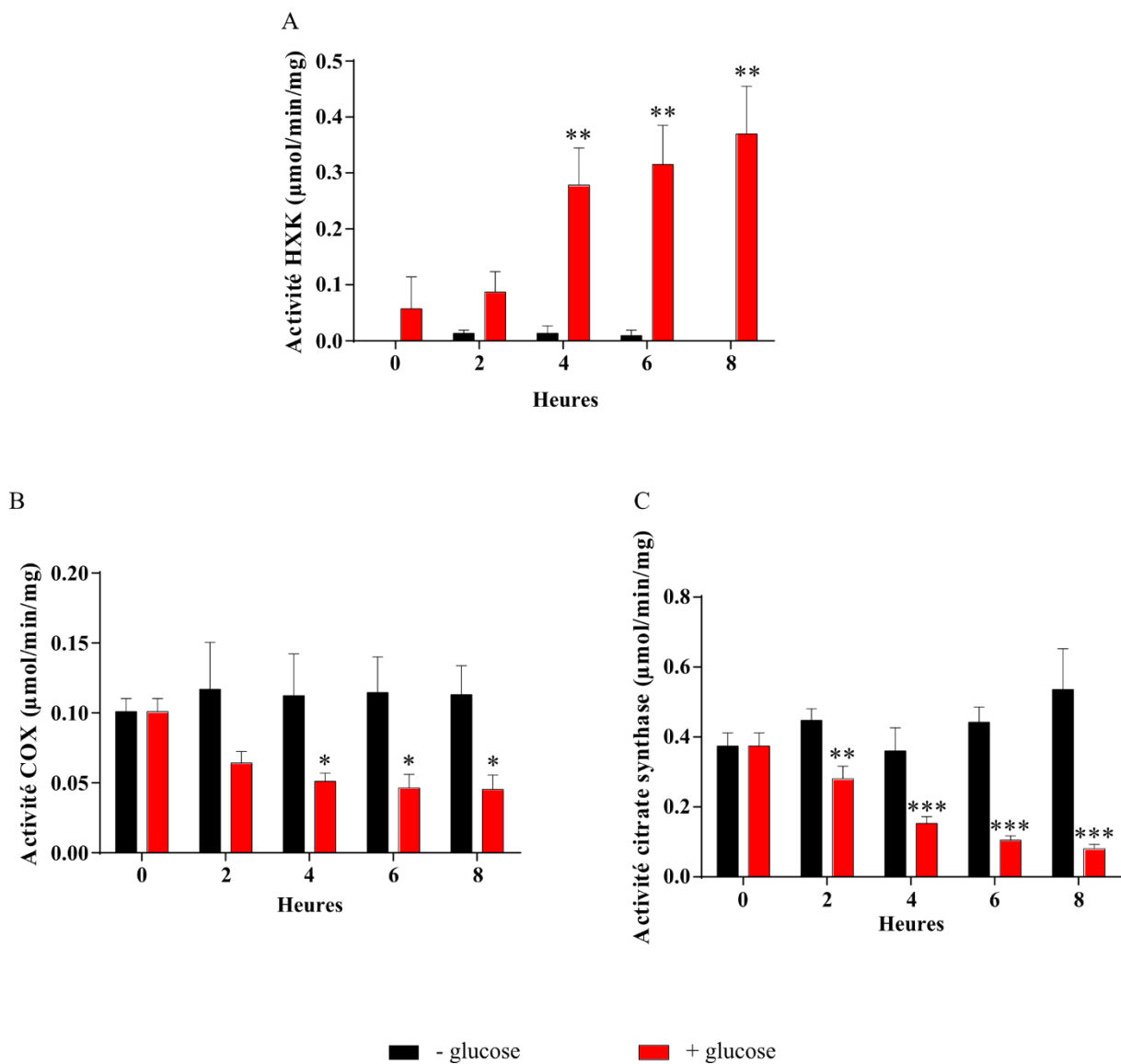


Figure 77. Effet du glucose sur les activités enzymatiques dans les cellules $\Delta hvk2$

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **A.** L'activité de l'hexokinase a été mesurée par spectrophotométrie et est rapportée à la quantité de protéine en mg. (n=6) **B.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=6) **C.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=6)

4.5.3 Influence de la délétion de *HVK2* associée à une surexpression de Hap4p

Dans la souche $\Delta hap4\uparrow$, la surexpression de la protéine régulatrice du complexe HAP semble empêcher partiellement l'effet Warburg d'être mis en place par un maintien de la biogenèse mitochondriale. Cependant, la glycolyse ne semblant pas touchée, l'étude d'une souche délétée sur une hexokinase et surexprimant Hap4p permettrait d'étudier le rôle conjoint

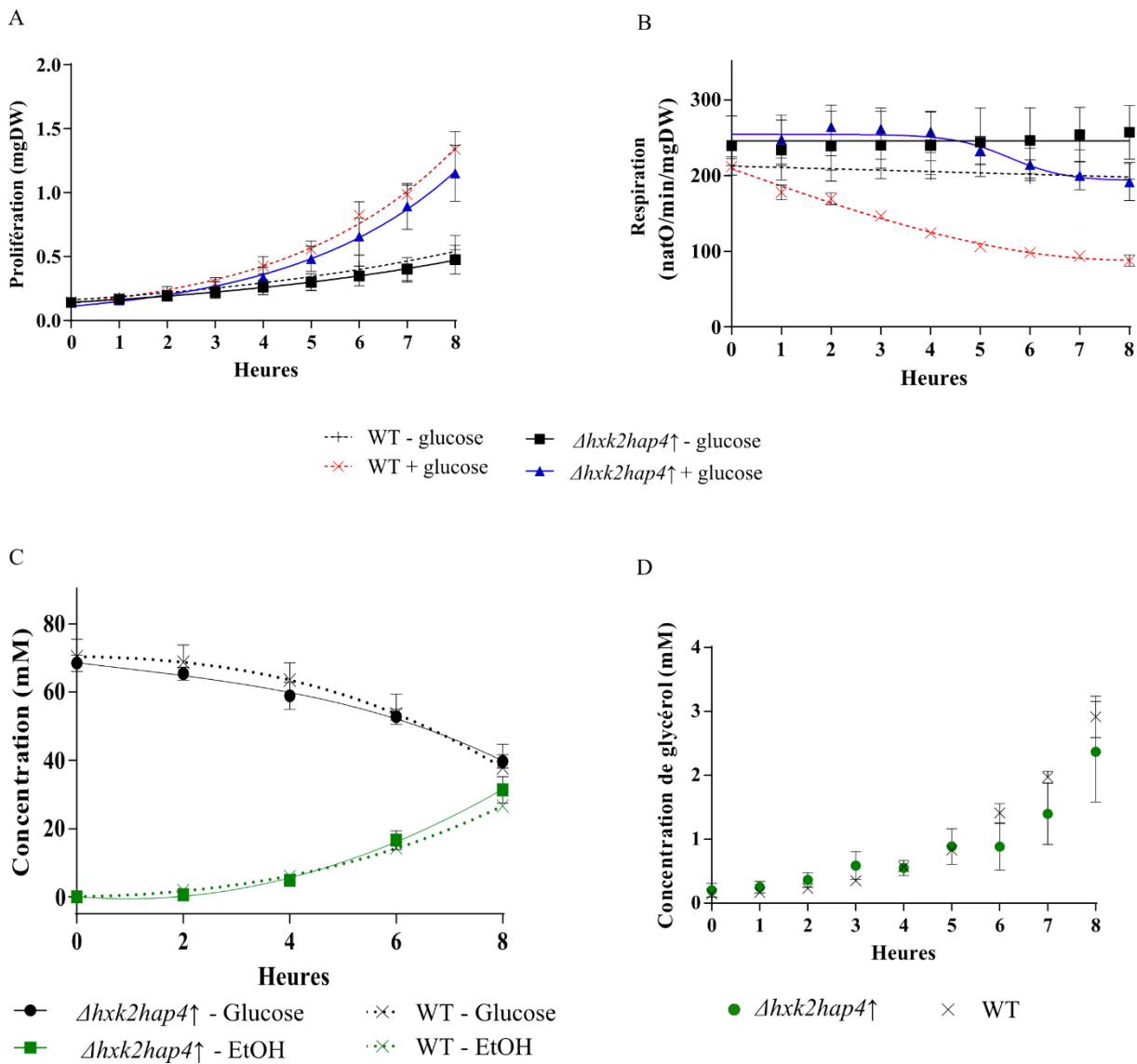


Figure 78. Effet de la double mutation sur les paramètres de l'effet Warburg

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. (n=14) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. (n=14) **C.** La consommation de glucose et la production d'éthanol (EtOH) sont suivies sur 8 heures en présence de 60mM de glucose. (n=4) **D.** La production du glycérol est suivie au cours des 8 heures après l'ajout de 60mM de glucose. (n=4)

de la délétion de *HXK2* et du maintien partiel du pool mitochondrial dans la mise en place de l'effet Warburg. Cette souche, notée $\Delta hvk2hap4^+$, a été déléetée pour la protéine Hxk2p.

Associée à une surexpression de Hap4p, la délétion de $\Delta hvk2$ a induit un phénotype tout autre. Dans les cellules $\Delta hvk2hap4^+$, la prolifération cellulaire en absence de glucose est similaire à celle observée dans les cellules WT (**Figure 78A**). La vitesse de respiration est, quant à elle, supérieure à celle des cellules WT d'environ 25% (**Figure 78B**). L'ajout de glucose induit une augmentation de la prolifération cellulaire comparable à celle de la souche sauvage. En revanche, la vitesse de la respiration est nettement moins impactée que dans la souche WT.

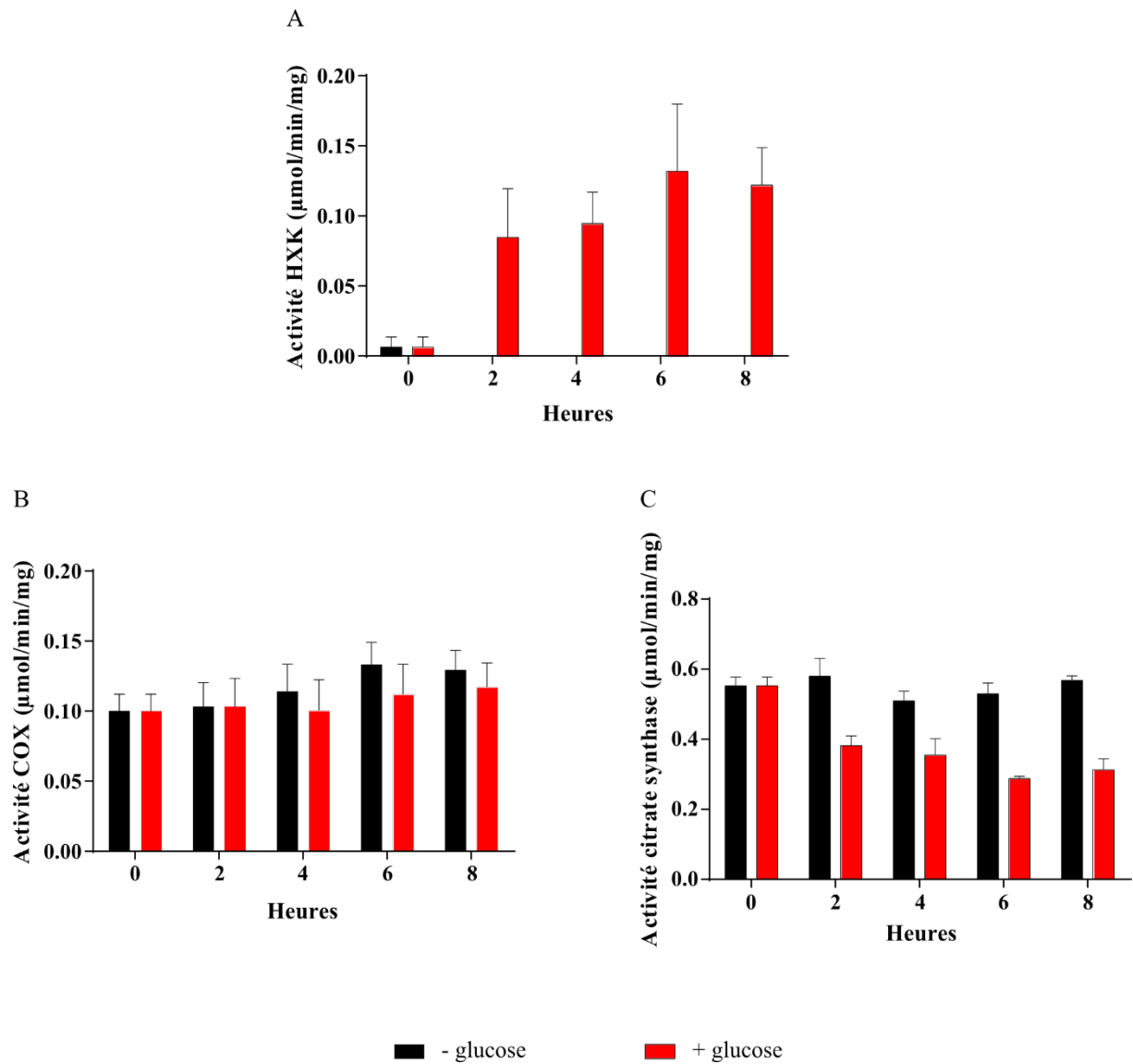


Figure 79. Effet du glucose sur les activités enzymatiques dans les cellules $\Delta hvk2hap4\uparrow$

Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **A.** L'activité de l'hexokinase a été mesurée par spectrophotométrie et est rapportée à la quantité de protéine en mg. (n=3) **B.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=3) **C.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=3)

La diminution de la vitesse de respiration n'est détectable que 5 heures après l'ajout du glucose et, après 8 heures de suivi, la respiration de la souche $\Delta hvk2hap4\uparrow$ est comparable à celle de la souche sauvage en absence de glucose. Ce résultat indique donc que la souche $\Delta hvk2hap4\uparrow$ est capable de maintenir les fonctions mitochondriales même en présence de glucose à un niveau comparable à celui des cellules WT en absence de glucose. L'absence d'inhibition de la respiration n'empêche pas, dans cette souche, une mise en place de la glycolyse et de la fermentation puisque la consommation du glucose et la production de l'éthanol et de glycérol augmente au cours du temps après l'ajout de glucose de façon comparable à la souche WT (**Figure 78C et D**). L'activité HXK est étonnement non détectable en absence de glucose, tout

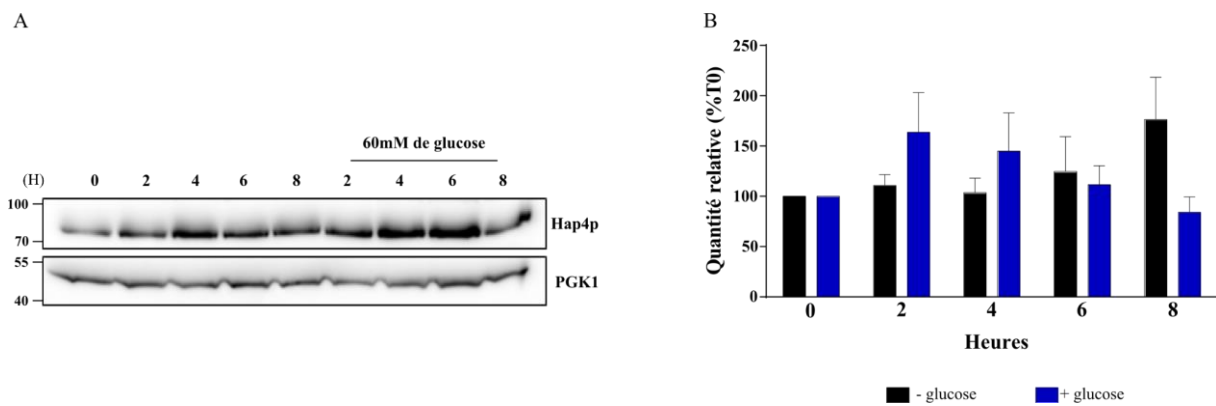


Figure 80. Effet du glucose sur la quantité relative de Hap4p dans les cellules $\Delta hpk2hap4\uparrow$

A. La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des résultats obtenus. **B.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=4)

elle l'est dans les cellules $\Delta hap4\uparrow$. Elle est augmentée suite à l'ajout de glucose de façon comparable aux cellules WT (**Figure 79A**).

D'autre part, l'activité COX dans cette souche est stable au cours du temps (**Figure 79B**). L'activité CS, quant à elle, semble impactée par l'ajout de glucose bien que nettement plus faiblement que dans les cellules WT (**Figure 79C**). Ce résultat peut s'expliquer par l'inhibition par le glucose de la citrate synthase peroxisomale. Afin de comprendre le maintien des fonctions mitochondriales en présence de glucose, la quantité de Hap4p a été mesurée. Dans la **Figure 80**, il apparaît que le niveau relatif de la protéine n'est pas impacté par l'ajout de glucose. Cela induirait donc un maintien de l'activité de biogenèse mitochondriale équivalent en présence ou en absence de glucose et ainsi un contenu mitochondrial stable dans les cellules même après l'ajout de glucose. Ceci est cohérent avec les résultats obtenus précédemment par le laboratoire montrant une stabilité au cours du temps de la quantité de cytochromes mitochondriaux après ajout de glucose dans la souche $\Delta hpk2hap4\uparrow$ (Hammad, 2018)(**Figure 81**).

Il est à noter que les résultats de cette souche diffèrent de ceux obtenus avec la souche mutante $\Delta hap4\uparrow$. En présence de glucose, la vitesse de respiration et la quantité de cytochromes sont moins diminuées dans la souche double mutant. La vitesse de respiration est d'ailleurs peu affectée par l'ajout du glucose et ce de façon stable dans le temps, lorsque la diminution de la vitesse de respiration de la souche $\Delta hap4\uparrow$ pourrait être due à un retard de l'impact de l'ajout du glucose sur la vitesse de respiration, par rapport à la souche WT. En revanche l'activité HXK est plus faible dans le double mutant par rapport aux résultats obtenus dans la souche $\Delta hap4\uparrow$.

L'association des deux mutations induit donc une diminution quantifiable de l'activité des protéines et permet également un maintien plus important de la biogenèse mitochondriale que dans les souches simple mutant. Les résultats obtenus sur cette souche mettent également en évidence que la double mutation empêche une diminution drastique des fonctions mitochondriales par un maintien de la biogenèse de ce compartiment *via* Hap4p par rapport aux souches simple mutant. En revanche, l'absence d'une répression glucose au niveau de la mitochondrie n'induit pas une absence de la glycolyse ni de l'augmentation de la prolifération cellulaire après ajout de glucose, comme observé dans la souche $\Delta hap4\uparrow$. Cette souche est celle qui permet un maintien de la biogenèse mitochondriale comparable à ce qui est observable dans la souche WT en absence de glucose. En effet, en présence de glucose cette souche (1) maintient une vitesse de respiration identique à celle mesurée dans la souche WT en absence de glucose ; (2) une quantité constante de cytochromes ; (3) une activité COX constante et (4) un maintien de la quantité relative de Hap4p. Pourtant, cela n'empêche pas une mise en place de la glycolyse avec une consommation de glucose et une production d'éthanol et de glycérol et surtout une augmentation de la vitesse de prolifération comparables au WT. Ce résultat décorrèlent encore les paramètres décrits par Warburg puisqu'il y a un maintien total de l'activité des OXPHOS et une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire.

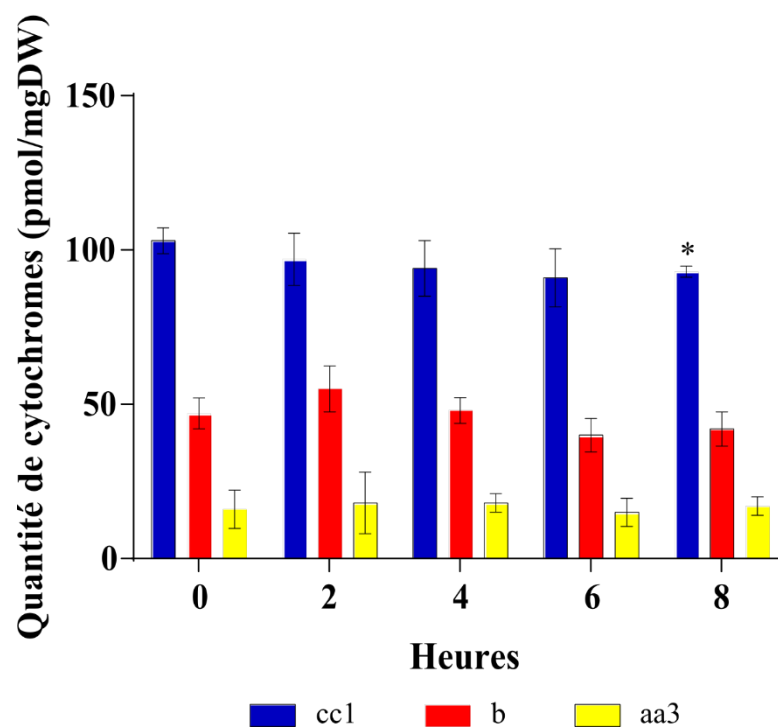


Figure 81. Effet du glucose sur la quantité de cytochromes mitochondriaux dans la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$. (issus de la thèse de Nouredine Hammad)

4.6 Résultats complémentaires de la caractérisation de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*

Afin d'avancer dans la compréhension de ce phénotype et afin de caractériser au mieux les mécanismes de mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*, l'étude d'un certain nombre de paramètres a été initiée.

4.6.1 Influence de l'inhibition de Hap4p sur la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae*

Au vu des premiers résultats obtenus, le maintien d'une activité de biogenèse mitochondriale semble permettre un maintien suffisant de l'activité des OXPHOS. Ce phénomène empêche la mise en place de l'effet Warburg par un maintien de la vitesse de respiration malgré l'activité glycolytique identique à celles des cellules WT. Ainsi, une étude a été réalisée sur la souche $\Delta hap4\uparrow$ dans un contexte où l'expression de *HAP4* est bloquée à l'initiation du suivi sur 8 heures. Dans ces conditions, au moment où l'expression du gène est déléetée, les cellules ont un pool mitochondrial intact, contrairement à une souche $\Delta hap4$. L'objectif de cette étude est de savoir si l'absence de Hap4p dans cette souche peut accélérer la mise en place de l'effet Warburg, la surexpression de cette protéine semblant diminuer la répression glucose sur la biogenèse mitochondriale. Pour ce faire, les cellules $\Delta hap4\uparrow$ ont été placées dans un milieu contenant de la DOX, qui comme expliqué précédemment permet d'empêcher l'expression du gène *HAP4*. Le turn-over de la protéine étant rapide (environ 7 minutes de temps de demi-vie), après l'ajout de DOX, la quantité de la protéine baisse très rapidement. La **Figure 82A** montre qu'à 5 μ g/mL de DOX ajoutés après une heure la protéine n'est plus détectable et qu'à 10 μ g/mL, Hap4p n'est plus détectable dès 30 minutes d'incubation et le reste durant les 8 heures de suivi (**Figure 82B**). Les expériences ont donc été réalisées en présence de 10 μ g/mL de DOX.

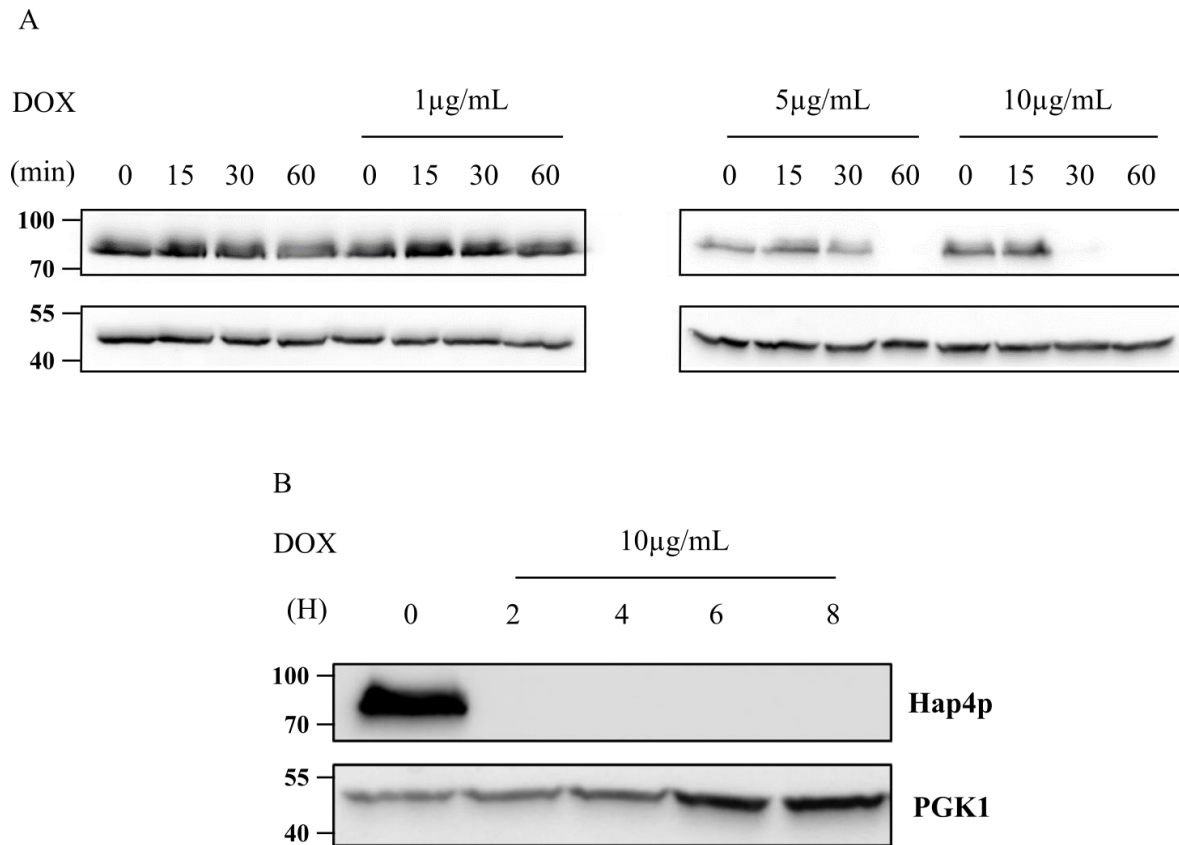


Figure 82. Effet de la DOX sur la quantité de Hap4p dans la souche $\Delta hap4^{\uparrow}$

A. Les cellules ont été incubées en présence de DOX aux concentrations indiquées au-dessus des pistes. Le temps est indiqué en minutes. La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. **B.** Les cellules ont été incubées en présence de DOX à la concentration indiquée au-dessus des pistes. Le temps est indiqué en heures. La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. L'immunodétection présentée est représentative de l'ensemble des quatre résultats obtenus.

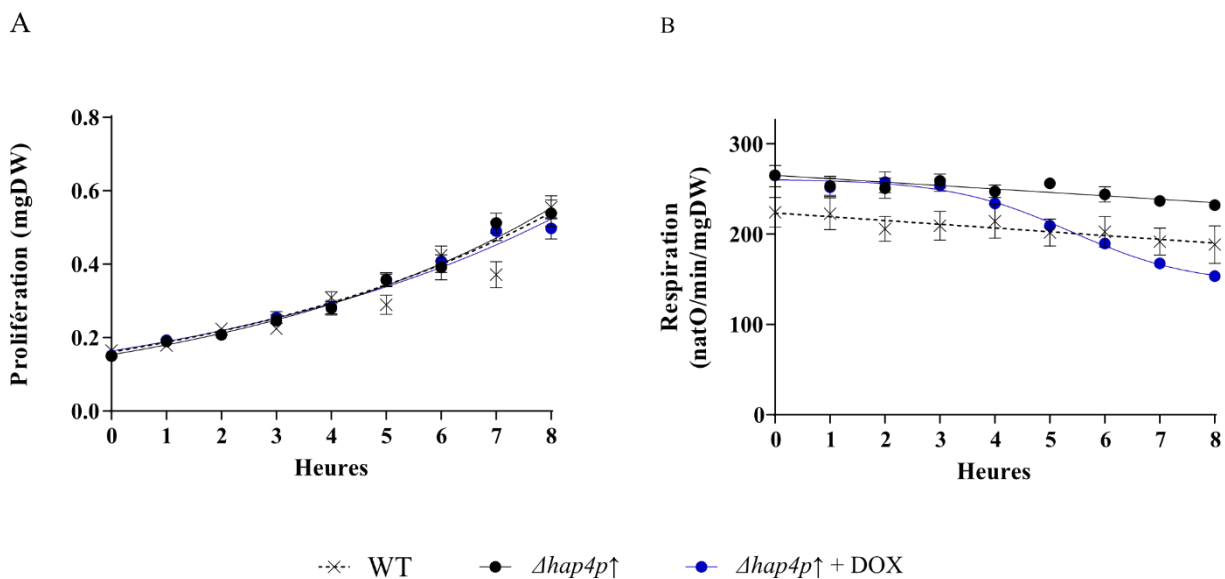


Figure 83. Effet de la DOX sur la prolifération et la respiration dans la souche $\Delta hap4\uparrow$

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en milieu lactate en absence ou en présence de 10 μ g/mL de DOX. (n=7) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en milieu lactate en absence ou en présence de 10 μ g/mL de DOX. (n=7)

La **Figure 83A** met en évidence que l'ajout de DOX dans le milieu de culture n'induit aucune modification sur la prolifération cellulaire de la souche. En revanche, l'absence d'expression du gène *HAP4* semble être à l'origine d'une diminution de la vitesse de respiration s'initiant environ 4 heures après l'ajout de DOX (**Figure 83B**). La protéine Hap4p régulant la biogenèse mitochondriale, l'absence de cette protéine doit entraîner une diminution progressive de la quantité de mitochondries dans les cellules à la suite de la prolifération cellulaire. L'ajout de glucose dans ces conditions, n'entraîne, là encore, aucune modification de la vitesse de prolifération par rapport à celle après ajout de glucose seul (**Figure 84A**). De même manière, la vitesse de respiration après ajout de glucose associée à la DOX n'est pas différente de celle mesurée dans les cellules WT subissant la répression glucose (**Figure 84B et C**). En effet, la diminution de la respiration semble apparaître plus tardivement, après 2 heures, mais *in fine*, après 8 heures de suivi, une diminution de la respiration de 70% est observé dans les deux conditions (**Figure 84B et C**).

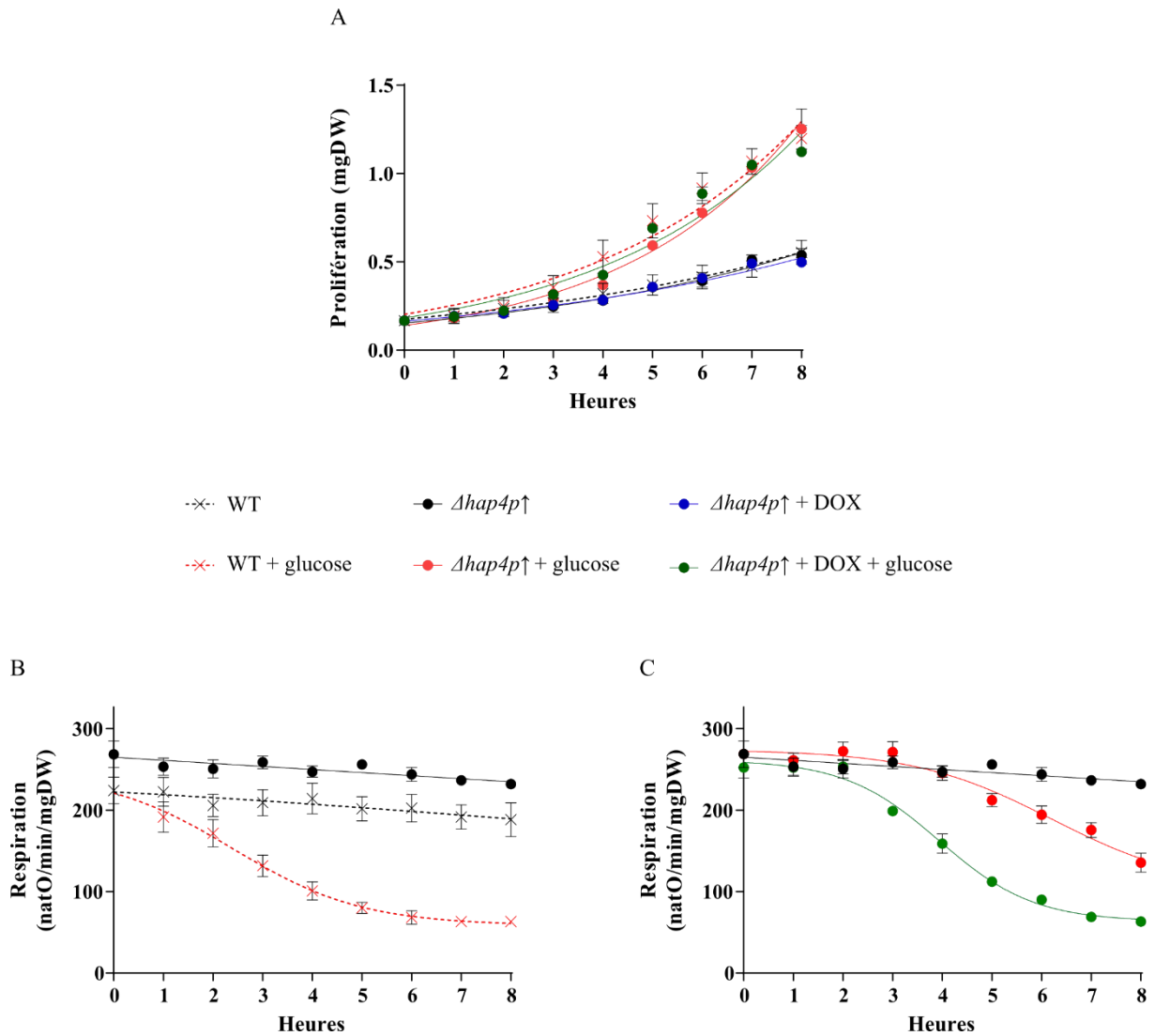


Figure 84. Effet du glucose associé à la DOX sur la prolifération et la respiration dans les cellules $\Delta hap4\uparrow$

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 10 μ g/mL de DOX et/ou de 60mM de glucose. (n=3) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 10 μ g/mL de DOX. (n=7) **C.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 10 μ g/mL de DOX et/ou de 60mM de glucose. (n=3)

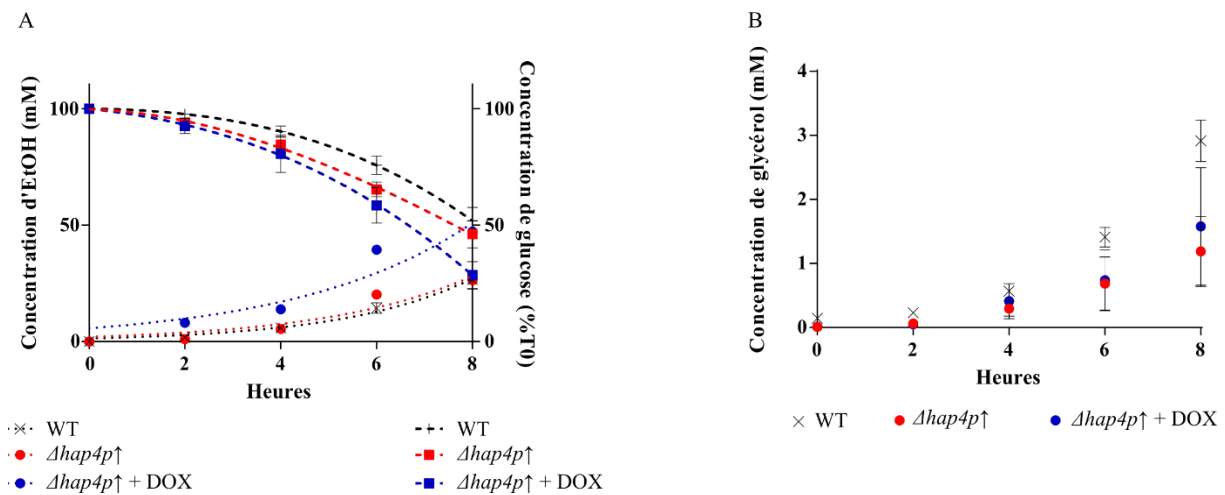


Figure 85. Effet du glucose et de la DOX sur la glycolyse dans les cellules $\Delta hap4\uparrow$

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La consommation de glucose et la production d'éthanol (EtOH) sont suivies sur 8 heures en présence de 60mM de glucose et/ou de 10 μ g/mL de DOX. Les pourcentages présentés pour la consommation du glucose ont été calculés à partir des concentrations obtenues dans ces conditions en pourcentage de la mesure à T0. (n=4) **B.** La production du glycérol est suivie au cours des 8 heures après l'ajout de 60mM de glucose et/ou de 10 μ g/mL de DOX. (n=4)

La mise en place de la glycolyse a été étudiée *via* la consommation de glucose et la production de deux produits de la glycolyse, l'éthanol et le glycérol. La **Figure 85A** met en évidence que l'ajout de DOX semble induire une consommation plus importante de glucose par rapport au $\Delta hap4\uparrow$ sans DOX, qui a une consommation équivalente au WT. Il en est de même pour la production d'éthanol qui est équivalente dans la souche sauvage et la souche $\Delta hap4\uparrow$ et qui semble plus importante dans la souche mutée supplémentée avec de la DOX. D'autre part, la production de glycérol, autre produit de la glycolyse, est produite en plus faible concentration chez la souche délétée (**Figure 85B**). Cela pourrait signifier que, dans cette souche, la production d'éthanol est davantage favorisée par rapport à ce qui est visible dans la souche sauvage. Il est possible que la diminution de la quantité de Hap4p soit à l'origine d'une augmentation du flux glycolytiques. Dans ce cas-là, le mécanisme est donc différent de la répression de Hap4p par le glucose ou l'inhibition de Hap4p et la répression glucose ont un effet synergique sur le flux glycolytique.

L'ensemble de ces résultats semblent indiquer que la glycolyse est plus fortement induite dans une souche dans laquelle il n'y a pas de synthèse d'Hap4p. Il est donc envisageable que la mise en place de l'effet Warburg dans les cellules *S. cerevisiae* soit dépendante de la répression qu'exerce le glucose sur Hap4p pour l'initiation du remodelage métabolique. En présence d'un maintien fort de l'expression de Hap4p, l'effet Warburg est réduit par un maintien du pool mitochondrial, à l'inverse en l'absence de la synthèse de cette protéine, la mise en place de la glycolyse est plus rapide, la quantité de mitochondries est faible et les cellules subissent un effet Warburg menant à une prolifération rapide.

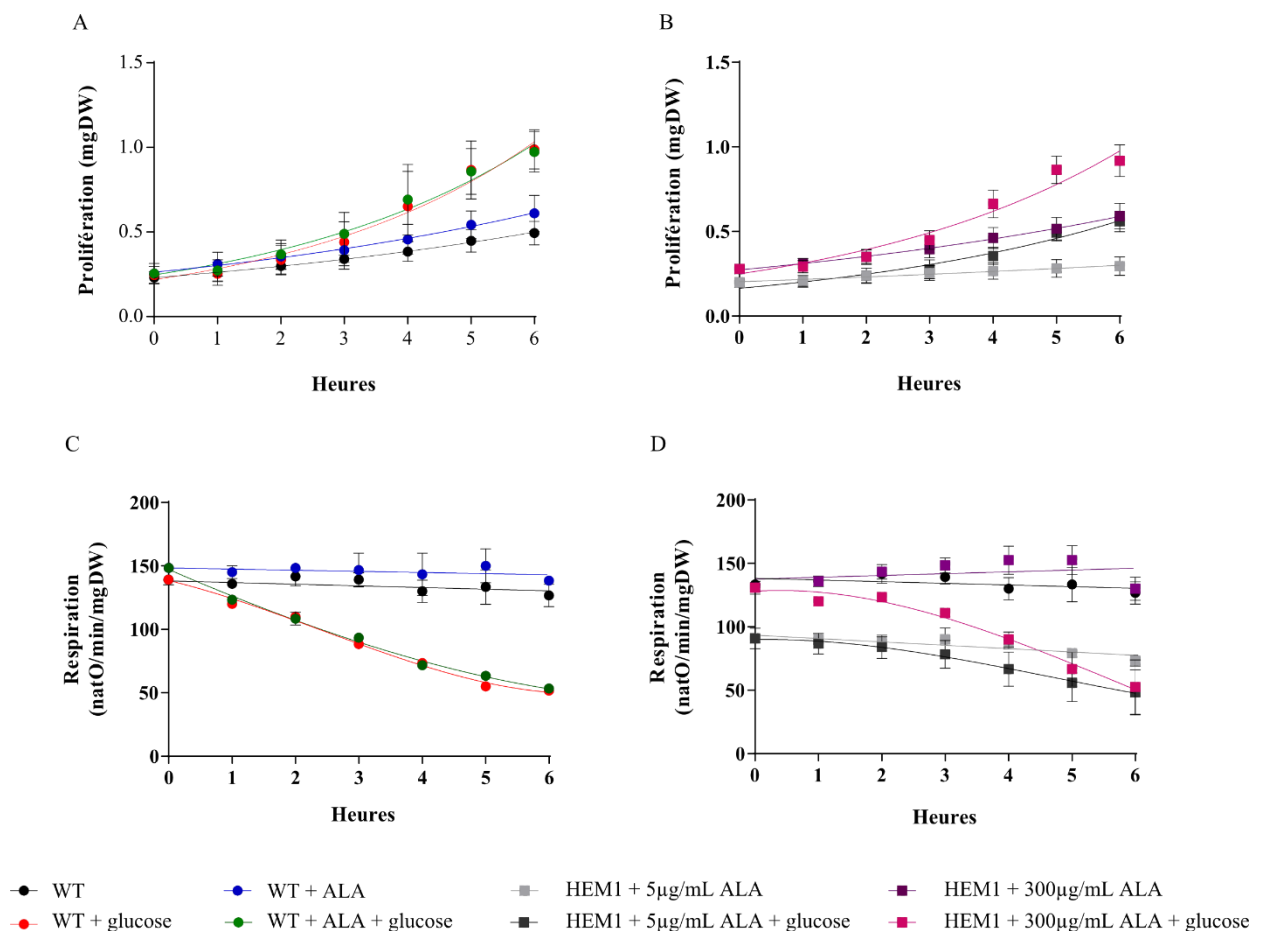


Figure 86. Effet de l'ALA dans un contexte de répression glucose

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La prolifération cellulaire est suivie sur 6 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose sur la souche sauvage dont le milieu a été supplémenté ou non par 300 μ g/mL d'ALA. (n=4) **B.** La prolifération cellulaire est suivie sur 6 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose sur la souche $\Delta hem1$ dont le milieu a été supplémenté par 5 μ g/mL ou 300 μ g/mL d'ALA. (n=4) **C.** La vitesse de respiration est suivie sur 6 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose sur la souche sauvage dont le milieu a été supplémenté ou non par 300 μ g/mL d'ALA. (n=4) **D.** La vitesse de respiration est suivie sur 6 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose sur la souche $\Delta hem1$ dont le milieu a été supplémenté par 5 μ g/mL ou 300 μ g/mL d'ALA. La courbe représentant la respiration de la souche WT seule a été ajouté pour comparaison (n=4)

4.6.2 Est-ce que l'ALA peut augmenter la biogenèse dans ces conditions ?

Les premiers résultats obtenus semblent indiquer que la mise en place de l'effet Warburg chez *S. cerevisiae* est dépendante de la répression de Hap4p par le glucose. En effet, le maintien de la quantité de Hap4p dans les cellules permet celui de la quantité de mitochondries et donc une activité mitochondriale constante. Or, dans le chapitre précédent, j'ai pu mettre en évidence que l'ajout en forte concentration d'ALA, dans une souche délétée pour la première enzyme de la voie de biosynthèse de l'hème, induisait une augmentation de la stabilité de Hap4p. Je me suis donc intéressée à l'impact de l'ALA dans un contexte de répression glucose. En effet, l'ajout du glucose semble induire une diminution de la stabilité de cette protéine (**Figure 68A et B**). Il est donc possible que l'ajout d'ALA à forte concentration puisse empêcher la diminution de la quantité de Hap4p par une augmentation de sa stabilité. De plus, dans leur étude, Vancura et son équipe ont mis en évidence qu'une synthèse accrue de l'hème dans le levure *Δhem1* induisait un remodelage métabolique principalement fermentaire vers un métabolisme principalement mitochondrial, donc inverse à l'effet Warburg, même dans des conditions de répression du glucose (Zhang et al., 2017). Cependant, leur étude est effectuée dans un milieu glucose dans lequel la répression de Hap4p est déjà établie et leur étude se concentre sur l'expression du gène Hap4p et non sur la quantité de protéine finale. Or, mes résultats montrent que la répression glucose agit également directement sur la stabilité de la protéine. Des cellules WT et *Δhem1* ont donc été supplémentées avec de l'ALA à des concentrations similaires, 300 μg/mL ou à de faibles concentrations, 5 μg/mL, afin de déterminer si cela induisait une différence lors de la mise en place de l'effet Warburg. Le suivi a été effectué sur 6 heures car la faible concentration d'ALA ajoutée ne permet pas un suivi plus long sur les cellules *Δhem1*.

Les résultats obtenus montrent que l'ajout d'ALA à forte concentration ne semble avoir aucun effet ni sur la vitesse de prolifération, ni sur la vitesse de respiration dans les deux souches, bien que dans la souche *Δhem1*, la diminution de la respiration semble se mettre en place plus tardivement (**Figure 86**). Cela met ainsi en évidence que les deux voies de régulation de Hap4p sont bien distinctes. En revanche, on remarque que la diminution de la respiration induite dans les cellules *Δhem1-ALA5-* est nettement inférieure aux autres conditions (environ 60% dans les cellules WT avec ou sans ALA et *Δhem1-ALA300-* contre 35% dans les cellules *Δhem1-ALA5-*). Dans les mêmes conditions, la prolifération double en présence de glucose de façon similaire aux autres conditions (**Figure 86**). Les résultats du chapitre précédent mettaient en évidence que dans de telles conditions de prolifération, la quantité de Hap4p était très faible. Il est possible que la quantité faible de Hap4p ne permettent pas sa réelle répression par le

glucose expliquant un faible impact de l'ajout du glucose sur la vitesse respiration et un impact équivalent sur l'augmentation de la prolifération. Cela confirmerait que le maintien du pool mitochondrial est dépendant de Hap4p. De plus, il est à noter que malgré le fait qu'à 5µg/mL d'ALA, le glucose n'induit qu'une faible diminution de la respiration, l'augmentation de la prolifération est comparable aux autres conditions. Dans ce contexte, il y a donc une décorrélation entre les paramètres décrits dans l'effet Warburg.

4.6.3 Influence du substrat dans la mise en place de l'effet Warburg

Dans les résultats précédents sur le $\Delta h x k 2$ et $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$, et malgré l'absence de Hxk2p, l'activation de la glycolyse suite à l'ajout de glucose était maintenue. Une étude sur le changement du substrat des hexokinases a été réalisée afin de savoir si cela pourrait empêcher l'induction de la glycolyse. En effet, la transformation du glucose en glucose-6-phosphate par les hexokinases permet son engagement dans la voie de la glycolyse. Cependant, les hexokinases peuvent également permettre la transformation du fructose en fructose-6-phosphate, troisième intermédiaire de la glycolyse. Les hexokinases ont une affinité 20 fois supérieure pour le glucose que pour le fructose. L'utilisation du fructose plutôt que du glucose pourrait permettre de ralentir la mise en place de l'effet Warburg. De plus, il ne semble pas avoir été montré actuellement un lien entre le fructose et la répression de la synthèse de Hap4p.

Le fructose a donc été ajouté de la même manière et à la même concentration que le glucose dans le milieu de culture des cellules WT. La **Figure 87A et B** montre que l'ajout du fructose n'induit aucun changement au phénotype observé en présence de glucose que ce soit pour la vitesse de respiration ou de prolifération. Ce qui est cohérent avec la quantité relative de Hap4p détectée. En effet, l'ajout de fructose, tout comme l'ajout de glucose, induit une forte diminution de la quantité de Hap4p dès 2 heures après l'ajout et qui se maintient durant tout le suivi (**Figure 87C et D**). Ces résultats indiquent que la répression mitochondriale peut être induite par l'engagement d'autres hexoses qui peuvent-être à l'origine d'une initiation de la glycolyse.

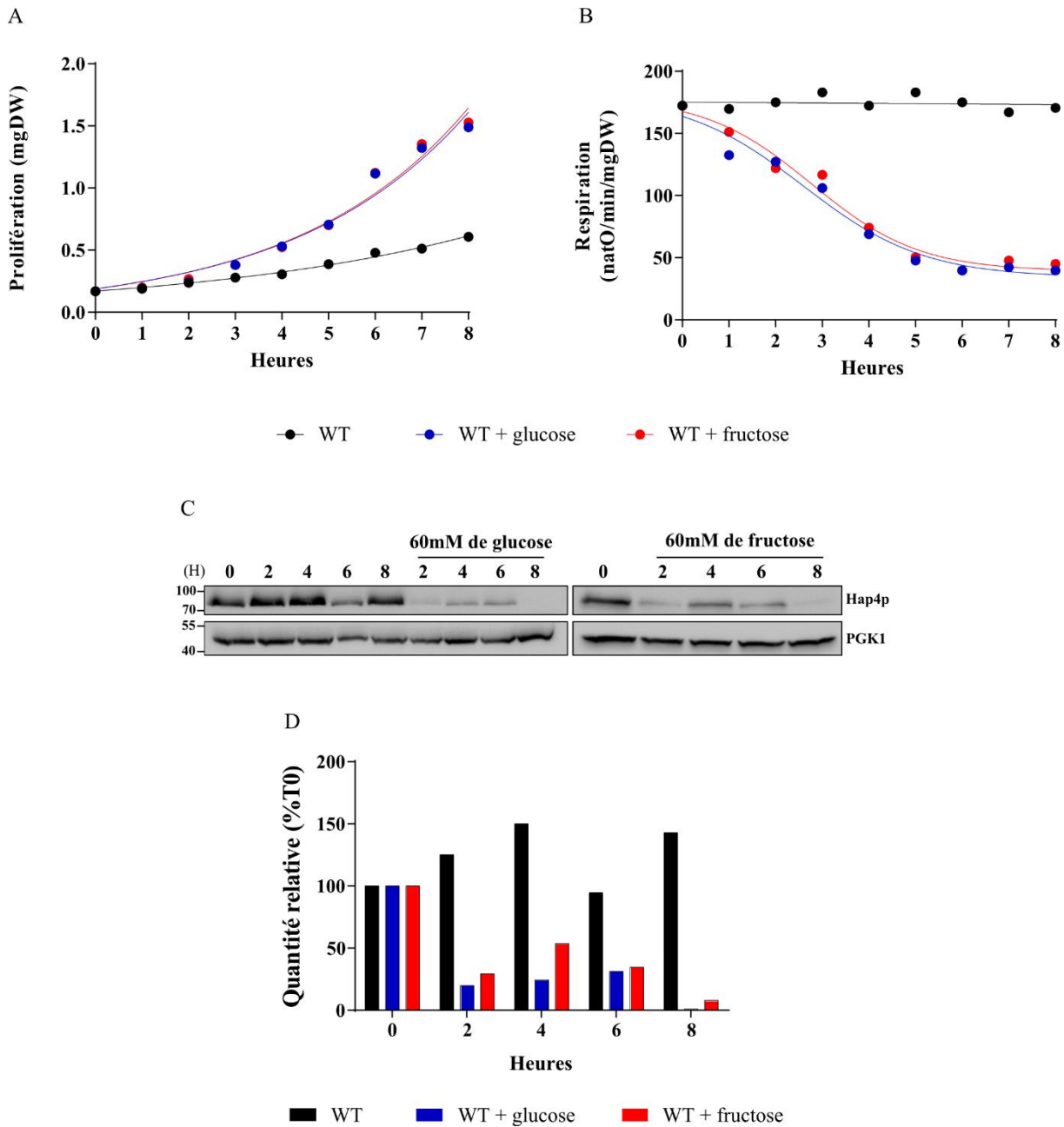


Figure 87. Effet du fructose sur la prolifération, la respiration et la quantité de Hap4p

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de fructose ou de glucose. (n=1) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de fructose ou de glucose. (n=1) **C.** La quantité relative de Hap4p est mise en évidence par western-blot sur des extraits cellulaires totaux prélevés à 0,5UDO et en suivant l'apparition d'une bande correspondant à la protéine grâce à des anticorps dirigés contre Hap4p. La protéine PGK-1 est un contrôle de charge. **D.** Le niveau relatif de Hap4p est déterminé dans les deux conditions, en présence ou en absence de fructose ou de glucose, en la comparant à la quantité relative du contrôle de charge. Le résultat est exprimé en pourcentage du T0. (n=1)

4.7 Effet du glucose sur la souche *Candida utilis*, une souche respiratoire obligatoire

Dans les résultats précédents, l'expression de Hap4p a été modifiée génétiquement, par surexpression ou inhibition de l'expression. L'utilisation d'une souche qui maintient naturellement la biogenèse mitochondriale malgré l'ajout de glucose serait donc intéressant afin de confirmer, dans ce contexte, une augmentation de la vitesse de prolifération par le glucose. Cette souche permettrait ainsi de confirmer la décorrélation entre les paramètres de l'effet Warburg. La souche *Candida utilis* est respiratoire obligatoire, est connue comme nécessitant un métabolisme mitochondrial actif pour se développer même en présence de glucose. Elle est alors définie comme Crabtree Négative. L'effet Crabtree est l'inhibition de la consommation d'oxygène cellulaire lors de l'addition de glucose relevant alors d'une régulation cinétique de la phosphorylation oxydative mitochondriale (Crabtree, 1929; Díaz-Ruiz et al., 2008; Rosas Lemus et al., 2018). Dans les levures, les souches ont longtemps été caractérisées en fonction de la réponse des OXPHOS mitochondriales à la présence de glucose. Les souches Crabtree-négatives sont bien connues pour nécessiter un métabolisme mitochondrial actif pour leur prolifération en présence de glucose.

De plus cette souche, *Candida utilis*, ne possède naturellement pas le gène pour Hap4p. En effet, d'après la littérature peu de souches possèdent une telle régulation de la biogenèse et à l'heure actuelle seule *Saccharomyces cerevisiae*, *Hansenula polymorpha* et *Kluyveromyces lactis* semblent exprimer la protéine Hap4p (Bourgarel et al., 1999; Sybirna et al., 2005; Singh et al., 2011). Les autres souches telles que *C. utilis*, sont connues pour exprimer Hap2p, Hap3p et Hap5p de la même manière que *S. cerevisiae*, cependant le complexe est régulé par d'autres protéines possédant un domaine HAP4L permettant l'interaction avec les autres membres du complexe (Singh et al., 2011; Thiébaud et al., 2017). Ces régulateurs ne sont pas connus pour être réprimés par le glucose, ce qui peut expliquer le caractère respiratoire obligatoire, au vu des précédents résultats. L'utilisation de la souche *C. utilis* pourrait donc permettre de voir si une souche sauvage ne possédant pas Hap4p se comporte après ajout du glucose comme la souche sauvage de *S. cerevisiae* ou des souches mutées $\Delta hap4\uparrow$ et $\Delta hck2$.

Dans les cellules *C. utilis*, comme précédemment montré avec *Saccharomyces cerevisiae*, le glucose induit une augmentation de la vitesse de prolifération cellulaire (**Figure 88A**). En revanche, la vitesse de la respiration mitochondriale n'est pas significativement modifiée lors de l'ajout de glucose bien qu'une légère diminution soit observée en l'absence de glucose (**Figure 88B**). L'augmentation de la vitesse de prolifération est associée à une consommation de glucose, mais cette consommation est très inférieure (20% après 8 heures) à

celle mesurée dans les cellules *S. cerevisiae* (45% après 8 heures) (**Figure 88C**). La production d'éthanol, quant à elle, semble être au niveau minimal dans la souche lors de l'ajout de glucose, et reste constante tout au long du suivi, ce qui est en accord avec le maintien de la phosphorylation oxydative (**Figure 88C**). Ce résultat diffère de ceux observés chez les souches mutantes de *S. cerevisiae* qui malgré un maintien de l'activité des OXPHOS avaient un maintien de la production d'éthanol. De manière similaire la production de glycérol est quasi nulle (**Figure 88D**). En outre, aucun changement significatif dans les cytochromes mitochondriaux et des activités enzymatiques mitochondriales n'a été observé lors de l'ajout de glucose dans cette souche (**Figure 89**). L'activité HXK n'a pas été mesurée, mais la consommation faible de

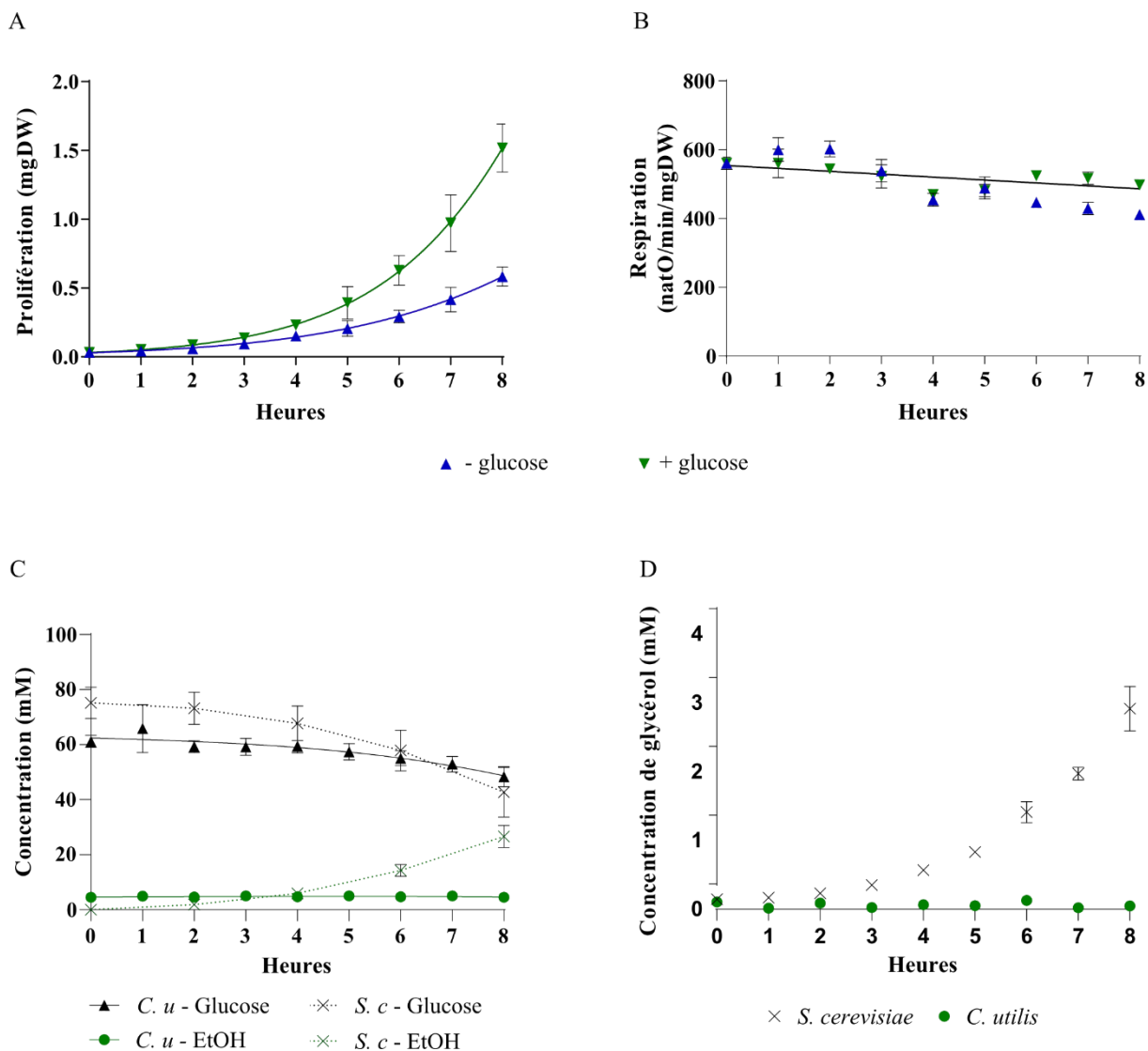
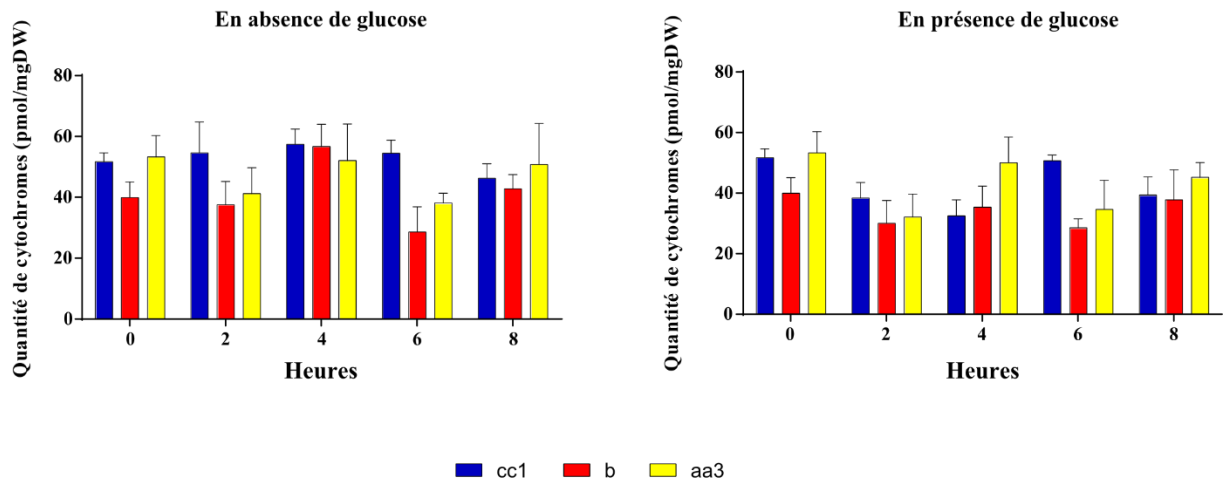


Figure 88. Effet du glucose sur les trois paramètres de l'effet Warburg chez *C. utilis*

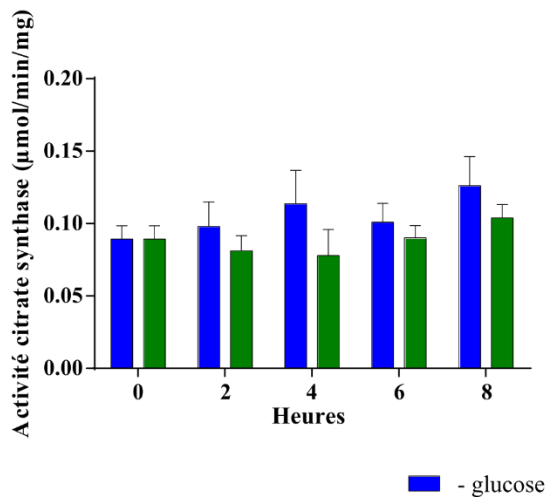
A. La croissance cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. (n=17) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. (n=17) **C.** La consommation de glucose et la production d'éthanol (EtOH) sont suivies sur 8 heures en présence de 60mM de glucose. (n=6) **D.** La production du glycérol est suivie au cours des 8 heures après l'ajout de 60mM de glucose. (n=6)

glucose associée à la faible production d'éthanol et de glycérol tendent à indiquer une faible activité glycolytique. Dans cette souche, les résultats montrent que malgré l'absence de remodelage métabolique suite à l'ajout du glucose, l'augmentation de la prolifération cellulaire est bel et bien présente. Cela confirme que même sur une souche non mutée, l'augmentation de la vitesse de prolifération peut-être décorrélée du remodelage métabolique exercé par le glucose.

A



B



C

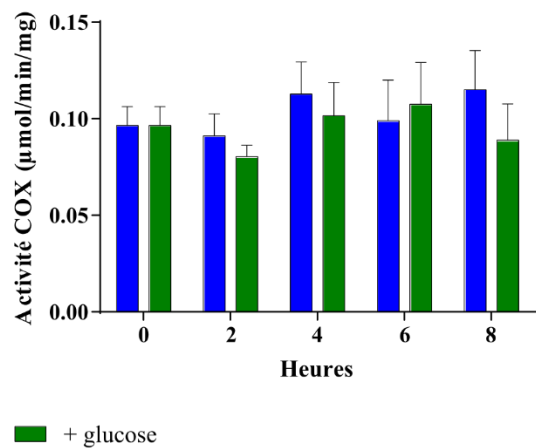


Figure 89. Effet du glucose sur le contenu mitochondrial chez *C. utilis*

A. Quantification à partir de culots cellulaires issus de culture en milieu lactate supplémenté ou non par 60mM de glucose. Quantification des cytochromes par spectrophotométrie à double faisceau. Les cytochromes c et c1 sont quantifiés par le même pic et ne sont donc pas individualisés, de même pour les cytochromes a et a3. (n=6) **B.** et **C.** Les activités ont été effectuées sur des cellules cultivées en lactate 2% (p/v) et lysées comme décrit en section 2.3.5. **B.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=5) **C.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=5)

Il a pu être mis en évidence au sein du laboratoire que *Candida utilis*, contrairement à *S. cerevisiae*, présentait un complexe de pompage de protons, complexe I de la chaîne respiratoire, à l'instar des cellules de mammifère (Avéret et al., 2015). Des expériences similaires aux précédentes ont donc été réalisées en présence de Piericidine A (P.A), un inhibiteur du complexe I (Ohnishi, 1972; Coles et al., 2014; Avéret et al., 2015), afin de s'assurer que l'addition de glucose ne modifie pas la stœchiométrie de pompage des protons de la chaîne respiratoire. Cela pourrait conduire à une augmentation de l'efficacité du système des OXPHOS. En effet, comme expliqué précédemment, la glycolyse génère du NADH qui pourrait être réoxydé au niveau du complexe I. À partir du complexe I, il est admis que la chaîne respiratoire produit 2,5 ATP pour une molécule d'oxygène consommée, alors que pour toutes les autres déshydrogénases, le ratio est de 1,5, du fait de l'absence d'extrusion de proton vers l'espace intermembranaire *via* un complexe I. Dans ce contexte, l'ajout de glucose à ces cellules pourrait alors augmenter l'efficacité de la phosphorylation oxydative (Duszynski et al., 1981; Stoner, 1987; Fitton et al., 1994; Ouhabi et al., 1998). Ce qui expliquerait en partie les résultats obtenus, il ne serait donc plus possible de les comparer à *S. cerevisiae*. Cette expérience a également été réalisée sur la Yeast Foam, une souche de *Saccharomyces cerevisiae* qui a une vitesse de prolifération et de respiration plus proche de celle de *Candida utilis*, par rapport au modèle de *S. cerevisiae* habituel. Son utilisation permet une comparaison entre les phénotypes des deux souches, possédant ou non un complexe I capable d'extruder des protons.

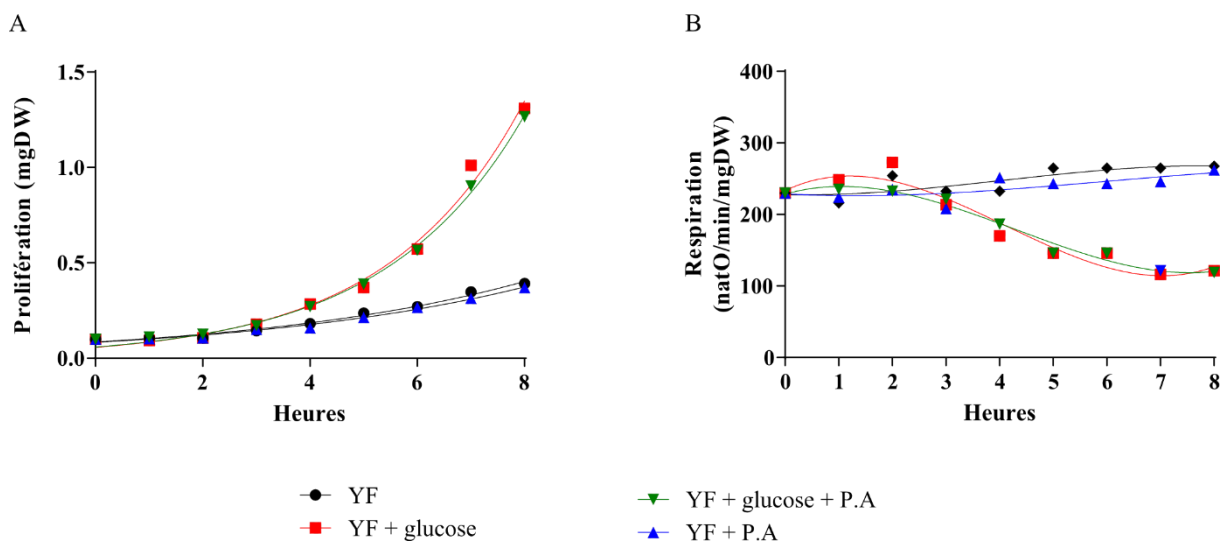


Figure 90. Effet de la piericidine A associée au glucose sur la Yeast Foam

Pour chaque expérience, à T0, 60mM de glucose sont ajoutés au milieu de culture lactate 2% (p/v). **A.** La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 200µM de P.A ou de 60mM de glucose. (n=1) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 200µM de P.A ou de 60mM de glucose. (n=1)

Dans les cellules *Yeast Foam*, l'ajout de P.A n'a aucun effet sur les vitesses de prolifération et de respiration (**Figure 90**), cette souche ne présentant pas de complexe I. En revanche, dans la souche *C. utilis*, la **Figure 91A** montre une augmentation de la vitesse de prolifération après ajout du glucose y compris en présence de P.A et donc d'un complexe I fonctionnel. Cette augmentation de la vitesse de prolifération est similaire en absence de P.A (**Tableau XVIII**). La vitesse de respiration baisse en présence de l'inhibiteur montrant bien l'effet de cette molécule sur l'activité de la chaîne respiratoire (**Figure 91B**). Ce résultat élude ainsi un rôle éventuel de changement d'efficacité de phosphorylation oxydative dans l'augmentation de la vitesse de prolifération.

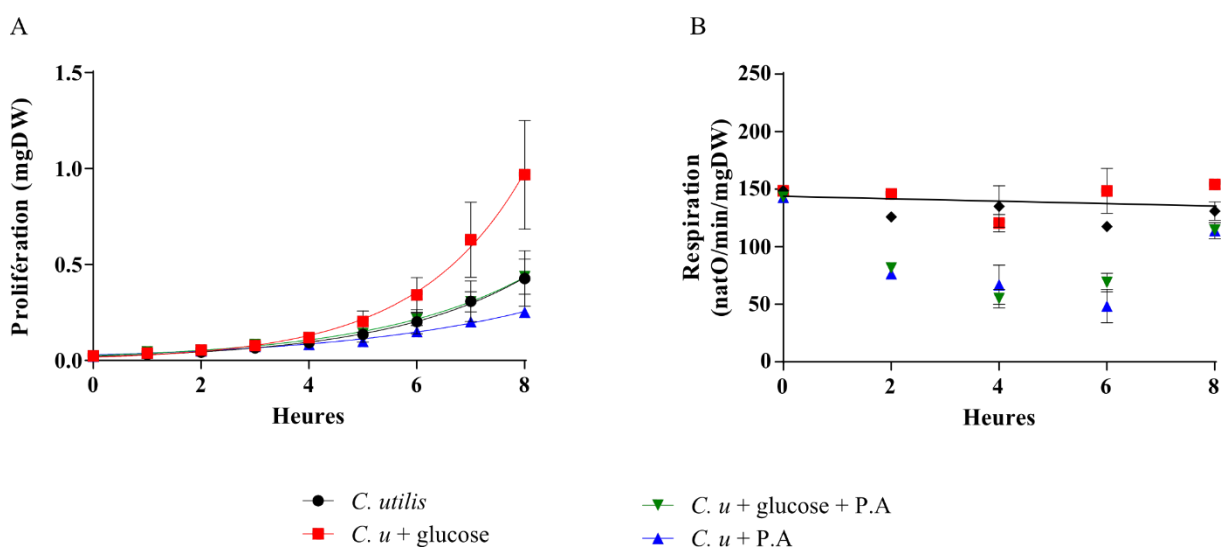


Figure 91. Effet de la piericidine A associée au glucose dans la *C. utilis*

A. La prolifération cellulaire est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 200 μ M de P.A ou de 60mM de glucose. (n=3) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 8 heures en absence ou en présence de 200 μ M de P.A ou de 60mM de glucose. (n=3)

Tableau XVIII. Augmentation de la prolifération dans la souche *C. utilis* après ajout de glucose en présence ou non de P.A en fonction de leur contrôle respectif (% du T0 \pm S.E.M)

	Glucose	Glucose + P.A
<i>T0</i>	1	1
<i>T1</i>	1,28 (\pm 0,09)	1,16 (\pm 0,09)
<i>T2</i>	1,41 (\pm 0,27)	1,02 (\pm 0,08)
<i>T3</i>	1,26 (\pm 0,15)	1,14 (\pm 0,14)
<i>T4</i>	1,3 (\pm 0,1)	1,29 (\pm 0,09)
<i>T5</i>	1,51 (\pm 0,13)	1,43 (\pm 0,11)
<i>T6</i>	1,75 (\pm 0,17)	1,41 (\pm 0,17)
<i>T7</i>	2,09 (\pm 0,15)	1,50 (\pm 0,18)
<i>T8</i>	2,33 (\pm 0,2)	1,71 (\pm 0,23)

L'ensemble de ces résultats permet d'ores et déjà de définir *S. cerevisiae* comme un bon modèle d'étude de la mise en place de l'effet Warburg. Ce remodelage métabolique semble avoir pour élément clef la sous-unité régulatrice du complexe HAP. En effet, la répression glucose qui mime un effet Warburg est médiée par une répression Hap4p. Ce résultat pourrait d'ailleurs être confirmé par les résultats obtenus chez *C. utilis* qui ne possède pas cette protéine et ne semble pas pouvoir effectuer le remodelage métabolique définissant la présence de l'effet Warburg.

Enfin, l'utilisation de cellules mutantes ainsi que de cellules Crabtree négatives nous a permis de montrer qu'il n'y a pas de lien direct entre la diminution de l'activité de phosphorylation oxydative et l'augmentation de la prolifération. En effet, lorsque l'activité de phosphorylation oxydative est maintenue lors de l'ajout de glucose aux cellules, il y a une nette augmentation du taux de prolifération, indiquant qu'il n'y a pas de corrélation entre les deux paramètres. Or dans son étude Warburg couplait le remodelage métabolique avec l'augmentation de la vitesse de prolifération, cette dernière étant alors définie comme une conséquence du remodelage. Les résultats présentés ici, montrent que contrairement à la définition donnée par Warburg dans les années 50, l'augmentation de la vitesse de prolifération n'est pas dépendante de la diminution de l'activité des OXPHOS et de l'augmentation de la voie glycolytique/fermentaire mais que ces paramètres peuvent être dissociés.

4.8 Le flux de synthèse ATP ne contrôle pas la vitesse de prolifération cellulaire

Le comportement de la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$ qui ne correspond pas à la définition d'un effet Warburg soulève un certain nombre de questions. En effet, l'une des fonctions proposées de l'effet Warburg est une augmentation du flux de synthèse d'ATP par la glycolyse permettant une prolifération accrue. Le flux glycolytique a donc été calculé dans la souche *S. cerevisiae* sauvage et dans la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$. Dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le produit final de la glycolyse aérobie telle que définie par Warburg - c'est-à-dire la fermentation - est l'éthanol (**Figure 58**). La **Figure 92** présente le flux de consommation de glucose et le taux de production d'éthanol dans les deux types de souches. Le flux de consommation de glucose a atteint un état stationnaire après environ 4 heures après l'ajout de glucose pour les deux souches et ce flux dans la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$ est inférieur à celui de la souche sauvage (**Figure 92A**).

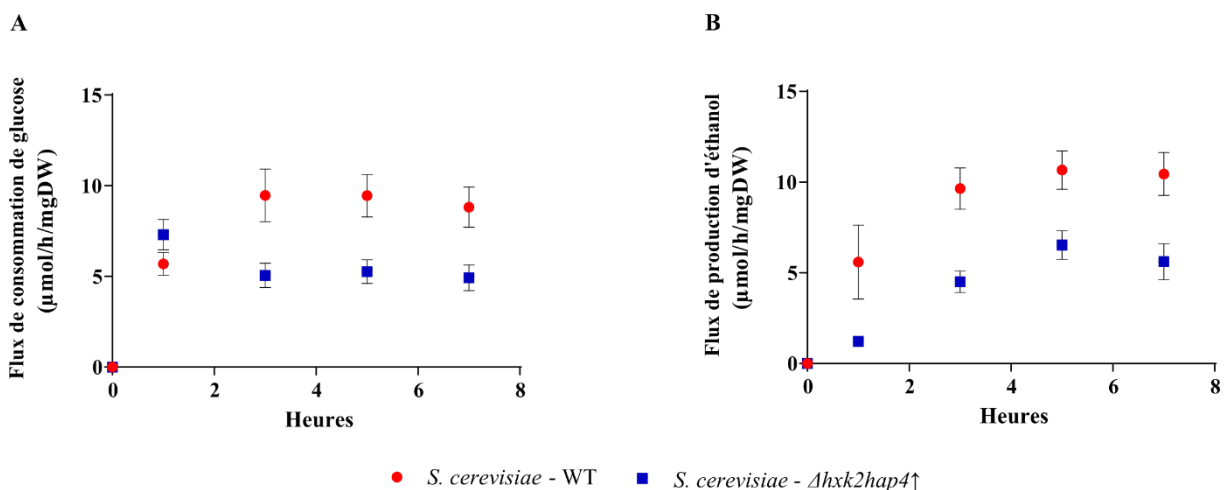


Figure 92. Effet du glucose sur le flux de consommation de glucose et de production d'éthanol

A. Pour les deux souches, le flux de consommation de glucose a été calculé à partir des concentrations de glucose présentes dans le milieu et la prolifération cellulaire associée à chaque heure (n=5) **B.** Pour les deux souches, le flux de consommation de glucose a été calculé à partir des concentrations d'éthanol produit dans le milieu et la prolifération cellulaire associée à chaque heure (n=5)

Le flux de production d'éthanol a également atteint un état stationnaire environ 4 heures après l'ajout du glucose pour les deux souches et ce flux dans la souche $\Delta hxk2hap4\uparrow$ est, encore une fois, inférieur à celui observé dans les cellules WT (**Figure 92B**). Lors de la fermentation, il est établi qu'une mole de glucose permet la production de deux moles d'éthanol. La **Figure 92** montre aussi qu'après 4 heures de suivi, lorsque les modifications métaboliques sont établies, le flux de production d'éthanol est comparable au flux de consommation de glucose dans la souche WT et la souche double mutant. Cela signifie que la moitié du glucose consommé sert à la formation de l'éthanol. Par conséquent, deux molécules ATP sont produits par le glucose qui est alors entièrement métabolisé. Dans nos conditions, le flux de synthèse d'ATP

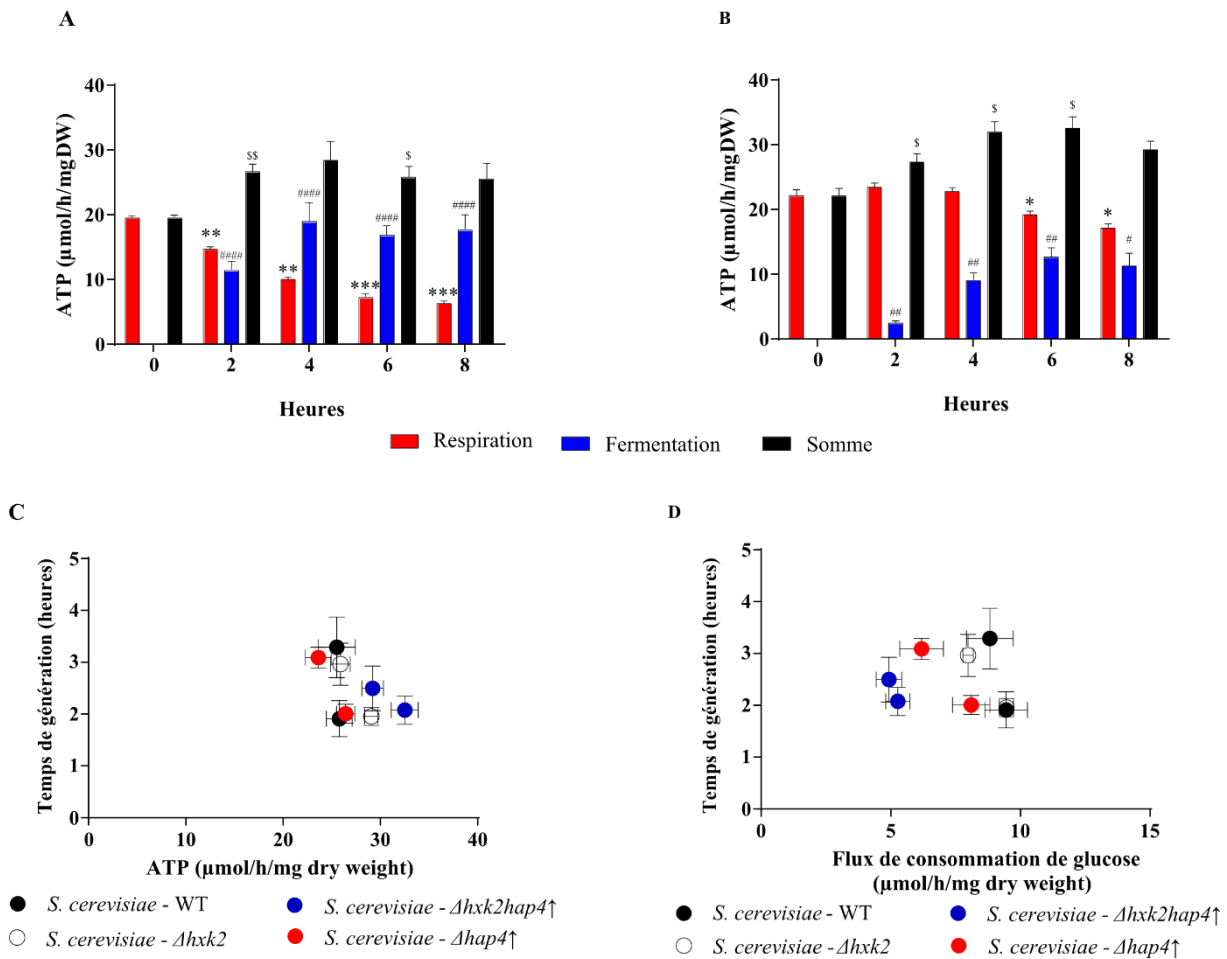


Figure 93. Effet du glucose sur le flux de synthèse de l'ATP dans les différentes souches de *S. cerevisiae*

A. Le flux de synthèse de l'ATP dans les cellules WT a été calculé pour le flux respiratoire et le flux de synthèse de l'éthanol selon le ratio : $\frac{1}{2} O_2 = 1,5 \text{ ATP}$ pour la respiration et $1 \text{ EtOH} = 2 \text{ ATP}$ pour la fermentation. Pour chaque condition, les valeurs sont comparées au T0 correspondant et la p-value est représentée telle que * pour la respiration, # pour la fermentation et \$ pour la somme. **B.** Le flux de synthèse de l'ATP dans les cellules $\Delta hvk2hap4\uparrow$ a été calculé pour le flux respiratoire et le flux de synthèse de l'éthanol selon le ratio : $\frac{1}{2} O_2 = 1,5 \text{ ATP}$ pour la respiration et $1 \text{ EtOH} = 2 \text{ ATP}$ pour la fermentation. Pour chaque condition, les valeurs sont comparées au T0 correspondant et la p-value est représentée telle que * pour la respiration, # pour la fermentation et \$ pour la somme. **C.** Le temps de génération des différentes souches à 6 et 8 heures après l'ajout du glucose a été représenté en fonction du flux de synthèse d'ATP calculé. **D.** Le temps de génération des différentes souches à 6 et 8 heures après l'ajout du glucose a été représenté en fonction du flux de consommation de glucose calculé.

lié à la glycolyse pourrait être assimilé au flux de production d'éthanol, la production de glycérol étant négligeable par rapport à la production d'éthanol. Les mitochondries *S. cerevisiae* n'ont pas de complexe I au sein de leur chaîne respiratoire (Nosek and Fukuhara, 1994; Friedrich et al., 1995). Ainsi, le transfert d'électrons à travers cette chaîne respiratoire implique toujours deux sites de pompage de protons, à travers le complexe III et le complexe IV. L'efficacité de la phosphorylation oxydative est supposée constante et d'environ 1,5 ATP produit par molécule d'oxygène consommé. Puisque les vitesses de respiration des différentes souches ont été mesurées tout au long de la croissance, il est possible d'estimer le flux de synthèse d'ATP lié à

la phosphorylation oxydative mitochondriale. Les flux de synthèse d'ATP dérivés de l'activité mitochondriale et de la glycolyse pour les souches WT et $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ ont donc été calculés. Dans la souche sauvage, lors de l'ajout de glucose, une diminution conséquente de la synthèse d'ATP liée aux mitochondries a été associée à une augmentation concomitante de la synthèse d'ATP liée à la glycolyse (**Figure 93A**). Dans la souche $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$, l'ajout de glucose ne diminue que légèrement la synthèse d'ATP mitochondriale et la synthèse d'ATP liée à la glycolyse ne représente qu'environ 30% du flux total (**Figure 93B**).

Plus important encore, il n'y a pas de lien clair entre la vitesse de prolifération et la synthèse de l'ATP, quelle que soit l'origine de l'ATP (**Figure 93C**). En outre, si la prolifération cellulaire est comparée au flux de consommation de glucose, il n'y a, encore une fois, pas de lien clair entre ces deux paramètres (**Figure 93D**).

Ainsi contrairement à ce qui est décrit dans la littérature, l'ATP n'est pas le métabolite limitant pour la prolifération cellulaire intense. L'augmentation de la glycolyse ne semble pas devoir compenser une perte de l'activité de l'ATP synthase mitochondriale. Cela corroborerait l'hypothèse que le remodelage métabolique et la mise en place du flux glycolytique/fermentation n'est pas tant important pour la formation rapide et importante d'ATP mais pour le maintien de la balance redox que certaines études avancent (Locasale and Cantley, 2011). Afin d'avoir un élément de réponse en ce qui concerne cette hypothèse, un calcul approximatif du flux d'oxydation du NADH a été réalisé. Dans ces conditions de prolifération en lactate supplémenté par du glucose, plusieurs substrats respiratoires sont disponibles pour la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae* : le NADH cytosolique, le NADH matriciel issu des transformations au niveau du cycle de Krebs, le glycérol et le lactate. En amont du complexe III, les Nde et la succinate déshydrogénase sont prioritaires pour transférer leurs électrons aux quinones par rapport au Ndip et Gut2p (Bunoust et al., 2005; Rigoulet et al., 2010). Bien que la Sdh puisse participer au flux des électrons à travers la chaîne respiratoire, son fonctionnement est dépendant de l'état redox de la matrice mitochondriale, elle-même dépendante de la capacité de la Ndip 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 les Nde (Bunoust et al., 2005). En aval du complexe III, les lactates déshydrogénases couplent la conversion du lactate en pyruvate au transfert d'électrons vers le cytochrome c (Mourier et al., 2008). Ce dernier se charge du transport des électrons provenant à la fois du complexe III et à la fois des LDH vers le complexe IV puis vers l'oxygène l'accepteur final d'électrons. Il a été vu précédemment que le flux provenant de l'activité des LDH représente environ 30% du flux total des électrons vers

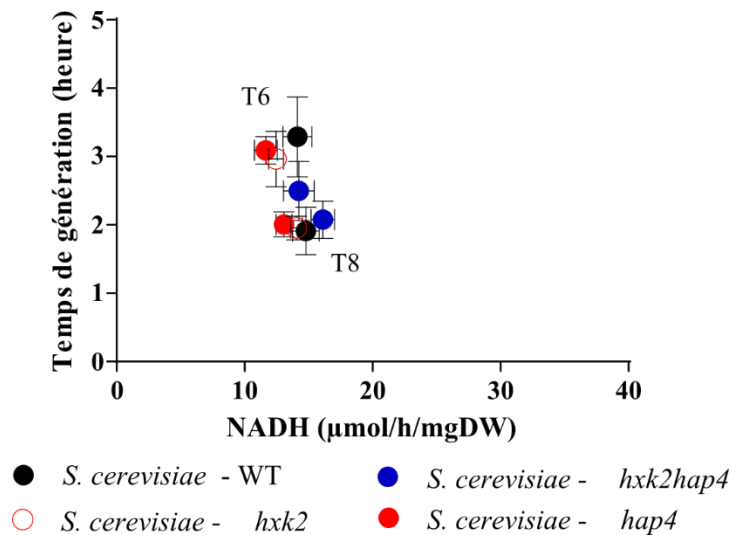


Figure 94. Effet du glucose sur le flux de réoxydation du NADH dans les différentes souches de *S. cerevisiae*

Le temps de génération des différentes souches à 6 et 8 heures après l'ajout du glucose a été représenté en fonction du flux total de réoxydation du NADH calculé à partir des flux respiratoires et des flux de productions d'éthanol à 6 et 8 heures selon le ratio : $\frac{1}{2} O_2 = 1 \text{ NADH}$ pour la respiration et $1 \text{ EtOH} = 1 \text{ NADH}$ pour la fermentation.

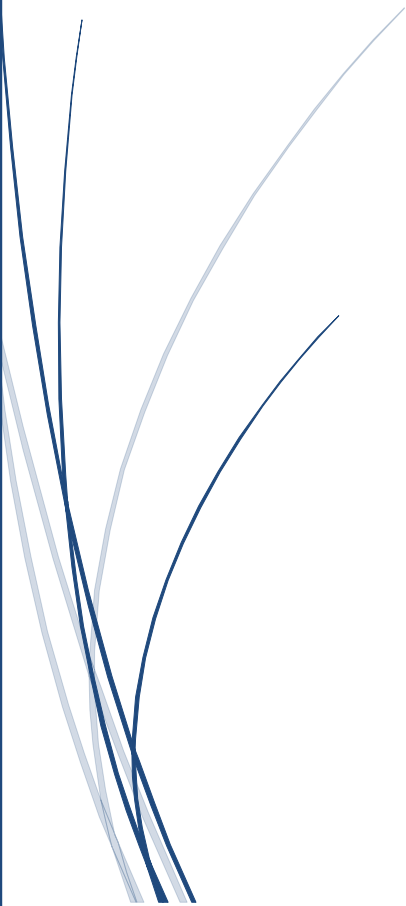
l'oxygène et ce même après l'ajout du glucose (**Figure 62**), les 70% restant provenant du complexe III.

Après ajout du glucose, l'activation de la glycolyse mène à une augmentation de la concentration de NADH cytosolique. L'oxydation de ce dernier est prioritaire au niveau de la chaîne respiratoire et le flux respiratoire des cellules est principalement dû à son oxydation. 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, le flux de réoxydation du NADH a été calculé. Les flux de consommation d'oxygène utilisés sont ceux présentés précédemment. Les flux de production d'éthanol, quant à eux, sont présentés précédemment pour les souches WT et $\Delta hxk2hap4\uparrow$ (**Figure 92B**) ou issus de la thèse de Nouredine Hammad pour les souches $\Delta hxk2$ et $\Delta hap4\uparrow$. Le flux de production du glycérol est considéré comme négligeable par rapport à celui de l'éthanol. La **Figure 94** met en évidence tout d'abord que le flux de réoxydation du NADH est comparable entre les quatre souches de *S. cerevisiae*. De plus, il semble que ce flux soit constant entre 6 et 8 heures après l'ajout du glucose bien que la vitesse de prolifération soit 1,5 fois plus importante à 8 heures (**Figure 94**). Ces résultats montrent donc que le métabolisme mis en place après l'ajout du glucose permet un maintien par ces deux mécanismes de la vitesse de réoxydation du NADH à un niveau stable malgré une augmentation de la vitesse de prolifération et donc une demande plus importante de cette réoxydation.



Chapitre 5

Etude de la
souche *K. lactis*



5.1 Introduction

En parallèle des travaux réalisés sur le rôle de l'effet Warburg, une étude de la souche *Kluyveromyces lactis* a été réalisée. En effet, cette souche dont les vitesses de prolifération et de respiration sont proches de celle de la souche *S. cerevisiae* étudiée, a été décrite comme étant Crabtree négative (De Deken, 1966; Inchaurredo et al., 1994). Cette souche aurait donc pu être un contrôle de souche respiratoire obligatoire en parallèle de l'étude réalisée sur *C. utilis*. D'autant plus que la souche *K. lactis* possède une protéine régulatrice du complexe HAP nommée KlHap4p capable de compléter Hap4p dans la souche *S. cerevisiae* $\Delta hap4$ et sa régulation de la biogenèse mitochondriale pourrait donc être proche de celle de *S. cerevisiae* (Bourgarel et al., 1999; Buschlen et al., 2003). En effet, comme dit précédemment, dans la souche *S. cerevisiae*, le facteur de transcription hétéromérique HAP est nécessaire pour la biogenèse mitochondriale et la protéine Hap4p est nécessaire à l'activation transcriptionnelle. La protéine KlHap4p est capable de compléter la souche de *S. cerevisiae* $\Delta hap4$ (Bourgarel et al., 1999). Ce qui fait donc de cette souche un modèle Crabtree négatif beaucoup plus proche de notre modèle de *S. cerevisiae* que *C. utilis*.

5.2 Conditions de culture

Il est apparu durant les premières expériences que la souche *K. lactis* ne proliférait pas avec le lactate comme source de carbone. Ce résultat est surprenant car cette souche est décrite comme ayant une lactate déshydrogénase mitochondriale pouvant transférer ses électrons au cytochrome c (Lodi et al., 1994). Cette lactate déshydrogénase étant inductible, il est possible que dans nos conditions, son induction soit empêchée, bien que l'origine du problème n'est pas pu être identifié. Nos expériences ont donc été réalisées en milieu glycérol, non fermentescible, supplémenté ou non en glucose. Le suivi est effectué sur 6 heures au lieu des 8 heures habituelles afin d'étudier le comportement des cellules dans des conditions de phase de prolifération exponentielle, ce qui n'est plus le cas après 6 heures de suivi.

5.3 Etude de la souche *K. lactis* comme souche Crabtree négative

5.3.1 La souche *K. lactis* ne semble pas mettre en place l'effet Warburg après ajout du glucose.

Comme dit précédemment, cette souche est donc, à l'instar de *C. utilis*, défini comme Crabtree négative, c'est-à-dire respiratoire obligatoire (De Deken, 1966; Inchaurredo et al.,

1994; Tarrío et al., 2006). Il est donc attendu que cette souche maintienne naturellement la biogenèse mitochondriale malgré l'ajout de glucose de la même façon que la souche *C. utilis*. Cependant, le statut de *K. lactis* vis-à-vis de ce mécanisme reste incertain. En effet, certaines études définissent la souche comme Crabtree positive car selon ces études *K. lactis* effectue une fermentation alcoolique en condition aérobie (Blondeau et al., 1994; Mulder et al., 1995; Wésolowski-Louvel et al., 1996). Il a même été proposé que *K. lactis* ne puisse pas être caractérisé comme Crabtree-positif ou négatif, mais occupe une position intermédiaire (Gonzalez Siso et al., 1996). Cependant, dans ces études les milieux étaient exclusivement composés de glucose ou de glycérol.

Les paramètres définissant l'effet Warburg ont donc été étudiés dans les cellules *K. lactis* après ajout du glucose afin d'observer dans les conditions de la cinétique de mise en place de l'effet Warburg l'impact du glucose sur le métabolisme de ces cellules. La **Figure 95** montre que l'ajout de glucose ne modifie pas la vitesse de respiration comme dans les cellules *C. utilis*.

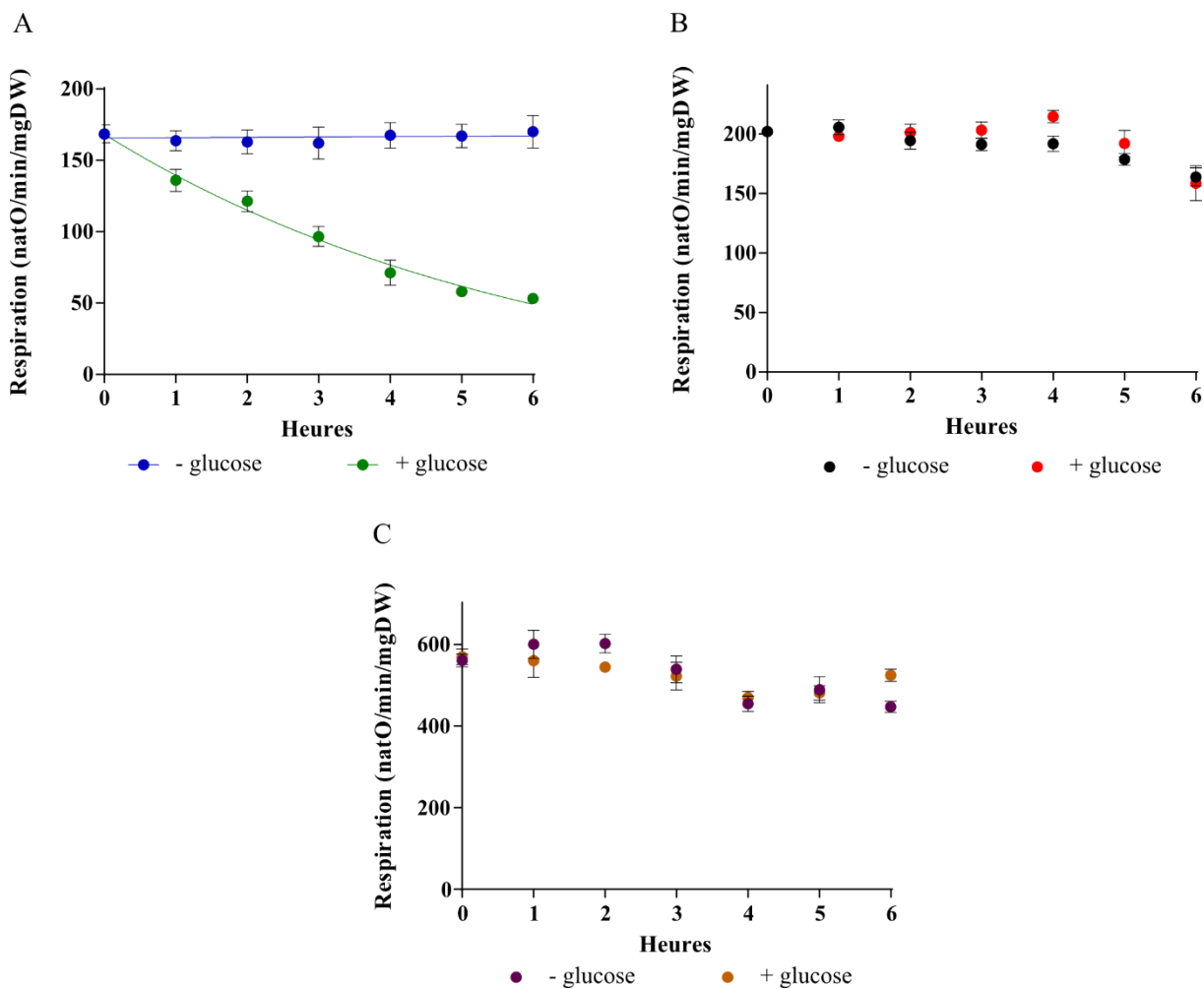


Figure 95. Effet du glucose sur la vitesse de respiration des cellules des trois souches

Les cellules sont cultivées dans un milieu glycérol 2%. La vitesse de respiration est suivie sur 6 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. **A.** sur les cellules de *S. cerevisiae*. (n=6) **B.** sur les cellules de *K. lactis*. (n=6). **C.** sur les cellules de *C. utilis*. (n=6).

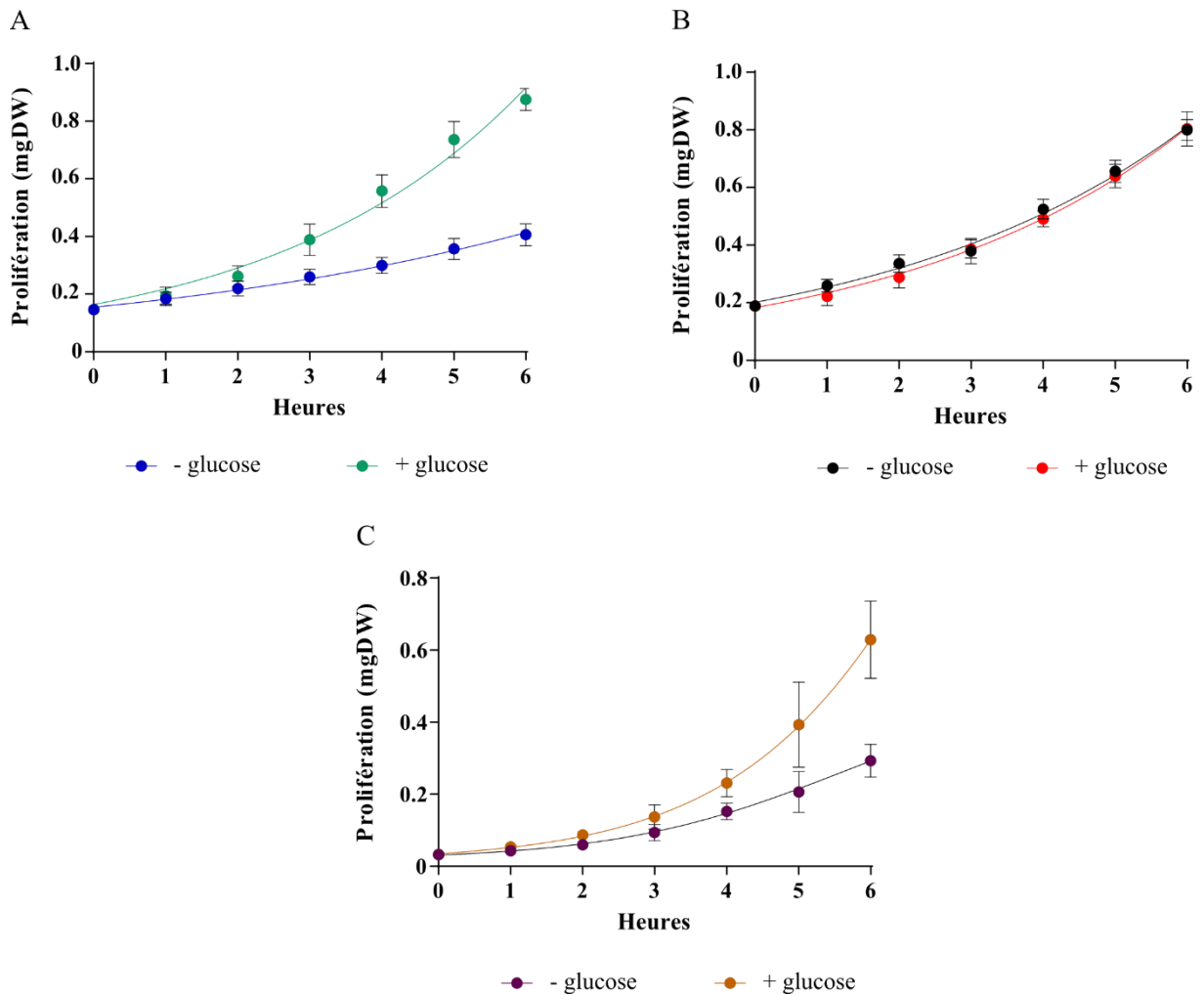


Figure 96. Effet du glucose sur la vitesse de prolifération sur les cellules des trois souches

Les cellules sont cultivées dans un milieu glycérol 2%. La vitesse de prolifération est suivie sur 6 heures en absence ou en présence de 60mM de glucose. **A.** sur les cellules de *S. cerevisiae*. (n=6) **B.** sur les cellules de *K. lactis*. (n=6). **C.** sur les cellules de *C. utilis*. (n=6).

En revanche et contrairement à toutes les souches étudiées, la vitesse de prolifération ne semble pas du tout affectée par l'ajout de glucose (**Figure 96**). En parallèle, un contrôle de la consommation de glucose a été effectué et la **Figure 97** montre que la souche *K. lactis* consomme très peu de glucose. En effet, lorsque la souche *S. cerevisiae* consomme environ 45% du glucose fourni à la fin du suivi et *C. utilis*, environ 20%, les cellules *K. lactis* en consomme moins de 5% **Figure 88C**. Il est à noter qu'après l'ajout du glucose, le temps de génération de la souche *S. cerevisiae* passe de 4h à 2h20, soit une augmentation de la vitesse de prolifération de 42%. De même, le temps de génération de la souche *C. utilis* passe de 2h20 à 1h55, soit une augmentation de la vitesse de prolifération de 25%. Pris ensemble, ces premiers résultats montrent que la consommation du glucose induit l'augmentation de la vitesse de prolifération. L'absence de consommation de glucose de la souche *K. lactis* explique donc l'absence de modification de la vitesse de prolifération.

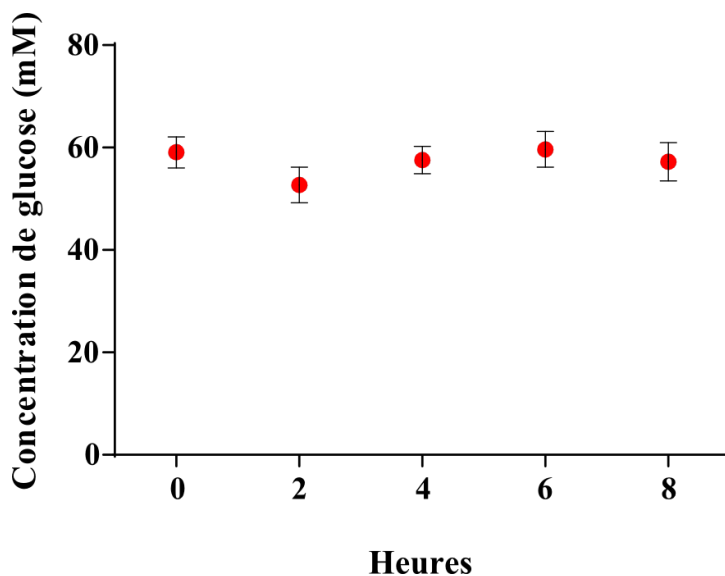


Figure 97. Consommation de glucose des cellules *K. lactis* cultivées en glycérol

Les cellules sont cultivées dans un milieu glycérol 2% supplémenté par 60mM de glucose. La consommation de glucose est suivie sur 6 heures en présence de 60mM de glucose.

Ces résultats font de *K. lactis* une souche très particulière car les levures sont décrites généralement comme favorisant la consommation du glucose quand cette source carbonée est disponible. Afin de vérifier que cette souche est capable de proliférer en milieu glucose, des cultures ont été réalisées avec du glucose comme seule source carbonée. Dans un milieu contenant uniquement du glucose, il apparaît que les vitesses de respiration et de prolifération sont plus faibles qu'en milieu glycérol (**Figure 98A et B**), mais le glucose est consommé (**Figure 98C**).

En revanche, le fait que la vitesse de respiration soit plus faible en glucose qu'en glycérol pourrait s'apparenter à une répression glucose (**Figure 98A**). Cependant la vitesse de prolifération est diminuée lors de la croissance sur glucose par rapport la croissance sur glycérol. L'effet Warburg est défini par une diminution de la vitesse de respiration et une augmentation de la fermentation et de la prolifération. Ici, la concentration de glucose restant dans le milieu est entre 40mM et 60mM. La concentration de glucose est encore suffisante pour engendrer un effet Warburg. Cela montre que *K. lactis* ne possède les caractéristiques d'un effet Warburg en présence de glucose et confirme l'absence de répression glucose dans cette souche.

Déjà en 1975, Royt et MacQuillan montrait que *K. lactis* consommait moins de glucose lorsque les cellules ont eu au préalable une prolifération en succinate par rapport à celles n'ayant été incubées qu'en milieu glucose seul (Royt and Macquillan, 1976). Plus récemment, des études ont montré que le principal transporteur de glucose chez *K. lactis*, Rag1, pouvait être partiellement réprimé en condition aérobie (Merico et al., 2009) et par l'homologue de Hap1p, KlHap1p (Bao et al., 2008). Bien que KlHap1p soit capable de compléter la souche *S.*

cerevisiae $\Delta hap1$, le fait que KIHap1p soit capable de réprimer l'expression du gène de transporteur majeur du glucose *RAG1* et de réduire le taux d'absorption du glucose, suggère que cette protéine a une implication dans la régulation du flux glycolytique à travers le système de transport du glucose, contrairement à la protéine de *S. cerevisiae* (Bao et al., 2008).

Cependant, si la littérature pointe le fait que la consommation du glucose est moins favorisée dans cette souche par rapport à celle étudié précédemment, les résultats exposés ci-dessus semble indiquer que le glucose n'est quasiment pas utilisé par les cellules lors d'une prolifération initialement purement respiratoire ni pour la production de substrats de la chaîne respiratoire, ni pour la prolifération. Ce comportement semble donc très différent de celui présent dans d'autres souches définies comme Crabtree-négative, telle que *C. utilis*, comme le montrent les résultats du chapitre précédent (voir 4.7).

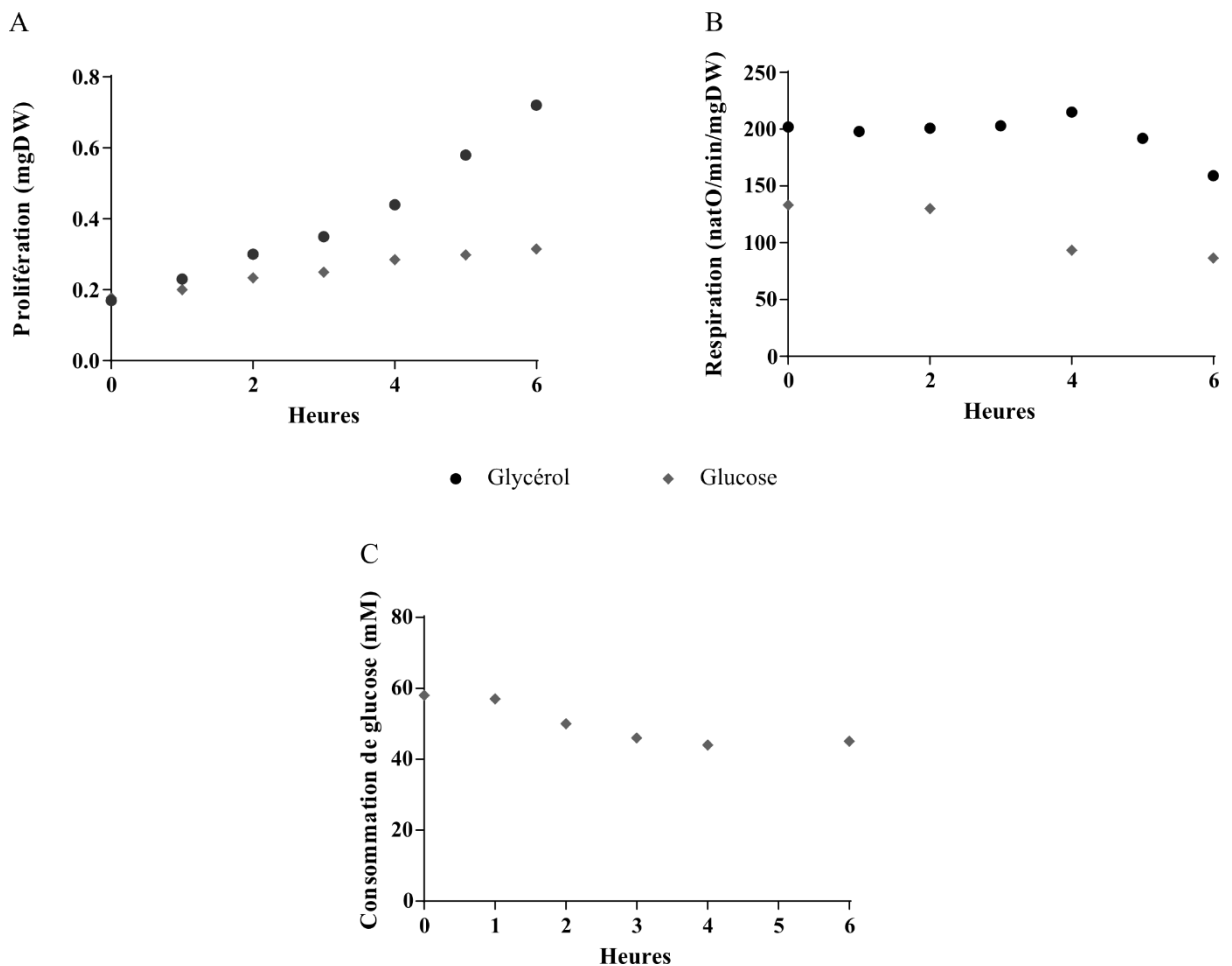


Figure 98. Suivi des paramètres de l'effet Warburg sur les cellules *K. lactis* cultivées en glycérol ou en glucose

A. La prolifération cellulaire est suivie sur 6 heures sur cellules cultivées en glycérol 2% ou en glucose 2%. (n=2) **B.** La vitesse de respiration est suivie sur 6 heures sur cellules cultivées en glycérol 2% ou en glucose 2%. (n=2) **C.** La consommation de glucose est suivie sur 6 heures sur cellules cultivées en glucose 2%. (n=2)

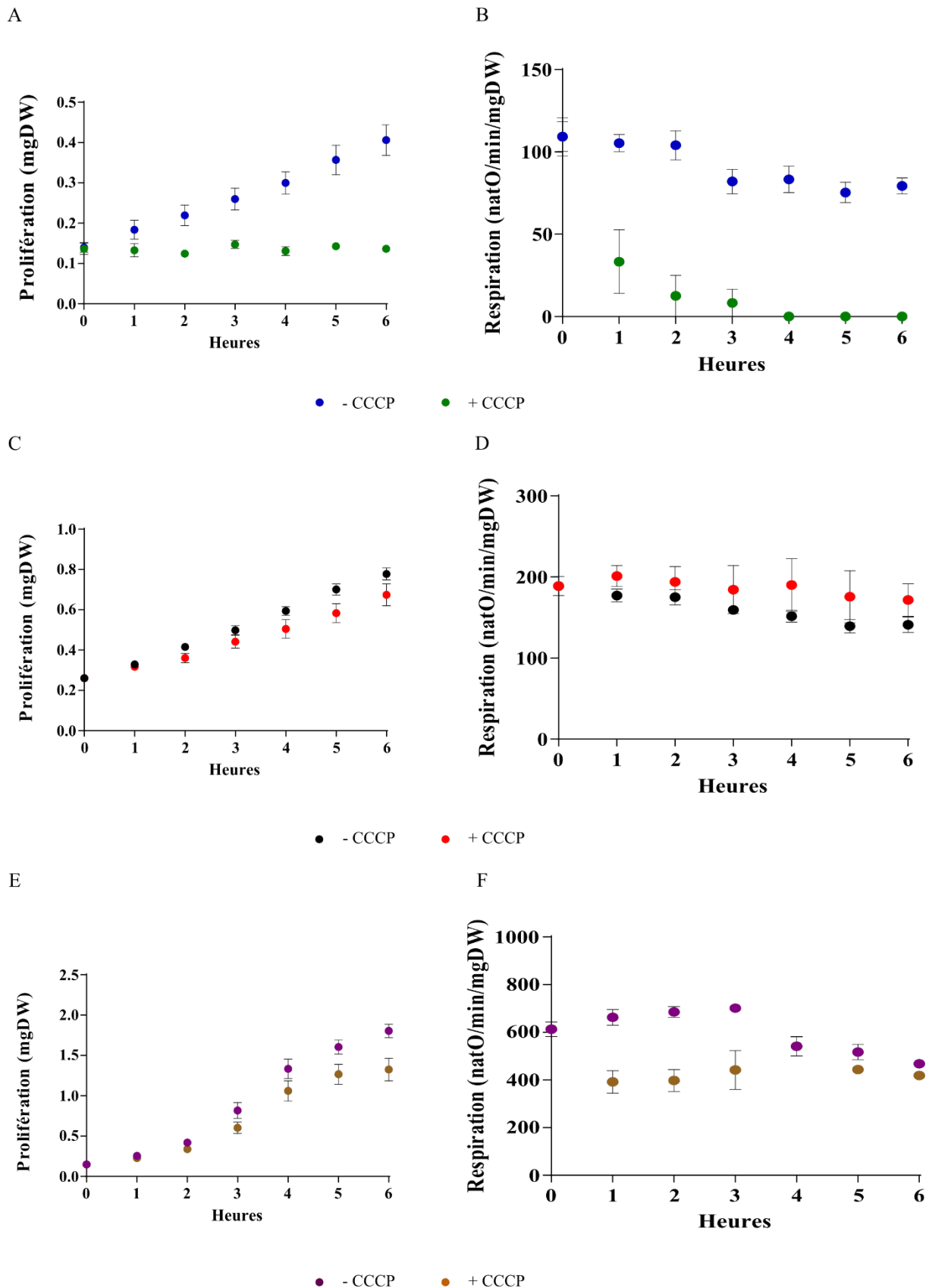


Figure 99. Effet du CCCP sur les vitesses de prolifération et de respiration sur les trois souches

A. La prolifération cellulaire des *S. cerevisiae* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 2 μ M CCCP. (n=5) **B.** La vitesse de respiration des *S. cerevisiae* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 1,5 μ M CCCP. (n=5) **C.** La prolifération cellulaire des *K. lactis* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 2 μ M CCCP. (n=5) **D.** La vitesse de respiration *K. lactis* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 1,5 μ M CCCP. (n=5) **E.** La prolifération cellulaire des *C. utilis* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 2 μ M CCCP. (n=5) **F.** La vitesse de respiration *C. utilis* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 1,5 μ M CCCP. (n=5)

5.3.2 La souche *K. lactis* est peu sensible au découplant.

Dans un second temps, une étude a été réalisée sur cellules en condition découplée. L'objectif était de savoir si lorsque la chaîne respiratoire est découplée de la synthèse d'ATP, les cellules consommaient le glucose. En effet, dans ces conditions, la synthèse d'ATP n'est pas possible par l'utilisation du système des OXPHOS et donc seule la glycolyse pourrait fournir l'ATP nécessaire à leur survie. Ces cellules ont donc été incubées en présence ou non de CCCP sans ajout de glucose dans un premier temps et leurs vitesses de respiration et de prolifération ont été comparées à celles des cellules *S. cerevisiae* et *C. utilis*, respectivement Warburg positive et Crabtree/Warburg négative, cultivées dans les mêmes conditions. Les cellules *S. cerevisiae*, après ajout du CCCP dans la culture, ne prolifère plus et leur vitesse de respiration chute au cours du temps (**Figure 99A et B**). Dans ces conditions, les cellules sont privées de l'ATP fourni habituellement par le système des OXPHOS et l'absence de glucose empêche sa synthèse par la voie glycolytique. Ainsi, il n'y a plus de formation d'ATP au sein de la cellule, ce qui explique l'arrêt de la prolifération. Cela a pour conséquence un arrêt de la production de NADH. Le NADH n'étant plus généré et le glycérol ne pouvant plus être phosphorylé, en absence d'ATP, la chaîne respiratoire, privée de ses principaux substrats, ne peut plus fonctionner. Les cellules *C. utilis*, quant à elles, subissent un ralentissement de la vitesse de prolifération et de la vitesse de respiration, bien que moins significatif que dans la souche *S. cerevisiae* (**Figure 99E et F**). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la concentration initiale de CCCP ajouté ne soit pas suffisante sur le long terme, étant donné les vitesses de prolifération et de respiration rapide de cette souche. Cependant, une augmentation de la concentration de CCCP initiale induirait une inhibition de l'activité du système des OXPHOS (Van Dam, 1967) et un ajout au cours de la cinétique induirait une modification des conditions dans lesquelles cette souche est comparée aux autres. Enfin, l'ajout de CCCP à la culture des cellules *K. lactis*, n'induit pas de changement significatif au niveau de la vitesse de prolifération et de la respiration (**Figure 99C et D**). Ce résultat est très surprenant car dans ces conditions cela signifie que ces cellules continuent de proliférer même en absence de synthèse d'ATP mitochondriale. Il se pourrait que cette souche puisse utiliser le DHAP formé à partir de la transformation du glycérol en glycérol-3-phosphate pour la synthèse d'une molécule d'ATP *via* les dernières étapes de la glycolyse (**Figure 100**). Le fait que les dernières étapes de la glycolyse puissent être réalisées pourrait être à l'origine de la mise en place d'une réaction de fermentation. Cela pourrait expliquer la concentration constante d'éthanol mesurée dans ces cultures (**Figure 101**) et remet en cause la caractéristique non-fermentescible de ce milieu.

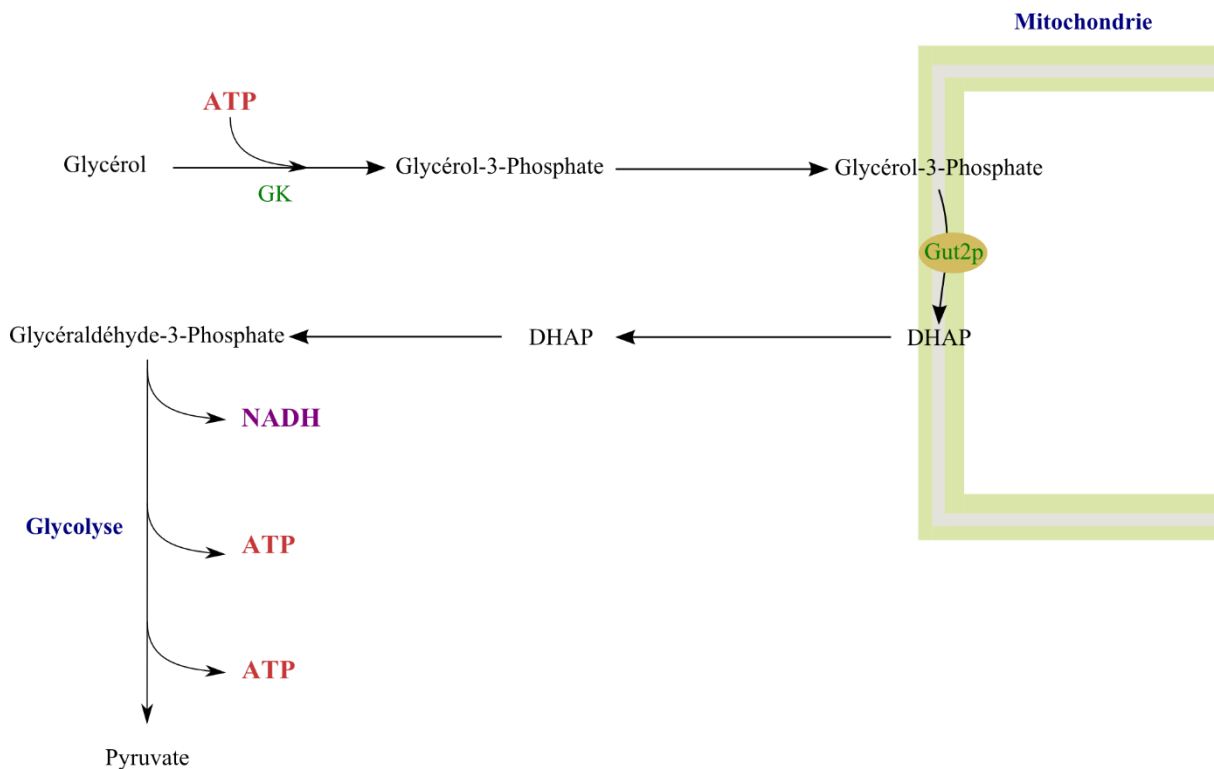


Figure 100. Illustration de l'utilisation possible du glycérol par les cellules *K. lactis*

Le glycérol du milieu peut être pris en charge par la Glycérol kinase (GK) afin de le transformer en glycérol-3-phosphate. Cette étape consomme une molécule d'ATP. Ce métabolite est le substrat de la Gut2p au niveau de la chaîne respiratoire. Une fois formé, le DHAP peut être utilisé par une isomérase pour former du glycéraldéhyde-3-phosphate et peut alors être pris en charge par les dernières enzymes de la glycolyse. Ces étapes permettent de former deux molécules d'ATP, ce qui amène au rendement final de 1 ATP formé par molécule de glycérol transformée par cette voie.

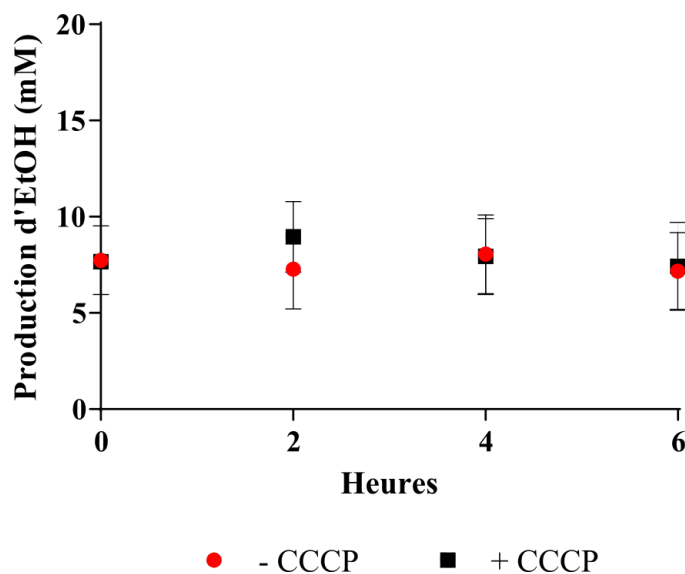


Figure 101. Effet du CCCP sur la production d'éthanol dans les cellules *K. lactis*

Les cellules sont cultivées dans un milieu glycérol 2%. La production d'éthanol (EtOH) est suivie au cours des 6 heures après l'ajout du CCCP. (n=3)

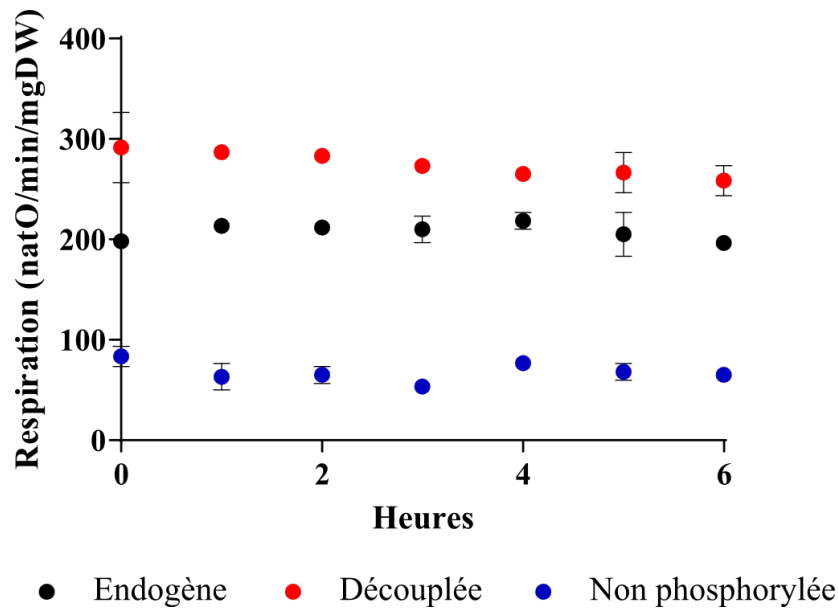


Figure 102. Comparaison de la respiration endogène, découplée et non phosphorylée dans la souche *K. lactis*

Les cellules sont cultivées dans un milieu glycérol 2%. Les respirations découplée et non phosphorylée sont mesurées chaque heure par ajout d'éthanol et de CCCP ou par l'ajout de TEE seul tel que décrit dans le chapitre matériel et méthode (2.3.2.2). (n=3)

Il est à noter que ces cellules ont une valeur de respiration très proche de la valeur maximale de respiration (Figure 102). Ces cellules semblent donc avoir une vitesse de respiration très rapide et ne pas subir de frein cinétique durant l'ensemble des transferts d'électrons au sein de la chaîne respiratoire que ce soit au niveau de l'apport en substrats ou du couplage dans le transfert d'électrons vers l'espace intermembranaire ou de son entrée *via* A B

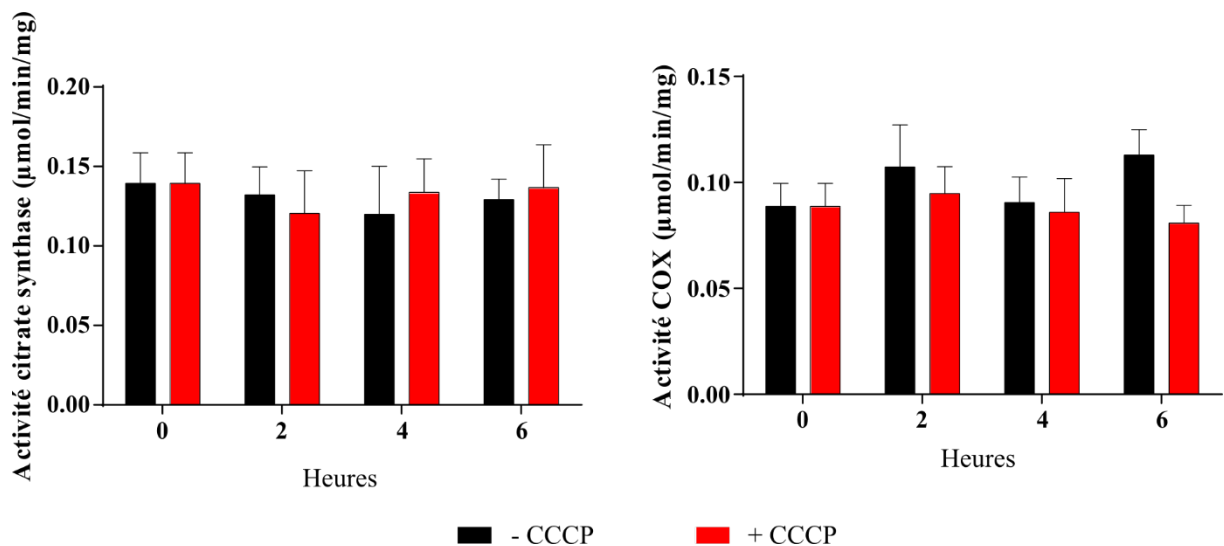


Figure 103. Effet du CCCP sur les activités enzymatiques dans la souche *K. lactis*

Les cellules sont cultivées dans un milieu glycérol 2%. **A.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de CCCP. (n=4) **B.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de CCCP. (n=4)

l'ATP synthase. Ainsi, les résultats obtenus en présence de CCCP semblent d'autant plus surprenant. De plus, les activités mitochondriales et en particulier l'activité COX ne semblent pas non plus modifiées après ajout du CCCP (**Figure 103 A et B**). Associé à cela, la quantité d'unités de chaîne respiratoire ne semble pas modifiée car la quantité de cytochromes n'est pas modifiée après ajout du CCCP (**Figure 104**).

Enfin, l'ajout de glucose en plus du CCCP ne semble pas avoir un impact significatif sur les vitesses de respiration et de prolifération (**Figure 105A et B**), ni sur les activités enzymatiques mesurées (**Figure 105C et D**).

Il semble donc que cette souche soit capable de compenser rapidement l'absence de formation d'ATP *via* le système des OXPHOS. Cela doit être possible par la mise en place des dernières réactions de la glycolyse à partir de la transformation du glycérol.

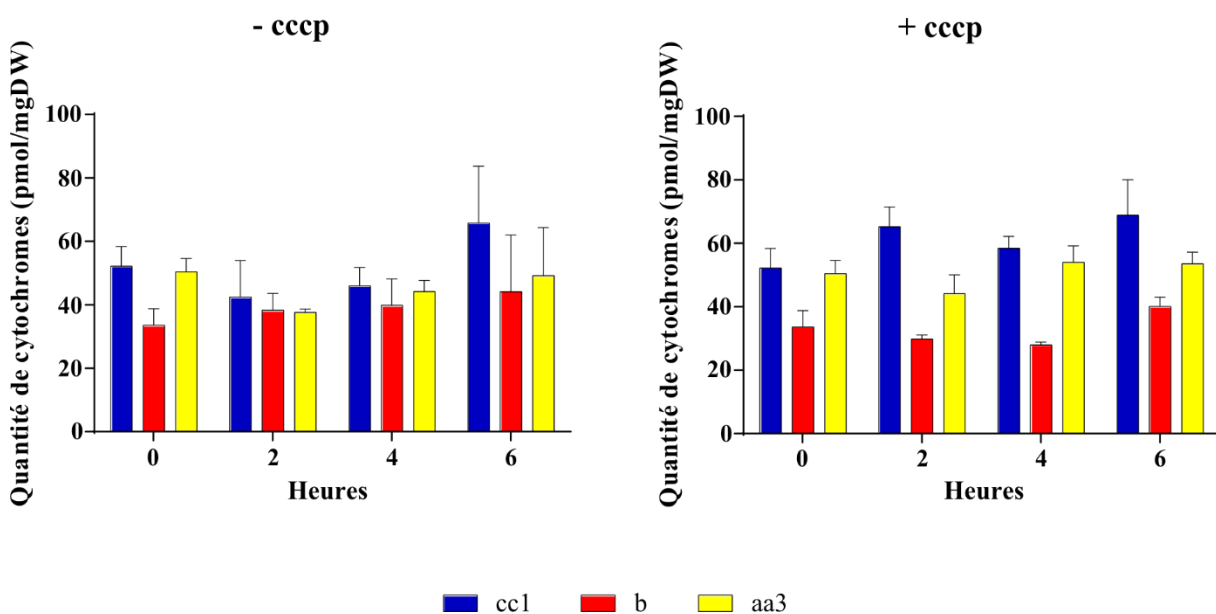


Figure 104. Effet du CCCP sur la quantité de cytochromes dans la souche *K. lactis*

Quantification à partir de culots cellulaires issus de culture en milieu glycérol 2% supplémenté ou non par 1,5 μ M de CCCP. Quantification des cytochromes par spectrophotométrie à double faisceau. Les cytochromes c et c1 sont quantifiés par le même pic et ne sont donc pas individualisés, de même pour les cytochromes a et a3. (n=3)

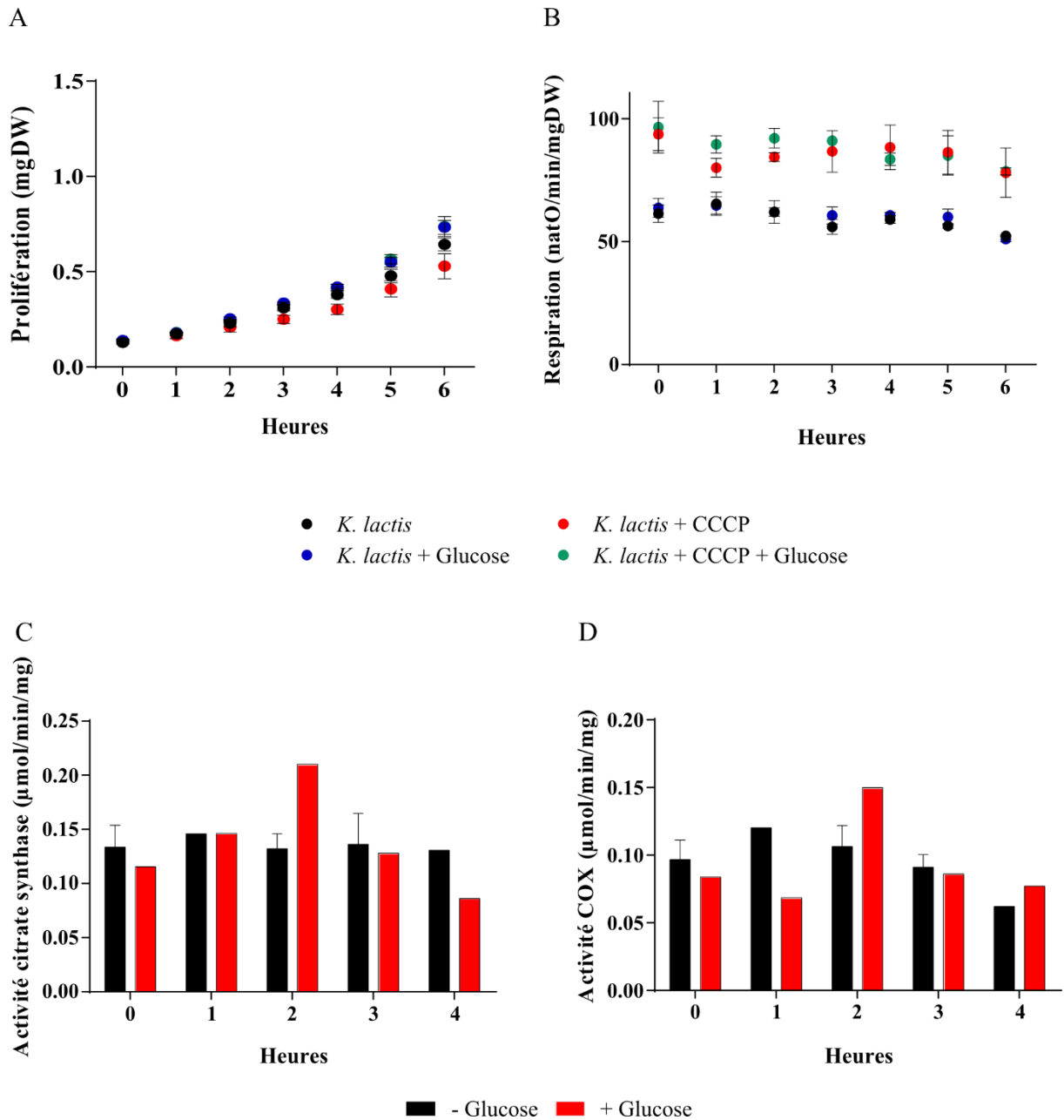


Figure 105. Effet du CCCP et du glucose sur la prolifération, la respiration et les activités enzymatiques mitochondriales dans la souche *K. lactis*

Les cellules sont cultivées dans un milieu glycérol 2%. **A.** La prolifération cellulaire des *K. lactis* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 2µM CCCP et/ou de 60mM de glucose. (n=3) **B.** La vitesse de respiration *K. lactis* est suivie sur 6 heures en présence ou non de 1,5µM CCCP et/ou de 60mM de glucose. (n=3) **C.** L'activité de la citrate synthase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=2) **D.** L'activité de la cytochrome c oxydase a été mesurée par spectrophotométrie et rapportée en pourcentage du T0 en présence ou en absence de glucose. (n=2)

5.4 Etude de la chaîne respiratoire de la souche *K. lactis*

La seconde question étudiée dans ce chapitre concernait la structure de la chaîne respiratoire de la souche *K. lactis* et notamment la présence d'un complexe I associé une extrusion de protons. En effet, la présence d'un complexe I permettant un transfert d'électrons au niveau de l'espace intermembranaire, induirait un rendement plus important au niveau de l'ATP/O du système OXPHOS de cette souche par rapport à la souche *S. cerevisiae*, par exemple. Cela permettrait, entre autre, de conclure plus précisément sur les précédents résultats.

En effet, cette souche a été décrite à de nombreuses reprises comme possédant des NADH déshydrogénases internes et externes fournissant leurs électrons à l'ubiquinone à l'instar de la souche *S. cerevisiae* (Gonzalez Siso et al., 1996; Derisi et al., 1997; Tarrío et al., 2005). Pourtant, il est également décrit que les souches respiration obligatoire ont souvent un complexe I associé à une extrusion de protons qui permet un ratio P/O plus important comme pour la souche *C. utilis* par exemple (Tarrío et al., 2005; Avéret et al., 2015). Or, des résultats préliminaires semblent indiquer que le ratio ADP/O mesurable dans les mitochondries de *K. lactis* est plus proche de celui des mitochondries *C. utilis* que de celui des mitochondries *S. cerevisiae* (**Tableau XIX**). Cependant, ces résultats ont été obtenus à partir d'une première isolation de mitochondries de *K. lactis*. Ces mitochondries étaient couplées sur substrats pyruvate et malate, habituellement associés à une respiration sur complexe I pompant des protons (**Figure 107**). Une seconde isolation a été réalisée dans les mêmes conditions et sur la même souche, cependant ces mitochondries n'ont jamais montré de couplage sur ces substrats (**Figure 106**). Une troisième isolation serait nécessaire afin de réellement conclure sur ce résultat.

Tableau XIX. Rapport ADP/O pour chaque souche

	<i>S. cerevisiae</i>	<i>K.lactis</i>	<i>C. utilis</i>
ADP/O	1.63	2,42	2,60

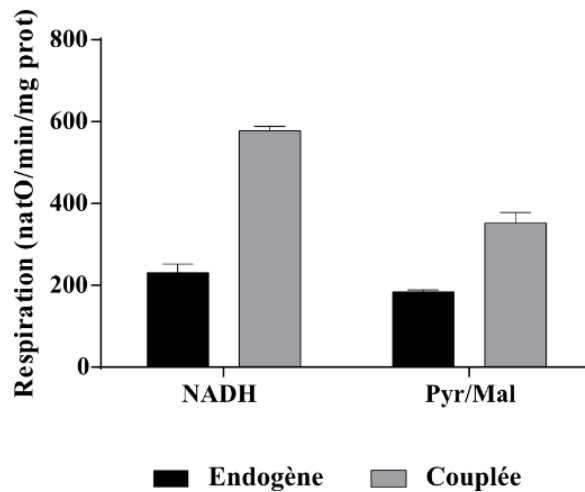


Figure 107. Etude de la respiration sur mitochondries isolées de *K. lactis*

Résultats obtenus à partir de la première isolation des mitochondries. La vitesse de respiration est mesurée en présence (gris) ou en absence (noir) d'ADP après ajout de NADH, de pyruvate et de malate (Pyr/Mal). Sur mitochondries isolées la respiration est rapportée en mg de protéines. (n=2)

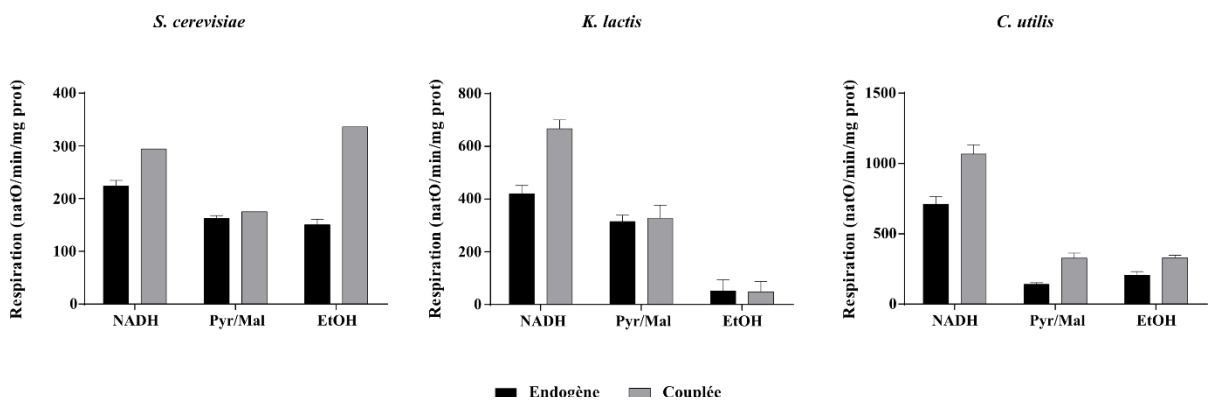


Figure 106. Etude de la respiration sur mitochondries isolées suivant différents substrats fournis sur les trois souches

Résultats obtenus à partir de la seconde isolation des mitochondries. Pour chaque souche, la vitesse de respiration est mesurée en présence ou en absence d'ADP après ajout de NADH, de pyruvate et de malate (Pyr/Mal) ou d'éthanol (EtOH). Sur mitochondries isolées la respiration est rapportée en mg de protéines. (n=3)

Ces résultats mènent à se questionner sur une présence du complexe I dans la chaîne respiratoire de cette souche. Des résultats préliminaires sur la respiration de mitochondries isolées ont été réalisées en présence de différents substrats respiratoires associés ou non à un ajout d'ADP. Cela permet de savoir si, suivant le substrat disponible, la respiration est plus ou moins couplée avec la synthèse d'ATP mais également si le contrôle cinétique a lieu au niveau de la disponibilité du substrat ou de l'activité de l'enzyme. Ces expériences ont permis de mettre en évidence que la respiration de la souche *K. lactis* était couplée sur substrat NADH, tout comme les mitochondries de *S. cerevisiae* et *C. utilis* (Figure 106). Cela confirme l'existence d'une NADH déshydrogénase externe permettant la réoxydation du NADH cytosolique dans cette souche. En revanche, dans les mitochondries issues de la seconde isolation, l'ajout de pyruvate et de malate, permettant normalement de favoriser une réoxydation du NADH par le

complexe I, associé à l'ajout d'ADP, n'induit pas une augmentation de la vitesse de respiration par rapport à la condition sans ADP. Les substrats étant ajoutés en excès et l'ADP favorisant l'entrée de protons par l'activité de l'ATP synthase, l'absence d'augmentation de la vitesse de respiration dans ces conditions laisserait penser qu'il n'y a pas de complexe I couplé à une sortie de protons. Ce résultat est d'ailleurs retrouvé sur les mitochondries de *S. cerevisiae* contrairement aux mitochondries de *C. utilis* (**Figure 106**). Il est également envisageable que ce résultat soit dû à un contrôle cinétique en amont de la chaîne respiratoire, ce qui ne serait alors pas incompatible avec la présence d'un complexe I.

Cependant, les NADH déshydrogénases alternatives, Nde1/2 et Ndi, sont décrites dans la littérature comme insensibles aux inhibiteurs du complexe I tels que la roténone ou la piericidine A. Ceci est confirmé par la **Figure 108** où la respiration des mitochondries *S. cerevisiae* n'est pas ou peu impactée par l'ajout des inhibiteurs. En effet, la piericidine A à forte concentration semble commencer à inhiber la respiration, cependant à de telles concentrations, il est possible que la molécule ait des effets non spécifiques à l'inhibition d'un complexe I. En revanche, la respiration des mitochondries *K. lactis* est inhibée par l'ajout croissant d'inhibiteur du complexe I, et ce dès les premiers ajouts, tout comme la respiration des mitochondries de *C. utilis*. Ce dernier résultat suggérerait donc la présence d'un complexe I.

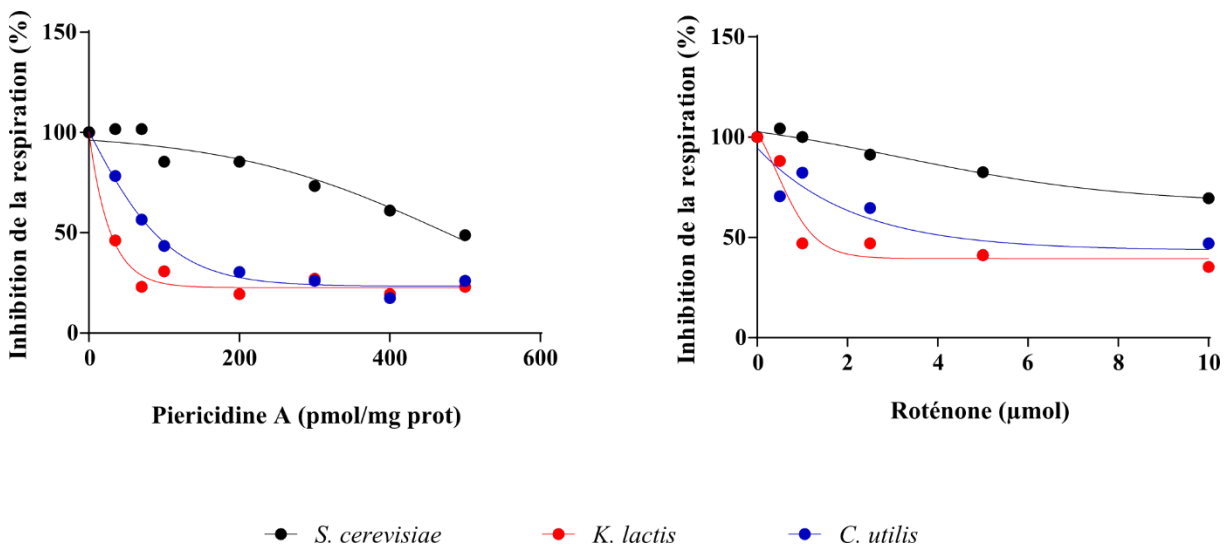


Figure 108. Effet des inhibiteurs du complexe I sur les trois souches

Pour chaque souche, la respiration sur mitochondries isolées en présence de pyruvate et de malate est mesurée après ajout d'une concentration croissante de piericidine A ou de roténone. (n=2)

Enfin, un gel en conditions non dénaturantes a été réalisé. Un complexe I étant bien plus gros que les NADH déshydrogénases alternatives pourrait être repéré par comparaison avec le profil obtenu *via* des mitochondries de mammifères et de la souche *C. utilis*. Pour identifier les complexes, des activités sur gel ont été réalisées, activités spécifiques aux NADH déshydrogénases, au complexe IV et à l'ATP synthase. Il apparaît, tout d'abord, que le profil d'activité des mitochondries *C. utilis* est très proche de celui des mitochondries de cœur (**Figure 109**). De plus, il semble qu'il y ait une légère activité dans *K. lactis* au même niveau que le complexe I chez *C. utilis*, bien que cette activité soit bien moindre par rapport à ce qui est observé chez *C. utilis*. Il est aussi bien visible, sur la **Figure 109**, que des complexes de hauts poids moléculaires sont présents aussi bien dans les mitochondries de *C. utilis* que dans celles de *K. lactis* alors qu'ils sont absents dans les mitochondries de *S. cerevisiae*. Il en est de même pour l'activité ATP synthase. Dans un second temps, un gel a été réalisé de la même manière en modifiant uniquement la concentration de digitonine utilisée afin d'obtenir une meilleure résolution des complexes. Les concentrations utilisées sur les mitochondries de levures étaient 3g/g, 6g/g (concentration utilisée précédemment) et 9g/g. La **Figure 110** montre qu'une diminution de la concentration de digitonine permet d'obtenir des bandes plus nettes dans la souche *K. lactis* et confirme la présence d'un complexe de haut poids moléculaire, proche du

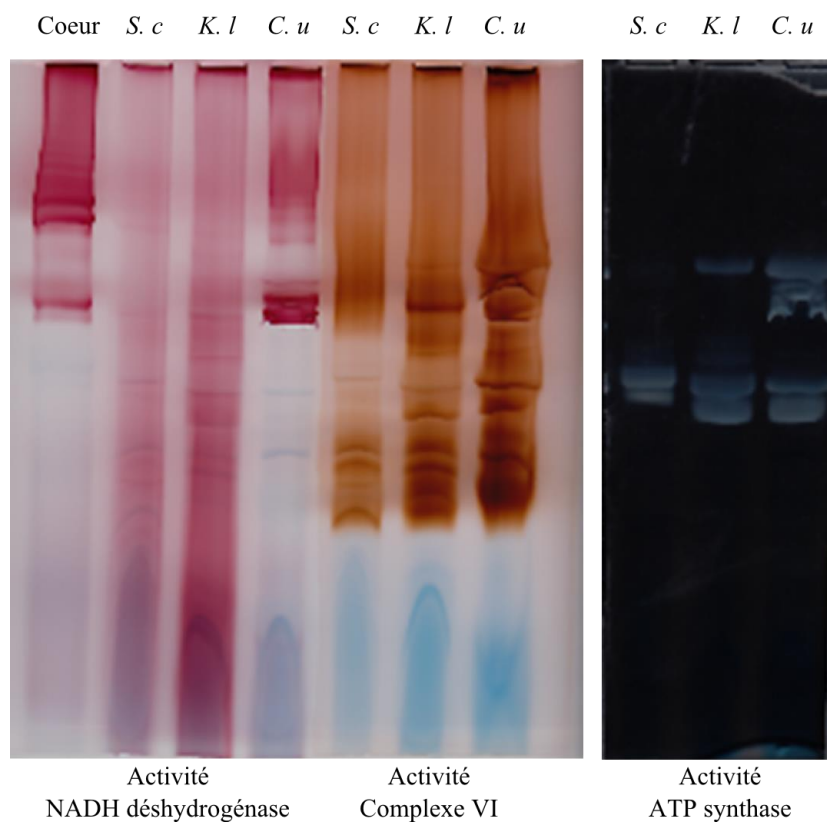


Figure 109. Activité en gel de complexes du système OXPHOS dans les trois souches

Ces gels sont réalisés à 6g/g de digitonine à partir de mitochondries de cœur de souris, données par Thibaut Molinié, de *S. cerevisiae* (*S. c*), *K. lactis* (*K. l*) et *C. utilis* (*C. u*). Les activités NADH déshydrogénases, du complexe IV et de l'ATP synthase ont été réalisées sur gel à 28°C.

complexe I de *C. utilis* et possédant une activité NADH déshydrogénase. De plus, une bande plus faiblement exprimée apparaît nettement à la même hauteur que le complexe I de la souche *C. utilis*. Cela peut être dû à une modification post-traductionnelle du possible complexe I de *K. lactis* qui augmenterait alors son poids moléculaire. De même pour la bande située au-dessus des bandes correspondant au complexe I. Ce potentiel complexe I de *K. lactis* pourrait aussi avoir une structure légèrement différente de celui de la souche *C. utilis*.

Ces résultats pourraient indiquer une proximité structurelle des complexes de la chaîne respiratoire de *K. lactis* et *C. utilis* et la présence d'un complexe I, bien que ces résultats doivent être confirmés et reproduits.

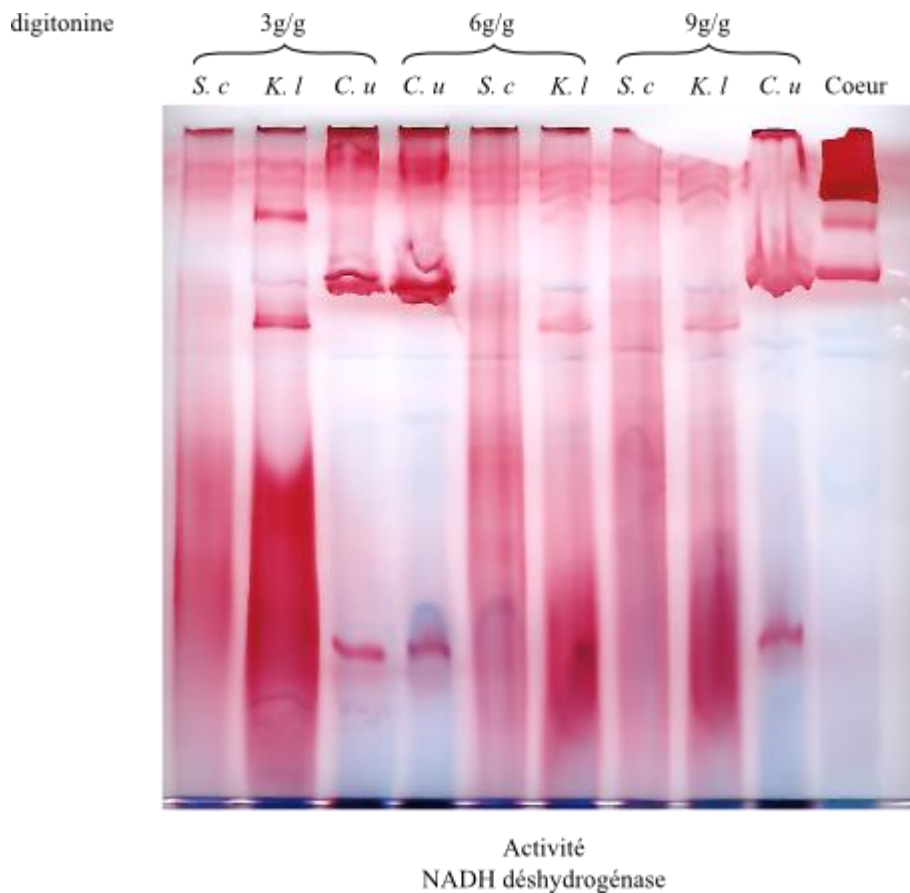


Figure 110. Effet de différentes concentrations de digitonine sur l'activité sur gel des NADH déshydrogénases dans des mitochondries de levures

Le gel est réalisé avec 3g/g, 6g/g ou 9g/g de digitonine pour les mitochondries de *S. cerevisiae* (*S. c*), *K. lactis* (*K. l*) et *C. utilis* (*C. u*), et 8g/g de digitonine pour les mitochondries de cœur de souris, données par Thibaut Molinié. L'activité NADH déshydrogénases réalisée sur gel à 28°C.

L'ensemble de ses résultats ne semblent donc pas permettre de conclure véritablement sur la présence d'un complexe I dans la souche *K. lactis* mais laissent cependant envisager sa présence. Ces résultats restant préliminaires, l'augmentation des conditions et des contrôles permettraient peut-être une conclusion plus définitive. En effet, cette étude n'a pu être plus aboutie en raison du confinement. Dans ce projet, il avait été initialement prévu, outre l'augmentation de la reproduction des expériences présentées ici, une étude du potentiel de membrane par fluorescence sur mitochondries isolées. Cela aurait permis de conclure sur un export de protons supplémentaires dans les mitochondries de la souche *K. lactis* par rapport à la souche *S. cerevisiae*.



Chapitre 6

Conclusion Générale

Les travaux qui ont été effectués durant ma thèse s'inscrivent dans le cadre de l'étude de la régulation de la biogenèse mitochondriale sur le modèle levure dans la souche *S. cerevisiae*. Le principal acteur de la biogenèse mitochondriale dans cette souche est le complexe HAP activé par sa sous-unité régulatrice Hap4p.

Mes travaux ont donc permis de mettre en évidence différents niveaux de régulation de ce complexe et en particulier au niveau de Hap4p.

6.1 Régulation positive par l'hème

Dans un premier temps, mes travaux de thèse se sont intéressés au rôle de l'hème sur le complexe HAP. Ce rôle a souvent été suggéré mais n'avait jamais été formellement identifié. Pour cela, une étude de l'induction de la biosynthèse de l'hème et ses conséquences sur la biogenèse mitochondriale a été réalisée. Mes résultats ont permis de mettre en évidence que (1) l'hème pouvait effectivement se fixer de façon directe sur Hap4p sous sa forme labile. D'après les expériences d'interaction *in vitro*, la fixation de l'hème a lieu sur la deuxième moitié de la protéine, entre les fragments 330 et 554. Cette interaction est sûrement possible par la présence du triplet d'histidines, site de fixation connu de l'hème labile. Cependant, ce site n'a pas été formellement identifié. L'utilisation d'un mutant pour le triplet d'histidines permettrait de vérifier que la fixation de l'hème a bien lieu à ce niveau. (2) Les résultats ont également pu montrer que cette interaction entre l'hème et Hap4p était à l'origine d'une augmentation de la stabilité de Hap4p. L'augmentation de la stabilité du régulateur du complexe HAP mène alors à une augmentation de la biogenèse mitochondriale qui se traduit par une augmentation du contenu en mitochondries au niveau cellulaire. Dans un milieu purement respiratoire, l'activité mitochondriale est primordiale au maintien de la prolifération et de la division cellulaire, exceptée pour la souche *K. lactis*, comme l'ont montré les résultats du chapitre précédent (5.3.2). Le mécanisme mis en évidence par l'ensemble de ces résultats est illustré par la **Figure 111**. (3) Cependant, mes travaux ont également mis en évidence que l'état rédox de l'hème jouait sur cette interaction. En effet, les résultats obtenus montrent qu'en présence de NAC, un anti oxydant, l'interaction hème/Hap4p est moindre et que la stabilité de la protéine n'est plus l'élément régulé dans le maintien de l'activité de HAP. Ce qui suggère que les premiers résultats sont dus à la forme oxydée de l'hème spécifiquement. Ainsi bien que le NAC semble permettre d'augmenter la quantité de Hap4p, cette régulation semble parallèle à celle de la voie de signalisation de l'hème et ne semble pas avoir un effet synergique avec cette dernière.

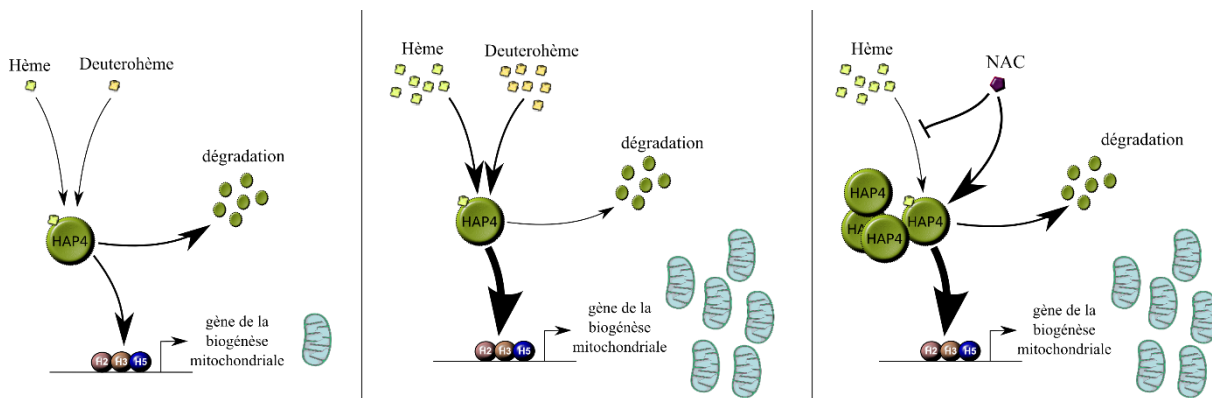


Figure 111. Illustration des mécanismes de régulation de la biogenèse mitochondriale via l'hème

L'hème ou son homologue non métabolisable, le deutérohème, sont capables de se fixer sur Hap4p permettant alors d'augmenter sa stabilité. Ce mécanisme est proportionnel à la quantité d'hème disponible, en présence d'une forte quantité d'hème, la stabilité de Hap4p sera très importante et permettra une biogenèse mitochondriale plus importante. En revanche la présence de NAC, induit une diminution de l'interaction de l'hème avec Hap4p par réduction de l'hème. Dans des conditions de stress oxydatif, cette molécule est cependant à l'origine d'une augmentation de la quantité de Hap4p qui permet un maintien de la biogenèse mitochondriale élevée.

Cette hypothèse, bien que partiellement vérifiée, pourrait faire l'objet d'une étude, par exemple, il serait possible *via* l'étude *in vitro* de l'interaction entre l'hémine et le fragment de Hap4p de pouvoir montrer une modification du Kd en présence ou non de l'anti-oxydant. Egalement, les résultats suggèrent un turn-over plus important en présence de NAC du fait de l'absence de régulation de sa stabilité. Etudier les mécanismes de sa dégradation seraient donc importants pour la compréhension de ces deux voies de signalisation. Bien que le mécanisme de dégradation de Hap4p ne semble pas encore connu, de précédents travaux du laboratoire suggère que cette dégradation est assurée par un système ubiquitine/protéasome. Il implique la liaison de plusieurs petites protéines appelées ubiquitines aux protéines cibles. La protéine, alors polyubiquitinée, est ensuite dégradée par un large complexe protéique nommé le 26S protéasome. Cependant, ce mécanisme reste à être prouvé.

D'autre part, il serait intéressant de savoir si une telle régulation existe chez le mammifère. Comme décrit en introduction, la protéine Hap4p est l'homologue fonctionnel de PGC1 α , acteur principal de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez le mammifère. À l'heure actuelle aucune étude ne semble associer l'hème à une régulation de cette protéine. Cependant, si une telle régulation existait, elle pourrait peut-être être utilisée dans un contexte physiopathologique. Si les deux protéines sont des homologues fonctionnels, elles ne sont en revanche pas homologues structurels et la protéine PGC1 α ne possède pas de triplet d'histidines, site présumé de fixation de l'hème. Cependant, la séquence de la protéine comprend de nombreuses cystéines, également connues pour permettre la fixation de l'hème. Une étude concernant la capacité ou non de l'hème à se fixer sur ces potentiels sites devrait être

mené au niveau *in vitro* et *ex vivo*. Si une telle interaction se confirmait, une étude physiologique des conséquences de cette interaction sur l'activité de PGC1 α *et fortiori* sur la biogenèse mitochondriale devrait être étudiée.

6.2 Répression positive par le glucose

Dans un second temps, mon travail s'est concentré sur le rôle de la répression glucose sur la biogenèse mitochondriale. De précédents travaux du laboratoire avaient permis de mettre en évidence que la répression glucose chez *S. cerevisiae* entraînait un comportement similaire à celui observé dans les cellules tumorales subissant un effet Warburg. En effet, l'ajout de glucose induit sur du long terme une diminution de la vitesse de respiration, une augmentation du flux glycolytique et de la vitesse de prolifération. Ces trois paramètres définissent l'effet Warburg et ont été décrit comme étant corrélés, le remodelage métabolique entre respiration et glycolyse semble être à l'origine de l'augmentation de la prolifération. Ce modèle a donc permis d'observer la mise en place de l'effet Warburg au sein des cellules et ainsi de chercher les mécanismes de régulation pouvant déstabiliser ce phénomène. En effet, bien que le modèle levure soit relativement éloigné du modèle cellule cancéreuse par sa nature unicellulaire, il présente de nombreux avantages par rapport à la cellule mammifère. Tout d'abord, et comme décrit ci-dessus, ce modèle permet de suivre la mise en place de l'effet Warburg dans les cellules quand cet effet est souvent déjà établi dans les cultures cellulaires de mammifères.

Ainsi, le travail effectué durant ma thèse sur ce modèle a permis de montrer que (1) dans la souche *S. cerevisiae*, un maintien de la biogenèse mitochondriale entraînait un maintien de la vitesse de respiration et donc une absence du remodelage métabolique décrit par Warburg (Warburg, 1956a). L'étude réalisée sur le double mutant $\Delta hxk2hap4\uparrow$ montre également que l'impact du glucose sur la vitesse de la respiration est quasi nul. Ce phénomène n'induit pas une absence de flux glycolytique et fermentaire, mis en place après l'ajout du glucose mais ne permet plus de définir un effet Warburg. Ainsi, la délétion de *Hxk2*, si elle n'empêche pas la glycolyse a bien un impact sur la mise en place de l'effet Warburg, puisqu'elle semble associée à la surexpression de *HAP4*, pouvoir empêcher la répression glucose sur la vitesse de respiration, lorsque la surexpression de *HAP4* seule, si elle la diminue pourrait juste induire un retard de cette répression. En revanche, dans une souche où le maintien de la biogenèse mitochondriale est naturel, telle que *C. utilis*, la glycolyse et la fermentation sont nettement moins importantes. Ces résultats confirment donc que l'origine de la diminution de la respiration, observée durant l'effet Warburg, est due à une répression du glucose sur la biogenèse mitochondriale. (2) Mes travaux ont permis de montrer que le remodelage

métabolique et l'augmentation de la prolifération peuvent être décorrélés. En effet, que ce soit dans les souches mutantes ne présentant pas un effet Warburg ou dans une souche sauvage respiratoire obligatoire, l'absence de l'effet Warburg par maintien de la biogenèse mitochondriale et/ou par l'absence d'augmentation du flux glycolytique, n'empêche pas l'augmentation de la vitesse de prolifération. Ainsi, le remodelage et l'augmentation de la prolifération sont donc deux paramètres mis en place en parallèle suite à l'ajout du glucose et ne sont pas dépendant l'un de l'autre comme le suggérait Warburg (Warburg, 1956b, 1956a).

(3) Enfin, mes résultats semblent montrer que l'augmentation du flux glycolytique observé lors de l'effet Warburg n'ait pas essentiellement mis en place pour un maintien de la synthèse d'ATP suite à la diminution de l'activité du système OXPHOS, comme la littérature l'a longtemps suggéré. L'augmentation du flux glycolytique/fermentaire semble, en revanche, important au maintien de la balance redox et participe, en particulier, essentiellement à une réoxydation rapide du NADH fourni par la glycolyse. L'ensemble de ces résultats est illustré par la **Figure 112**.

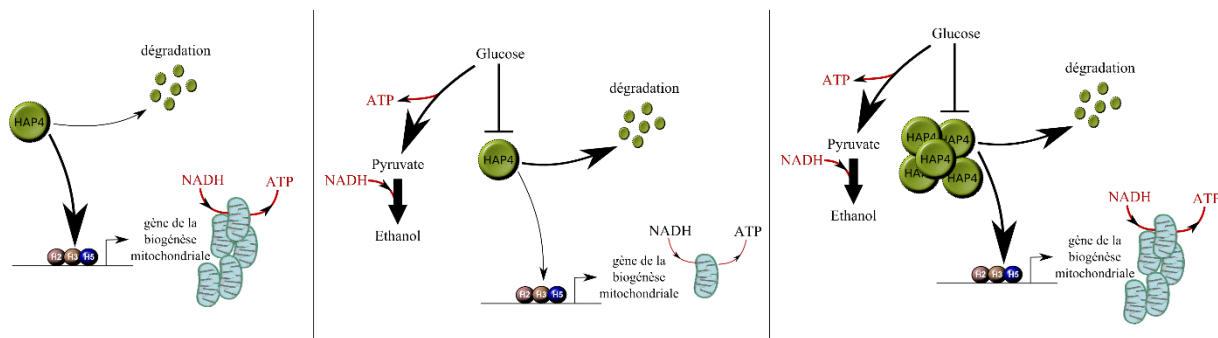


Figure 112. Illustration de l'effet du glucose sur la biogenèse mitochondriale dans la souche *S. cerevisiae*

En absence de glucose et dans un milieu purement respiratoire, la biogenèse mitochondriale de la souche *S. cerevisiae* est induite par le complexe HAP et sa sous-unité régulatrice Hap4p. Le glucose va induire une répression de l'expression du gène codant pour Hap4p ainsi qu'une diminution de sa stabilité et ainsi une diminution de la biogenèse mitochondriale. En parallèle, la consommation du glucose induit une mise en place de la glycolyse et de la fermentation. Un remodelage métabolique a donc lieu. Lors d'une surexpression de la protéine Hap4p, l'ajout de glucose ne semble pas être suffisant pour inhiber sa synthèse, un maintien de la biogenèse mitochondriale est observé, malgré la mise en place de la glycolyse et de la fermentation. Ce résultat est augmenté lorsque la surexpression de Hap4p est associée à une délétion de *HXK2*.

Cela est, par ailleurs, en accord avec les résultats obtenus avec la souche *C. utilis*. Cette souche est Warburg négatif, malgré l'ajout du glucose, la biogenèse mitochondriale est maintenue et la vitesse de respiration est bien supérieure à celle observée dans la souche *S. cerevisiae* étudiée. En parallèle, les flux glycolytique et fermentaire sont plus faibles que dans la souche *S. cerevisiae* malgré l'augmentation de la vitesse de prolifération. Il est possible que le fait que la

vitesse de respiration soit élevée induise une réoxydation du NADH plus rapide que dans la souche *S. cerevisiae* via la chaîne respiratoire. Dans ce contexte, l'activité de la chaîne respiratoire pourrait suffire pour réoxyder suffisamment rapidement le NADH malgré l'augmentation de la vitesse de prolifération et donc la demande croissante en NAD⁺. Cependant, cette hypothèse mériterait une étude plus poussée, notamment par une réelle quantification des ratios NADH/NAD et ADP/ATP dans les différentes souches afin de confirmer les calculs effectués.

D'autre part, le second objectif de ce travail, après l'étude de la mise en place de l'effet Warburg et ses conséquences sur le métabolisme cellulaire, était d'identifier des mécanismes permettant de réverser ce phénotype ou du moins de le modérer. Ces mécanismes n'ont pas pu être identifiés, car si le maintien de la biogenèse mitochondriale semble possible, cet effet n'induit pas une suppression du flux fermentaire ni de l'augmentation de la vitesse de prolifération. Or ces paramètres semblent être des atouts dans le processus d'invasion tumoral. Une étude plus poussée sur la régulation de ces deux paramètres devrait donc être menée.

Enfin, l'objectif de ce travail étant une étude du comportement cellulaire lors de la régulation de l'effet Warburg, à long terme, il semble essentiel d'effectuer des tests similaires sur cellules tumorales. Une fois les mécanismes bien décrits sur le modèle levure, cela permettrait de tester sur des cellules, où l'effet Warburg est déjà établi, les processus identifiés permettant de l'inhiber ou de le déstabiliser.

6.3 Le cas de la souche *K. lactis*

L'origine de l'étude de cette souche vient de la recherche d'une souche respiratoire obligatoire qui soit plus proche de la souche de *S. cerevisiae* étudiée que ne l'était *C. utilis*. La souche *K. lactis* a une vitesse de prolifération et une vitesse de respiration proche de celle du modèle *S. cerevisiae* et possède un homologue structural et fonctionnel de Hap4p (Bourgarel et al., 1999; Buschlen et al., 2003).

Dans un premier temps, cette étude a permis de mettre en évidence que lorsque cette souche est cultivée en milieu purement respiratoire, avec comme substrat carboné le glycérol, par exemple, l'ajout de glucose ne modifie pas son comportement. En effet, contrairement aux souches précédemment étudiées, l'ajout de glucose n'induit ni augmentation de la vitesse de prolifération, ni diminution de la vitesse de respiration. Il est apparu alors que la souche ne consommait pas le glucose ajouté, bien qu'elle puisse le consommer lorsque le glucose est la seule source de substrat carboné à sa disposition. Dans ce cas, la vitesse de respiration est plus

faible que lors d'une prolifération en glycérol, tout comme sa vitesse de prolifération. Ainsi, cette souche est bien Warburg négatif, ne répondant pas aux critères mis en place lors d'un effet Warburg, mais elle a également un comportement très différent des autres souches étudiées qui favorisent systématiquement la consommation de glucose lorsqu'il est disponible.

Afin de forcer la souche à consommer le glucose, une étude de la prolifération de *K. lactis* en présence de CCCP a été effectuée. Dans ces conditions, l'ATP ne pouvant plus être obtenu par l'activité du système OXPHOS, une mise en place de la glycolyse *via* la consommation du glucose était attendue, afin de pallier au manque d'ATP. Cependant, les résultats ont montré qu'en présence ou en absence de glucose, la vitesse de prolifération et la vitesse de respiration n'étaient que peu impactées par l'ajout du découplant. Il a donc été suggéré que le glycérol permettait une formation d'ATP *via* une mise en place des dernières réactions de la glycolyse (**Figure 100**). Cette hypothèse pourrait être confirmée par un suivi de glycérol marqué, par exemple, permettant de suivre son devenir au sein de la cellule.

Dans un second temps, la présence d'un complexe I couplé à un transport de protons vers l'espace intermembranaire, semblable à ce qui est observable dans la souche *C. utilis*, a été étudiée. Les résultats n'ont pas pu mener à des conclusions fermes. En effet, il a pu être mis en évidence que, comme chez *C. utilis*, la respiration était sensible aux inhibiteurs du complexe I. Dans les cellules *S. cerevisiae*, ces inhibiteurs n'ont aucun effet sur les déshydrogénases. De plus, le profil des activités en gel de *K. lactis*, en ce qui concerne le complexe IV et l'ATP synthase, est très proche de ce qui est observable chez *C. utilis*. En revanche, pour le complexe I, si une faible activité semble être détectable dans la souche *K. lactis*, le profil n'est pas assez défini pour conclure. Cette expérience devrait être refaite en présence d'une quantité de mitochondries plus importante.

L'ensemble des résultats obtenus sur la souche *K. lactis* laissent penser que cette souche a un comportement très différent de la plupart des souches étudiées et mériterait une étude plus approfondie de la structure de sa chaîne respiratoire et du devenir des substrats carbonés mis à sa disposition.



Chapitre 7

Abréviations

Nde1/2p : NADH déshydrogénases externes

Ndi : NADH déshydrogénase interne

SDH : Succinate déshydrogénase

DHAP : Dihydroxyacétone phosphate

PiC : Transporteur de phosphate

NRF : Nuclear Respiratory Factor-1

PPAR : Peroxisome Proliferator Associated Receptors

PGC-1 : PPAR Gamma Coactivator-1

CREB : cAMP Responsive Element Binding protein

AMPK : AMP-activated protein kinase

GPCR : Récepteur couplé aux protéines G

WT : Wild Type

HAP : Heme activator protein

Hem1 : Aminolevulinate synthase

HMG2 : HMG-coA reductase

CYC1 : iso-1-cytochrome c

GST : Glutathion-S-transférase

ALA : δ -aminolévulinate

DO : Densité optique

PEG : Polyéthylène glycol

KCl : Chlorure de potassium

mgDW : mg poids sec

Triéthylétain : TET

CCCP : Carbonyl cyanide m-chloro-phenyl hydrazone

B-Gal : β -galactosidase

ONPG : O-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside

ONP : Orthonitrophénol

SDS : DodécylSulfate de Sodium

LaurylSS : Lauryl sarcosinate de sodium

G6PDH : glucose-6-phosphate déshydrogénase

G6P : Gluconate-6-phosphate

GK : Glycérokinase

G3P : L-glycérol-3-phosphate

PK : Pyruvate kinase

PEP : phosphoénolpyruvate

ADP : Adénosine di phosphate

ATP : Adénosine tri phosphate

LDH : L-lactate déshydrogénase

ADH : Alcool déhydrogénase

Al-DH : Aldéhyde désydrogénase

PiK : phosphate de potassium

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

PMSF : PhenylMethylSulfonyl Fluoride

BSA : Albumine de sérum de bœuf

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

APS : Persulfate d'ammonium

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthylène diamine

TBST : Tris buffer saline tween

PGK-1 : Phosphoglycerate kinase 1

CHX : Cycloheximide

ROS : Espèce réactive de l'oxygène

COX : Cytochrome c oxydase

HXK : Hexokinase

OXPHOS : Système des oxydations
phosphorylante

CS : Citrate synthèse

hap4↑ : surexpression du gène *hap4*

DP IX : Deutéroporphyrine IX

NAC : N-Acétyl-cystéine

GSH : Glutathion réduit

Asc : Ascorbate

G6P : Glucose-6-Phosphate

DOX : Doxycycline

P.A : Piericidine A

TAM : Macrophages associés aux tumeurs

β-Gal : β-Galactosidase

RSV : Respiratory State Value

AA : Antimycine A

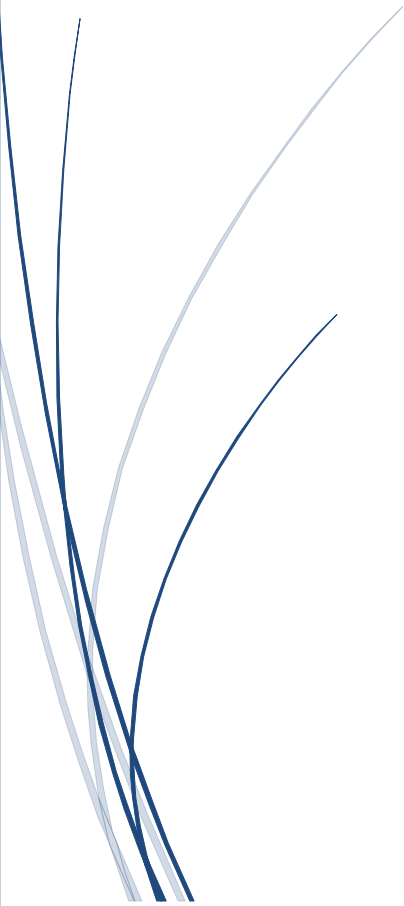
INT : Iodonitrotétrazolium formazan

DAB : Diaminobenzidine



Chapitre 8

Références



- Abrahams, J. P., Leslie, A. G. W., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628. doi:10.1038/370621a0.
- Ahuatzi, D., Herrero, P., Cera, T. De, and Moreno, F. (2004). The Glucose-regulated Nuclear Localization of Hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* Is Mig1-dependent. *J. Biol. Chem.* 279, 14440–14446. doi:10.1074/jbc.M313431200.
- Ajioka, R. S., Phillips, J. D., and Kushner, J. P. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *BBA - Bioenerg.* 1763, 723–736. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.005.
- Alaynick, W. A. (2008). Nuclear receptors, mitochondria and lipid metabolism. *Mitochondrion* 8, 329–337. doi:10.1016/j.mito.2008.02.001.
- Avéret, N., Jobin, M. L., Devin, A., and Rigoulet, M. (2015). Proton pumping complex I increases growth yield in *Candida utilis*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1847, 1320–1326. doi:10.1016/j.bbabi.2015.07.001.
- Bao, W., Guiard, B., Fang, Z., Donnini, C., Gervais, M., Lopes Passos, F. M., et al. (2008). Oxygen-Dependent Transcriptional Regulator Hap1p Limits Glucose Uptake by Repressing the Expression of the Major Glucose Transporter Gene RAG1 in *Kluyveromyces lactis*. *Eucaryotic Cell* 7, 1895–1905. doi:10.1128/EC.00018-08.
- Beauvoit, B., and Rigoulet, M. (2001). Regulation of Cytochrome c Oxidase by Adenylic Nucleotides. Is Oxidative Phosphorylation Feedback Regulated by its End-Products? *IUBMB Life* 52, 143–152. doi:10.1080/152165401317316545.
- Benz, R., and McLaughlin, S. (1983). THE MOLECULAR MECHANISM OF ACTION OF THE PROTON IONOPHORE FCCP. *Biophys J* 41, 381–398.
- Betina, S., Gavurníková, G., Haviernik, P., Šabová, L., and Kolarov, J. (1995). Expression of the AAC2 Gene Encoding the Major Mitochondrial ADP/ATP Carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is Controlled at the Transcriptional Level by Oxygen, Heme and HAP2 Factor. *Eur. J. Biochem.* 229, 651–657. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.tb20510.x.
- Bhalla, K., Hwang, B. J., Dewi, R. E., Ou, L., Twaddel, W., Fang, H.-B., et al. (2011). PGC1 α promotes tumor growth by inducing gene expression programs supporting lipogenesis. *Cancer Res.* 71, 6888–6898. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-1011.
- Bhatia-kissova, I., and Camougrand, N. (2010). Mitophagy in yeast: actors and physiological roles. *FEMS Microbiol. Lett.* 10, 1023–1034. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00659.x.

- Bisson, L. F., Coons, D. M., Kruckeberg, A. L., and Lewis, D. A. (1993). Yeast Sugar Transporters. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 28, 259–308. doi:10.3109/10409239309078437.
- Blom, J., De Mattos, M. J., and Grivell, L. A. (2000). Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 1970–1973. doi:10.1128/aem.66.5.1970-1973.2000.
- Blondeau, K., Boze, H., Moulint, G. J. G., and Galzy, P. (1994). Physiological Approach to Heterologous Human Serum Albumin Production by *Kluyveromyces lactis* in Chemostat Culture. *Yeast* 10, 1297–1303.
- Boles, E., and Hollenberg, C. P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiol. Rev.* 21, 85–111.
- Boubekeur, S., Camougrand, N., Bunoust, O., Rigoulet, M., and Guerin, B. (2001). Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 268, 5057–5065.
- Bourens, M., Fontanesi, F., Soto, I. C., Liu, J., and Barrientos, A. (2013). Redox and Reactive Oxygen Species Regulation of Mitochondrial Cytochrome *c* Oxidase Biogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1940–1952. doi:10.1089/ars.2012.4847.
- Bourgarel, D., Nguyen, C. C., and Bolotin-Fukuhara, M. (1999). HAP4, the glucose-repressed regulated subunit of the HAP transcriptional complex involved in the fermentation-respiration shift, has a functional homologue in the respiratory yeast *Kluyveromyces lactis*. *Mol. Microbiol.* 31, 1205–1215. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01263.x.
- Boyer, P. D. (1997). THE ATP SYNTHASE—A SPLENDID MOLECULAR MACHINE. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 717–749. doi:10.1146/annurev.biochem.66.1.717.
- Brand, A., Singer, K., Koehl, G. E., Kolitzus, M., Schoenhammer, G., Thiel, A., et al. (2016). LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 24, 657–671. doi:10.1016/j.cmet.2016.08.011.
- Brandt, U., Uribe, S., Schägger, H., and Trumpower, B. L. (1994). Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* 269, 12947–12953.
- Brons, J. F., De Jong, M., Valens, MichèleGrivell, L. A., Grivell, L. A., Bolotin-Fukuhara, M., and

- Blom, J. (2002). Dissection of the promoter of the HAP4 gene in *S. cerevisiae* unveils a complex regulatory framework of transcriptional regulation. *Yeast* 19, 923–932. doi:10.1002/yea.886.
- Brzobohaty, B., and Kovac, L. (1986). Factors Enhancing Genetic Transformation of Intact Yeast Cells Modify Cell Wall Porosity. *J. Gen. Microbiol.* 132, 3089–3093.
- Bullis, B. L., and Lemires, B. D. (1994). Isolation and Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* SDH4 Gene Encoding a Membrane Anchor Subunit of Succinate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 269, 6543–6549.
- Bunoust, O., Devin, A., Avéret, N., Camougrand, N., and Rigoulet, M. (2005). Competition of Electrons to Enter the Respiratory Chain. *J. Biol. Chem.* 280, 3407–3413. doi:10.1074/jbc.M407746200.
- Burant, C. F., Takedat, J., Brot-Laroche, E., Bell, G. I., and Davidsons, N. O. (1992). Fructose Transporter in Human Spermatozoa and Small Intestine Is GLUT5. *J. Biol. Chem.* 267, 14523–14526.
- Buschlen, S., Amillet, J. M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C., and Bolotin-Fukuhara, M. (2003). The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comp. Funct. Genomics* 4, 37–46. doi:10.1002/cfg.254.
- Cain, K., and Griffiths, D. E. (1977). LOCALIZATION OF THE SITE OF ACTION OF TRIALKYLTIN IN. *Biochem J* 162, 575–580.
- Cammarota, M., Paratcha, G., Bevilaqua, L. R., Levi de Stein, M., Lopez, M., Pellegrino de Iraldi, A., et al. (1999). Cyclic AMP-responsive element binding protein in brain mitochondria. *J. Neurochem.* 72, 2272–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10349835>.
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Skehel, J. M., Shannon, R. J., Hirst, J., and Walker, J. E. (2006). Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 281, 32724–32727. doi:10.1074/jbc.M607135200.
- Cervený, K. L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R. E., and Sesaki, H. (2007). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Cell Biol.* 17. doi:10.1016/j.tcb.2007.08.006.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing Mitochondrial Proteins : Machineries and Mechanisms. *Cell* 138, 628–644. doi:10.1016/j.cell.2009.08.005.

- Chance, B. (1952). SPECTRA AND REACTION KINETICS OF RESPIRATORY PIGMENTS OF HOMOGENIZED AND INTACT CELLS. *Nature* 169, 215–221.
- Chance, B., and Williams, G. R. (1955). Respiratory enzymes in phosphorylation. II. Difference spectra. *J. Biol. Chem.* 217, 395–407.
- Chantrel, Y., Gaisne, M., Lions, C., and Verdière, J. (1998). The Transcriptional Regulator Hap1p (Cyp1p) Is Essential for Anaerobic or Heme-Deficient Growth of *Saccharomyces cerevisiae* : Genetic and Molecular Characterization of an Extragenic Suppressor that Encodes a WD Repeat Protein. *Genetics* 148, 559–569.
- Chapman, K. B., Solomon, S. D., and Boeke, J. D. (1992). SDH1, the gene encoding the succinate from *Saccharomyces cerevisiae* dehydrogenase flavoprotein subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 118, 131–136.
- Chen, D.-C., Yang, B.-C., and Kuo, T.-T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr. Genet.* 21, 83–84.
- Chen, J.-J., Yang, J. M., Petryshyn, R., Kosower, N., and London, I. M. (1989). Disulfide Bond Formation in the Regulation of eIF-2a Kinase by Heme. *J. Biol. Chem.* 264, 9559–9564.
- Chen, J. J. (2007). Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2a kinase: Relevance to anemias. *Blood* 109, 2693–2699. doi:10.1182/blood-2006-08-041830.
- Chevtzoff, C., Yoboue, E. D., Galinier, A., Casteilla, L., Daignan-Fornier, B., Rigoulet, M., et al. (2010). Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 285, 1733–1742. doi:10.1074/jbc.M109.019570.
- Christen, S., and Sauer, U. (2011). seven yeast species by 13 C flux analysis and metabolomics. *Yeast Res.* 11, 263–272. doi:10.1111/j.1567-1364.2010.00713.x.
- Cobley, J. G., Singer, T. P., Beinert, H., and Grossman, S. (1975). Piericidin A sensitivity, site 1 phosphorylation, and reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase during iron-limited growth of *Candida utilis*. *J. Biol. Chem.* 250, 211–217.
- Colegio, O. R., Chu, N.-Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., et al. (2015). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513, 559–563. doi:10.1038/nature13490.Functional.
- Coles, C. J., Gutman, M., and Singer, T. P. (2014). On the reaction of piericidin A with the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase of *Candida utilis*. *J. Biol. Chem.* 249, 3814–

3818.

- Coons, D. M., Boulton, R. B., and Bisson, L. F. (1995). Computer-Assisted Nonlinear Regression Analysis of the Multicomponent Glucose Uptake Kinetics of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 3251–3258.
- Cory, S., and Adams, J. M. (2002). THE BCL2 FAMILY : REGULATORS OF THE CELLULAR LIFE-OR-DEATH. *Nat. Rev.* 2, 647–656. doi:10.1038/nrc883.
- Crabtree, H. G. (1929). OBSERVATIONS ON THE CARBOHYDRATE METABOLISM OF TUMOURS . *Biochem. J.* 23, 536–545.
- Crisp, R. J., Pollington, A., Galea, C., Jaron, S., Yamaguchi-Iwai, Y., and Kaplan, J. (2003). Inhibition of Heme Biosynthesis Prevents Transcription of Iron Uptake Genes in Yeast. *J. Biol. Chem.* 278, 45499–45506. doi:10.1074/jbc.M307229200.
- Daignan-Fornier, B., Valenss, M., Lemire, B. D., and Bolotin-Fukuharas, M. (1994). Structure and Regulation of SDH3 , the Yeast Gene Encoding the Cytochrome b560 Subunit of Respiratory Complex II. *J. Biol. Chem.* 269, 15469–15472.
- Dang, C. V (2012). Links between metabolism and cancer. *Genes Dev.* 26, 877–890. doi:10.1101/gad.189365.112.GENES.
- David, M., Daveran, M.-L., Batut, J., Dedieu, A., Domergue, O., Ghai, J., et al. (1988). Cascade Regulation of *nif* Gene Expression in *Rhizobium meliloti*. *Cell* 54, 671–683.
- De Deken, R. H. (1966). The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44, 149–156. doi:10.1099/00221287-44-2-149.
- DeBerardinis, R. J., and Chandel, N. S. (2016). Fundamentals of cancer metabolism. *Sci. Adv.* 2, e1600200. doi:10.1126/sciadv.1600200.
- Deberardinis, R. J., Lum, J. J., Hatzivassiliou, G., and Thompson, C. B. (2008). The Biology of Cancer : Metabolic Reprogramming Fuels Cell Growth and Proliferation. *Cell Metab.* 7, 11–20. doi:10.1016/j.cmet.2007.10.002.
- Deckert, J., Perini, R., Balasubramanian, B., and Zitomer, R. S. (1995). Multiple Elements and auto-repression regulate Rox1, a Repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genet. Soc. Am.* 139, 1149–1158.
- Derisi, J. L., Iyer, V. R., and Brown, P. O. (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science (80-.).* 278, 680–686.

- Devin, A., Dejean, L., Beauvoit, B., Chevtzoff, C., Avéret, N., Bunoust, O., et al. (2006). Growth yield homeostasis in respiring yeast is due to a strict mitochondrial content adjustment. *J. Biol. Chem.* 281, 26779–26784. doi:10.1074/jbc.M604800200.
- Díaz-Ruiz, R., Avéret, N., Araiza, D., Pinson, B., Uribe-Carvajal, S., Devin, A., et al. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate: A possible role in Crabtree effect induction? *J. Biol. Chem.* 283, 26948–26955. doi:10.1074/jbc.M800408200.
- Diderich, J. A., Schepper, M., Hoek, P. Van, Luttik, M. A. H., Dijken, J. P. Van, Pronk, J. T., et al. (1999). Glucose Uptake Kinetics and Transcription of HXT Genes in Chemostat Cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274, 15350–15359.
- Diderich, J. A., Schuurmans, J. M., Van Gaalen, M. C., Kruckeberg, A. L., and Van Dam, K. (2001). Functional analysis of the hexose transporter homologue HXT5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 1515–1524.
- Dienel, G. A., and Cruz, N. F. (2016). This review first describes characteristics of aerobic glycolysis, and then identifies metabolic pathways that contribute to its becoming manifest with increases in their rates. Lactate release is recognized as a major, but not the only, factor in. *J. Neurochem.* 138, 14–52. doi:10.1111/jnc.13630.
- Duszynski, J., Bogucka, K., Letko, G., Kuster, U., Kunz, W., and Wojtczak, L. (1981). RELATIONSHIP BETWEEN THE ENERGY COST OF ATP TRANSPORT AND ATP SYNTHESIS IN MITOCHONDRIA. *BBA - Bioenerg.* 637, 217–223.
- Egner, R., Mahé, Y., Pandjaitan, R., and Kuchler, K. (1995). Endocytosis and Vacuolar Degradation of the Plasma Membrane-Localized Pdr5 ATP-Binding Cassette Multidrug Transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15, 5879–5887.
- Eisenbach, M., and Gutman, M. (1976). Demonstration of the active and the sluggish forms of cytochrome b in isolated b-c1 complexes of the respiratory chain. *FEBS Lett.* 6, 247–250.
- Elbing, K., Larsson, C., Bill, R. M., Albers, E., Snoep, J. L., Boles, E., et al. (2004). Role of Hexose Transport in Control of Glycolytic Flux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5323–5330. doi:10.1128/AEM.70.9.5323.
- Evans, M. J., and Scarpulla, R. C. (1990). NRF-1: A trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev.* 4, 1023–1034. doi:10.1101/gad.4.6.1023.
- Evans, M. J., and Scarpullas, C. (1989). Interaction of Nuclear Factors with Multiple Sites in the

Somatic Cytochrome c Promoter. *J Biol Chem* 264, 14361–8. Available at:
<http://www.jbc.org/content/264/24/14361.long>.

- Fan, M., Rhee, J., St-Pierre, J., Handschin, C., Puigserver, P., Lin, J., et al. (2004). Suppression of mitochondrial respiration through recruitment of p160 myb binding protein to PGC-1alpha: modulation by p38 MAPK. *Genes Dev.* 18, 278–289. doi:10.1101/gad.1152204.
- Fantin, V. R., St-Pierre, J., and Leder, P. (2006). Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance. *Cancer Cell* 9, 425–434. doi:10.1016/j.ccr.2006.04.023.
- Fitton, V., Rigoulet, M., Ouhabi, R., and Guérin, B. (1994). Mechanistic Stoichiometry of Yeast Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *Biochemistry* 33, 9692–9698. doi:10.1021/bi00198a039.
- Forsburg, S. L., and Guarente, L. (1989). Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *CSH Press*, 1166–1178. doi:10.1101/gad.3.8.1166.
- Franken, A. C., Lokman, B. C., Ram, A. F. J., Punt, P. J., van den Hondel, C. A. M. J. J., and de Weert, S. (2011). Heme biosynthesis and its regulation: towards understanding and improvement of heme biosynthesis in filamentous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 91, 447–460. doi:10.1007/s00253-011-3391-3.
- Frey, T. G., and Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 319–324.
- Friebe, A., and Koesling, D. (2003). Regulation of Nitric Oxide – Sensitive Guanylyl Cyclase. *Circ. Res.* 93, 96–105. doi:10.1161/01.RES.0000082524.34487.31.
- Friedrich, T., Steinmtiller, K., and Weiss, H. (1995). The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett* 367, 107–111.
- Fytlovich, S., Gervais, M., Agrimonti, C., and Guiard, B. (1993). Evidence for an interaction between the CYPi (HAP1) activator and a cellular factor during heme-dependent transcriptional regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 12, 1209–1218.
- Gamo, F. J., Moreno, E., and Lagunas, R. (1995). The Low-affinity Component of the Glucose Transport System in *Saccharomyces cerevisiae* is not due to Passive Diffusion. *Yeast* 11, 1393–1398.

- Gancedo, J. M. (1998). Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 334–361.
- Gancedo, J. M., Clifton, D., and Fraenkel, D. G. (1977). Yeast Hexokinase Mutants. *J. Biol. Chem.* 252, 4443–4445.
- Gari, E., Piedrafita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1997). A Set of Vectors with a Tetracycline-Regulatable Promoter System for Modulated Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 837–848.
- Gatenby, R. A., and Gillies, R. J. (2004). WHY DO CANCERS HAVE HIGH AEROBIC GLYCOLYSIS ? *Nat. Rev.* 4, 891–899. doi:10.1038/nrc1478.
- Gell, D. A. (2018). Structure and function of haemoglobins. *Blood Cells, Mol. Dis.* 70, 13–42. doi:10.1016/j.bcmed.2017.10.006.
- Gilles-Gonzalez, M. A., Ditta, G. S., and Helinski, D. R. (1991). A haemoprotein with kinase activity encoded by the oxygen sensor of *Rhizobium meliloti*. *Lett. to Nat.* 350, 170–172.
- Glass, C. K., and Rosenfeld, M. G. (2000). The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors. *Genes Dev.* 14, 121–141.
- Gonzalez-Dominguez, M., Freire-Picos, M. A., and Cerdan, M. E. (2001). Haem regulation of the mitochondrial import of the *Kluyveromyces lactis* 5-aminolaevulinate synthase : an organelle approach. *Yeast* 18, 41–48.
- Gonzalez Siso, M. I., Freire Picas, M. A., and Cerdan, M. E. (1996). Reoxidation of the NADPH produced by the pentose phosphate pathway is necessary for the utilization of glucose by *Khyveromyces Zactis* rag2 mutants. *FEBS Lett.* 387, 7–10.
- Gornall, A. G., Bardawill, C. J., and David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.* 177, 751–766.
- Grandér, D. (1998). How do mutated oncogenes and tumor suppressor genes cause cancer ? *Med. Oncol.* 15, 20–26.
- Gregolin, C., and D'Alberon, A. (1964). On the properties of a D(-)lactic oxidase system in respiratory particles of yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 14, 103–108. doi:10.1016/0006-291x(64)90237-2.
- Gregolin, C., and Scaella, P. (1964). PHOSPHORYLATION LINKED TO OXIDATION OF D(-) AND L(+)-LACTATE BY RESPIRING PARTICLES FROM YEAST. *Biochim. Biophys.*

Acta 92, 163–165. doi:10.1016/0926-6569(64)90284-6.

Gregolin, C., Scaletta, P., and D'Alberon, A. (1964). INTERACTION OF CYTOCHROME C WITH YEAST C(-)LACTIC OXIDASE. *Nature* 204, 1302–1303. doi:10.1038/2041302b0.

Gregolin, C., and Singer, T. P. (1961). The D-lactic cytochrome reductase of yeast: its chemical nature, origins, and relation to the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 4, 189–194. doi:10.1016/0006-291x(61)90268-6.

Gregolin, C., and Singer, T. P. (1962). Zinc-FAD, prosthetic groups of D-lactate cytochrome reductase. *Biochim. Biophys. Acta* 57, 410–412. doi:10.1016/0006-3002(62)91147-2.

Gregolin, C., and Singer, T. P. (1963). The lactic dehydrogenase of yeast. III. D(-)Lactic cytochrome c reductase, a zinc-flavoprotein from aerobic yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 67, 201–218. doi:10.1016/0006-3002(63)91818-3.

Grossman, S., Cobley, J. G., and Singer, T. P. (1974). Reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase, piericidin sensitivity, and site 1 phosphorylation in different growth phases of *Candida utilis*. *J. Biol. Chem.* 249, 3819–3826.

Guaragnella, N., Palermo, V., Galli, A., Moro, L., Mazzoni, C., and Giannattasio, S. (2014). The expanding role of yeast in cancer research and diagnosis: insights into the function of the oncosuppressors p53 and BRCA1/2. *Yeast Res.* 14, 2–16. doi:10.1111/1567-1364.12094.

Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P., and Alani, E. (1984). Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae*. *Cell* 36, 503–511. doi:10.1016/0092-8674(84)90243-5.

Guerin, B., Guerin, M., Napias, C., and Rigoulet, M. (1977). Phosphate transport in yeast mitochondria: is the phosphate carrier a part of the oligomycin-sensitive adenosine triphosphatase complex? *Biochem. Soc. Trans.* 5, 503–506. doi:10.1042/bst0050503.

Gugneja, S., and Scarpulla, R. C. (1997). Serine phosphorylation within a concise amino-terminal domain in nuclear respiratory factor 1 enhances DNA binding. *J. Biol. Chem.* 272, 18732–18739. doi:10.1074/jbc.272.30.18732.

Gugneja, S., Virbasius, J. V., and Scarpulla, R. C. (1995). Four structurally distinct, non-DNA-binding subunits of human nuclear respiratory factor 2 share a conserved transcriptional activation domain. *Mol. Cell. Biol.* 15, 102–111. doi:10.1128/mcb.15.1.102.

Guo, B., Phillips, J. D., Yu, Y., and Leibold, E. A. (1995). Iron Regulates the Intracellular

Degradation of Iron Regulatory Protein 2 by the Proteasome. *J. Biol. Chem.* 270, 21645–21651.

Guppy, M., Leedman, P., Zu, X., and Russell, V. (2002). Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J* 364, 309–315.

Hahn, S., Pinkham, J., Wei, R., Miller, R., and Guarente, L. (1988). The HAP3 regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 8, 655–663. doi:10.1128/MCB.8.2.655.Updated.

Hammad, N. (2018). Etude de l'effet Warburg, à l'origine du métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 144, 646–674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

Hanna, D. A., Hu, R., Kim, H., Martinez-Guzman, O., Torres, M. P., and Reddi, A. R. (2018). Heme bioavailability and signaling in response to stress in yeast cells. *J Biol Chem* 293, 12378–12393. doi:10.1074/jbc.RA118.002125.

Hedges, D., Proft, M., and Entian, K.-D. (1995). CAT8, a New Zinc Cluster-Encoding Gene Necessary for Derepression of Gluconeogenic Enzymes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biochem.* 15, 1915–1922.

Herrero, P., Galindez, J., Ruiz, N., Martinez-Campa, C., and Moreno, F. (1995). Transcriptional Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HXK1, HXK2 and GLK1 genes. *Yeast* 11, 137–144.

Heytler, P. G. (1963). Uncoupling of Oxidative Phosphorylation by Carbonyl Cyanide Phenylhydrazones and Chloroplasts I. Some Characteristics of m-Cl-CCP Action on Mitochondria. *Biochemistry* 2, 357–361. doi:10.1021/bi00902a031.

Hickman, M. J., and Winston, F. (2007). Heme Levels Switch the Function of Hap1 of *Saccharomyces cerevisiae* between Transcriptional Activator and Transcriptional Repressor. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7414–7424. doi:10.1128/MCB.00887-07.

Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R. (1978). Transformation yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1929–1933.

Hon, T., Dodd, A., Dirmeier, R., Gorman, N., Sinclair, P. R., Zhang, L., et al. (2003). A Mechanism

- of Oxygen Sensing in Yeast. *J. Biol. Chem.* 278, 50771–50780. doi:10.1074/jbc.M303677200.
- Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007). The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* doi:10.1146/annurev.biochem.76.071905.090048.
- Hsu, P. P., and Sabatini, D. M. (2008). Cancer Cell Metabolism : Warburg and Beyond. *Cell* 134, 703–707. doi:10.1016/j.cell.2008.08.021.
- Ichai, C., El-mir, M. Y., Nogueira, V., Piquet, M.-A., Chauvin, C., Fontaine, E., et al. (2001). Exogenous Mg-ATP Induces a Large Inhibition of Pyruvate Kinase in Intact Rat Hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 6398–6403. doi:10.1074/jbc.M004169200.
- Ignarro, L. J., Degnan, J. N., Baricos, W. H., Kadowitz, P. J., and Wolin, M. S. (1982). ACTIVATION OF PURIFIED GUANYLATE CYCLASE BY NITRIC OXIDE REQUIRES HEME COMPARISON OF HEME-DEFICIENT, HEME-RECONSTITUTED AND HEME-CONTAINING FORMS OF SOLUBLE ENZYME FROM BOVINE LUNG. *Biochim. Biophys. Acta* 718, 49–59.
- Inchaurredo, V. A., Yautorno, O. M., and Voget, C. E. (1994). Yeast Growth and b-Galactosidase Production During Aerobic Batch Cultures in Lactose-Limited Synthetic Medium. *Process Biochem.* 29, 47–54.
- Inuzuka, T., Yun, B.-G., Ishikawa, H., Takahashi, S., Hori, H., Matts, R. L., et al. (2004). Identification of Crucial Histidines for Heme Binding in the N-terminal Domain of the Heme-regulated eIF2a Kinase. *J. Biol. Chem.* 279, 6778–6782. doi:10.1074/jbc.C300464200.
- Ishikawa, H., Kato, M., Hori, H., Ishimori, K., Kirisako, T., Tokunaga, F., et al. (2005). Involvement of Heme Regulatory Motif in Heme-Mediated Ubiquitination and Degradation of IRP2. *Mol. Cell* 19, 171–181. doi:10.1016/j.molcel.2005.05.027.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of Intact Yeast Cells Treated with Alkali Cations. *J. Bacteriol.* 153, 163–168.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J., and Spiegelman, B. M. (2007). AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *PNAS* 104, 12017–12022.
- Jayaraman, J., Padmanaban, G., Malathi, K., and Sarma, P. S. (1971). Haem synthesis during mitochondriogenesis in yeast. *Biochem J* 121, 531–535. doi:10.1042/bj1210531.
- Jiang, X.-P., Elliott, R. L., and Head, J. F. (2015). Exogenous normal mammary epithelial

- mitochondria suppress glycolytic metabolism and glucose uptake of human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 153, 519–529. doi:10.1007/s10549-015-3583-0.
- Johnson, J. D., Muhonen, W. W., and Lambeth, D. O. (1998). Characterization of the ATP- and GTP-specific Succinyl-CoA Synthetases in Pigeon. *J. Biol. Chem.* 273, 27573–27579.
- Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends Genet* 15, 29–33. doi:doi: 10.1016/s0168-9525(98)01637-0.
- Jones, R. G., and Thompson, C. B. (2009). Tumor suppressors and cell metabolism : a recipe for cancer growth. *Genes Dev.* 23, 537–548. doi:10.1101/gad.1756509.GENES.
- Jones, W., and Bianchi, K. (2015). Aerobic glycolysis : beyond. *Front. Immunol.* 6, 1–5. doi:10.3389/fimmu.2015.00227.
- Kasianowicz, J., Benz, R., and McLaughlin, S. (1984). The Kinetic Mechanism by which CCCP (Carbonyl Cyanide m-Chlorophenylhydrazone) Transports Protons across Membranes. *J Membr. Biol* 82, 179–190.
- Kaufman, S., and Alivisatos, S. G. A. (1955). Purification and properties of the phosphorylating enzyme from spinach. *J. Biol. Chem.* 216, 141–152.
- Kelly, D. P., and Scarpulla, R. C. (2004). Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev.* 18, 357–368. doi:10.1101/gad.1177604.
- Kippert, F. (1995). A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of beta-galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 128, 201–206. doi:10.1016/0378-1097(95)00113-J.
- Klebe, R. J., Harriss, J. V, Sharp, Z. D., and Douglas, M. G. (1983). A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. *Gene* 25, 333–341.
- Klockow, C., Stahl, F., Scheper, T., and Hitzmann, B. (2008). In vivo regulation of glucose transporter genes at glucose concentrations between 0 and 500 mg/L in a wild type of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* 135, 161–167. doi:10.1016/j.jbiotec.2008.03.009.
- Kruckeberg, A. L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* 166, 283–292.
- Kumar, S., and Bandyopadhyay, U. (2005). Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol. Lett.* 157, 175–188. doi:10.1016/j.toxlet.2005.03.004.

- Kwast, K. E., Burke, P. V., and Poyton, R. O. (1998). OXYGEN SENSING AND THE TRANSCRIPTIONAL REGULATION OF OXYGEN- RESPONSIVE GENES IN YEAST. *J. Exp. !biology* 201, 1177–1195.
- Labbe-Bois, R., Simon, M., Rytka, J., Litwinska, J., and Bilinski, T. (1980). Effect of 5-aminolevulinic acid synthesis deficiency on expression of other enzymes of heme pathway in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95, 1357–1363.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lambeth, D. O., Tews, K. N., Adkins, S., Frohlich, D., and Milavetz, B. I. (2004). Expression of Two Succinyl-CoA Synthetases with Different Nucleotide Specificities in Mammalian Tissues *. *J. Biol. Chem.* 279, 36621–36624. doi:10.1074/jbc.M406884200.
- Lan, C., Lee, H. C., Tang, S., and Zhang, L. (2004). A Novel Mode of Chaperone Action. *J. Biol. Chem.* 279, 27607–27612. doi:10.1074/jbc.M402777200.
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C. N., Nielsen, L. B., Wibrand, F., Stride, N., et al. (2012). Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* 590, 3349–3360. doi:10.1113/jphysiol.2012.230185.
- Larsson, C., Pahlman, I., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., and Gustafsson, L. (1998). The Importance of the Glycerol 3-Phosphate Shuttle During Aerobic Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 347–357.
- Lascaris, R., Bussemaker, H. J., Boorsma, A., Piper, M., van der Spek, H., Grivell, L., et al. (2003). Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.* 4, R3. doi:10.1186/gb-2002-4-1-r3.
- Lathrop, J. T., and Timko, M. P. (1993). Regulation by Heme of Mitochondrial Protein Transport Through a Conserved Amino Acid Motif. *Science (80-)*. 259, 522–526.
- Leandro, M. J., Fonseca, C., and Gonçalves, P. (2009). Hexose and pentose transport in ascomycetous yeasts : an overview. *FEMS Yeast Res.* 9, 511–525. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00509.x.
- LeBleu, V. S., O’Connell, J. T., Gonzales Herrera, K. N., Wikman-Kocher, H., Pantel, K., Haigis, M. C., et al. (2015). PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation to promote metastasis. *Nat Cell Biol* 16, 1–32. doi:10.1038/ncb3039.PGC-1.

- Lee, J., Kim, C., Simon, D. K., Aminova, L. R., Alexander, Y., Kushnareva, Y. E., et al. (2005). Mitochondrial Cyclic AMP Response Element-binding Protein (CREB) Mediates Mitochondrial Gene Expression and Neuronal Survival. *J Biol Chem Author Manuscr.* 280, 40398–40401. doi:10.1074/jbc.C500140200.Mitochondrial.
- Leif, H., Sled, V. D., Ohnishi, T., Weiss, H., and Friedrich, T. (1995). Isolation and Characterization of the Proton-translocating NADH:ubiquinone Oxidoreductase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 230, 538–548. doi:10.1111/j.1432-1033.1995.0538h.x.
- Leif, H., Weidner, U., Berger, A., Spehr, V., Braun, M., van Heek, P., et al. (1993). *Escherichia coli* NADH dehydrogenase I, a minimal form of the mitochondrial complex I. *Biochem. Soc. Trans.* 21, 998—1001. doi:10.1042/bst0210998.
- Lewin, A. S., Hines, V., and Small, G. M. (1990). Citrate Synthase Encoded by the CIT2 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Is Peroxisomal. *Mol. Cell. Biol.* 10, 1399–1405.
- Liberti, M. V., and Locasale, J. W. (2016). The Warburg Effect : How Does it Benefit Cancer Cells ? *Trends Biochem Sci* 41, 211–218. doi:10.1016/j.tibs.2015.12.001.The.
- Liu, D., Chang, C., Lu, N., Wang, X., Lu, Q., Ren, X., et al. (2017). Comprehensive Proteomics Analysis Reveals Metabolic Reprogramming of Tumor-Associated Macrophages Stimulated by the Tumor Microenvironment. *J. proteome* 16, 288–297. doi:10.1021/acs.jproteome.6b00604.
- Liu, Z., and Butow, R. A. (2006). Mitochondrial Retrograde Signaling. *Annu. Rev. Genet.* 40, 159–185. doi:10.1146/annurev.genet.40.110405.090613.
- Locasale, J. W., and Cantley, L. C. (2011). Review Metabolic Flux and the Regulation of Mammalian Cell Growth. *Cell Metab.* 14, 443–451. doi:10.1016/j.cmet.2011.07.014.
- Locasale, J. W., Grassian, A. R., Melman, T., Lyssiotis, C. A., Mattaini, K. R., Bass, A. J., et al. (2013). Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat. Genet.* 43, 869–874. doi:10.1038/ng.890.Phosphoglycerate.
- Lodi, T., Alberti, A., Guiard, B., and Ferrero, I. (1999). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* DLD1 gene encoding the mitochondrial protein D -lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* 262, 623–632.
- Lodi, T., and Ferrero, I. (1993). Isolation of the DLD gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *Mol. Gen. Genet.* 238, 315–324.

- Lodi, T., O'Connor, D., Goffrini, P., and Ferrero, I. (1994). Carbon catabolite repression in *Kluyveromyces lactis*: isolation and characterization of the KINLD gene encoding the mitochondrial enzyme D-lactate ferricytochrome c oxidoreductase. *MGG Mol. Gen. Genet.* 244, 622–629. doi:10.1007/BF00282752.
- Lombardo, A., Carine, K., and Scheffler, I. E. (1990). Cloning and Characterization of the Iron-Sulfur Succinate Dehydrogenase from *Saccharomyces Subunit Gene of cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265, 10419–10423.
- Lunt, S. Y., and Vander Heiden, M. G. (2011). Aerobic Glycolysis : Meeting the Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 27, 441–464. doi:10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
- Luttik, M. A. H., Overkamp, K. M., Kötter, P., De Vries, S., Van Dijken, J. P., and Pronk, J. T. (1998). The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J. Biol. Chem.* 273, 24529–24534. doi:10.1074/jbc.273.38.24529.
- Margulis, L., and Bermudes, D. (1985). Symbiosis as a Mechanism of Evolution : Status of Cell Symbiosis Theory. *Symbiosis* 1, 101–123.
- Martin, M., Beauvoit, B., Voisin, P. J., Canioni, P., Guerin, B., and Rigoulet, M. (1998). Energetic and Morphological Plasticity of C6 Glioma Cells Grown on 3-D Support ; Effect of Transient Glutamine. *J. Bioenerg. Biomembr.* 30, 565–578.
- Matner, R. R., and Sherman, F. (1982). Differential accumulation of two apo-iso-cytochromes c in processing mutants of yeast. *J. Biol. Chem.* 257, 9811–9821. doi:10.1016/0031-8914(61)90014-3.
- Mcbride, H. M., and Neuspiel, M. (2006). Mitochondria : More Than Just a Powerhouse. *Curr. Biol.*, 551–560. doi:10.1016/j.cub.2006.06.054.
- McNabb, D. S., and Pinto, I. (2005). Assembly of the Hap2p / Hap3p / Hap4p / Hap5p-DNA Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eucaryotic Cell* 4, 1829–1839. doi:10.1128/EC.4.11.1829.
- McNabb, D. S., Xing, Y., and Guarente, L. (1995). Cloning of yeast HAP5: A novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* 9, 47–58. doi:10.1101/gad.9.1.47.
- Menz, R. I., Walker, J. E., and Leslie, A. G. W. (2001). Structure of Bovine Mitochondrial F1-

ATPase with Nucleotide Bound to All Three Catalytic Sites: Implications for the Mechanism of Rotary Catalysis. *Cell* 106, 331–341. doi:[https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00452-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00452-4).

Merico, A., Galafassi, S., Piskure, J., and Compagno, C. (2009). The oxygen level determines the fermentation pattern in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 9, 749–756. doi:10.1111/j.1567-1364.2009.00528.x.

Mogensen, M., Bagger, M., Pedersen, P. K., Fernström, M., and Sahlin, K. (2006). Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency. *J. Physiol.* 571, 669–681. doi:10.1113/jphysiol.2005.101691.

Moreno-Sanchez, R., Rodriguez-Enriquez, S., Marin-Hernandez, A., and Saavedra, E. (2007). Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* 274, 1393–1418. doi:10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x.

Moreno, F., Ahuatzzi, D., Riera, A., Palomino, C. A., and Herrero, P. (2005). Glucose sensing through the Hxk2-dependent signalling pathway. *Biochem. Soc.* 33, 265–268.

Moreno, F., and Herrero, P. (2002). The hexokinase 2-dependent glucose signal transduction pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 26, 83–90.

Mourier, A., Vallortigara, J., Yoboue, E. D., Rigoulet, M., and Devin, A. (2008). Kinetic activation of yeast mitochondrial d-lactate dehydrogenase by carboxylic acids. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1777, 1283–1288. doi:10.1016/j.bbabi.2008.06.007.

Mulder, W., Scholten, I. H. J. M., and Grivell, L. A. (1995). Carbon catabolite regulation of transcription of nuclear genes coding for mitochondrial proteins in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Curr. Biol.* 28, 267–273.

Munakatah, H., Sun, J.-Y., Yoshida, K., Nakatani, T., Honda, E., Hayakawai, S., et al. (2004). Role of the Heme Regulatory Motif in the Heme-Mediated Inhibition of Mitochondrial Import of 5-Aminolevulinate Synthase. *J. Biochem* 136, 233–238. doi:10.1093/jb/mvh.

Muratsubaki, H., and Katsume, T. (1979). DISTRIBUTION OF HEXOKINASE ISOENZYMES DEPENDING ON A CARBON SOURCE IN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 86, 1030–1036.

Nakajima, H., Honma, Y., Tawara, T., Kato, T., Park, S., Miyatake, H., et al. (2001). Redox Properties and Coordination Structure of the Heme in the CO-sensing Transcriptional Activator CoxA. *J. Biol. Chem.* 276, 7055–7061. doi:10.1074/jbc.M003972200.

- Neely, K. E., Hassan, A. H., Brown, C. E., Howe, L., and Workman, J. L. (2002). Transcription Activator Interactions with Multiple SWI / SNF Subunits. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1615–1625. doi:10.1128/MCB.22.6.1615.
- Nicholls, P. (2012). Classical catalase : Ancient and modern. *Arch. Biochem. Biophys.* 525, 95–101. doi:10.1016/j.abb.2012.01.015.
- Nosek, J., and Fukuhara, H. (1994). NADH Dehydrogenase Subunit Genes in the Mitochondrial DNA of Yeasts. *J. Bacteriol.* 176, 5622–5630.
- Nygaard, A. P. (1961). D- and L-Lactic Cytochrome c Reductases of Yeast : Reversible Interaction of Inhibitors at the Active Sites. *J. Biol. Chem.* 236, 2779–2783.
- O'Connor, R. J. (1950). The effect on cell division of inhibiting aerobic glycolysis. *Br. J. Exp. Pathol.* 31, 449–453.
- Ohnishi, T. (1972). FACTORS CONTROLLING THE OCCURRENCE OF SITE I PHOSPHORYLATION IN C. UTILIS MITOCHONDRIA. *FEBS Lett.* 24, 305–309.
- Ouhabi, R., Boue-Grabot, M., and Mazat, J.-P. (1998). Mitochondrial ATP Synthesis in Permeabilized Cells : Assessment of the ATP/O Values in Situ. *Anal. Biochem.* 263, 169–175.
- Oyedotun, K. S., and Lemire, B. D. (2004). The Quaternary Structure of the *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 279, 9424–9431. doi:10.1074/jbc.M311876200.
- Påhlman, I. L., Gustafsson, L., Rigoulet, M., and Larsson, C. (2001). Cytosolic redox metabolism in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 611–620. doi:10.1002/yea.709.
- Påhlman, I., Larsson, C., Averet, N., Bunoust, O., Boubekour, S., Gustafsson, L., et al. (2002). Kinetic Regulation of the Mitochondrial Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase by the External NADH Dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 277, 27991–27995. doi:10.1074/jbc.M204079200.
- Paramaesvaran, M., Nguyen, K., Caldon, E., McDonald, J. A., Najdi, S., Gonzaga, G., et al. (2003). Porphyrin-Mediated Cell Surface Heme Capture from Hemoglobin by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* 185, 2528–2537. doi:10.1128/JB.185.8.2528.
- Pasdois, P., Deveaud, C., Voisin, P., Bouchaud, V., Rigoulet, M., and Beauvoit, B. (2003). Contribution of the Phosphorylatable Complex I in the Growth Phase-Dependent Respiration of C6 Glioma Cells in Vitro. *J. Bioenerg. Biomembr.* 35, 439–450.

doi:10.1023/A:1027391831382.

- Pavlova, N.N.; Thompson, C. B. (2016). The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* 23, 27–47. doi:10.1016/j.cmet.2015.12.006.THE.
- Peisach, J., Blumberg, W. E., Wittenberg, B. A., and Wittenberg, J. B. (1963). The Electronic Structure of Protoheme Proteins III. CONFIGURATION OF THE HEME AND ITS LIGANDS. *J. Biol. Chem.* 243, 1871–1880.
- Peláez, R., Herrero, P., and Moreno, F. (2010). Functional domains of yeast hexokinase 2. *Biochem. J.* 432, 181–190. doi:10.1042/BJ20100663.
- Petit, T., Diderich, J. A., Kruckeberg, A. L., Gancedo, C., and Van Dam, K. (2000). Hexokinase Regulates Kinetics of Glucose Transport and Expression of Genes Encoding Hexose Transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 182, 6815–6818.
- Pfeifer, K., Kim, K., Kogan, S., and Guarente, L. (1987). Functional Dissection and Sequence of Yeast HAP1 Activator. *Cell* 56, 291–301.
- Pfeiffer, T., Schuster, S., and Bonhoeffer, S. (2001). Cooperation and Competition in the Evolution of ATP-Producing Pathways. *Science* (80-.). 292, 504–508.
- Pilkis, S. J., and Granner, D. K. (1992). MOLECULAR PHYSIOLOGY OF GLUCONEOGENESIS AND GLYCOLYSIS. *Annu. Rev. Physiol.* 54, 885–909.
- Pinkham, J. L., and Guarente, L. (1985). Cloning and molecular analysis of the HAP2 locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 5, 3410–6. doi:10.1128/MCB.5.12.3410.Updated.
- Porporato, P. E., Payen, V. L., De Saedeleer, C. J., Thissen, J., Feron, O., and Sonveaux, P. (2012). Lactate stimulates angiogenesis and accelerates the healing of superficial and ischemic wounds in mice. *Angiogenesis* 15, 581–592. doi:10.1007/s10456-012-9282-0.
- Potter, V. R., and Reif, A. E. (1952). Inhibition of an electron transport component by antimycin A. *J Biol Chem* 194, 287–297.
- Puigserver, P., Rhee, J., Lin, J., Wu, Z., Yoon, J. C., Zhang, C.-Y., et al. (2001). Cytokine Stimulation of Energy Expenditure through p38 MAP Kinase Activation of PPAR γ Coactivator-1. *Mol. Cell* 8, 971–982. doi:https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00390-2.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C. W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B. M. (1998). A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.

doi:10.1016/s0092-8674(00)81410-5.

- Qi, Z., Hamza, I., and O'Brian, M. R. (1999). Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 13056–13061. doi:10.1073/pnas.96.23.13056.
- Rabøl, R., Svendsen, P. F., Skovbro, M., Boushel, R., Haugaard, S. B., Schjerling, P., et al. (2009). Reduced skeletal muscle mitochondrial respiration and improved glucose metabolism in nondiabetic obese women during a very low calorie dietary intervention leading to rapid weight loss. *Metabolism.* 58, 1145–1152. doi:10.1016/j.metabol.2009.03.014.
- Ramos, J. L., Martinez-Bueno, M., Molina-Henares, A. J., Teran, W., Watanabe, K., Zhang, X., et al. (2005). The TetR Family of Transcriptional Repressors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 326–356. doi:10.1128/MMBR.69.2.326.
- Reif, A. E., and Potter, V. R. (1953). Oxidative Pathways Insensitive to Antimycin A. *Arch. Biochem. Biophys.* 48, 1–6. doi:10.1016/0003-9861(54)90298-2.
- Reifenberger, E., Boles, E., and Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. *Eur. J. Biochem.* 245, 324–333.
- Rickey, T. M., and Lewin, A. S. (1986). Extramitochondrial Citrate Synthase Activity in Bakers' Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 6, 488–493.
- Rigoulet, M., Ezzahid, Z., and Guerin, B. (1983). Effect of tribenzylphosphate on the active phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113, 751–756. doi:https://doi.org/10.1016/0006-291X(83)91063-X.
- Rigoulet, M., and Guerin, B. (1979). Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: Effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate. *FEBS Lett.* 102, 18–22. doi:https://doi.org/10.1016/0014-5793(79)80919-9.
- Rigoulet, M., Guerin, M., and Guerin, B. (1977). Effects of physiological manipulation on the kinetics of mitochondrial phosphate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* 471, 280–295. doi:10.1016/0005-2736(77)90256-5.
- Rigoulet, M., Mourier, A., Galinier, A., Casteilla, L., and Devin, A. (2010). Electron competition process in respiratory chain: Regulatory mechanisms and physiological functions. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1797, 671–677. doi:10.1016/j.bbabi.2010.01.030.

- Rigoulet, M., Velours, J., and Guerin, B. (1985). Substrate-level phosphorylation in isolated yeast mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 153, 601–607.
- Rigoulet, M., Yoboue, E. D., and Devin, A. (2011). Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* 14, 459–468. doi:10.1089/ars.2010.3363.
- Rodgers, J. T., Lerin, C., Haas, W., Gygi, S. P., Spiegelman, B. M., and Puigserver, P. (2005). Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 α and SIRT1. *Nature* 434, 113–118. doi:10.1038/nature03314.1.
- Rodríguez-Enríquez, S., Vital-González, P. A., Flores-Rodríguez, F. L., Marín-Hernández, A., Ruiz-Azuara, L., and Moreno-Sánchez, R. (2006). Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 215, 208–217. doi:10.1016/j.taap.2006.02.005.
- Rodriguez, A., De la Cera, T., Herrero, P., and Moreno, F. (2001). The hexokinase 2 protein regulates the expression of the GLK1, HXK1 and HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 355, 625–631.
- Rokitskaya, T. I., Ilyasova, T. M., Severina, I. I., Antonenko, Y. N., and Skulachev, V. P. (2013). Electrogenic proton transport across lipid bilayer membranes mediated by cationic derivatives of rhodamine 19 : comparison with anionic protonophores. *Eur Biophys J* 42, 477–485. doi:10.1007/s00249-013-0898-9.
- Rolland, F., Winderickx, J., and Thevelein, J. M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.* 2, 183–201.
- Rønnow, B., and Kielland-Brandt, M. C. (1993). GUT2, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9, 1121–1130. doi:10.1002/yea.320091013.
- Rosas Lemus, M., Roussarie, E., Hammad, N., Mougeolle, A., Ransac, S., Issa, R., et al. (2018). The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect. *J. Biol. Chem.*, jbc.RA118.003672. doi:10.1074/jbc.RA118.003672.
- Ross, E., and Schatz, G. (1975). Cytochrome c 1 of Bakers ' Yeast. *J. Biol. Chem.* 251, 1997–2004.
- Royt, P. W., and Macquillan, A. M. (1976). Evidence for an Inducible Glucose Transport System In *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta* 426, 302–316.

- Ruan, G., and Kazlauskas, A. (2013). Lactate Engages Receptor Tyrosine Kinases Axl , Tie2 , and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 to Activate Phosphoinositide 3-Kinase / Akt and Promote Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 288, 21161–21172. doi:10.1074/jbc.M113.474619.
- Rubinstein, J. L., Walker, J. E., and Henderson, R. (2003). Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J.* 22, 6182–6192. doi:10.1093/emboj/cdg608.
- Ryter, S. W., and Tyrrell, R. M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways : Role in oxidant sensitivity. Heme Oxygenase has Both Pro- and Antioxidant Properties. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 289–309.
- Saltzgaber-Müller, J., and Schatz, G. (1978). Heme is necessary for the accumulation and assembly of cytochrome c oxidase subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 253, 305–310.
- Samaniegos, F., Chin, J., Iwai, K., Rouault, T. A., and Klausner, R. D. (1994). Molecular Characterization of a Second Iron-responsive Element Binding Protein , Iron Regulatory Protein. *J. Biol. Chem.* 269, 30904–30910.
- Sanadi, D. R., Gibson, D. M., and Ayengar, P. (1954). Guanosine triphosphate, the primary product of phosphorylation coupled to the breakdown of succinyl coenzyme A. *Biochim. Biophys. Acta* 14, 434–436.
- Santangelo, G. M. (2006). Glucose Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 253–282. doi:10.1128/MMBR.70.1.253.
- Saraste, M. (1999). Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle. *Science (80-.)*. 283, 1488–1493. doi:10.1126/science.283.5407.1488.
- Schagger, H., Cramer, W. A., and Vonjagow, G. (1994). Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 217, 220–230. doi:10.1006/abio.1994.1112.
- Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19, 1777–1783.
- Schiestl, R. H., and Gietz, R. D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339–346.
- Schmalix, W., Oechsner, U., Magdolen, V., and Bandlow, W. (1986). Kinetics of the Intracellular Availability of Heme after Supplementing a Heme-Deficient Yeast Mutant with 5-

Aminolevulinate. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 367, 379–385.

Schneider, J. C., and Guarente, L. (1991). Regulation of the yeast CYT1 gene encoding cytochrome c1 by HAP1 and HAP2/3/4. *Mol. Cell. Biol.* 11, 4934–42. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1656218> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC361470>.

Schuller, H.-J. (2003). Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43, 139–160. doi:10.1007/s00294-003-0381-8.

Semenza, G. L. (2010). HIF-1 : upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20, 1–10. doi:10.1016/j.gde.2009.10.009.HIF-1.

Semenza, G. L., Artemov, D., Bedi, A., Bhujwala, Z., Chiles, K., Feldser, D., et al. (2001). “The Metabolism of Tumours’: 70 Years Later,” in *The Tumour Microenvironment: Causes and Consequences of Hypoxia and Acidity* (John Wiley & Sons, Ltd), 251–264. doi:10.1002/0470868716.ch17.

Sena, L. A., and Chandel, N. S. (2013). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48, 158–167. doi:10.1016/j.molcel.2012.09.025.Physiological.

Shelver, D., Kerby, R. L., He, Y., and Roberts, G. P. (1995). Carbon Monoxide-Induced Activation of Gene Expression in *Rhodospirillum rubrum* Requires the Product of *cooA*, a Member of the Cyclic AMP Receptor Protein Family of Transcriptional Regulators. *J. Bacteriol.* 177, 2157–2163.

Shelver, D., Kerby, R. L., He, Y., and Roberts, G. P. (1997). *CooA*, a CO-sensing transcription factor from *Rhodospirillum rubrum*, is a CO-binding heme protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 11216–11220.

Shemin, D., Russell, C. S., and Abramsky, T. (1955). The succinate-glycine cycle. I. The mechanism of pyrrole synthesis. *J. Biol. Chem.* 215, 613–626.

Singh, R. P., Prasad, H. K., Sinha, I., Agarwal, N., and Natarajan, K. (2011). Cap2-HAP complex is a critical transcriptional regulator that has dual but contrasting roles in regulation of iron homeostasis in *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 286, 25154–25170. doi:10.1074/jbc.M111.233569.

Singleton, C., White, G. F., Todd, J. D., Marritt, S. J., Cheesman, M. R., Johnston, A. W. B., et al. (2010). Heme-responsive DNA Binding by the Global Iron Regulator *Irr* from *Rhizobium leguminosarum*. *J. Biol. Chem.* 285, 16023–16031. doi:10.1074/jbc.M109.067215.

- Skildum, A., Dornfeld, K., and Wallace, K. (2011). Mitochondrial amplification selectively increases doxorubicin sensitivity in breast cancer cells with acquired antiestrogen resistance. *Breast Cancer Res Treat* 129, 785–797. doi:10.1007/s10549-010-1268-2.
- Sled', V. D., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., Meinhardt, S. W., Fukumori, Y., et al. (1993). Bacterial NADH-quinone oxidoreductases: Iron-sulfur clusters and related problems. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25, 347–356. doi:10.1007/BF00762460.
- Small, W. C., and McAlister-Henn, L. (1998). Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 180, 4051–4055. doi:10.1128/JB.180.16.4051-4055.1998.
- Smith, D. B. (2000). Generating Fusions to Glutathione S-Transferase for Protein Studies. *Methods Enzymol.* 326, 254–270.
- Smith, D. W., and Williams, R. J. P. (1970). The spectra of ferric haems and haemoproteins. *Struct. Bond.* 7, 1–45. doi:10.1007/BFb0118898.
- Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., et al. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3930–3942. doi:10.1172/JCI36843.3930.
- Soontorngun, N., Larochelle, M., Drouin, S., Robert, F., and Turcotte, B. (2007). Regulation of gluconeogenesis in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by activator and repressor functions of Rds2. *Mol. Cell. Biol.* 27, 7895–7905. doi:10.1128/MCB.01055-07.
- Soret, J.-L. (1883). Analyse spectral : Sur le spectre d'absorption du sang dans la partie violette et ultra-violette.
- Soto, I. C., Fontanesi, F., Myers, R. S., Hamel, P., and Barrientos, A. (2012). A Heme-Sensing Mechanism in the Translational Regulation of Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Biogenesis. *Cell Metab* 16, 801–813. doi:10.1016/j.cmet.2012.10.018.A.
- Sprague, G. F., and Cronan, J. E. (1977). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in glycerol catabolism. *J. Bacteriol.* 129, 1335–1342. doi:10.1128/JB.129.3.1335-1342.1977.
- Stoner, C. D. (1987). Determination of the P/2e- Stoichiometries at the Individual Coupling Sites in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 262, 10445–10453.
- Stuart, C. A., Yin, D., Howell, M. E. A., Dykes, R. J., Laffan, J. J., and Ferrando, A. A. (2006).

- Hexose transporter mRNAs for GLUT4, GLUT5, and GLUT12 predominate in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 291, 1067–1073. doi:10.1152/ajpendo.00250.2006.
- Suzuki, H., Tashiro, S., Hira, S., Sun, J., Yamazaki, C., Zenke, Y., et al. (2004). Heme regulates gene expression by triggering Crm1-dependent nuclear export of Bach1. *EMBO J.* 23, 2544–2553. doi:10.1038/sj.emboj.7600248.
- Sybirna, K., Guiard, B., Li, Y. F., Bao, W. G., Bolotin-Fukuhara, M., and Delahodde, A. (2005). A new Hansenula polymorpha HAP4 homologue which contains only the N-terminal conserved domain of the protein is fully functional in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 47, 172–181. doi:10.1007/s00294-004-0556-y.
- Tan, Z., Luo, X., Xiao, L., Tang, M., and Bode, A. M. (2016). The Role of PGC1 α in Cancer Metabolism and its Therapeutic Implications. *Mol Cancer Ther* 15, 774–783. doi:10.1158/1535-7163.MCT-15-0621.
- Tarrio, N., Becerra, M., Cerdan, M. E., and Gonzalez Siso, M. I. (2006). Reoxidation of cytosolic NADPH in *Kluyveromyces lactis*. *Yeast Res.* 6, 371–380. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00021.x.
- Tarri o, N., D ıaz Prado, S., Cerd an, M. E., and Gonz alez Siso, M. I. (2005). The nuclear genes encoding the internal (KINDI1) and external (KINDE1) alternative NAD(P)H:ubiquinone oxidoreductases of mitochondria from *Kluyveromyces lactis*. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1707, 199–210. doi:10.1016/j.bbabi.2004.12.008.
- Tessier, W. D., Meaden, P. G., Dickinson, F. M., and Midgley, M. (1998). Identification and disruption of the gene encoding the K-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 164, 29–34.
- Thevelein, J. M. (1994). Signal Transduction in Yeast. *Yeast* 10, 1753–1790.
- Thevelein, J. M., and De Winde, J. H. (1999). Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 33, 904–918. doi:10.1046/j.1365-2958.1999.01538.x.
- Thi ebaut, A., Delaveau, T., Benchouaia, M., Boeri, J., Garcia, M., Lelandais, G., et al. (2017). The CCAAT-Binding Complex Controls Respiratory Gene Expression and Iron Homeostasis in *Candida Glabrata*. *Sci. Rep.* 7, 1–10. doi:10.1038/s41598-017-03750-5.
- Thorens, B., and Mueckler, M. (2010). Glucose transporters in the 21st Century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, 141–145. doi:10.1152/ajpendo.00712.2009.

- Thorsness, M., Schafer, W., D'Ari, L., and Rine, J. (1989). Positive and negative transcriptional control by heme of genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 9, 5702–5712.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Scott, J. D., McMullen, B., et al. (1987a). Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 7, 1371–7. doi:10.1128/MCB.7.4.1371.
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., and Wigler, M. (1987b). Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277–287. doi:10.1016/0092-8674(87)90223-6.
- Tong, X., Zhao, F., and Thompson, C. B. (2009). The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 19, 32–37. doi:10.1016/j.gde.2009.01.002.The.
- Tzagoloff, A. (1995). “[4] Ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*,” in *Mitochondrial Biogenesis and Genetics Part A Methods in Enzymology*. (Academic Press), 51–63. doi:https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)60129-5.
- Van Dam, K. (1967). The inhibitory effect of uncouplers of oxidative phosphorylation on mitochondrial respiration. *BBA* 131, 407–411.
- Van Rossum, H. M., Kozak, B. U., Niemeijer, M. S., Duine, H. J., Luttik, M. A. H., Boer, V. M., et al. (2016). Alternative reactions at the interface of glycolysis and citric acid cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 16, 1–13. doi:10.1093/femsyr/fow017.
- Van Urk, H., Voll, W. S. L., Scheffers, W. A., and Van Dijken, J. P. (1990). Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 281–287.
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., and Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect : The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* (80-.). 324, 1029–1034.
- Verwaal, R., Paalman, J. W. G., Hogenkamp, A., Verklij, A. J., Verrips, C. T., and Boonstra, J. (2002). HXT5 expression is determined by growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 19, 1029–1038. doi:10.1002/yea.895.
- Virbasius, C. A., Virbasius, J. V, and Scarpulla, R. C. (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family

of developmental regulators. *Genes Dev.* 7, 2431–2445. doi:10.1101/gad.7.12a.2431.

Virbasius, J. V, and Scarpulla, R. C. (1991). Transcriptional activation through ETS domain binding sites in the cytochrome c oxidase subunit IV gene. *Mol. Cell. Biol.* 11, 5631–5638. doi:10.1128/mcb.11.11.5631.

von Jagow, G., and Klingenberg, M. (1970). Pathways of Hydrogen in Mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.* 12, 583–592.

Vyas, S., Zaganjor, E., and Haigis, M. C. (2017). Mitochondria and cancer. *Cell* 166, 555–566. doi:10.1016/j.cell.2016.07.002.Mitochondria.

Wagner, P. D. (2008). The biology of oxygen. *Eur Respir J* 31, 887–890. doi:10.1183/09031936.00155407.

Walsh, R. B., Clifton, D., Horak, J., and Fraenkel, D. G. (1991). *Saccharomyces cerevisiae* Null Mutants in Glucose Phosphorylation: Metabolism and Invertase Expressio. *Genet. Soc. Am.* 128, 521–527.

Warburg, O. (1956a). On respiratory impairment in cancer cells. *Science* (80-.). 124, 269–270.

Warburg, O. (1956b). On the Origin of Cancer Cells. *Science* (80-.). 123, 309–314. Available at: <http://www.sciencemag.org/content/123/3191/309.full.pdf>.

Wedel, B., Humbert, P., Harteneck, C., Foerster, J., Malkewitz, J., Bohme, E., et al. (1994). Mutation of His-105 in the b1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 2592–2596.

Weinhouse, S. (1976). The Warburg Hypothesis Fifty Years Later. *Z. Krebsforsch. Klin. Onkol. Cancer Res. Clin. Oncol* 87, 115–126.

Wenes, M., Shang, M., Di Matteo, M., Goveia, J., Martin-Pérez, R., Serneels, J., et al. (2016). Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis Article Macrophage Metabolism Controls Tumor Blood Vessel Morphogenesis and Metastasis. *Cell Metab.* 24, 701–715. doi:10.1016/j.cmet.2016.09.008.

Wésolowski-Louvel, M., Breunig, K. D., and Fukuhara, H. (1996). “*Kluyveromyces lactis*,” in *Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook* (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), 139–201. doi:10.1007/978-3-642-79856-6_5.

Westermann, B., and Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: Convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 16,

1421–1427. doi:10.1002/1097-0061(200011)16:15<1421::AID-YEA624>3.0.CO;2-U.

- Wittig, I., Carrozzo, R., Santorelli, F. M., and Schägger, H. (2007). Functional assays in high-resolution clear native gels to quantify mitochondrial complexes in human biopsies and cell lines. *Electrophoresis* 28, 3811–3820. doi:10.1002/elps.200700367.
- Wu, W., and Zhao, S. (2013). Metabolic changes in cancer : beyond the Warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin* 45, 18–26. doi:10.1093/abbs/gms104.Review.
- Xing, F., Luan, Y., Cai, J., Wu, S., Mai, J., Gu, J., et al. (2018). The Anti-Warburg Effect Elicited by the cAMP-PGC1 α Pathway Drives Differentiation of Glioblastoma Cells into Astrocytes. *Cell Rep* 18, 468–481. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.037.The.
- Yang, F., Xia, X., Lei, H.-Y., and Wang, E.-D. (2010). Hemin Binds to Human Cytoplasmic Arginyl-tRNA Synthetase and Inhibits Its Catalytic Activity. *J. Biol. Chem.* 285, 39437–39446. doi:10.1074/jbc.M110.159913.
- Yang, J., Ishimori, K., and O'Brian, M. R. (2005). Two Heme Binding Sites Are Involved in the Regulated Degradation of the Bacterial Iron Response Regulator (Irr) Protein. *J. Biol. Chem.* 280, 7671–7676. doi:10.1074/jbc.M411664200.
- Yoboue, E. D. (2011). Contrôle et régulation de la biogenèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. *Theses.Fr*. Available at: <http://www.theses.fr/2011BOR21860/abes>.
- Yoboue, E. D., Augier, E., Galinier, A., Blancard, C., Pinson, B., Casteilla, L., et al. (2012). cAMP-induced mitochondrial compartment biogenesis: Role of glutathione redox state. *J. Biol. Chem.* 287, 14569–14578. doi:10.1074/jbc.M111.302786.
- Yoboue, E. D., and Devin, A. (2012). Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis. *Int. J. Cell Biol.* 2012. doi:10.1155/2012/403870.
- Yoboue, E. D., Mougeolle, A., Kaiser, L., Averet, N., Rigoulet, M., and Devin, A. (2014). The role of mitochondrial biogenesis and ROS in the control of energy supply in proliferating cells. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1837, 1093–1098. doi:10.1016/j.bbabi.2014.02.023.
- Youle, R. J., and Narendra, D. P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Mol. cell Biol.* 12, 9–14. doi:10.1038/nrm3028.
- Yu, L., YU, C.-A., and King, T. E. (1977). Subunit Structure of the Reconstitutively Active Cytochrome b-c1 Complex - Determination of Amino Acids and Molar Distribution of Subunit Fractions from Gel Electrophoresis. *BBA* 495, 232–247.

- Zaman, S., Lippman, S. I., Zhao, X., and Broach, J. R. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu. Rev. Genet.* 42, 27–81. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130206.
- Zenke-Kawasaki, Y., Dohi, Y., Katoh, Y., Ikura, T., Ikura, M., Asahara, T., et al. (2007). Heme Induces Ubiquitination and Degradation of the Transcription Factor Bach1 □. *Mol. Cell. Biol.* 27, 6962–6971. doi:10.1128/MCB.02415-06.
- Zhang, L., Bermingham-McDonogh, O., Turcotte, B., and Guarente, L. (1993). Antibody-promoted dimerization bypasses the regulation of DNA binding by the heme domain of the yeast transcriptional activator HAP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 2851–2855.
- Zhang, L., and Guarente, L. (1994). HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. *J. Biol. Chem.* 269, 14643–14647.
- Zhang, L., and Guarente, L. (1995). Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *EMBO J.* 14, 313–320.
- Zhang, L., and Hach, A. (1999). Molecular mechanism of heme signaling in yeast : the transcriptional activator Hap1 serves as the key mediator. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 415–426.
- Zhang, T., Bu, P., Zeng, J., and Vancura, A. (2017). Increased heme synthesis in yeast induces a metabolic switch from fermentation to respiration even under conditions of glucose repression. *J. Biol. Chem.* 292, 16942–16954. doi:10.1074/jbc.M117.790923.
- Zhao, F.-Q. (2014). Biology of Glucose Transport in the Mammary Gland. *J mammary Gland Biol Neoplasia* 19, 3–17. doi:10.1007/s10911-013-9310-8.
- Zong, W., Rabinowitz, J. D., and White, E. (2016). Mitochondria and Cancer. *mol Cell* 61, 667–676. doi:10.1016/j.molcel.2016.02.011.Mitochondria.

Liste des publications :

1. Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway.
Bouchez C, Devin A.
Cells. 2019 Mar 27;8(4). pii: E287. doi: 10.3390/cells8040287. Review.

2. Mitochondria: Ultrastructure, Dynamics, Biogenesis and Main Functions.
Devin A, Bouchez C, Molinié T, David C, Duvezin-Caubet S, Rojo M, Mourier A, Avéret N, Rigoulet M.
In book: Mitochondria in Obesity and Type 2 Diabetes. 2019 Jan. doi: 10.1016/B978-0-12-811752-1.00001-8

3. Inhibition of mitochondrial cytochrome c oxidase by metabolized Nobiletin in yeast.
Sharikadze N, Hammad N, Bouchez CL, Averet N, Rigoulet M, Zhuravliova E, Mikeladze DG, Devin A. J Biol Regul Homeost Agents. 2019 Jul-Aug;33(4):1097-1103.

4. "Labile" heme critically regulates mitochondrial biogenesis through the transcriptional co-activator Hap4p in *Saccharomyces cerevisiae*.
Bouchez CL, Yoboue ED, de la Rosa Vargas LE, Salin B, Cuvellier S, Rigoulet M, Duvezin-Caubet S, Devin A.
J Biol Chem. 2020 Apr 10;295(15):5095-5109. doi: 10.1074/jbc.RA120.012739. Epub 2020 Feb 18.

5. The Warburg effect : Repression of mitochondrial metabolism is not a prerequisite to promote cell proliferation.
Bouchez CL, Hammad N, Cuvellier S, Rigoulet M, Devin A.
Frontiers in Oncology. 2020 Aug 19;10(1333):1–18. doi: 10.3389/fonc.2020.01333

6. Cell energy metabolism: an update.
Rigoulet M, Bouchez CL, Paumard P, Ransac R, Cuvellier S, Duvezin-Caubet S, Mazat JP, Devin A.
Biochimistr Biophys Acta Bioenerg. 2020 Jul 24;1861(11):148276. doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148276. Online ahead of print.

“Labile” heme critically regulates mitochondrial biogenesis through the transcriptional co-activator Hap4p in *Saccharomyces cerevisiae*

Received for publication, January 27, 2020, and in revised form, February 13, 2020. Published, Papers in Press, February 18, 2020, DOI 10.1074/jbc.RA120.012739

Cyrielle L. Bouchez^{‡§1}, Edgar D. Yoboue^{‡§1}, Livier E. de la Rosa Vargas^{‡§}, Bénédicte Salin^{‡§}, Sylvain Cuvelier^{‡§}, Michel Rigoulet^{‡§}, Stéphane Duvezin-Caubet^{‡§}, and Anne Devin^{‡§2}

From [‡]CNRS and [§]Université de Bordeaux, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France

Edited by Ruma Banerjee

Heme (iron protoporphyrin IX) is a well-known prosthetic group for enzymes involved in metabolic pathways such as oxygen transport and electron transfer through the mitochondrial respiratory chain. However, heme has also been shown to be an important regulatory molecule (as “labile” heme) for diverse processes such as translation, kinase activity, and transcription in mammals, yeast, and bacteria. Taking advantage of a yeast strain deficient for heme production that enabled controlled modulation and monitoring of labile heme levels, here we investigated the role of labile heme in the regulation of mitochondrial biogenesis. This process is regulated by the HAP complex in yeast. Using several biochemical assays along with EM and epifluorescence microscopy, to the best of our knowledge, we show for the first time that cellular labile heme is critical for the post-translational regulation of HAP complex activity, most likely through the stability of the transcriptional co-activator Hap4p. Consequently, we found that labile heme regulates mitochondrial biogenesis and cell growth. The findings of our work highlight a new mechanism in the regulation of mitochondrial biogenesis by cellular metabolites.

Mitochondria are organelles that have a critical role in the energy and intermediary metabolism in eukaryotic cells. They are well-known for their involvement in the synthesis of ATP, the currency in charge of fulfilling cell energy demand. Mitochondrial ATP synthesis mostly relies on the oxidative phosphorylation system (OXPHOS),³ which involves enzymatic complexes that form the mitochondrial respiratory chain and the phosphorylation system. It is well-established that mitochondrial enzymatic content within cells varies to match ATP

synthesis to ATP demand. This phenomenon has been observed in different species and experimental models, ranging from microorganisms, such as yeast, to mammals, and is associated with diverse pathologies (1–6).

Although mitochondria possess their own genome (mtDNA), they are genetically semiautonomous. Indeed, the mtDNA encodes a few (8 in yeast and 13 in mammals) of the numerous proteins constituting the OXPHOS. All of the remaining OXPHOS components and mitochondrial proteins (protein machineries involved in mtDNA replication, transcription and translation, assembly factors, mitochondrial protein import, and intermediary metabolism) are encoded by the nuclear genome. Thus, regulation of the expression of both mitochondrial and nuclear genes encoding mitochondrial proteins is controlled by a defined network of nuclear transcription factors.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the transcription factors Hap2p/3p/4p/5p (HAP complex) are the master regulators of mitochondrial biogenesis (7, 8). This heteromeric complex relies on the binding to the promoter of target genes by the DNA-binding subcomplex Hap2p/Hap3p/Hap5p. These three subunits are constitutively expressed. The activation of transcription is mediated by Hap4p, the co-activator subunit (9–13) and the only subunit whose expression is known to be regulated by the carbon source. Deletion of any of the subunits of the HAP complex impairs yeast growth on nonfermentable substrate, such as lactate, on which mitochondria are the only source of ATP production (11). In mammals, due to multicellular organization, more transcriptional regulators are involved, although the general mechanism is the same, with the well-known co-activator PGC-1 α acting like a functional counterpart of the yeast Hap4p (14, 15). Extensive work is still being carried out to identify the molecular regulators of the activity of PGC-1 α and Hap4p. In this regard, it is interesting to point out recent results that highlight that both the yeast and mammalian co-activators share common regulatory signals. For example, it has been recently demonstrated that PGC-1 α is regulated by the GSH redox state, as we previously showed for Hap4p (16, 17). Previous studies also established the involvement of reactive oxygen species and cAMP-dependent signaling in negative and positive regulation of the transcriptional regulators of mitochondrial biogenesis in both yeast and mammals (5, 18–21).

This work was supported by the Ligue contre le Cancer, the Agence Nationale de la Recherche, and CNRS. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

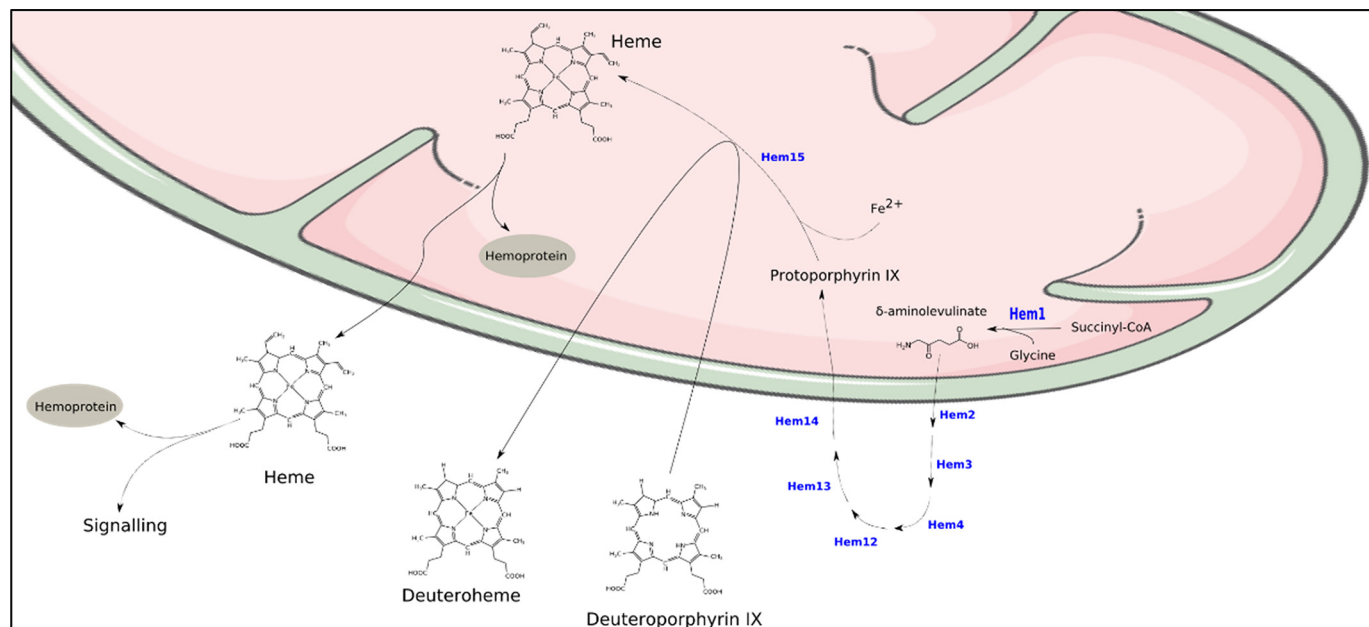
This article contains Figs. S1 and S2.

¹ Both authors contributed equally to this work.

² To whom correspondence should be addressed: IBGC du CNRS, Bioenergetics and Cell Metabolism Laboratory, 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France. Tel.: 33-556999035; Fax: 33-556999040; E-mail: anne.devin@ibgc.cnrs.fr.

³ The abbreviations used are: OXPHOS, oxidative phosphorylation; HAP, heme activator protein; mtDNA, mitochondrial DNA; PGC-1, PPAR γ coactivator-1; DP IX, deuteroporphyrin IX; PGK1, phosphoglycerate kinase 1; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); GST, GSH S-transferase; ALA, δ -aminolevulinic acid; HEM1, δ -aminolevulinic acid synthase; OD, optical density; Bis-Tris, 2-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol.

Labile heme regulates mitochondrial biogenesis



Scheme 1. Overview of the heme synthesis pathway in yeast. Heme is synthesized from glycine and succinyl-CoA in a pathway initiated (*Hem1*, 5-aminolevulinic acid synthase) and terminated inside mitochondria (*Hem14*, protoporphyrinogen oxidase; *Hem15*, ferrochelatase) with a number of intermediary reactions taking place in the cytosol (*Hem2*, ALA dehydratase; *Hem3*, porphobilinogen deaminase; *Hem4*, uroporphyrinogen III synthase; *Hem12*, uroporphyrinogen III decarboxylase; *Hem13*, coproporphyrinogen III oxidase). Heme can then be complexed in mitochondrial or cytosolic hemoproteins or act in signaling pathways. Deuteroporphyrin IX is an analogue of protoporphyrin IX that is much more soluble and stable and can be converted to deuteroheme (an analogue of heme) by the ferrochelatase enzyme but cannot be incorporated into hemoproteins.

Heme (iron protoporphyrin IX) is well-known as a prosthetic group for enzymes involved in the metabolic pathway, such as oxygen transport and electron transfer through the mitochondrial respiratory chain. However, heme has also been shown to be an important regulatory molecule (“labile” heme) for diverse processes, such as translation, kinase activity, and transcription in mammals, yeast, and bacteria (22–24). Moreover, the hypothesis that heme can be a regulatory molecule for the HAP complex has been previously formulated (11, 25–27). However, no study has been able to establish molecular details surrounding heme regulation of the HAP complex, although a heme-dependent regulation of Hap4p transcription has been described recently (28–32). Thus, although the name HAP historically stands for “heme activator protein,” the HAP complex is sometimes designated like a heme-independent transcription factor (33). Taking advantage of a yeast strain deficient for heme production, we tackled this question. Our results are the first to show that cellular labile heme is critical for the HAP complex activity, most likely through an enhancement of the stability of the co-activator Hap4p. Consequently, labile heme regulates mitochondrial biogenesis and cell growth. This work represents a new contribution to the field of mitochondrial biogenesis regulation by cell metabolites.

Results

Modulation of cellular labile heme pool

Our cell growth experiments were carried out on a nonfermentable substrate: lactate. In this condition, the mitochondrial compartment is well-differentiated, and mitochondrial oxidative phosphorylation processes and the HAP complex are mandatory for cell growth and proliferation. The heme biosynthesis pathway is localized within two distinct compartments:

the mitochondria and the cytosol (Scheme 1). To modulate the cellular labile heme pool, we made use of a strain deleted for the first enzyme of this pathway: Hem1p. This enzyme, which is localized in the mitochondrial matrix, catalyzes the condensation of glycine with succinyl-CoA to generate δ -aminolevulinic acid (ALA). A strain deleted for this enzyme is auxotrophic for ALA (35). In an attempt to modulate cellular labile heme, the $\Delta hem1$ strain was supplemented with increasing concentrations of ALA, and the cellular labile heme pool was assessed thanks to the reliable *HMG2-lacZ* reporter gene (35, 36). In this system, expression of the β -gal is under the regulation of the HMG2 promoter, which is strongly repressed by the heme level. Fig. 1 shows that whereas this promoter’s activity is low in WT cells, this activity is strongly increased in $\Delta hem1$ cells grown in the presence of low (5 and 10 $\mu\text{g/ml}$) ALA concentrations. Increasing extracellular ALA concentrations lead to a decrease in this promoter’s activity. This shows that modulation of extracellular ALA in a $\Delta hem1$ strain allows modulation of the cellular labile heme pool. Extracellular ALA concentration above 100 $\mu\text{g/ml}$ in both WT and $\Delta hem1$ cells did not increase the repression of *HMG2-lacZ* reporter gene (data not shown).

Modulation of mitochondrial compartment

As stipulated above, cells were grown on nonfermentable substrate, where growth is strictly dependent on mitochondrial activity (*i.e.* energy conversion processes (ATP synthesis) take place at the mitochondrial level). Further, mitochondrial oxidative phosphorylation requires heme biosynthesis to generate mitochondrial cytochromes. We thus investigated mitochondrial activities in $\Delta hem1$ cells supplemented with various concentrations of ALA. Fig. 2A shows that there is a 50% decrease in $\Delta hem1_{-ALA5}$ cellular respiratory rate compared with the WT

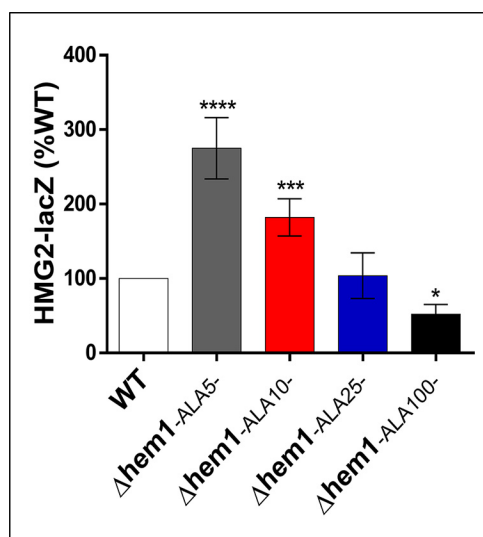


Figure 1. Assessment of the labile heme level through the activity of HMG2 promoter-lacZ gene at different concentrations of ALA. WT and $\Delta hem1$ cells were transformed with a plasmid encoding the reporter gene HMG2-lacZ, which is negatively regulated by labile heme. The growth medium of $\Delta hem1$ cells was supplemented with $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hem1_{-ALA5-}$), $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hem1_{-ALA10-}$), $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hem1_{-ALA25-}$), or $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hem1_{-ALA100-}$) ALA. Cells were harvested, and β -gal activities were measured and expressed as a percentage of WT. Results shown represent means \pm S.D. (error bars) of at least three separate experiments. *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

cells. Increasing extracellular ALA up to $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ allowed a full restoration of the cellular respiratory rate. Fig. 2B shows that this modulation of the cellular respiratory rate affected the cellular growth rate, and the relationship between these two parameters is linear (Fig. 2B, inset), as shown previously (3). In addition, Fig. 2C shows that the activity of cytochrome *c* oxidase (one of the most controlling enzymes of the oxidative phosphorylation system (37–39)) exhibits a 50% decrease in $\Delta hem1_{-ALA5-}$ compared with the WT cells. Increasing extracellular ALA up to $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ allows a full restoration of this activity. Furthermore, cytochrome *c* oxidase activity perfectly correlates with respiratory rate (Fig. 2C, inset).

The above-mentioned results relate to the oxidative phosphorylation amount/activity. To determine whether we observed an overall quantitative regulation of the mitochondrial compartment, we assessed citrate synthase activity, a well-accepted marker of mitochondrial amount within cells (40–42). Fig. 2D shows that there is a 60% decrease in $\Delta hem1_{-ALA5-}$ citrate synthase activity compared with the WT cells. Increasing extracellular ALA up to $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ allows a full restoration of citrate synthase activity. The inset in Fig. 2D shows a very good correlation between respiratory rate and citrate synthase activity, reinforcing the hypothesis of an overall regulation of the mitochondrial compartment upon the addition of ALA in $\Delta hem1$ cells.

Within the cell, mitochondria are highly dynamic organelles that form a network. They undergo fusion and fission events continuously, leading to a diverse range of mitochondrial morphologies, from fragmented states to continuous networks (43–45). It remains unclear how the diverse morphologies interact with bioenergetic properties. To determine whether the mitochondrial structure/network was altered when mitochondrial oxidative phosphorylation activities decreased, we performed

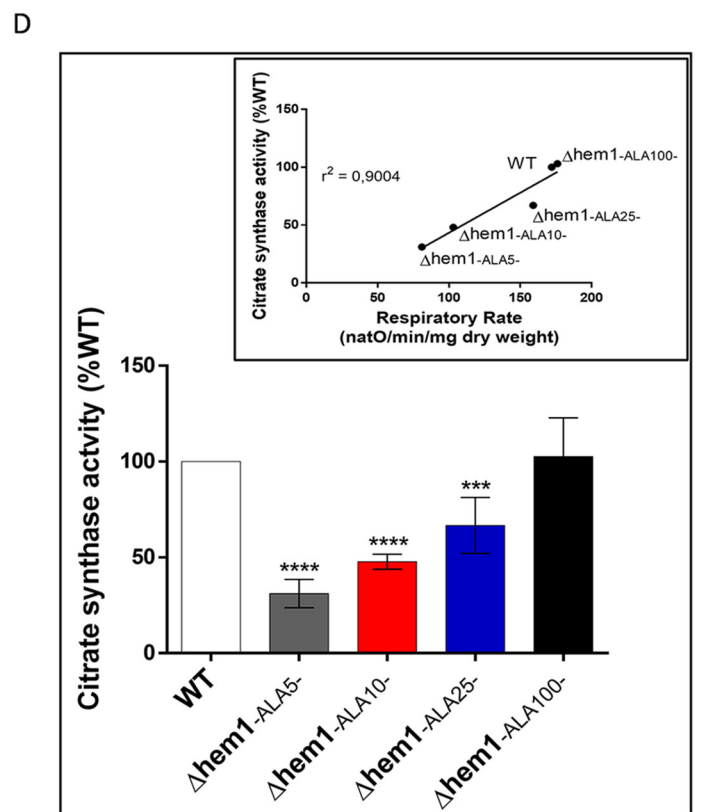
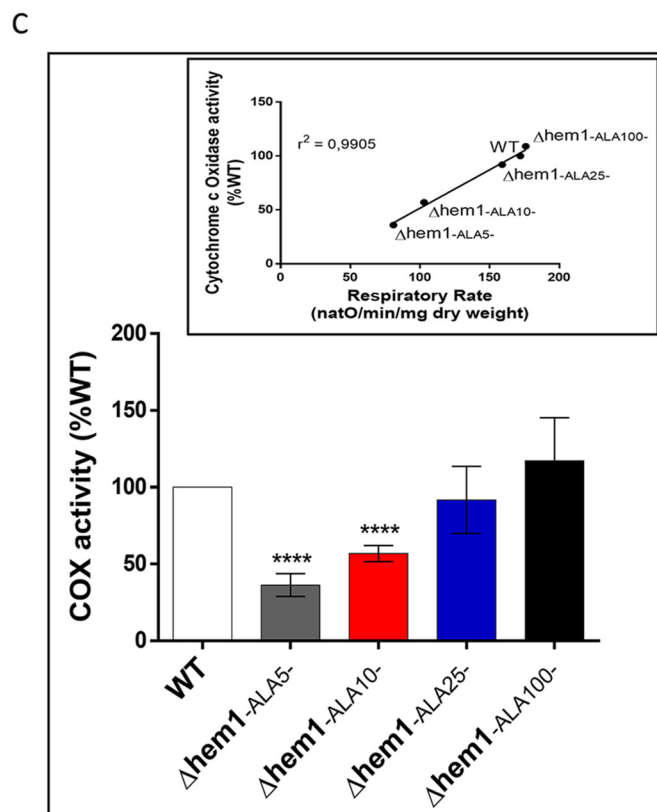
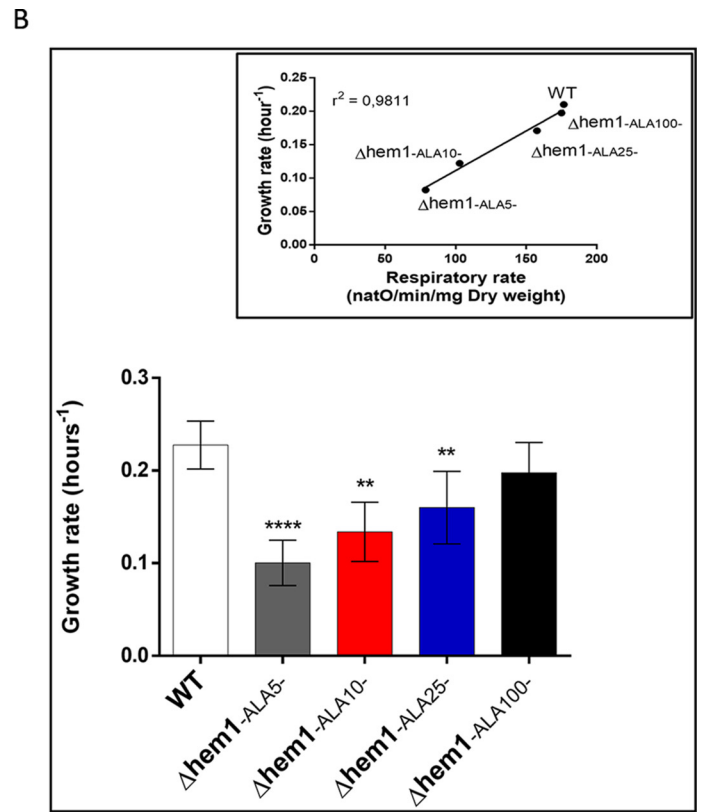
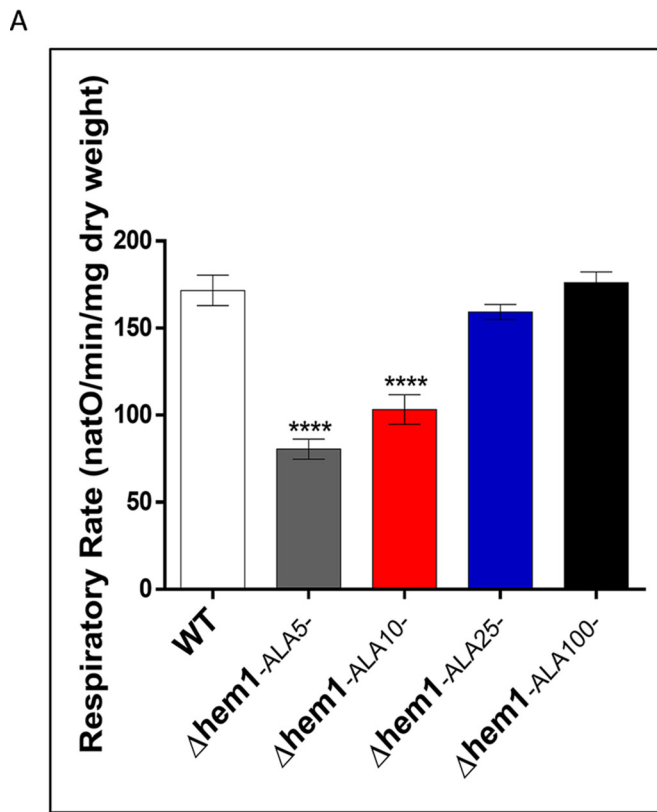
both fluorescence and electronic microscopy under our experimental conditions. Fig. 3A shows that when visualized in fluorescence microscopy, mitochondria exhibit a well-differentiated network, comparable with that of the WT for any of the extracellular ALA concentrations tested. Fig. 3B shows that when visualized in EM, mitochondria exhibit a coherent ultrastructure, comparable with that of the WT for any of the extracellular ALA concentration tested. However, for the lowest ($\Delta hem1_{-ALA5-}$ and $\Delta hem1_{-ALA10-}$) ALA concentrations, a decrease in mitochondrial diameter was observed. For higher ALA concentrations, the mitochondrial diameter was comparable with that of the WT.

Cellular labile heme pool regulates mitochondrial biogenesis

The amount of mitochondria within a cell is controlled by its turnover (*i.e.* the respective rates of mitochondrial biogenesis and mitochondrial degradation). The HAP complex has been shown to be involved in the specific induction of genes involved in gluconeogenesis, metabolism of alternate carbon sources, respiration, and mitochondrial development. The disruption of any subunit of this complex renders the cells unable to grow on nonfermentable carbon sources (10, 12, 46, 47). Moreover, many genes involved in energy metabolism have been shown to be regulated by this complex (8, 48). We thus assessed the activity of the HAP complex with a widely used reporter gene, pCYC1-lacZ (49). Fig. 4A shows that under low cellular labile heme condition ($\Delta hem1_{-ALA5-}$), the activity of the HAP complex is highly decreased, and this activity increases proportionally with the amount of cellular labile heme, being slightly higher than in the WT for the $\Delta hem1_{-ALA100-}$ condition. The master regulator of the activity of the HAP multicomplex is the subunit Hap4p (11). Cellular amounts of Hap4p were thus assessed under our experimental conditions. Fig. 4B shows that the amount of Hap4p is highly increased proportionally with the amount of cellular labile heme, being higher than in the WT for the $\Delta hem1_{-ALA100-}$ condition.

Hap1p is not involved in labile heme-induced regulation of mitochondrial biogenesis through Hap4p

A number of studies have established that Hap1p is the heme sensor that controls the expression of a number of genes encoding heme- and oxygen-dependent processes (34). In addition, Hap1p controls the expression of Hap4p (32), which is the activation domain of the Hap2/3/4/5 transcription complex (HAP complex). To assess whether Hap1p could play a role in heme-induced regulation of mitochondrial biogenesis through Hap4p, we generated a $\Delta hap1$ and a $\Delta hap1\Delta hem1$ mutant in which most of the experiments mentioned above were repeated. As shown in Fig. 5, Hap1p deletion did not modify labile heme titration by ALA in the absence of Hem1p (A), the increase in respiratory rate induced by an increase in labile heme (B), the relationship between growth rate and respiratory rate (C), the increase in cytochrome oxidase activity induced by an increase in labile heme (D), the increase in HAP complex activity induced by an increase in labile heme (E), and the increase in Hap4p induced by an increase in labile heme (F). These results clearly show that Hap1p is not involved in the labile heme-induced regulation of mitochondrial biogenesis through Hap4p.



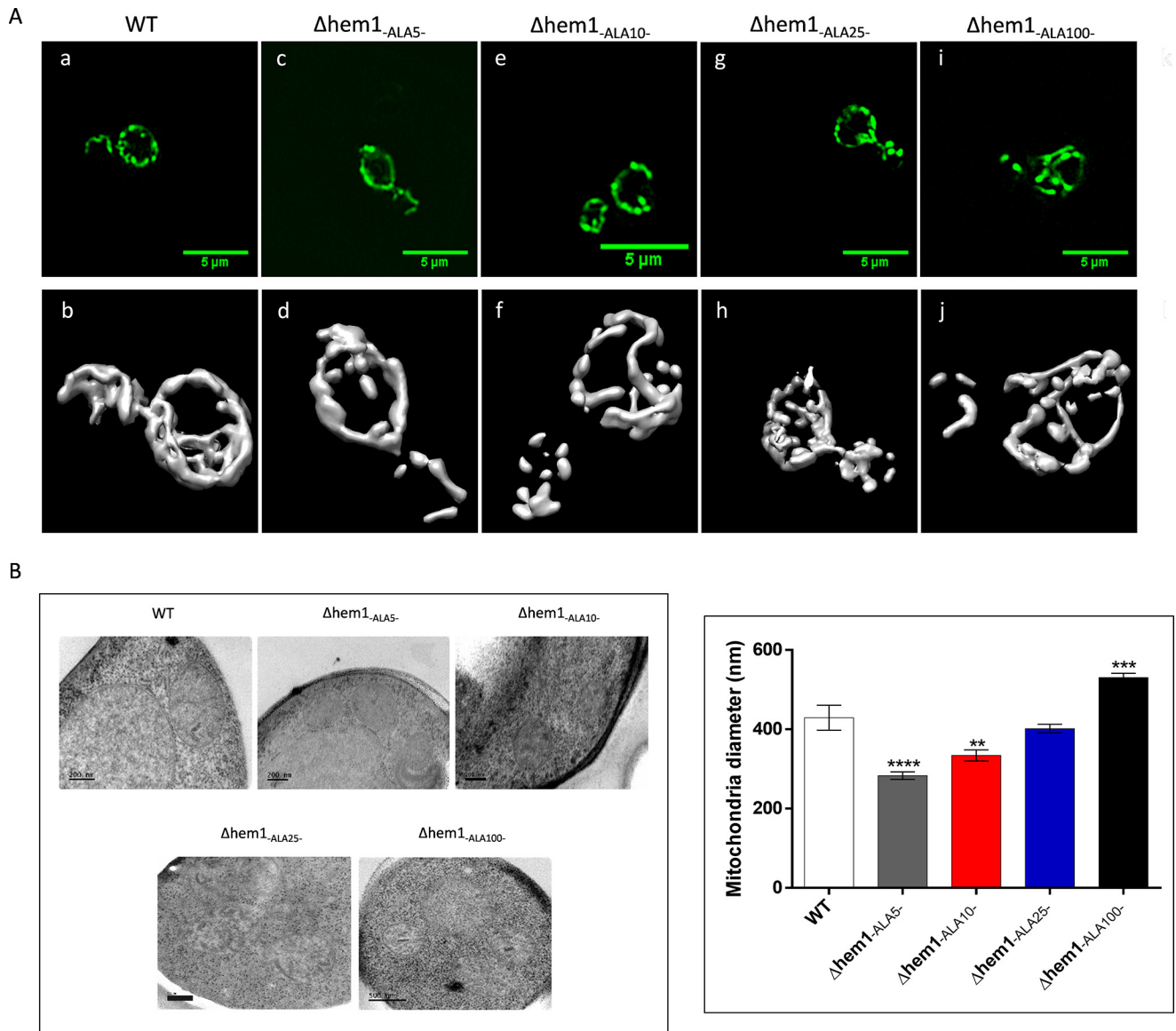


Figure 3. Effect of ALA addition on mitochondrial network and ultrastructure in WT and mutant cells cultured in the different conditions. *A*, mitochondrial network morphology observed by epifluorescence microscopy. WT or mutant cells were transformed with pVT100u-mtGFP and observed by fluorescence microscopy. Representative images are shown for each condition. Deconvolved fluorescence images (top) and three-dimensional reconstructed images are shown (bottom). *B*, electron micrographs of cells with increasing concentrations of ALA. Ultrastructural studies were performed as described under “Experimental procedures.” Images of representative cells observed in the considered conditions are shown. The average diameter of mitochondrial sections was observed as described in *B* in the different conditions. More than two sections from seven different cells in total were analyzed in each condition. The bar graph shows the mean \pm S.D. (error bars) for all experiments. Data for WT and $\Delta hem1_{-ALA5-}$ from Fig. 3 (A and B) were reused in Fig. S1 (A and B) for comparison with DP IX data. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

Hemin interacts with Hap4p

As shown above, intracellular Hap4p amount is strongly correlated to the cellular labile heme amount. This led us to formulate the hypothesis of an eventual interaction between this

protein and cellular labile heme. GSH *S*-transferase (GST)-Hap4p(330–554) was thus purified, and *in vitro* interaction between this Hap4p fragment and hemin was tested through spectrophotometric analysis. We focused on the fragment

Figure 2. Effect of ALA addition on respiratory rates, growth, and cytochrome *c* oxidase and citrate synthase activities in WT and $\Delta hem1$ cells. WT and $\Delta hem1$ cells were grown aerobically in the presence of increasing concentrations of ALA for the latter as described in the legend to Fig. 1. Each culture was subjected to several analyses during exponential phase, all repeated five times over a 4-h period. The experiments were reproduced at least three times with independent cultures. *A*, spontaneous respiratory rates measured on cultures in the different conditions. The given values for each condition are means of all data points \pm S.D. (error bars). *B*, growth rate measured on cultures in the different conditions. The given values for each condition are means of all data points \pm S.D. *Inset*, a linear regression line between respiratory rate and growth rate is presented for which the determination coefficient is indicated (r^2). Growth rates for each condition were calculated in each experiment from measured $OD_{600\text{ nm}}$ of cultures over a 4-h period. *C*, cytochrome *c* oxidase activities measured on cultures in the different conditions are shown. The given values for each condition are means of all data points \pm S.D. *Inset*, a linear regression line between respiratory rate and cytochrome *c* oxidase activity is presented for which the determination coefficient is indicated (r^2). *D*, citrate synthase activities measured on cultures in the different conditions. *Inset*, a linear regression line between respiratory rate and citrate synthase activity is presented for which the determination coefficient is indicated (r^2). The given values for each condition are means of all data points \pm S.D. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

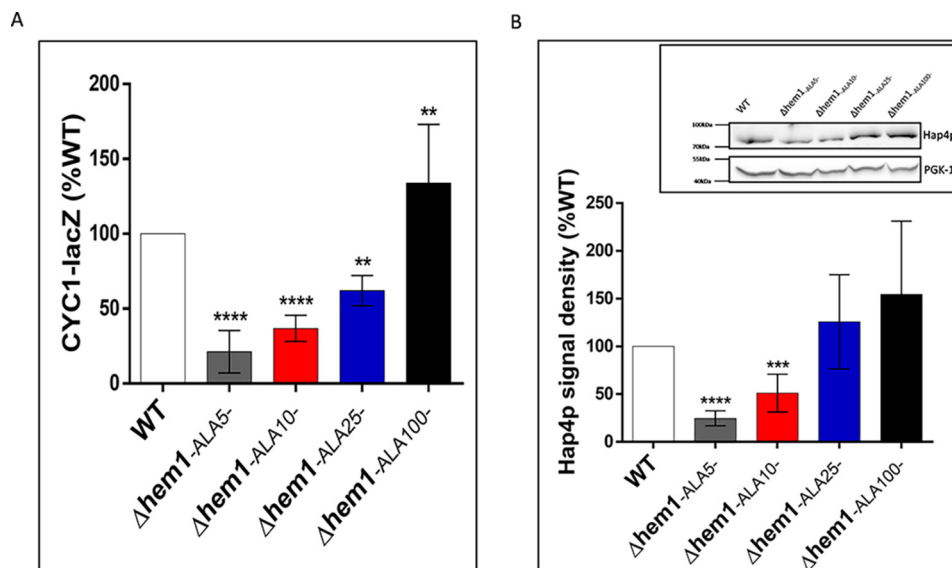


Figure 4. Effect of ALA addition on the HAP complex activity in WT and $\Delta hem1$ cells. A, WT and $\Delta hem1$ cells were transformed with the plasmid p-CYC1-LacZ bearing the *lacZ* reporter gene under the control of the CYC1 promoter regulated by the HAP transcription factor. The cells were grown in the conditions described in the legend to Fig. 1, and β -gal activities were measured. Results are the mean percentage of WT \pm S.D. (error bars) of at least three measurements performed on independent cell cultures. B, the relative levels of the co-activator Hap4p were determined in WT and $\Delta hem1$ cells in the presence or the absence of the different concentrations of ALA (see the legend to Fig. 1 for ALA concentrations). Total protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies directed against Hap4p and PGK1 as a loading control. Results representative of at least four experiments are shown in the inset. Hap4p signal was quantified. Signal intensity was normalized to PGK1 signal and expressed as a percentage of WT for each experiment. The bar graph shows the mean percentage of WT \pm S.D. for all experiments. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

330–554 because it contains the only triplet of histidine that can allow an interaction between Hap4p/heme. This fragment and its relevance have already been described (54). Further, to this day, none of the groups working on Hap4p have been able to purify a full-length protein. It has been shown that the hemin spectrum is strongly modified upon its interaction with a protein (50). Fig. 6A shows that GST-Hap4p(330–554) does not exhibit any absorbance spectra, whereas hemin exhibits a strong absorbance signal around 390 nm, characteristic of the Soret band. Adding GST-Hap4p(330–554) (4 μ M) to hemin (4 μ M) at a stoichiometric concentration induces a shift in the hemin maximal absorbance signal. Further increasing the GST-Hap4p(330–554) concentration (up to 8 μ M) did not modify the GST-Hap4p(330–554)-hemin absorbance spectrum. Fig. 6A (inset) shows the differential spectrum between hemin and GST-Hap4p(330–554)-hemin. Furthermore, Fig. 6B shows that GST alone does not modify the hemin absorbance spectrum. Fig. 6B (inset) shows the differential spectrum between hemin and hemin in the presence of GST spectra. These results strongly indicate an interaction between hemin and GST-Hap4p(330–554).

To determine whether the full-length Hap4p is also able to interact with hemin, we performed co-precipitation of Hap4p on whole-cell lysates using hemin-agarose beads. Fig. 6C clearly shows that even in different amounts, hemin and Hap4p (from both WT and $\Delta hem1_{-ALA100-}$) co-precipitate, strongly reinforcing the possibility of an interaction between hemin and Hap4p. The specificity of this interaction was further confirmed by performing a competition experiment between hemin and hemin-agarose. When cell extracts were preincubated in the presence of hemin, there was no detectable interaction between Hap4p and hemin-agarose (Fig. 6D). To further characterize this inter-

action *in vitro*, a difference spectroscopy titration of hemin binding to Hap4p was performed, and an apparent K_d of about 1.4 μ M was measured (Fig. 6E).

Cellular labile heme pool regulates Hap4p stability

Our results show not only that cellular labile heme amount correlates with the amount of Hap4p, but also that Hap4p and hemin can interact *in vitro*. Based on these results, we hypothesized that cellular labile heme could play a role in regulating the amount of Hap4p through a stabilization of this protein. Consequently, Hap4p turnover was assessed through cycloheximide addition to cells under conditions where cellular labile heme amount is modulated (see Fig. 2). Fig. 7 clearly shows that increasing cellular labile heme increases Hap4p half-life. Indeed, with the lowest concentrations of ALA ($\Delta hem1_{-ALA5-}$ and $\Delta hem1_{-ALA10-}$), Hap4p underwent a decrease of 60% in 3 min and 70% in 7 min, whereas with high concentrations of ALA ($\Delta hem1_{-ALA25-}$ and $\Delta hem1_{-ALA100-}$), Hap4p is only reduced by 30% in 3 min and 50% after 7 min, similarly to the WT, with a low variability between the experiments (Table 1).

A nonmetabolizable analogue of heme up-regulates mitochondrial biogenesis

The experiments stated above point to a regulation of mitochondrial biogenesis by cellular labile heme. However, in these experiments, labile heme levels were manipulated through ALA addition to a $\Delta hem1$ strain. ALA is the second metabolite of the heme biosynthesis pathway and can be incorporated in hemoproteins. To strengthen our observations, we decided to reproduce our experiments with deuteroporphyrin IX (DP IX), a so-called gratuitous inducer (51). DP IX is a more soluble analog of protoporphyrin IX, which is the penultimate product of the heme

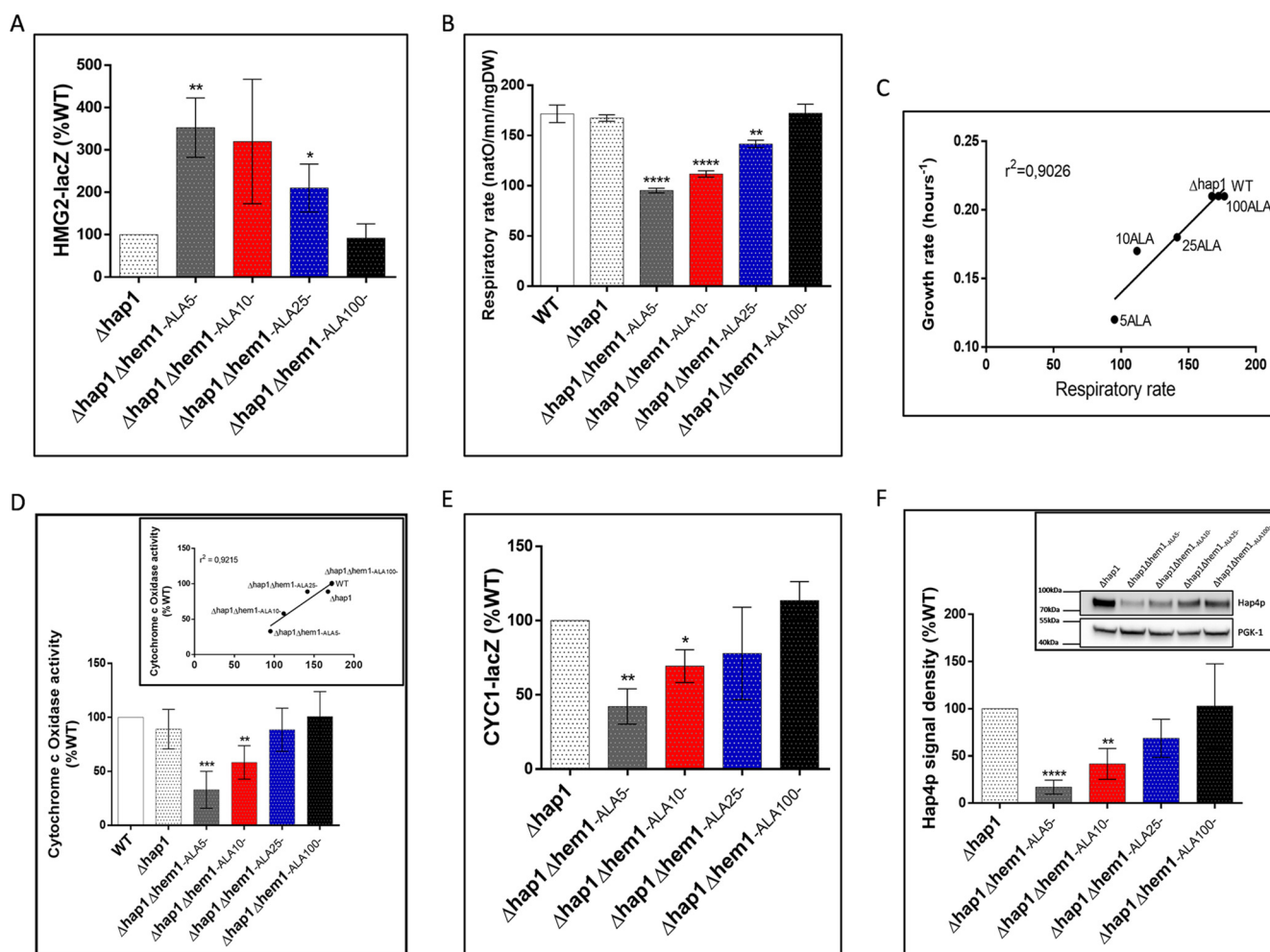


Figure 5. Study of the role of Hap1p in the regulation of mitochondrial biogenesis by heme. *A*, $\Delta hap1$ and $\Delta hap1 \Delta hem1$ cells were transformed with a plasmid encoding the reporter gene HMG2-LacZ, which is negatively regulated by labile heme. The growth medium of $\Delta hap1 \Delta hem1$ cells was supplemented with $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hap1 \Delta hem1_{-ALA5}$), $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hap1 \Delta hem1_{-ALA10}$), $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hap1 \Delta hem1_{-ALA25}$), or $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($\Delta hap1 \Delta hem1_{-ALA100}$). $\Delta hap1$ and $\Delta hap1 \Delta hem1$ cells were grown aerobically. Cells were harvested, and β -gal activities were measured and expressed as a percentage of $\Delta hap1$. Results shown represent means of at least three separate experiments \pm S.D. (error bars). *B*, spontaneous respiratory rates measured on cultures in the different conditions of WT, $\Delta hap1$, and $\Delta hap1 \Delta hem1$ are shown. The given values for each condition are means of all data points \pm S.E. *C*, a linear regression line between respiratory rate and growth rate is presented for which the determination coefficient is indicated (r^2). Growth rates for each condition of WT, $\Delta hap1$, and $\Delta hap1 \Delta hem1$ cells were calculated in each experiment from the measured $OD_{600\text{nm}}$ of cultures over a 4-h period. *D*, cytochrome *c* oxidase activities measured on cultures in the different conditions are shown. The given values for each condition of WT, $\Delta hap1$, and $\Delta hap1 \Delta hem1$ cells are means of all data points and expressed as a percentage of $\Delta hap1 \pm$ S.D. *E*, $\Delta hap1$ and $\Delta hap1 \Delta hem1$ cells were transformed with the plasmid p-CYC1-LacZ bearing the lacZ reporter gene under the control of the CYC1 promoter regulated by the HAP transcription factor. The cells were grown in the conditions described in the legend to Fig. 1, and β -gal activities were measured. Results are the mean percentage of $\Delta hap1 \pm$ S.D. of at least three measurements performed on independent cell cultures. *F*, the relative levels of the co-activator Hap4p were determined in $\Delta hap1$ and $\Delta hap1 \Delta hem1$ cells in the presence or the absence of the different concentrations of ALA. Total protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies directed against Hap4p and PGK1 as a loading control. Results representative of at least four experiments are shown in the inset. Hap4p signal was quantified. Signal intensity was normalized to PGK1 signal and expressed in percentage of $\Delta hap1$ for each experiment. The bar graph shows mean percentage of $\Delta hap1 \pm$ S.D. for all experiments. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$.

biosynthesis pathway (Scheme 1) and can be matured by the ferrochelatase. Hence, DP IX is another way to increase intracellular heme level and to emphasize the involvement of the heme molecule in regulatory processes. However, once matured by ferrochelatase, this molecule cannot be incorporated into hemo-proteins (51). Consequently, a $\Delta hem1$ strain cannot grow with DP IX alone (data not shown), and experiments performed with DP IX were done in the presence of the lowest concentration of ALA used all throughout our experiments.

Fig. 8A shows that DP IX supplementation of $\Delta hem1_{-ALA5}$ cells restores cellular labile heme to the WT level. Fig. 8B shows that DP IX supplementation of $\Delta hem1_{-ALA5}$ cells strongly increases the respiratory rate in such a way that it reaches 90% of the WT respi-

ratory rate. Growth and cytochrome *c* oxidase activity are partially restored by DP IX supplementation of $\Delta hem1_{-ALA5}$ cells (Fig. 8, C and D). Fig. 8E shows that DP IX supplementation of $\Delta hem1_{-ALA5}$ cells restores citrate synthase activity to the WT level.

We then assessed whether DP IX was able to regulate HAP complex activity. Fig. 9A shows that DP IX supplementation of $\Delta hem1_{-ALA5}$ cells significantly increases HAP complex activity. Further, in these conditions, Hap4p levels are similar to the ones assessed in the WT cells (Fig. 9B). Last, DP IX supplementation of $\Delta hem1_{-ALA5}$ cells strongly decreases Hap4p turnover (Fig. 9C). Taken together, the results obtained by DP IX supplementation of $\Delta hem1_{-ALA5}$ cells clearly show that cellular labile heme regulates mitochondrial biogenesis.

Labile heme regulates mitochondrial biogenesis

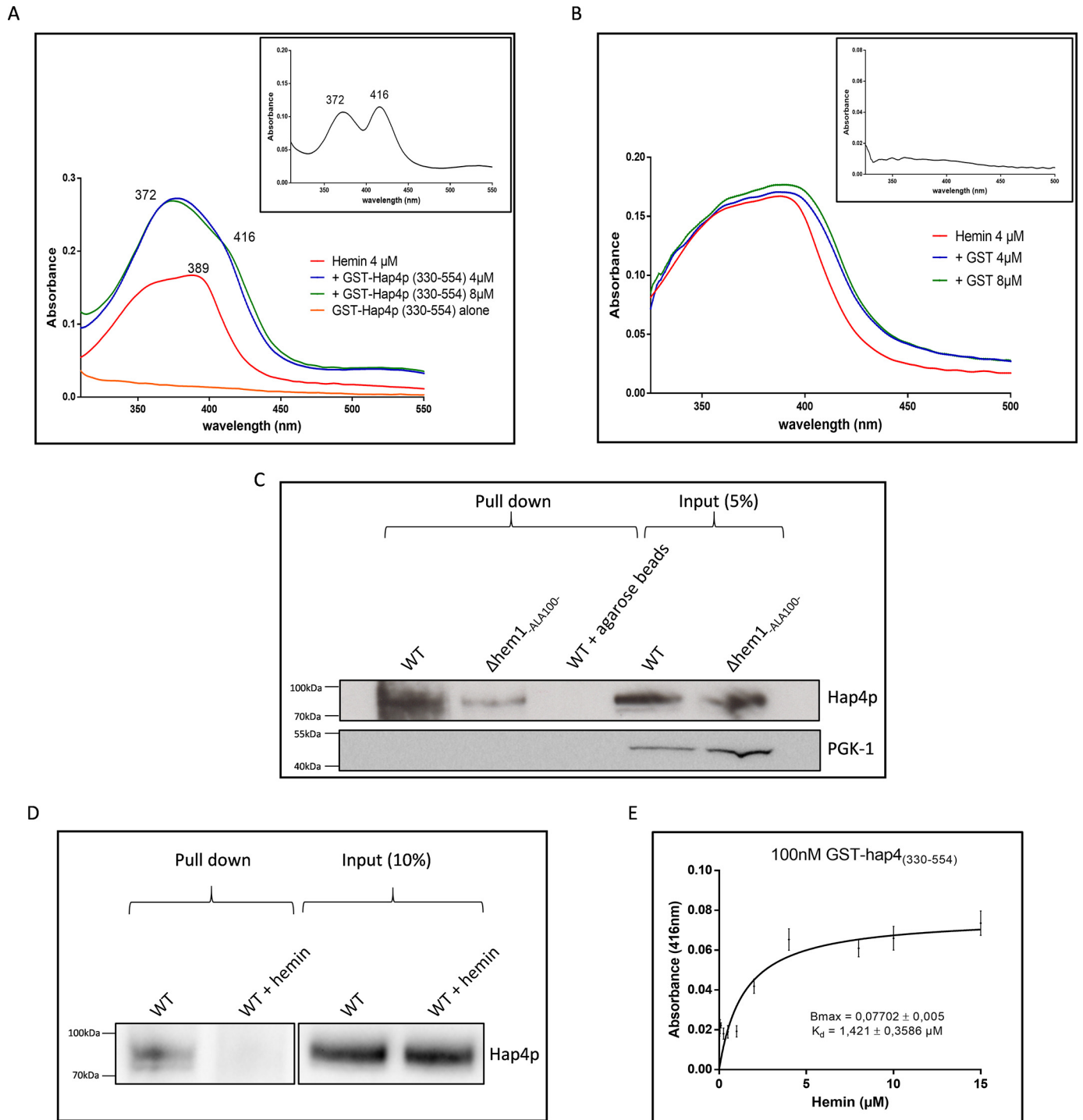


Figure 6. Physical interaction between hemin and Hap4p. *A*, absorption spectra of hemin, GST-Hap4p(330–554) purified recombinant protein, or a mixture of both at the indicated concentrations. *Inset*, difference spectrum between hemin with Hap4p (+ GST-Hap4p(330–554), 4 μM) and hemin alone (Hemin, 4 μM). The wavelengths of major peaks are indicated above them. *B*, spectra of hemin in the presence or absence of the indicated concentrations of purified recombinant GST. *Inset*, difference spectrum between hemin with GST (+ GST, 4 μM) and hemin alone (Hemin, 4 μM). *C*, co-precipitation of Hap4p in hemin pull-down experiments. WT or $\Delta hem1$ cells were cultured aerobically in the absence or in the presence of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ of ALA, respectively. Cell extracts were subjected to a co-precipitation assay with hemin-agarose beads and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies directed against Hap4p or PGK1. A negative control experiment was also performed with WT cell extracts and unconjugated agarose beads (WT + agarose beads). Representative Western blotting results of at least three replicates are shown. *D*, co-precipitation of Hap4p in hemin pull-down experiments. Cell extracts were preincubated with 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hemin for 2 h and then subjected to a co-precipitation assay with hemin-agarose beads and analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies directed against Hap4p. Representative Western blotting results of at least three replicates are shown. *E*, difference absorption spectra and titration of GST-Hap4p(330–554) at 100 nM with increasing concentrations of hemin (from 0 to 15 μM). The curves were generated from fits to an equation describing a single binding site ($Y = B_{\text{max}} \cdot X / (K_d + X)$) with GraphPad Prism. Error bars, S.D.

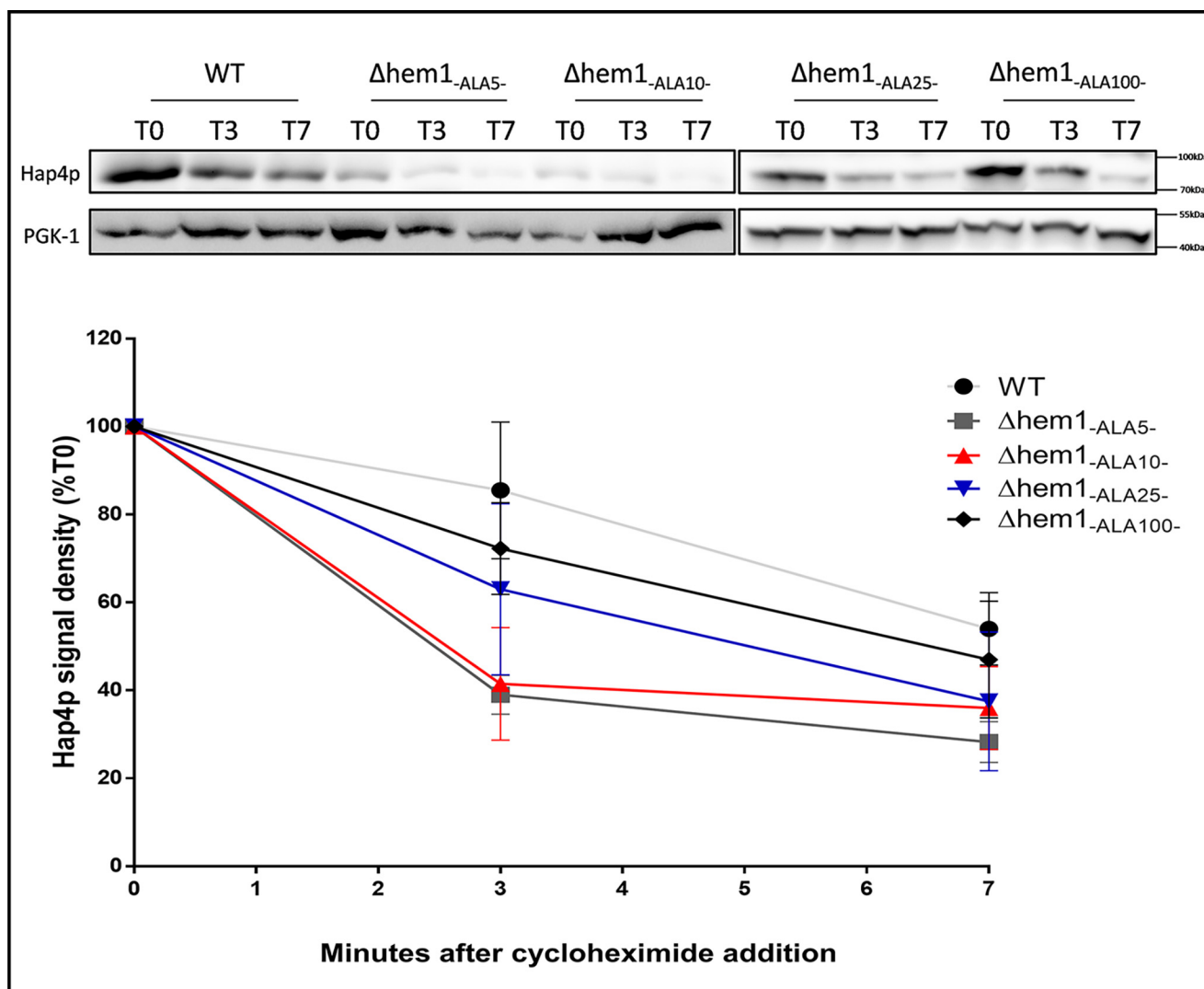


Figure 7. Assessment of Hap4p protein stability at different concentrations of ALA. Cycloheximide ($0.4 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) was added to WT and $\Delta hem1$ cells grown aerobically in the absence or the presence of different concentrations of ALA (as described in the legend to Fig. 1). Aliquots of cells were harvested for each condition right before (T0) and 3 min (T3) and 7 min (T7) after adding cycloheximide. Total protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and Western blotting using antibodies directed against Hap4p or PGK1. *Top*, representative results of four replicates are shown. *Bottom*, Hap4p signal was quantified, normalized to PGK1 signal (loading control), and expressed in percentage of T0 for each condition. The data points are mean percentage of T0 \pm S.D. (error bars) over four independent experiments. Data for Fig. S2E were reused from this figure.

Table 1

Mean percentages of Hap4p protein stability assay

For each condition and each time, mean percentages \pm S.D. of T0 (shown in Fig. 7) are reported; data were extracted from Fig. 7.

	WT	DHEM1 _{-ALA5-}	DHEM1 _{-ALA10-}	DHEM1 _{-ALA25-}	DHEM1 _{-ALA100-}	DHEM1 _{-ALA5- + DP IX-}
T0	100	100	100	100	100	100
T3	85.5 \pm 13.5	38.75 \pm 3.8	41.5 \pm 11.1	63 \pm 16.8	72.25 \pm 9	67.25 \pm 6.9
T7	54 \pm 7.1	28 \pm 4	36 \pm 8.2	37.5 \pm 13.6	47 \pm 11.5	48.5 \pm 15.1

Discussion

In this paper, making use of a strain deleted for the first enzyme of the heme biosynthesis pathway, we were able to modulate the intracellular labile heme concentration. On non-fermentable growth substrate, this labile heme concentration modulation positively regulates cellular mitochondrial content. We investigated the origin of this regulation and were able to show that intracellular labile heme regulates mitochondrial biogenesis. Indeed, the activity of the master regulator of this process, the HAP complex, positively correlates with the cellu-

lar labile heme concentration. Moreover, both the amount and the stability of the co-activator of this complex, Hap4p, positively correlate with the cellular labile heme concentration. Further, we were able to show that hemin and Hap4p interact directly *in vitro* as well as by co-precipitation. *In vitro* experiments allowed us to assess an apparent K_d of about $1.4 \mu\text{M}$. Although that K_d seems quite weak, especially relative to current estimates for the labile heme concentration in various non-erythroid cell lines, 25–300 nM, there may be active processes that increase the flux of heme into the nucleus to activate

Labile heme regulates mitochondrial biogenesis

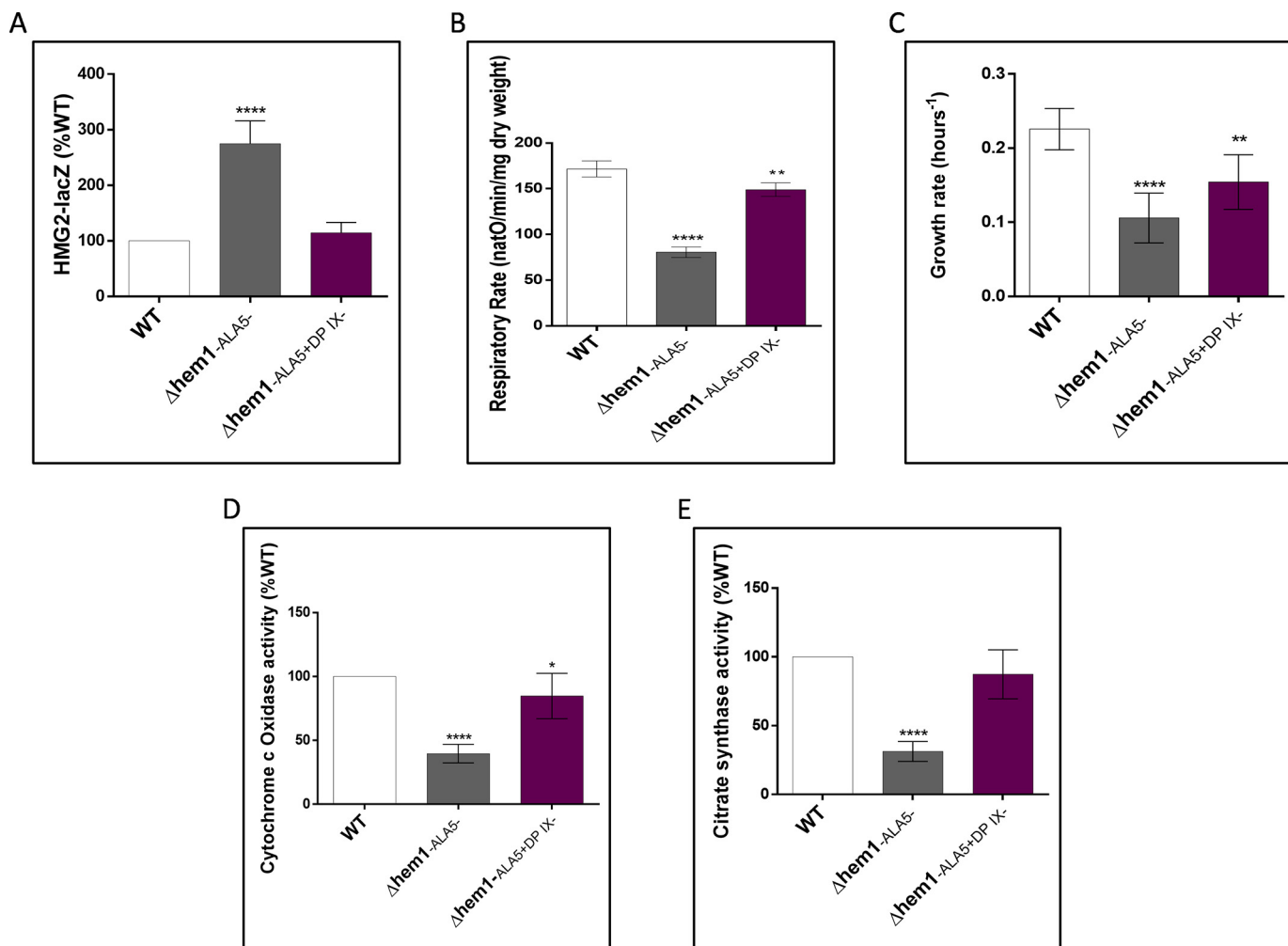


Figure 8. Effect of the deuteroporphyrin IX analogue on labile heme pool, growth, respiratory rate, and cytochrome c oxidase and citrate synthase activities. WT and $\Delta hem1$ cells were grown aerobically. $\Delta hem1$ cultures were supplemented with $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ALA ($\Delta hem1-ALA5-$) or $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ALA and $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ deuteroporphyrin IX ($\Delta hem1-ALA5+DP IX-$). Results are from at least three independent experiments. *A*, WT and $\Delta hem1$ cells transformed with the plasmid encoding the reporter gene HMG2-LacZ were grown in the conditions described above. Cells were harvested, and β -gal activities were measured and expressed as a percentage of WT. The bar graph shows the mean percentage of WT of at least three separate experiments \pm S.D. (error bars). *B*, spontaneous respiratory rates were measured in the different conditions as described in the legend to Fig. 1. Mean values \pm S.D. are shown. *C*, growth rates in each condition were determined for each experiment from measured $OD_{600\text{nm}}$ of cultures over a 4-h period. Mean values \pm S.D. are shown. *D*, cytochrome c oxidase activities were measured and expressed for each experiment as a percentage of WT. Mean values \pm S.D. are shown. *E*, citrate synthase activities were measured in the different conditions and expressed as a percentage of WT. Mean values \pm S.D. are shown. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

Hap4p. For instance, peroxide and NO are two potential signals that can labilize heme to activate Hap4p. Another possibility is that the Hap4p-heme complex stability has been underestimated because heme-binding measurements were done on a peptide fragment of Hap4p and not the full-length protein, which is technically challenging to purify. Even a modest 3-fold boost in heme-binding affinity, which may be accounted for in the context of full-length Hap4p, would place the heme affinity of Hap4p as more similar to that of Mss51, a heme-sensing translational activator with $K_d \sim 300 \text{ nM}$. It is tempting to speculate that the Hap4p-labile heme interaction allows an increase in Hap4p stability, which itself will increase mitochondrial biogenesis.

It should be pointed out here that despite an important modulation of mitochondrial activities in our experimental conditions, no alteration of the mitochondrial network was assessed, which shows that there is no simple correlation

between cellular mitochondrial activities and the mitochondrial network.

It has previously been shown that in WT cells, heme is a limiting factor for Hap4p transcription (32). However, this is only the case in glucose-grown cells, where heme intracellular concentration is increased by supplying the cells with either ALA or hemin. In galactose-grown cells, a situation closer to our study in nonfermentable medium (no glucose repression of oxidative metabolism), neither heme nor ALA (at a concentration 3 times higher than the one used in our study) regulated Hap4p transcription (32). Such a regulation is thus unlikely under our experimental conditions. Further, our assessment of Hap4p half-life clearly shows that this parameter is positively regulated by labile heme. To our knowledge, our results are the first ones evidencing a post-translational regulation of the HAP complex.

A crucial point in our study is the link between heme and mitochondrial oxidative phosphorylation. Indeed, heme is

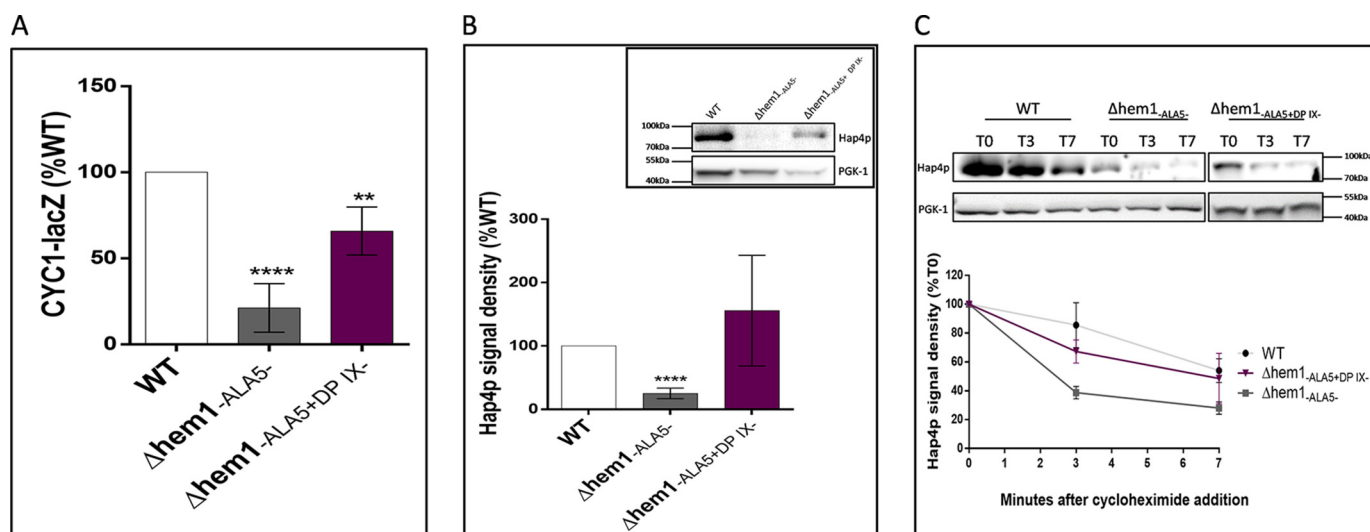


Figure 9. Effect of deuteroporphyrin IX on the HAP complex activity and the Hap4p subunit in WT and $\Delta hem1$ cells. *A*, the activity of the transcription factor HAP was assessed with the specific and widely used reporter gene pCYC1-LacZ (49) as described under “Experimental Procedures” from cells grown aerobically in minimal medium containing 0.2% (w/v) DL-lactate + 5 $\mu\text{g/ml}$ ALA and in the presence or absence of 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ DP IX. Results are mean \pm S.D. (error bars) of at least three measurements performed on three independent cell cultures. *B*, effect of DP IX on the protein level of the activator subunit Hap4p. The result is representative of at least four blots. Loading control was assessed using a commercial antibody directed against PGK1 (Invitrogen). *C*, numbers on the quantification graph correspond to the percentage between Hap4p levels in the mutant versus the WT after a normalization at the input. Quantification was assessed using the ImageJ software. Data for Fig. S2D were reused from this figure. **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$.

mandatory for mitochondrial biogenesis and the generation of mitochondrial cytochromes. Consequently, to demonstrate the regulation of mitochondrial biogenesis by cellular labile heme implies a distinction between heme that will lead to the generation of cytochromes and labile heme that is involved in cell signaling. To do so, we made use of deuteroporphyrin IX, a gratuitous inducer analogous to labile heme (51). This allowed us to show the following. (i) Even at low ALA concentration, an increase in deuteroheme—thanks to DP IX—allows an increase in mitochondrial biogenesis. This indicates that low ALA concentration is not controlling mitochondrial biogenesis through cytochrome generation. (ii) An increase in deuteroheme increases mitochondrial biogenesis through an increase in HAP activity and Hap4p stability.

In conclusion, we show that in the yeast *S. cerevisiae*, mitochondrial biogenesis is positively regulated by labile heme, via an increase of the HAP4 protein’s stability, most likely through its binding to labile heme (Scheme 2).

Experimental procedures

Yeast strains, plasmids, and culture medium

The following yeast strains were used in this study: BY4742 (*MAT α ura3 Δ 0 lys2 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 0*) (Euroscarf) and $\Delta hem1$ (*MAT α ura3 Δ 0 lys2 Δ 0 leu2 Δ 0 his3 Δ 0 ydr232W::kanMX4*) supplied by Dr T. Ferreira (Poitiers, France). Where indicated, yeast strains were transformed with any of the following plasmids: the reporter gene HMG2-LacZ (35, 36), pCYC1-lacZ (pLG669Z) (49), or pVT100U-mtGFP (53). The GST-Hap4p(330–554) plasmid (54), a kind gift of Dr. Berger, was expressed in bacteria for protein purification. $\Delta hap1$ and $\Delta hap1\Delta hem1$ strains were obtained by homologous recombination of the *hap1::HIS3MX6* deletion cassette in BY4742 and $\Delta hem1$ strains, respectively. The 1.4-kb deletion cassette was PCR-amplified from the plasmid pFA6a-HIS3MX6 (55) using

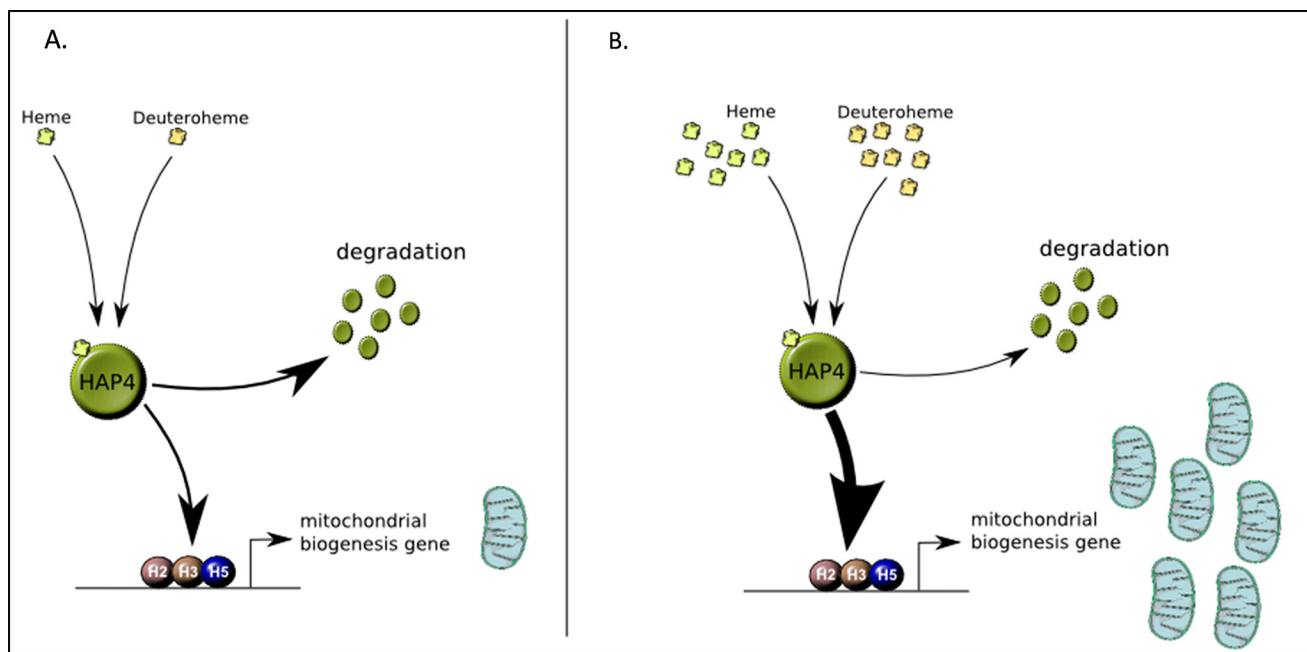
the forward F1-HAP1 (5'-GGGAACAATAGGTTAGATGTC-GAATACCCCTTATAATTCACGGATCCCCGGGTTAAT-TAA) and reverse R1-HAP1 (5'-CCATCAATTTCAACATT-ATCAACGGGTAGAAAATCAACCGGAATTCGAGCTCG-TTTAAAC) primers (underlined nucleotides refer to the sequence homology to the HIS3MX6 cassette and the remainder of the sequence to the HAP1 locus) according to Ref. 56. Clones were screened by PCR for integration by homologous recombination using HAP1-Fwd (5'-GAACCTCATTCCATC-AACTTCC) as a forward primer and either HAP1-Rev (5'-TGTTCATGTAGTGGCAGAG), located in the original HAP1 coding sequence, or TEFpro-Rev (5'-GATGTGAGAA-CTGTATCCTAGC), located in the deletion cassette, as a reverse primer.

Cells were grown aerobically at 28 °C in the following medium: 0.175% yeast nitrogen base (Difco), 0.2% casein hydrolysate (Merck), 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 0.2% lactate (w/v) (Prolabo), pH 5.5, 20 mg·liter⁻¹ L-tryptophan (Sigma), 40 mg·liter⁻¹ adenine hydrochloride (Sigma), and 20 mg·liter⁻¹ uracil (Sigma). When cells carried a plasmid, uracil was omitted in the growth medium. Where indicated, 5/10/25 or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 5-aminolevulinic acid (Frontier Scientific) and/or 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ deuteroporphyrin IX (Frontier Scientific) were added to 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, washed twice in distilled water, and weighed after extensive drying.

Oxygen consumption assays

The oxygen consumption was measured polarographically at 28 °C using a Clark oxygen electrode in a 1-ml thermostatically controlled chamber. 1 ml of culture was transferred to the chamber, and respiratory rates were determined from the slope

Labile heme regulates mitochondrial biogenesis



Scheme 2. Heme-induced regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *S. cerevisiae*. A, in the presence of low concentrations of heme or deuteroheme, the HAP4 turnover rate is high, and mitochondrial biogenesis is low. B, an increase in heme or deuteroheme concentration within the cell stabilizes HAP4, and the mitochondrial biogenesis rate is higher.

of a plot of O_2 concentration *versus* time. The measured activities are normalized per mg dry weight.

β -Gal activity measurement

Cells were harvested from cultures at $OD_{600\text{ nm}}$ of 0.5–1 and permeabilized using a standard procedure as described (57). After a 30-min preincubation period, 0.4 mg/ml *O*-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside was added, and the tube was briefly vortexed. The reaction was stopped after a yellow color had developed by the addition of 0.5 M Na_2CO_3 . The samples were centrifuged for 30 s at $14,000 \times g$, and the absorbance of the supernatant was read at 420 nm. β -Gal activity is expressed in arbitrary units per $OD_{600\text{ nm}}$ and per minute (57).

Protein extraction, electrophoresis, and Western blotting

Cells were lysed using a mixture of 7.5% β -mercaptoethanol in 1.85 M NaOH. After a 10-min incubation on ice, proteins were precipitated by the addition of an equal volume of 3 M TCA for 10 min on ice. After a rapid centrifugation at 4 °C, the protein pellet was suspended in a mixture of 10% SDS and sample buffer (0.06 M Tris, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 5% glycerol, 0.02% bromophenol blue). Protein amounts corresponding to 0.5 OD units of cells were separated by 10% SDS-PAGE performed according to the method of Laemmli. After electro-transfer onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), proteins were probed with the desired primary antibodies: α -Hap4p and α -PGK1 (mAb, Invitrogen) and detected using peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) and ECL Prime reagent (Amersham Biosciences), according to the manufacturers' instructions. Signal quantifications were done using the ImageJ software.

Protein degradation assay

To quantify Hap4p life span, 1 ml of each cell culture was centrifuged at 4 °C, corresponding to T0. Then 0.4 mg/ml cycloheximide was added to the cultures. After 3 and 7 min (T3 and T7), 1 ml of the cultures was centrifuged as previously. The dry pellets were conserved at -20 °C until protein extraction and Western blotting, as described above.

Citrate synthase activity

Cells were lysed in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) buffer and glass beads with five cycles (20 s at 4 m/s) of FastPrepTM. Citrate synthase (EC 4.1.3.7) activity was determined spectrophotometrically (Safas Monaco) by monitoring at 412 nm the oxidation of CoA (produced by citrate synthase activity) by 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) over time in the following buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM acetyl-CoA, 0.2 mM DTNB, and 0.5 mM oxaloacetate. The enzyme activity was calculated using an extinction coefficient of $13,600\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 412 nm for DTNB. One citrate synthase unit was equal to 1 μmol of DTNB reduced per minute per mg dry weight.

Cytochrome *c* oxidase activity

Cells were lysed in 50 mM potassium phosphate (pH 7.5) buffer and glass beads with five cycles (20 s at 4 m/s) of FastPrepTM. Cytochrome *c* oxidase activity (1 mM potassium cyanide-sensitive) was determined by monitoring spectrophotometrically (550 nm) the rate of disappearance of reduced cytochrome *c* at 28 °C in the following buffer: 50 mM P_i K, 100 μM reduced cytochrome *c*. The enzyme activity was calculated using an extinction coefficient of $18,500\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 550 nm for reduced cytochrome *c* (52, 58).

Hemin absorption spectra

Recombinant GST and GST fused to the C-terminal region of Hap4p (residues 330–554, containing the transcriptional activation domain) were purified from bacterial lysate after a 3-h induction with 1 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside. Bacterial cells were washed once in the following buffer: 25 mM HEPES, 50 mM KCl, 10% glycerol, 0.5 mM EDTA, 10 mM β -mercaptoethanol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.7. After three freeze-thaw cycles, cells were sonicated on ice and centrifuged for 15 min at 16,000 $\times g$. Purification was performed on the supernatant using GST-Sepharose 4B resin (GE healthcare) using the manufacturer's recommendations. The spectrum of heme (Sigma–Aldrich) was recorded in the absence and presence of different concentrations of the recombinant proteins in potassium phosphate buffer (0.1 M; pH 7) using a spectrophotometer (Safas).

Heme titrations were performed by difference spectroscopy at room temperature and aerobically using the Safas spectrophotometer. Heme working stock solution was 1 mM in 0.1 M NaOH. A concentration of 100 nM of the recombinant GST-Hap4p was used in potassium phosphate buffer (0.1 M; pH 7). After the baseline was set (Hap4p 100 nM against buffer), equal concentrations of heme were added to the reference and sample cuvette (0.025–15 μ M), and the cuvettes were incubated for 10 min to reflect the binding of recombinant protein and heme and not the absorbance of the free ligand. To determine the binding parameters, the data obtained from the heme titrations were plotted and fit to an equation describing a single binding site using the GraphPad Prism software.

Hemin co-precipitation assay

Cells were lysed in the following buffer: 50 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, pH 7.5 (IP buffer) and an anti-protease mixture (cOmplete, Roche Applied Science), with four cycles (20 s at 4 m/s) of FastPrepTM. For the co-precipitation, 50 μ l of 50% (v/v) hemin-agarose or agarose beads (Sigma) were added to 500 μ l of supernatant, corresponding to 80 OD units of cells, and incubated for 2 h at 4 °C. Beads were then washed with the IP buffer, and proteins were eluted with a mixture of 10% SDS and sample buffer. Inputs were samples without incubation with hemin-agarose beads and precipitated in 35% TCA. Protein pellets were resuspended in a mixture of 10% SDS and sample buffer. After quantification (Bio-Rad), proteins were separated by SDS-PAGE using precast Nupage 4–12% Bis-Tris Plus Gels (Invitrogen).

Antibodies

Polyclonal anti-HAP4 antibodies were generated by Eurogentec using the HAP4 fragment 330–554 as an antigen. Phosphoglycerate kinase antibody was a commercial antibody (phosphoglycerate kinase 1 (PGK1); Invitrogen)

Epifluorescence microscopy

For each condition, 900 μ l of cell cultures were added to 100 μ l of 37% paraformaldehyde. After 8 min of room temperature incubation, samples were pelleted and washed with 1 ml of PBS,

and pellets were resuspended in PBS. Cells were observed in a fully automated inverted microscope (Olympus) using a $\times 100$, 1.4 numerical aperture Plan-Apochromat objective. Stacks of fluorescence images were collected automatically at 0.2- μ m Z-intervals. The deconvolution of each Z-series was automatically computed with two plugins of ImageJ: PSF generator and DeconvolutionLab. To obtain a three-dimensional image, the deconvolutions were treated with the software Chimera (University of California, San Francisco).

EM microscopy

The yeast pellets were placed on the surface of a copper EM grid (400 mesh) that had been coated with Formvar. Each loop was very quickly submerged in liquid propane precooled and held at -180 °C by liquid nitrogen. The loops were then transferred in a precooled solution of 4% osmium tetroxide in dry acetone in a 1.8-ml polypropylene vial at -82 °C for 72 h (substitution) and warmed gradually to room temperature, followed by three washes in dry acetone. Specimens were stained for 1 h in 1% uranyl acetate in acetone at 4 °C in a darkroom. After another rinse in dry acetone, the loops were infiltrated progressively with araldite (epoxy resin, Fluka). Ultrathin sections were contrasted with lead citrate and observed with a Hitachi 7650 electron microscope (Bordeaux Imaging Center, Electron Microscopy Pole of the University of Bordeaux Segalen).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.D. Statistical analysis was carried out using analysis of variance for all results. Prism software (GraphPad, San Diego, CA) was used for all tests. A *p* value of less than 0.05 was considered significant.

Author contributions—C. L. B., E. D. Y., L. E. d. I. R. V., and A. D. conceptualization; C. L. B., E. D. Y., B. S., S. D.-C., and A. D. data curation; C. L. B. and A. D. investigation; C. L. B., E. D. Y., L. E. d. I. R. V., M. R., S. D.-C., and A. D. writing-review and editing; E. D. Y. and A. D. writing-original draft; B. S., S. C., S. D.-C., and A. D. formal analysis; M. R. and A. D. methodology; A. D. supervision; A. D. funding acquisition; A. D. validation; A. D. project administration.

Acknowledgments—We thank Dr. S. L. Berger for the gift of GST-Hap4p(330–554) plasmid, Prof. Jasper Rine and Prof. Jerry Kaplan for the gift of the plasmid HMG2-LacZ, and Corinne Blancard and Jim Dompierre for technical help in microscopy experiments.

References

- Holloszy, J. (1967) Effects of exercise on mitochondrial oxygen uptake and respiratory enzyme activity in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **242**, 2278–2282 [Medline](#)
- Dejean, L., Beauvoit, B., Guérin, B., and Rigoulet, M. (2000) Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1457**, 45–56 [CrossRef Medline](#)
- Devin, A., Dejean, L., Beauvoit, B., Chevztzoff, C., Avéret, N., Bunoust, O., and Rigoulet, M. (2006) Growth yield homeostasis in respiring yeast is due to a strict mitochondrial content adjustment. *J. Biol. Chem.* **281**, 26779–26784 [CrossRef Medline](#)
- Kelley, D. E., He, J., Menshikova, E. V., and Ritov, V. B. (2002) Dysfunction of mitochondria in human skeletal muscle in type 2 diabetes. *Diabetes* **51**, 2944–2950 [CrossRef Medline](#)

Labile heme regulates mitochondrial biogenesis

- Bonnard, C., Durand, D., Peyrol, S., Chanseume, E., Chauvin, M. A., Morio, B., Vidal, H., and Rieusset, J. (2008) Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin resistant mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 789–800 [CrossRef Medline](#)
- Devin, A., and Rigoulet, M. (2007) Mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells: mechanisms of mitochondrial response to variations in energy demand in eukaryotic cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**, C52–C58 [CrossRef Medline](#)
- Lascaris, R., Bussemaker, H. J., Boorsma, A., Piper, M., van der Spek, H., Grivell, L., and Blom, J. (2003) Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.* **4**, R3 [CrossRef Medline](#)
- Buschlen, S., Amillet, J. M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C., and Bolotin-Fukuhara, M. (2003) The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comp. Funct. Genomics* **4**, 37–46 [CrossRef Medline](#)
- Pinkham, J. L., and Guarente, L. (1985) Cloning and molecular analysis of the HAP2 locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **5**, 3410–3416 [CrossRef Medline](#)
- Hahn, S., Pinkham, J., Wei, R., Miller, R., and Guarente, L. (1988) The HAP3 regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 655–663 [CrossRef Medline](#)
- 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 [CrossRef Medline](#)
- McNabb, D. S., Xing, Y., and Guarente, L. (1995) Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* **9**, 47–58 [CrossRef Medline](#)
- McNabb, D. S., and Pinto, I. (2005) Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA Complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell* **4**, 1829–1839 [CrossRef Medline](#)
- Scarpulla, R. C., Vega, R. B., and Kelly, D. P. (2012) Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **23**, 459–466 [CrossRef Medline](#)
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R. C., and Spiegelman, B. M. (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115–124 [CrossRef Medline](#)
- Yoboue, E. D., Augier, E., Galinier, A., Blancard, C., Pinson, B., Casteilla, L., Rigoulet, M., and Devin, A. (2012) cAMP-induced mitochondrial compartment biogenesis: role of glutathione redox state. *J. Biol. Chem.* **287**, 14569–14578 [CrossRef Medline](#)
- Aquilano, K., Baldelli, S., Pagliei, B., Cannata, S. M., Rotilio, G., and Ciriolo, M. R. (2013) p53 orchestrates the PGC-1 α -mediated antioxidant response upon mild redox and metabolic imbalance. *Antioxid. Redox Signal.* **18**, 386–399 [CrossRef Medline](#)
- Dejean, L., Beauvoit, B., Alonso, A. P., Bunoust, O., Guérin, B., and Rigoulet, M. (2002) cAMP-induced modulation of the growth yield of *Saccharomyces cerevisiae* during respiratory and respiro-fermentative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1554**, 159–169 [CrossRef Medline](#)
- Bogacka, I., Ukropcova, B., McNeil, M., Gimble, J. M., and Smith, S. R. (2005) Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes *in vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **90**, 6650–6656 [CrossRef Medline](#)
- 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 [CrossRef Medline](#)
- Yoboue, E. D., and Devin, A. (2012) Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, 403870 [CrossRef Medline](#)
- Qi, Z., Hamza, I., and O'Brian, M. R. (1999) Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 13056–13061 [CrossRef Medline](#)
- Mense, S. M., and Zhang, L. (2006) Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res.* **16**, 681–692 [CrossRef Medline](#)
- Chen, J. J. (2007) Regulation of protein synthesis by the heme-regulated eIF2 α kinase: relevance to anemias. *Blood.* **109**, 2693–2699 [CrossRef Medline](#)
- Trawick, J. D., Wright, R. M., and Poyton, R. O. (1989) Transcription of yeast COX6, the gene for cytochrome *c* oxidase subunit VI, is dependent of heme and on the HAP2 gene. *J. Biol. Chem.* **264**, 7005–7008 [Medline](#)
- Betina, S., Gavurníková, G., Havierník, P., Šabová, L., and Kolarov, J. (1995) Expression of the AAC2 gene encoding the major mitochondrial ADP/ATP carrier in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled at the transcriptional level by oxygen, heme and HAP2 factor. *Eur. J. Biochem.* **229**, 651–657 [CrossRef Medline](#)
- Bourens, M., Fontanesi, F., Soto, I. C., Liu, J., and Barrientos, A. (2013) Redox and reactive oxygen species regulation of mitochondrial cytochrome *c* oxidase biogenesis. *Antioxid. Redox Signal.* **19**, 1940–1952 [CrossRef Medline](#)
- Hon, T., Lee, H. C., Hu, Z., Iyer, V. R., and Zhang, L. (2005) The heme activator protein Hap1 represses transcription by a heme-independent mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**, 1343–1352 [CrossRef Medline](#)
- Lan, C., Lee, H. C., Tang, S., and Zhang, L. (2004) A novel mode of chaperone action. *J. Biol. Chem.* **279**, 27607–27612 [CrossRef Medline](#)
- Lee, H. C., Hon, T., Lan, C., and Zhang, L. (2003) Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5857–5866 [CrossRef Medline](#)
- Lee, H. C., Hon, T., and Zhang, L. (2002) The molecular chaperone Hsp90 mediates heme activation of the yeast transcriptional activator Hap1. *J. Biol. Chem.* **277**, 7430–7437 [CrossRef Medline](#)
- Zhang, T., Bu, P., Zeng, J., and Vancura, A. (2017) Increased heme synthesis in yeast induces a metabolic switch from fermentation to respiration even under conditions of glucose repression. *J. Biol. Chem.* **292**, 16942–16954 [CrossRef Medline](#)
- Liu, Z., and Butow, R. (1999) A transcriptional switch in the expression of yeast tricarboxylic acid cycle genes in response to a reduction or loss of respiratory function. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 6720–6728 [CrossRef Medline](#)
- Schneider, J. C., and Guarente, L. (1991) Regulation of the yeast CYT1 gene encoding cytochrome *c*₁ by HAP1 and HAP2/3/4. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 4934–4942 [CrossRef Medline](#)
- Thorsness, M., Schafer, W., D'Ari, L., and Rine, J. (1989) Positive and negative transcriptional control by heme of genes encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 5702–5712 [CrossRef Medline](#)
- Crisp, R. J., Pollington, A., Galea, C., Jaron, S., Yamaguchi-Iwai, Y., and Kaplan, J. (2003) Inhibition of heme biosynthesis prevents transcription of iron uptake genes in yeast. *J. Biol. Chem.* **278**, 45499–45506 [CrossRef Medline](#)
- Groen, A. K., Wanders, R. J. A., Westerhoff, H. V., van der Meer, R., and Tager, J. M. (1982) Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration. *J. Biol. Chem.* **257**, 2754–2757 [Medline](#)
- Tager, J. M., Wanders, R. J. A., Groen, A. K., Kunz, W., Bohnsack, R., Küster, U., Letko, G., Böhme, G., Duszynski, J., and Wojtczak, L. (1983) Control of mitochondrial respiration. *FEBS Lett.* **151**, 1–9 [CrossRef Medline](#)
- Brown, G. C. (1992) Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells. *Biochem. J.* **284**, 1–13 [CrossRef Medline](#)
- Mogensen, M., Bagger, M., Pedersen, P. K., Fernström, M., and Sahlin, K. (2006) Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency. *J. Physiol.* **571**, 669–681 [CrossRef Medline](#)
- Larsen, S., Nielsen, J., Hansen, C. N., Nielsen, L. B., Wibrand, F., Stride, N., Schroder, H. D., Boushel, R., Helge, J. W., Dela, F., and Hey-Mogensen, M. (2012) Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* **590**, 3349–3360 [CrossRef Medline](#)

42. Rabøl, R., Svendsen, P. F., Skovbro, M., Boushel, R., Haugaard, S. B., Schjerling, P., Schrauwen, P., Hesselink, M. K. C., Nilas, L., Madsbad, S., and Dela, F. (2009) Reduced skeletal muscle mitochondrial respiration and improved glucose metabolism in nondiabetic obese women during a very low calorie dietary intervention leading to rapid weight loss. *Metabolism* **58**, 1145–1152 [CrossRef](#) [Medline](#)
43. McBride, H. M., Neuspiel, M., and Wasiak, S. (2006) Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol.* **16**, R551–R560 [CrossRef](#) [Medline](#)
44. Hoppins, S., Lackner, L., and Nunnari, J. (2007) The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 751–780 [CrossRef](#) [Medline](#)
45. Cerveny, K. L., Tamura, Y., Zhang, Z., Jensen, R. E., and Sesaki, H. (2007) Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol.* **17**, 563–569 [CrossRef](#) [Medline](#)
46. Olesen, J., Hahn, S., and Guarente, L. (1987) Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the CYC1 upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell* **51**, 953–961 [CrossRef](#) [Medline](#)
47. Forsburg, S. L., and Guarente, L. (1988) Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the CYC1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3-responsive site. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 647–654 [CrossRef](#) [Medline](#)
48. Dang, V. D., Bohn, C., Bolotin-Fukuhara, M., and Daignan-Fornier, B. (1996) The CCAAT box-binding factor stimulates ammonium assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*, defining a new cross-pathway regulation between nitrogen and carbon metabolisms. *J. Bacteriol.* **178**, 1842–1849 [CrossRef](#) [Medline](#)
49. Guarente, L., and Ptashne, M. (1981) Fusion of *Escherichia coli* lacZ to the cytochrome *c* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 2199–2203 [CrossRef](#) [Medline](#)
50. Smith, D. W., and Williams, R. J. P. (1970) The spectra of ferric haems and haemoproteins. *Struct. Bond.* **7**, 1–45 [CrossRef](#)
51. Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P., and Alani, E. (1984) Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the CYC1 gene of *S. cerevisiae*. *Cell* **36**, 503–511 [CrossRef](#) [Medline](#)
52. Massey, V. (1959) The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 255–256 [CrossRef](#) [Medline](#)
53. Westermann, B., and Neupert, W. (2000) Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1421–1427 [CrossRef](#) [Medline](#)
54. Wang, L., Turcotte, B., Guarente, L., and Berger, S. L. (1995) The acidic transcriptional activation domains of herpes virus VP16 and yeast HAP4 have different co-factor requirements. *Gene* **158**, 163–170 [CrossRef](#) [Medline](#)
55. Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., and Philippsen, P. (1997) Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1065–1075 [CrossRef](#) [Medline](#)
56. Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 953–961 [CrossRef](#) [Medline](#)
57. Kippert, F. (1995) A rapid permeabilization procedure for accurate quantitative determination of β -galactosidase activity in yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 201–206 [CrossRef](#) [Medline](#)
58. van Gelder, B. F., and Slater, E. C. (1962) The extinction coefficient of cytochrome *c*. *Biochim. Biophys. Acta* **58**, 593–595 [CrossRef](#) [Medline](#)



The Warburg Effect in Yeast: Repression of Mitochondrial Metabolism Is Not a Prerequisite to Promote Cell Proliferation

Cyrielle L. Bouchez^{1,2†}, Nouredine Hammad^{1,2†}, Sylvain Cuvellier^{1,2}, Stéphane Ransac^{1,2}, Michel Rigoulet^{1,2} and Anne Devin^{1,2*}

¹ CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, Bordeaux, France, ² Univ. de Bordeaux, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, Bordeaux, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Sara Rodriguez-Enriquez,
Instituto Nacional de
Cardiología, Mexico

Reviewed by:

Alvaro Marín Hernández,
Instituto Nacional de
Cardiología, Mexico
Mariafrancesca Scalise,
University of Calabria, Italy
Salvador Uribe-Carvajal,
National Autonomous University of
Mexico, Mexico

*Correspondence:

Anne Devin
anne.devin@ibgc.cnrs.fr

†These authors share first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Cancer Metabolism,
a section of the journal
Frontiers in Oncology

Received: 18 February 2020

Accepted: 25 June 2020

Published: 19 August 2020

Citation:

Bouchez CL, Hammad N, Cuvellier S,
Ransac S, Rigoulet M and Devin A
(2020) The Warburg Effect in Yeast:
Repression of Mitochondrial
Metabolism Is Not a Prerequisite to
Promote Cell Proliferation.
Front. Oncol. 10:1333.
doi: 10.3389/fonc.2020.01333

O. Warburg conducted one of the first studies on tumor energy metabolism. His early discoveries pointed out that cancer cells display a decreased respiration and an increased glycolysis proportional to the increase in their growth rate, suggesting that they mainly depend on fermentative metabolism for ATP generation. Warburg's results and hypothesis generated controversies that are persistent to this day. It is thus of great importance to understand the mechanisms by which cancer cells can reversibly regulate the two pathways of their energy metabolism as well as the functioning of this metabolism in cell proliferation. Here, we made use of yeast as a model to study the Warburg effect and its eventual function in allowing an increased ATP synthesis to support cell proliferation. The role of oxidative phosphorylation repression in this effect was investigated. We show that yeast is a good model to study the Warburg effect, where all parameters and their modulation in the presence of glucose can be reconstituted. Moreover, we show that in this model, mitochondria are not dysfunctional, but that there are fewer mitochondria respiratory chain units per cell. Identification of the molecular mechanisms involved in this process allowed us to dissociate the parameters involved in the Warburg effect and show that oxidative phosphorylation repression is not mandatory to promote cell growth. Last but not least, we were able to show that neither cellular ATP synthesis flux nor glucose consumption flux controls cellular growth rate.

Keywords: Warburg effect, mitochondria, oxidative phosphorylation, mitochondrial biogenesis, Hap4p, yeast

INTRODUCTION

Cell proliferation requires anabolic pathways that require energy for their accomplishment. ATP is the central molecule in energy conversion processes that can be synthesized through two kinds of reaction: substrate-level phosphorylation (glycolysis and Krebs cycle) and mitochondrial oxidative phosphorylation. Mitochondria has long been proposed to play a central role in ATP turn-over since they synthesize most of the cellular ATP. It is well-known that the energetic yield of both pathways is very different since when one glucose is being oxidized, glycolysis will generate 2 ATP, whereas mitochondria can generate over ten times more but requires oxygen, the final electron acceptor of the respiratory chain.

O. Warburg conducted one of the first studies on tumor energy metabolism. His early discoveries showed that cancer cells display a decreased respiration and an increased glycolysis proportional to the increase in their growth rate, suggesting that they mainly depend on fermentative metabolism for ATP generation (1). Because the repression of oxidative metabolism occurs even if oxygen is plentiful, this metabolic phenomenon was named “aerobic glycolysis.” Warburg later proposed that dysfunctional mitochondria are the root of aerobic glycolysis (2) and further hypothesized that this event is the primary cause of cancer. It should be stressed here that the Warburg effect, as defined by O. Warburg, requires the concomitant and correlated variations of the three parameters mentioned above: respiratory rate, glycolysis and growth rate. If one of these parameters does not evolve as expected, one can no longer consider the observed phenomenon to be a Warburg effect. Warburg’s results and hypothesis generated controversies that are persistent to this day. Moreover, this effect is very different from the Crabtree effect, which is defined as the inhibition of cellular oxygen consumption upon glucose addition to cells and fall under a kinetic regulation of mitochondrial oxidative phosphorylation (3).

It has been shown that oxidative phosphorylation activity can be increased in cultured cancer cells (4), which implies that the decrease in mitochondrial activity in these cells is not irreversible. In the same line of thought, it has been shown that some cancer cells, when cultured in petri dishes, can reversibly switch between fermentation and oxidative metabolism, depending on the absence or the presence of glucose and the environmental conditions (4–6). Another hypothesis was that the down regulation of oxidative phosphorylation was used by cancer cells to proliferate in hypoxic environments. Nonetheless, a considerable body of evidence challenges the paradigm of the purely “glycolytic” cancer cell (7). Some glioma, hepatoma and breast cancer cell lines possess functional mitochondria and they obtain their ATP mainly from oxidative phosphorylation (8–11). Moreover, a model proposed that “glycolytic” cells could establish a metabolic symbiosis with the “oxidative” ones through lactate shuttling (12). This points out that the metabolic plasticity observed *in vitro* may have an impact on tumor physiology *in vivo*.

Therefore, it is crucial to understand the mechanisms by which cancer cells can reversibly regulate the two pathways of their energy metabolism as well as the functioning of this metabolism in cell proliferation. Both pathways are thermodynamically controlled by two forces: the phosphate potential (ΔG_p) and the redox potential (ΔG_{redox}), which implies that they are inherently linked. Further, they are kinetically regulated by metabolites that can arise from one another (13, 14). These pathways being so intertwined raises the question whether the downregulation of mitochondrial

metabolism is a mandatory step to increase the flux through glycolysis.

A more finalist way of analyzing the Warburg effect is to investigate its added value to promote cell growth. A review of the literature shows that the possible benefits of this energy metabolism rewiring for cancer cell growth are not clear. Indeed, it is well-known that aerobic glycolysis is inefficient in terms of ATP synthesis yield when compared with mitochondrial respiration (15–17). However, in mammals, the rate of glucose metabolism through aerobic glycolysis is 10–100 higher than complete oxidation of glucose by mitochondrial oxidative phosphorylation. One could thus hypothesize that one of the functions of the Warburg effect would be to allow the rapid production of ATP that can be rapidly tuned to answer the demand for ATP synthesis. It has also been proposed that intense aerobic glycolysis was necessary to ensure the supply of glycolytic intermediates as building blocks to biosynthetic pathways. To this day, and despite numerous studies, the possible advantages of this metabolic rewiring are still under investigation.

There is a number of limitations to the use of cancer cells in culture in order to study their energy metabolism. First and foremost, in these cells, the metabolic deviation is already in place, not allowing a study of the molecular mechanisms giving rise to that deviation. Second, most of the studies conducted in these cells are conducted under hyperglycemic (22.5 mM glucose) and hyperoxic (21% O₂) conditions. These are two crucial parameters when one considers cell energy metabolism, glucose feeding glycolysis and oxygen being the electrons acceptor in the respiratory chain. From a metabolic point of view, the fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* and tumor cells share several features (18, 19). In both cell types, there are mechanisms that enhance glycolytic flux concomitantly with the repression of oxidative phosphorylation in the presence of glucose, and fermentation is preferred even in the presence of oxygen. Here, we made use of yeast as a model to study the Warburg effect and its eventual function in supporting an increased ATP demand to support cell proliferation. The role of oxidative phosphorylation repression in this effect was investigated. We show that yeast is a good model to study the Warburg effect, where all parameters can be reconstituted. Moreover, contrary to what was proposed by Warburg and in accordance with a number of reports from the literature, we show that in this model mitochondria are not dysfunctional: there are fewer mitochondria respiratory chain units per cell. Identification of the molecular mechanisms involved in this process allowed us to dissociate the parameters involved in the Warburg effect and show that oxidative phosphorylation repression is not mandatory to favor cell growth. Last but not least, we were able to show that cellular ATP synthesis flux does not control cellular growth rate.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains, Plasmids, and Culture Medium

The following yeast strains were used in this study: BY4742 (MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0); BY4742 Δ *hap4*

Abbreviations: ATP, Adenosine triphosphate; ΔG_p , phosphate potential; ΔG_{redox} , redox potential; O₂, dioxygen; HAP, heme activator protein; Hxk, Hexokinase; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone; KOH, Potassium hydroxide; NAD⁺, Nicotinamide adenine dinucleotide; PCA, Perchloric acid; NaOH, Sodium hydroxide; SDS, Sodium dodecyl sulfate; OD, Optical density; PGK1, phosphoglycerate kinase 1; HCl, hydrochloric acid; PiK, Potassium phosphate; EtOH, Ethanol; WT, Wild Type; w/, with; w/o, without.

(MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; hap4:: kanMX4); BY4742 Δ hvk2 (MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; lys2 Δ 0; ura3 Δ 0; Hvk2:: kan MX4); *Candida utilis* (CBS621) and *Saccharomyces cerevisiae* (yeast foam). Strains Δ hvk2-Hap4p \uparrow and Δ hap4-Hap4p \uparrow are BY4742 strains previously described (14).

Cells were grown aerobically at 28°C in the following medium: 0.175% yeast nitrogen base (Difco), 0.2% casein hydrolysate (Merck), 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 2% lactate (w/v) (Prolabo), pH 5.5, 20 mg.L⁻¹ L-tryptophan (Sigma), 40 mg.L⁻¹ adenine hydrochloride (Sigma) and 20 mg.L⁻¹ uracil (Sigma). When cells carried a plasmid, uracil was omitted in the growth medium [pTET-HAP4 (20, 21)]. Where indicated, glucose (60 mM) was added to the medium. Growth was measured at 600 nm in a Safas spectrophotometer (Monaco) in a 1 mL cuvette. Dry weight determinations were performed on samples of cells harvested throughout the growth period, washed twice in distilled water and weighed after extensive drying.

Oxygen Consumption Assays

Oxygen consumption was measured polarographically at 28°C using a Clark oxygen electrode in a 1 mL thermostatically controlled chamber. 1 mL of culture was transferred to the chamber and respiratory rates (JO₂) were determined from the slope of a plot of O₂ concentration vs. time. The measured activities are normalized per mg dry weight. Respiration assays of growing cells were performed in the growth medium. In the case of uncoupled respiratory rate (10 μ M CCCP), 100 mM Ethanol was added to the culture medium (22).

Glucose Measurement

Cells were grown in 2% lactate synthetic complete medium. Each hour, 1 mL of the culture was harvested and centrifuged. Culture supernatant was heated at 80°C for 5 min. Glucose was quantified in the supernatant with the Megazyme “D-Glucose HK assay Kit.”

Ethanol Measurement

Cells were grown in 2% lactate synthetic complete medium. Each hour, 1 mL of the culture was harvested and centrifuged. Culture supernatant was mixed with 25% of PCA. Then, KOMO (KOH 2M, MOPS 0.3M) was added to adjust the pH to 7. Samples were diluted in potassium phosphate buffer (50 mM) pH9 containing NAD⁺ (2 mM), Aldehyde dehydrogenase (0.3 U/mL) and alcohol dehydrogenase (70 U/mL). Ethanol was quantified by NAD⁺ reduction at 340 nm and 28°C.

Cytochrome Content Determination

The cellular content of mitochondrial cytochromes c+c₁, b and a+a₃ was calculated as described in Dejean et al. (23) considering the respective molar extinction coefficient values and the reduced-minus-oxidized spectra recorded using a dual beam spectrophotometer (Varian, Cary 4000).

Enzymatic Activities Determination

Cells were washed and then broken by vigorous shaking with an equal volume of glass beads in a buffer containing 50 mM Tris-HCl pH 7.4 and a mixture of protease inhibitors (Complete

EDTA-freeTM, Roche). Centrifugations (700 g, 2 min) allowed the elimination of pelleted unbroken cells and glass beads. Cellular proteins were quantified by the Lowry method. Citrate synthase (2.3.3.1) activity was determined by monitoring at 412 nm the oxidation of coenzyme A (produced by citrate synthase activity) by 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) as a function of time, in a Safas spectrophotometer. The enzyme activity was calculated using an extinction coefficient of 13 600 M⁻¹.cm⁻¹ at 412 nm. One citrate synthase unit was equal to 1 μ mole of DTNB reduced per minute per mg dry weight. Cytochrome c oxidase activity (1 mM potassium cyanide-sensitive) was determined by monitoring spectrophotometrically (550 nm) the rate of disappearance of reduced cytochrome c in the following buffer: 50 mM PiK, 100 μ M reduced cytochrome c. The enzyme activity was determined using an extinction coefficient of 18,500 M⁻¹.cm⁻¹ at 550 nm for reduced cytochrome c (all from Sigma). Hexokinase activity was determined by monitoring the rate of NAD⁺ reduction spectrophotometrically (340 nm) (2 mM) in the presence of 0.5 U/mL glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), 10 mM glucose, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂.

Protein Extraction, Electrophoresis, and Western-Blot

Cells were lysed using a mixture of 7.5% β -mercaptoethanol in 1.85M NaOH. After 10 min incubation on ice, proteins were precipitated by the addition of an equal volume of 3M trichloroacetic acid for 10 min on ice. After a rapid centrifugation at 4°C, the protein pellet was suspended in a mixture of 10% SDS and sample buffer (0.06M Tris, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol, 5% glycerol, 0.02% bromophenol blue). Protein amounts corresponding to 0.5 OD units of cells were separated by 10% SDS-PAGE performed according to the method of Laemmli (24). After electro-transfer onto nitrocellulose membranes (Amersham Biosciences), proteins were probed with the desired primary antibodies: α -Hap4p (see below) and α -PGK1 (monoclonal antibody, Invitrogen) and detected using peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) ECL Prime reagent (Amersham Biosciences), according to the manufacturer instructions. Signal quantifications were done using the ImageJ software.

Antibodies

Polyclonal anti-Hap4p antibodies were generated by Eurogentec using the Hap4p fragment 330–554 as an antigen. Phosphoglycerate kinase antibody was a commercial antibody (PGK1; Invitrogen).

Statistical Analysis

Results are expressed as mean \pm SD. Statistical analysis was carried out using ANOVA test for all results. Prism software (GraphPad, San Diego, CA) was used for all tests. A $p < 0.05$ was considered significant. A $p < 0.05$ was considered significant and * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

RESULTS AND DISCUSSION

Yeast as a Model to Study the Warburg Effect

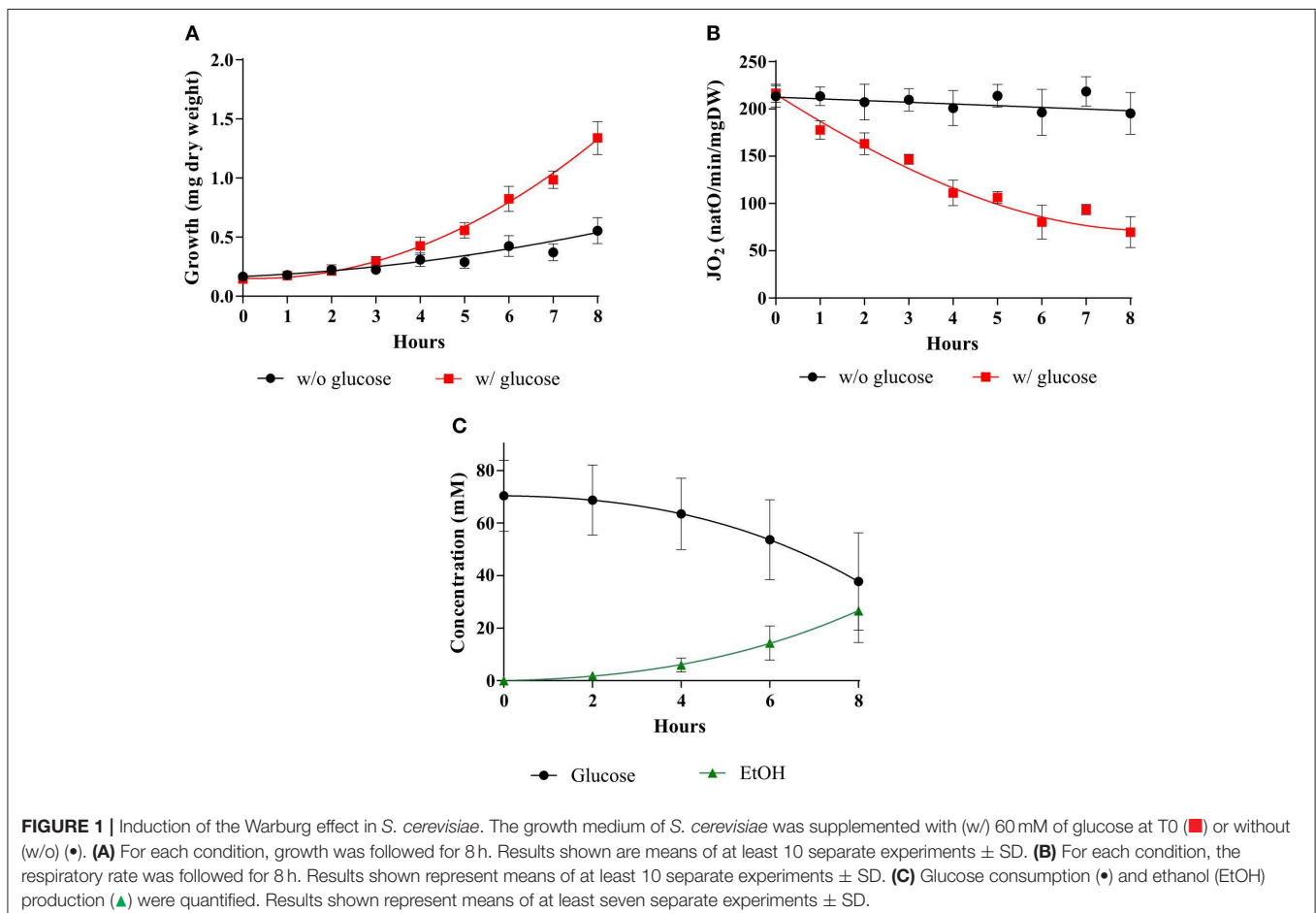
As stated above, in his seminal paper, Warburg showed a tight link between cell proliferation, cell respiration repression and aerobic glycolysis stimulation. Thus, what is now referred to as the Warburg effect must rely on these three parameters and their relationship(s). In order to define whether yeast would be a good model to study the induction of the Warburg effect, these three parameters were assessed in the presence or in the absence of glucose during yeast growth on non-fermentable medium. **Figure 1** shows that whereas in the absence of glucose both growth and respiration are constant, upon glucose addition, cellular growth is significantly increased (A). This is associated with a decrease in cellular respiratory rate (B) and an increase in glucose fermentation (C). Altogether, these parameters evolution upon glucose addition shows that yeast is a suitable model for a kinetic study of the Warburg effect induction.

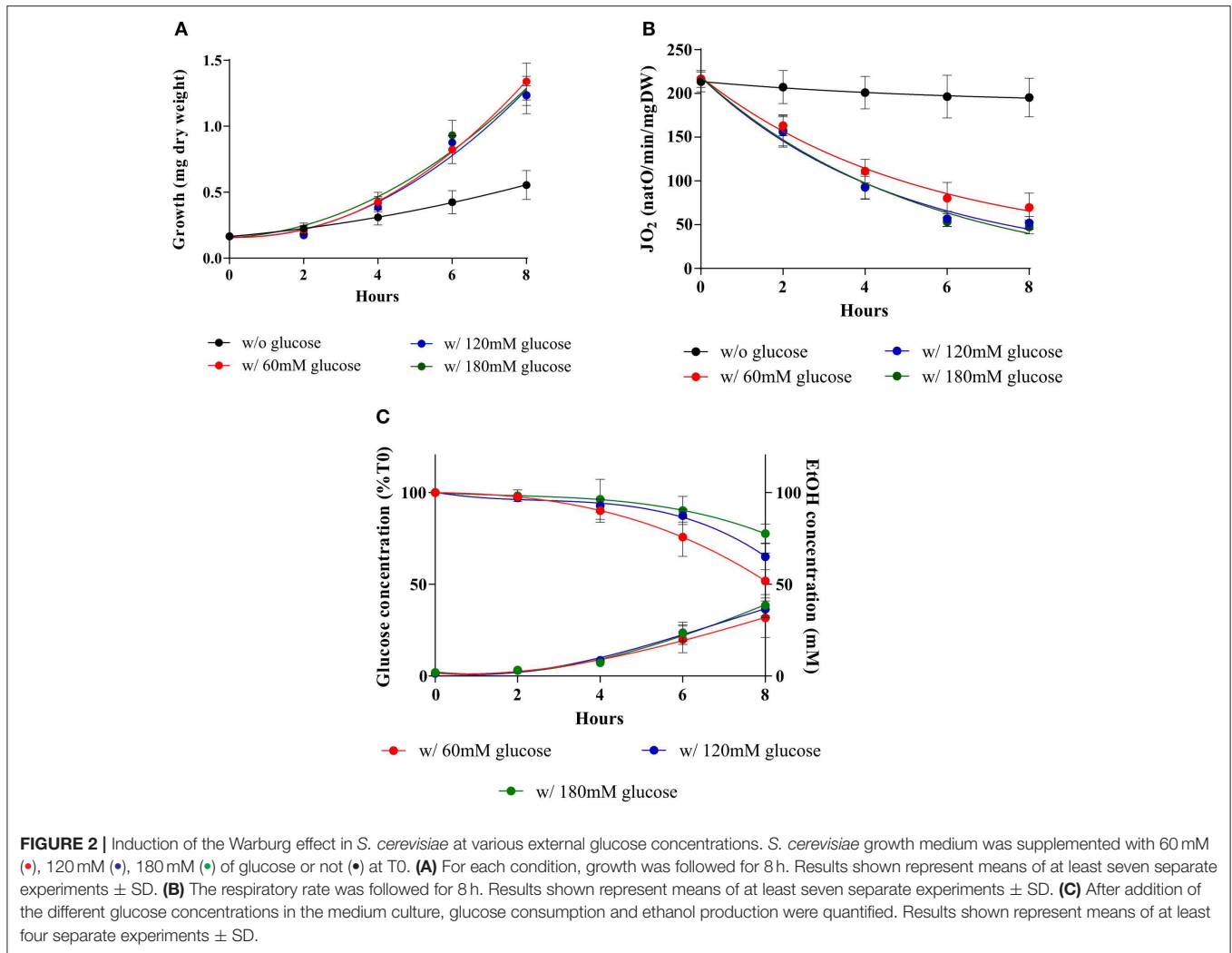
As shown in **Figure 1**, during the 8-h kinetic measurement up to 30 mM in glucose are consumed. 60 mM glucose was thus the lowest concentration used to ensure that glucose would not run low under our experimental conditions. To assess an eventual role of glucose concentration on the induction of the

Warburg effect cellular growths, respiratory rates and glucose consumptions were assessed upon addition of three distinct glucose concentrations. **Figure 2** shows that upon glucose addition, cellular growth is increased in a comparable extent whichever the glucose concentration (A). This is associated with a decrease in cellular respiratory rate to a comparable extent whichever the glucose concentration (B) and glucose fermentation to a comparable extent whichever the glucose concentration, after 8 h about 30 mM of glucose were consumed whichever the initial glucose concentration (C).

Mitochondria Are Not Dysfunctional, There Are Fewer Mitochondria

A decrease in cellular respiratory rate can originate in a number of distinct processes such as an alteration of mitochondria [i.e., dysfunctional mitochondria as proposed by Warburg (2, 25)], a modulation of the respiratory state (such as a decrease in phosphorylating processes), or a decrease in cellular mitochondrial content (herein assimilated to the content in respiratory chain units). In order to pinpoint the origin of the glucose-induced decrease in respiratory rate, a number of mitochondrial parameters were assessed. **Figure 3A** shows that whereas in the absence of glucose the uncoupled cellular respiratory rate is stable throughout exponential growth of the





cells, glucose addition induces a decrease of this rate, i.e., a decrease in respiratory chain activity. Because this decrease in respiratory chain activity can be due to either a kinetic regulation of the respiratory chain or a quantitative decrease in respiratory chain complexes, we quantified mitochondrial cytochromes within the cells. In the absence of glucose, the cytochromes are stable throughout exponential growth of the cells (Figure 3B). When the Warburg effect was induced (glucose addition) a continuous decrease of all types of cytochromes was assessed (Figure 3C). Moreover, the decrease in respiratory rate is directly proportional to the decrease in mitochondrial cytochromes (inset), showing that this oxygen consumption decrease is actually due to a decrease in mitochondrial respiratory chain units within the cells. This decrease in mitochondrial content was further confirmed by measuring mitochondrial enzymatic activities i.e., citrate synthase and cytochrome c oxidase. Both were decreased upon glucose addition to cells (Table 1). However, it should be stressed here that citrate synthase activity modulation should be interpreted with caution in yeast where a peroxisomal citrate synthase exists and is downregulated by glucose (26–28).

The Decrease in Mitochondrial Amount Originates in a Decrease in Mitochondrial Biogenesis

The amount of mitochondria within a cell is controlled by its turnover *i.e.*, the respective rates of mitochondrial biogenesis and mitochondrial degradation. The HAP complex has been shown to be involved in the specific induction of genes involved in gluconeogenesis, metabolism of alternate carbon sources, respiration, and mitochondrial development. Indeed, the disruption of any subunit of this complex renders the cells unable to grow on non-fermentable carbon sources (29–32). Moreover, many genes involved in energy metabolism have been shown to be regulated by this complex (33–35). In order to determine whether the biogenesis of the mitochondrial compartment was affected upon glucose addition to the cells, we assessed the cellular amount of the master regulator of the activity of this multicomplex, the subunit Hap4p. Figure 4A shows that Hap4p amount was decreased upon glucose addition, independently of glucose concentration. This protein tends to increase after 4 h in the presence of glucose and goes back to low levels for the 6

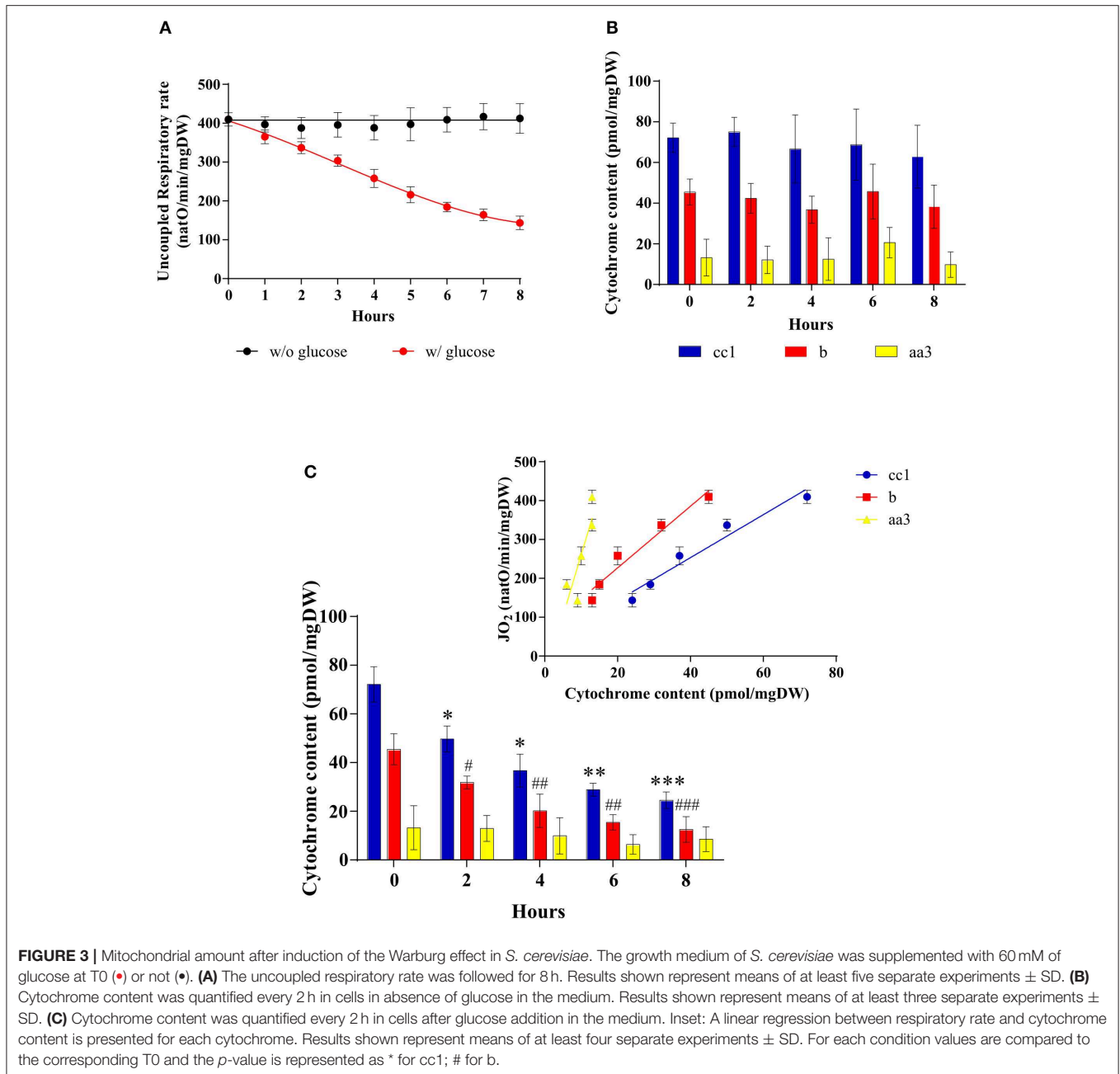


FIGURE 3 | Mitochondrial amount after induction of the Warburg effect in *S. cerevisiae*. The growth medium of *S. cerevisiae* was supplemented with 60 mM of glucose at T0 (●) or not (◐). **(A)** The uncoupled respiratory rate was followed for 8 h. Results shown represent means of at least five separate experiments \pm SD. **(B)** Cytochrome content was quantified every 2 h in cells in absence of glucose in the medium. Results shown represent means of at least three separate experiments \pm SD. **(C)** Cytochrome content was quantified every 2 h in cells after glucose addition in the medium. Inset: A linear regression between respiratory rate and cytochrome content is presented for each cytochrome. Results shown represent means of at least four separate experiments \pm SD. For each condition values are compared to the corresponding T0 and the *p*-value is represented as * for cc1; # for b.

and 8 h' time points. Quantitation of the western blots for this protein shows that it is almost undetectable after induction of the Warburg effect (Figure 4B). Further, porin, a mitochondrial outer membrane protein is shown to decrease, albeit to a lower level than the mitochondrial cytochromes, upon glucose addition to cells, independently of the glucose concentration used (Figures 4C,D). PGK1, a cytosolic enzyme was used as a loading control. This confirms the decrease in cellular mitochondrial content within the cells upon glucose addition. Further experiments showed no degradation (mitophagy) of the mitochondrial compartment upon glucose addition to cells (data not shown).

Repression of Mitochondrial Metabolism Is Not a Prerequisite to Promote Cell Proliferation

To further investigate the role of the decrease in mitochondrial respiratory rate on the Warburg effect we explored means to prevent mitochondrial biogenesis decrease upon glucose addition. First, we envisioned limiting the glycolytic flux. Hexokinase is the first enzyme of the glycolysis pathway. Among the three isoenzymes in both yeast and mammalian cells, hexokinase2 (Hxk2p) is the predominant hexokinase during growth on glucose. It is the yeast homologous of glucokinase

TABLE 1 | Citrate synthase and cytochrome c oxidase activities in wild type and mutant cells.

		T0		T2		T4		T6		T8	
		-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
S. c – WT	CS	0.37 (± 0.2)	0.34 (± 0.19)	0.19 (± 0.1)**	0.30 (± 0.16)	0.08 (± 0.04)**	0.33 (± 0.17)	0.04 (± 0.01)**	0.33 (± 0.17)	0.04 (± 0.02)**	
	COX	0.07 (± 0.02)	0.06 (± 0.02)	0.04 (± 0.01)	0.06 (± 0.02)	0.03 (± 0.01)**	0.05 (± 0.01)	0.02 (± 0.01)**	0.05 (± 0.02)	0.03 (± 0.01)*	
S. c – Δ hvk2	CS	0.39 (± 0.12)	0.48 (± 0.05)	0.28 (± 0.09)**	0.4 (± 0.14)	0.15 (± 0.05)***	0.44 (± 0.1)	0.1 (± 0.03)***	0.56 (± 0.13)	0.08 (± 0.03)***	
	COX	0.09 (± 0.03)	0.09 (± 0.03)	0.06 (± 0.02)	0.08 (± 0.02)	0.05 (± 0.01)*	0.09 (± 0.03)	0.05 (± 0.02)*	0.1 (± 0.03)	0.05 (± 0.02)*	
S. c – Δ hap4 \uparrow	CS	0.28 (± 0.03)	0.35 (± 0.03)	0.23 (± 0.03)*	0.32 (± 0.07)	0.23 (± 0.02)	0.32 (± 0.04)	0.23 (± 0.05)*	0.35 (± 0.01)	0.22 (± 0.06)*	
	COX	0.14 (± 0.04)	0.16 (± 0.04)	0.14 (± 0.03)	0.19 (± 0.04)	0.15 (± 0.02)	0.18 (± 0.02)	0.18 (± 0.05)	0.18 (± 0.02)*	0.14 (± 0.05)	
S. c – Δ hvk2hap4 \uparrow	CS	0.55 (± 0.06)	0.58 (± 0.09)	0.55 (± 0.06)*	0.51 (± 0.05)	0.38 (± 0.05)*	0.53 (± 0.05)	0.35 (± 0.08)**	0.57 (± 0.02)*	0.31 (± 0.05)*	
	COX	0.1 (± 0.03)	0.1 (± 0.03)	0.1 (± 0.03)	0.11 (± 0.03)	0.1 (± 0.04)	0.13 (± 0.03)	0.11 (± 0.04)	0.13 (± 0.02)	0.12 (± 0.03)	
C. u	CS	0.09 (± 0.04)	0.1 (± 0.04)	0.08 (± 0.03)	0.11 (± 0.05)	0.08 (± 0.04)	0.1 (± 0.03)	0.09 (± 0.02)	0.13 (± 0.04)	0.1 (± 0.02)	
	COX	0.11 (± 0.03)	0.09 (± 0.03)	0.08 (± 0.03)	0.11 (± 0.03)	0.08 (± 0.01)	0.1 (± 0.04)	0.1 (± 0.03)	0.12 (± 0.04)	0.09 (± 0.04)	

CS, citrate synthase; COX, cytochrome oxidase. Enzymatic activities were measured as stipulated in the Materials and Methods section and is expressed in μ mol/min/mg protein. (–) indicates in the absence of glucose. (+) indicates in the presence of glucose. T0-2-4-6-8 are the hours of incubation w/ or w/o glucose. Results shown are means of at least three separate experiments \pm SD.

(overexpressed in tumor cells) and has a dual function being both a catalyst in the cytosol and an important regulator of the glucose repression signal in the nucleus (36–39). The consequences of deleting this enzyme on the induction of the Warburg effect was thus investigated. No significant effect was observed on growth or glucose consumption (**Supplementary Figures 1A,C**), indicating that Hvk2p isoenzymes carry out the glucose phosphorylating function. This was further confirmed by measuring Hvk activity in our cells (**Table 2**). Of note, Hvk activity was much more increased after glucose addition in Δ hvk2 and Δ hap4 \uparrow cells, indicating a stronger activation of Hvk2p isoenzymes by glucose in the absence of Hvk2p. The deletion of Hvk2p associated with Hap4p overexpression (see below) restores this activity to a wild-type level suggesting a repression of these enzymes by Hap4p. Deletion of Hvk2p allowed a decrease in mitochondrial oxygen consumption and in mitochondrial enzymatic activities (**Table 1**) upon glucose addition, this decrease was smaller than in the wild type cells (**Supplementary Figure 1B**). However, this deleted strain was not sufficient to prevent the induction of the Warburg effect. Since Hap4p was shown to be strongly decreased upon glucose addition to cells (see **Figure 4A**), we ectopically overexpressed this protein, hoping to maintain mitochondrial biogenesis in the presence of glucose. No significant effect was observed on growth or glucose consumption/fermentation (**Supplementary Figures 2A,C**). However, although a decrease in mitochondrial oxygen consumption and in mitochondrial enzymatic activities (**Table 1**) upon glucose addition was observed with the overexpression of Hap4p (Δ hap4 \uparrow), this decrease was smaller than in the wild type cells, with a delay observed in its induction (**Supplementary Figure 2B**). Next, this protein was overexpressed in the Δ hvk2 strain (Δ hvk2hap4 \uparrow , **Figure 5**). Considering the function of both Hvk2p and Hap4p, such a strain should exhibit an increased mitochondrial content and a strong orientation of energetic metabolism toward respiratory metabolism, altering the relationship between glycolysis and respiratory rate. In the absence of glucose, this strain exhibits a slight increase in growth (**Figure 5A**, data not

shown) and an increase in cellular respiratory rate of about 25% (**Figure 5B**). Glucose addition to this strain led to an increase in proliferation comparable to the one in the wild type strain (**Figure 5A**). However, regarding the respiratory rate of this strain in the presence of glucose, only a slight decrease was assessed after 4 h delay and, more importantly, after 8 h, its respiratory rate was comparable to the one in the wild type strain in the absence of glucose (**Figure 5B**), indicating a strong maintenance of mitochondrial function even in the presence of glucose. Despite this high respiratory rate, the Δ hvk2hap4 \uparrow strain exhibits a significant -and comparable to the wild type- glucose consumption and ethanol production upon glucose addition, in accordance with the hvk activity exhibited in this strain (**Figure 5C & Table 2**). The ectopically overexpressed Hap4p was shown to be stable over time both in the presence and absence of glucose (**Figure 5D**). The origin of the maintenance of the respiratory chain activity in the presence of glucose was investigated by means of quantifying the mitochondrial cytochromes within the cells. **Figure 5E** shows that in this strain and in the presence of glucose, mitochondrial cytochromes are stable throughout the cell's growth. Of note, the cytochrome content in this strain in the absence of glucose is higher than in the wild type strain, in agreement with the increase in cellular respiration in absence of glucose. Mitochondrial content was further shown not to decrease by measuring cytochrome oxidase activity (**Table 1**). A slight decrease of citrate synthase activity was assessed after 6-h incubation in the presence of glucose (**Table 1**). Altogether, these results show that repression of mitochondrial metabolism is not a prerequisite to promote cell proliferation.

A Crabtree Negative Strain Exhibits an Increase in Growth Rate Without Any Mitochondrial Repression

The unexpected above-mentioned results were obtained in a *Saccharomyces cerevisiae* mutant strain. We then sought to confirm these results (increase in growth rate in the presence of glucose with little/no decrease in mitochondrial respiration)

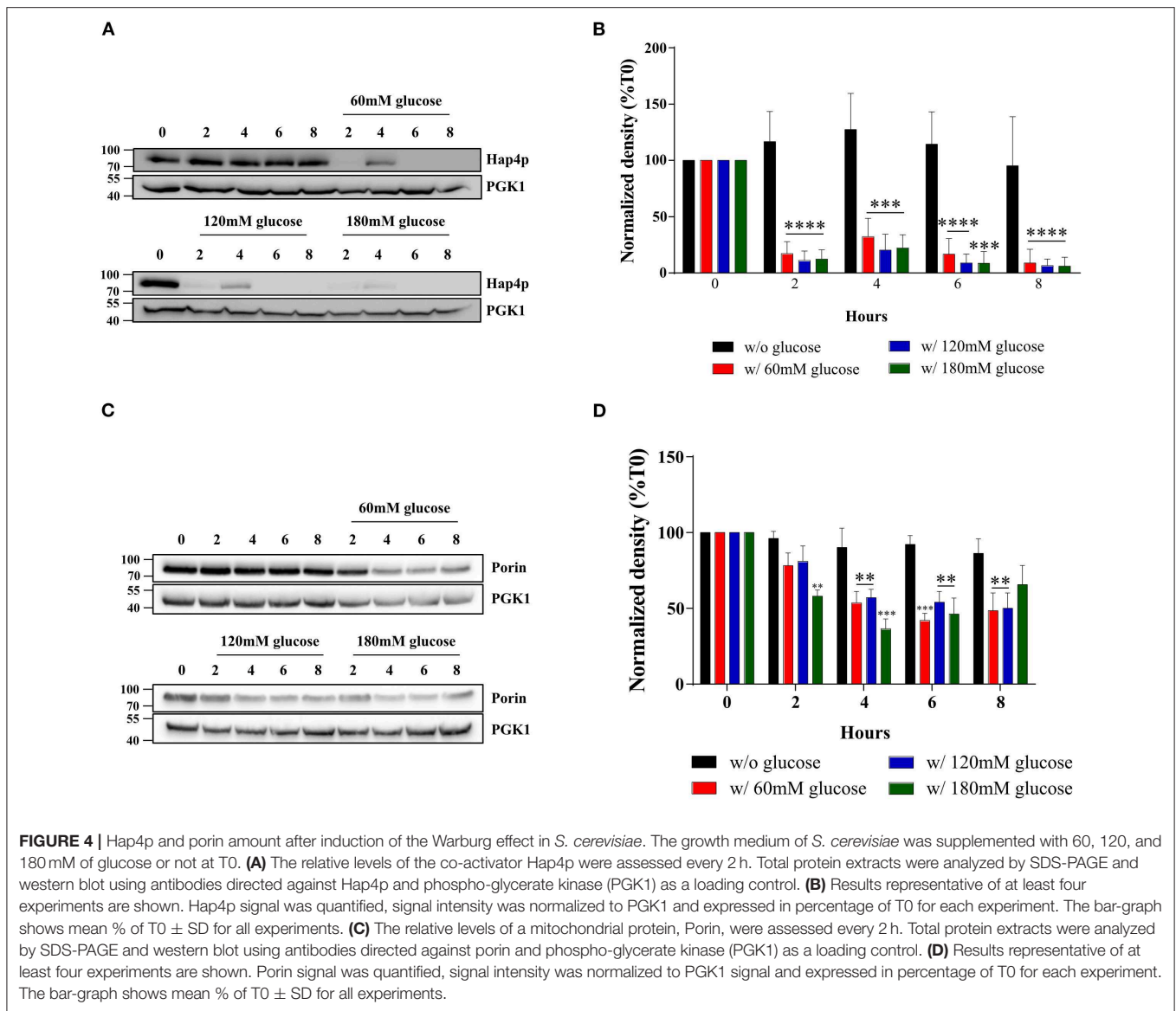


FIGURE 4 | Hap4p and porin amount after induction of the Warburg effect in *S. cerevisiae*. The growth medium of *S. cerevisiae* was supplemented with 60, 120, and 180 mM of glucose or not at T0. **(A)** The relative levels of the co-activator Hap4p were assessed every 2 h. Total protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and western blot using antibodies directed against Hap4p and phospho-glycerate kinase (PGK1) as a loading control. **(B)** Results representative of at least four experiments are shown. Hap4p signal was quantified, signal intensity was normalized to PGK1 and expressed in percentage of T0 for each experiment. The bar-graph shows mean % of T0 ± SD for all experiments. **(C)** The relative levels of a mitochondrial protein, Porin, were assessed every 2 h. Total protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and western blot using antibodies directed against porin and phospho-glycerate kinase (PGK1) as a loading control. **(D)** Results representative of at least four experiments are shown. Porin signal was quantified, signal intensity was normalized to PGK1 signal and expressed in percentage of T0 for each experiment. The bar-graph shows mean % of T0 ± SD for all experiments.

TABLE 2 | Hexokinase activity in wild type and mutant cells.

	T0		T2		T4		T6		T8	
	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
<i>S. c</i> – WT	UD	0.01 (± 0.02)	0.03 (± 0.03)	0.02 (± 0.03)	0.07 (± 0.05)	0.01 (± 0.02)	0.16 (± 0.04)*	0.01 (± 0.01)	0.21 (± 0.01)**	
<i>S. c</i> – $\Delta h x k 2$	UD	0.01 (± 0.01)	0.09 (± 0.09)	0.01 (± 0.03)	0.36 (± 0.14)**	0.01 (± 0.02)	0.4 (± 0.16)**	UD	0.53 (± 0.30)**	
<i>S. c</i> – $\Delta h a p 4 \uparrow$	0.17 (± 0.07)	0.18 (± 0.09)*	0.18 (± 0.08)	0.29 (± 0.14)	0.44 (± 0.27)	0.3 (± 0.14)	0.45 (± 0.23)	0.32 (± 0.14)	0.38 (± 0.22)	
<i>S. c</i> – $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$	0.01 (± 0.01)	UD	0.08 (± 0.06)	UD	0.09 (± 0.04)	UD	0.13 (± 0.08)	UD	0.12 (± 0.05)	

Enzymatic activity was measured as stipulated in the Materials and Methods section and is expressed in $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ protein. (-) indicates in absence of glucose. (+) indicates in the presence of glucose. T0-2-4-6-8 are the hours of incubation w/ or w/o glucose. Results shown are means of at least three separate experiments ± SD. UD, Undetectable.

with an alternate model. In the yeast community, yeast strains have long been characterized depending on their mitochondrial oxidative phosphorylation response to the presence of glucose. Crabtree-negative strains, also known as respiratory-obligatory

strains are well-known as requiring an active mitochondrial metabolism for growth in the presence of glucose. Consequently, we made use of a yeast strain known not to exhibit glucose-induced repression of oxidative phosphorylation metabolism.

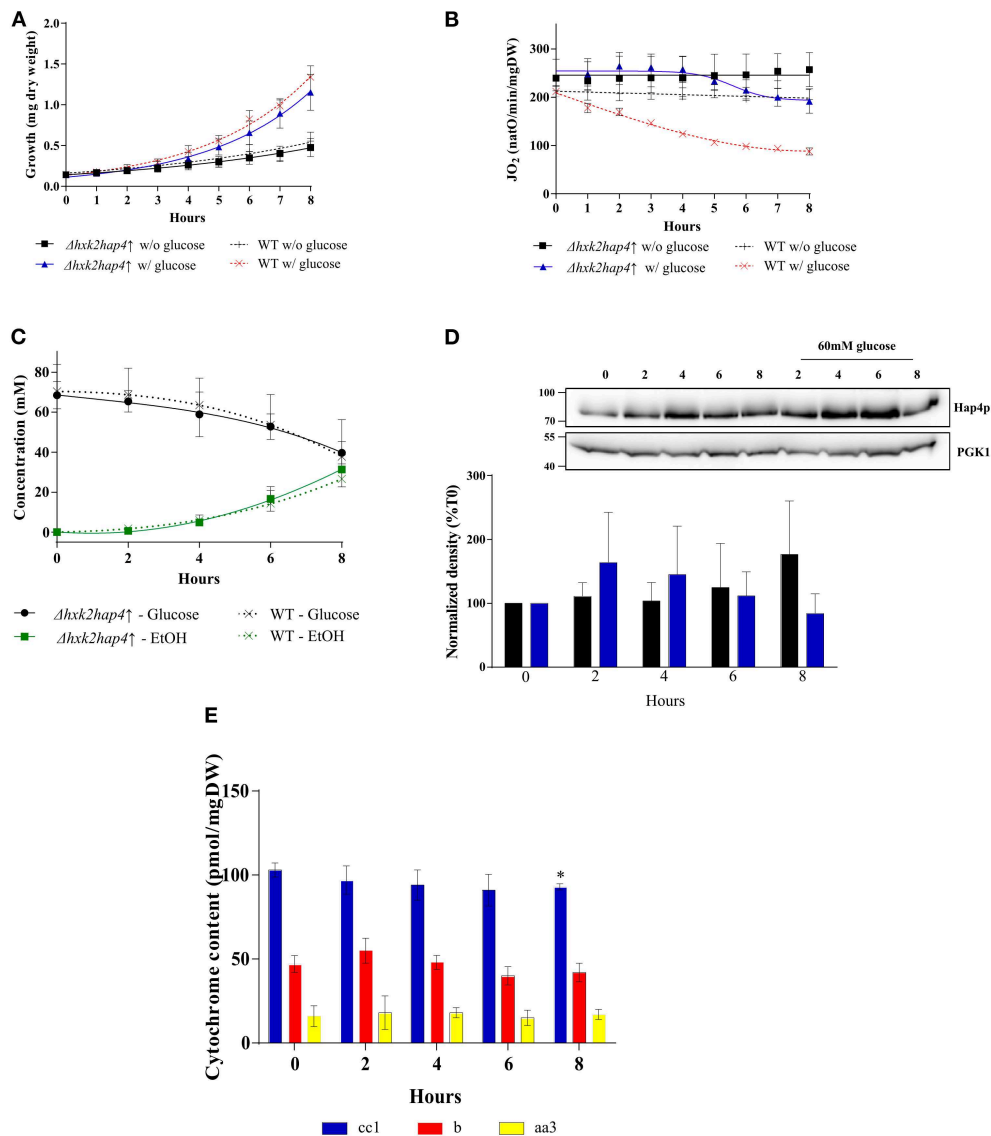


FIGURE 5 | Induction of the Warburg effect in *S. cerevisiae* $\Delta hvk2hap4\uparrow$. A *S. cerevisiae* strain deleted for *hvk2* ($\Delta hvk2$) was transformed with pCM189-Hap4p ($\Delta hvk2hap4\uparrow$). The growth medium was supplemented with 60 mM of glucose at T0 (\blacktriangle $\Delta hvk2hap4\uparrow$) and (\times WT) or not (\blacksquare $\Delta hvk2hap4\uparrow$) and (+ WT). **(A)** Growth was followed for 8 h. Results shown represent means of at least 10 separate experiments \pm SD. **(B)** The respiratory rate was followed for 8 h. Results shown represent means of at least 10 separate experiments \pm SD. **(C)** Glucose consumption (\bullet $\Delta hvk2hap4\uparrow$) and (\times WT) and ethanol production (\blacklozenge $\Delta hvk2hap4\uparrow$) and (\times WT) were quantified. Results shown represent means of at least five separate experiments \pm SD. **(D)** The relative levels of the co-activator Hap4p were determined every 2 h. Total protein extracts were analyzed by SDS-PAGE and western blot using antibodies directed against Hap4p and phospho-glycerate kinase (PGK1) as a loading control. Inset: Results representative of at least four experiments are shown. Hap4p signal was quantified, signal intensity was normalized to PGK1 signal and expressed as percentage of T0 for each experiment. The bar-graph shows mean % of T0 \pm SD for all experiments. **(E)** Cytochrome content was quantified every 2 h. Results shown represent means of at least four separate experiments \pm SD.

In this *Candida utilis* strain, as previously shown with a *Saccharomyces cerevisiae* strain, glucose induces an increase in cell growth (**Figure 6A**). Mitochondrial respiratory rate is not significantly modified upon glucose addition although a slight decrease is observed in absence of glucose (**Figure 6B**). The increase in growth rate is associated with glucose consumption, albeit to a lower level than in the *Saccharomyces cerevisiae* strain (**Figure 6C**). EtOH production was minimal in this strain upon

glucose addition in agreement with the maintenance of oxidative phosphorylation (**Figure 6C**). Further, no significant changes in mitochondrial cytochromes and mitochondrial enzymatic activities were observed upon glucose addition in this strain (**Figure 6D** and **Table 1**). Since *Candida utilis* exhibits a proton pumping complex I -which *Saccharomyces cerevisiae* does not exhibit-, similar experiments were done in the presence of Piericidin A, a complex I inhibitor (40–42), to ensure that glucose

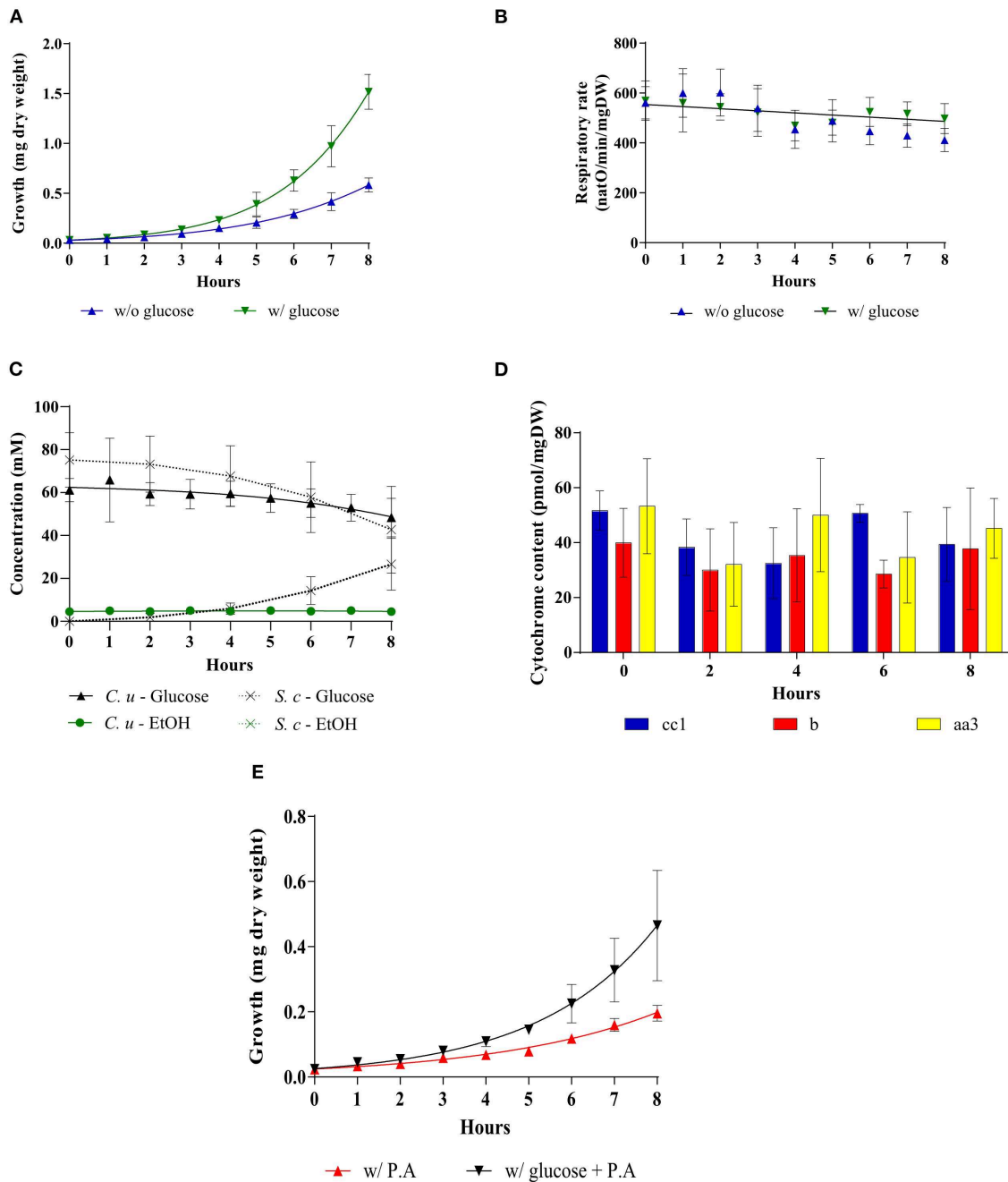


FIGURE 6 | Addition of glucose to a Crabtree-negative strain, *Candida utilis*. The growth medium was supplemented with 60 mM of glucose at T0 (▼) or not (▲). **(A)** Growth was followed for 8 hours. Results shown represent means of at least 15 separate experiments \pm SD. **(B)** The respiratory rate was followed for 8 h. Results shown represent means of at least 15 separate experiments \pm SD. **(C)** Glucose consumption (● *C. utilis*) or (\times *S. cerevisiae*) and ethanol production (● *C. utilis*) or (\times *S. cerevisiae*) were quantified. Results shown are means of at least four separate experiments \pm SD. **(D)** Cytochrome content was quantified every 2 h after glucose addition to the medium. Results shown represent means of at least five separate experiments \pm SD. **(E)** For each condition, growth was followed for 8 h in the presence or absence of Piericidin A (200 μ M). Results shown represent means of at least three separate experiments \pm SD.

addition did not change the proton pumping stoichiometry of the respiratory chain which could lead to an increase in oxidative phosphorylation efficiency. Indeed, glycolysis will generate NADH that is reoxidized at the level of complex I.

Since ATP/O is higher from complex I (2.5) than for all other dehydrogenases (1.5), one could imagine that glucose addition to these cells will increase oxidative phosphorylation efficiency (43–46). **Figure 6E** shows that the increase in growth rate assessed

upon glucose addition occurs in the absence of a functional complex I, eluding an eventual role of oxidative phosphorylation efficiency change in the growth rate increase.

There Is No Direct Link Between Oxidative Phosphorylation Repression and Cellular Growth Rate

Here, we developed a number of *S. cerevisiae* cellular models that allowed us to study the induction of the Warburg effect. As described above, these models exhibit various respiratory rate repression levels and various growth rates in the presence or absence of glucose. We calculated growth rates for every strain for the 4- to 8-h incubation time points since most changes in terms of growth and respiratory metabolism occur in the first 4 h. These growth rates were then plotted against the average respiratory rates for the same incubation time. This showed that there is not direct/simple link between oxidative phosphorylation repression and an increase in cell growth rate (data not shown but see results from **Figures 1, 3, SD1 & SD2**). Further, this occurs at a comparable coupling level between oxidation and phosphorylation at the level of the oxidative phosphorylation as shown by the constant ratio between spontaneous respiratory rate and non-phosphorylating respiratory rate (**Table 3**).

ATP Synthesis Flux Does Not Control Cellular Growth Rate

The behavior of the $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ strain that is not typical of a Warburg effect raises a number of questions. Indeed, one of the proposed functions of the Warburg effect is an increased ATP synthesis flux through glycolysis allowing for an increased growth. We thus calculated glycolytic flux in both the wild type and $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ strain (data from **Figures 1C, 5C**). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the end product of “aerobic glycolysis” as defined by Warburg -that is fermentation- is EtOH (lactate in mammalian cells). Glucose consumption flux and EtOH production rate in the wild type (WT) and $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ strains are presented in **Figures 7A,B**, respectively. Glucose consumption flux reached a stationary state after about 4 h for both strains and this flux in the $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ strain is lower than that of the wild type strain (**Figure 7A**). EtOH production flux reached a stationary state after about 4 h for both strains and this

flux in the $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ strain is lower than in the wild type strain (**Figure 7B**).

Upon fermentation, one mole of glucose allows for the production of two moles of EtOH. Since both glucose consumption flux and EtOH production flux are comparable in each strain after 4 h, only half the glucose is being fermented. Consequently, since 2 ATP are produced per fully metabolized glucose, under our conditions the glycolysis-linked ATP synthesis flux could be assimilated to EtOH production flux. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a proton pumping complex I (47, 48). Thus, electron transfer through that respiratory chain always involves two proton pumping sites, the efficiency of the oxidative phosphorylation is assumed to be constant and about 1.5 ATP produced per oxygen ($1/2 O_2$) consumed. Since we measured the respiratory rates of our strains throughout growth, we can estimate the ATP synthesis flux linked to mitochondrial oxidative phosphorylation. Mitochondria and glycolysis-derived ATP synthesis fluxes for the wild type and the mutant strains are presented in **Figures 8A,B**, respectively. In the wild type strain, upon glucose addition, a consequent decrease in mitochondria-linked ATP synthesis was associated with a concomitant increase in glycolysis-linked ATP synthesis (**Figure 8A**). In the $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$ strain, glucose addition only slightly decreases mitochondria-derived ATP synthesis and glycolysis-linked ATP synthesis only accounts for about 30% of the total flux (**Figure 8B**). More importantly, there is no clear link between growth rate and ATP synthesis, whichever the origin of the ATP (**Figure 8C**). Further, if one plots cell growth vs. the glucose consumption flux, again, there is no clear link between these two parameters (**Figure 8D**).

CONCLUSION

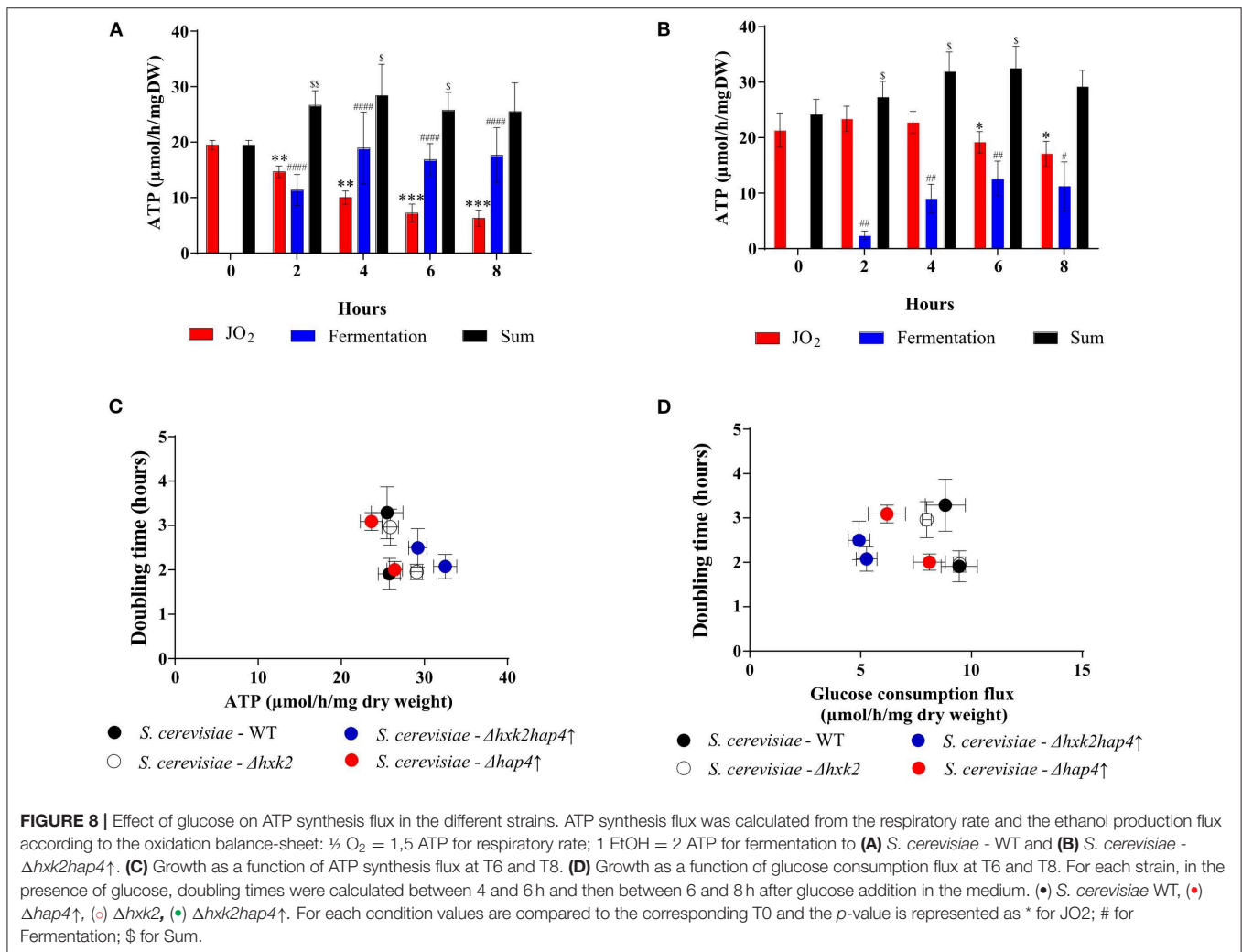
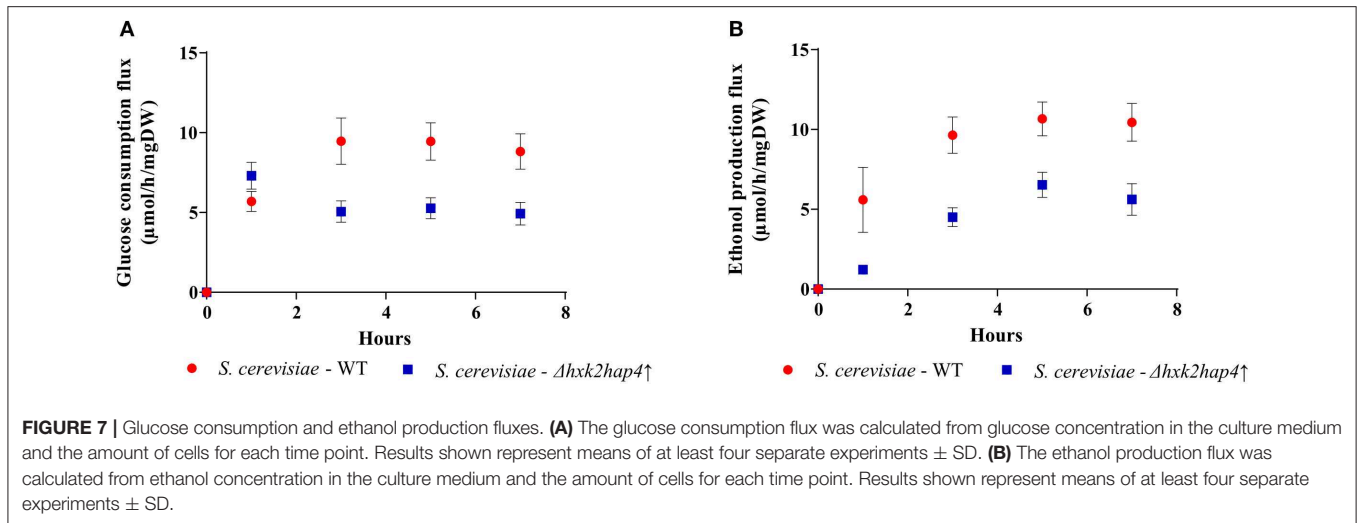
Throughout its history, the possible added value of the Warburg Effect has remained controversial and the potential function(s) of this energy metabolism rewiring remain(s) unclear. In this paper, we investigated the role of this rewiring in promoting cell growth and division. We made use of yeast to study the induction of the Warburg effect and its kinetics. Further, the use of mutants allowed us to further study the relationship between growth rate and the two pathways that support ATP synthesis namely glycolysis and oxidative phosphorylation. We show that yeast is a good model to study the Warburg effect, since all three parameters and their modulation by glucose can be reconstituted upon glucose addition to cells. Otto Warburg proposed that the decrease in oxidative phosphorylation activity was due to dysfunctional mitochondria. Here, we show that in our model upon induction of the Warburg effect, the decrease of mitochondrial oxidative phosphorylation is not due to dysfunctional mitochondria but to a decrease in mitochondrial biogenesis. Upon growth and while mitochondrial biogenesis is strongly decreased, mitochondria are diluted in the daughter cells. This result is in good agreement with a number of studies showing that mitochondrial are not dysfunctional in a number of cancer cells since their oxidative phosphorylation activity can be increased (4). However, this does not preclude that in

TABLE 3 | Spontaneous and non-phosphorylating respiratory rates in wild type and mutant cells.

Strains	JO ₂	JO ₂ -non phosphorylating	Ratio
<i>S. c</i> – WT	70 (± 4.5)	27 (± 0.8)****	2.59 (± 0.2)
<i>S. c</i> – $\Delta h x k 2$	91 (± 2.4)	36 (± 1.9)****	2.57 (± 0.4)
<i>S. c</i> – $\Delta h a p 4 \uparrow$	122 (± 5.3)	50 (± 0.4)****	2.52 (± 0.2)
<i>S. c</i> – $\Delta h x k 2 h a p 4 \uparrow$	192 (± 6.5)	73 (± 4.2)****	2.61 (± 0.2)
<i>C. u</i>	498 (± 14.6)	ND	ND

Respiratory rates were assessed after 8-h incubation in the presence of glucose. Non-phosphorylating respiratory rate was determined in the presence of 0.1 mM Triethyltin, an inhibitor of mitochondrial ATPsynthase.

ND, not determined.



some cases mitochondria cannot be dysfunctional since it has been shown that in some cancer cell line, succino-dehydrogenase was mutated and mostly inactive (49–52). The point here is

that there is no need for mitochondria to be dysfunctional to evidence a Warburg effect. We next investigated the link between oxidative phosphorylation repression and the increase

in growth rate. We were able to uncouple growth rate and oxidative phosphorylation repression by deleting Hxk2p and overexpressing Hap4p, indicating that both the maintenance of mitochondrial biogenesis and the loss of Hxk2 function are necessary for this uncoupling. Since glycolysis is maintained in $\Delta h x k 2$ cells, it is tempting to speculate that the transcription factor function of *h x k 2* is involved here. The use of mutant cells as well as Crabtree negative cells allowed us to show that there is no direct link between the decrease in oxidative phosphorylation activity and the increase in growth rate. Indeed, when oxidative phosphorylation activity is maintained upon glucose addition to cells there is a clear increase in growth rate, indicating no correlation between both parameters. This indicates that growth rate is not controlled by the modulation of energetic metabolism but rather depends on the presence of glucose. Whether glucose here acts as a signaling molecule or as a substrate of biosynthetic pathways remains to be determined. However, this is no easy task since it seems that in terms of fluxes, the flux through biosynthetic pathways is minor compared to the flux through glycolysis. Last, ATP synthesis fluxes in the presence of absence of a Warburg effect were calculated in our cellular models from fermentation and oxidative phosphorylation fluxes. We were able to show that ATP synthesis fluxes do not control cell growth. This experimental result is in accordance with previous calculations that suggest that the amount of ATP required for cell growth and division may be far lower than that required for basal cellular maintenance (53). Consequently, one can conclude that the growth-promoting role of the Warburg effect does not go through an increase in ATP synthesis fluxes.

In recent studies tumor energy metabolism has been assessed under more physiological concentrations of glucose and hypoxic conditions. It has been shown that lower mitochondrial biogenesis, deficient HIF-1 α /mutant p53 interaction, and development of a pseudohypoxic state under normoxia were the apparent biochemical mechanisms underlying glycolysis activation and OxPhos downregulation in HeLa-M cells (54). Further, decreasing glucose concentration down to 2.5 mM restrains the Warburg phenotype, in hypoxic HeLa cell cultures and microspheroids (55). This clearly indicates that both parameters are crucial for the study of the Warburg effect in mammalian cells and should be considered more often.

In this paper, we show that the cell energy metabolism reorganization observed upon de Warburg effect is not mandatory for an increase in cell growth. Further, maintenance of oxidative phosphorylation activity does not affect the glucose growth promoting effect that occurs at various glycolysis rate. Last, cell ATP synthesis flux is shown not to control the growth rate. A number of reports in human cancer cells have pointed out a quite variable mitochondrial content in these cells. Indeed, while some studies demonstrate a reduction of oxidative phosphorylation capacity in different types of cancer cells, other investigations revealed contradictory modifications with the upregulation of oxidative phosphorylation components and a larger dependency of cancer cells on oxidative energy substrates for anabolism and energy production (56). Studying these cells in terms of cell growth and ATP synthesis

flux in normoxia and normoglycemia would be of great interest to unravel the added value of the Warburg effect in cell proliferation.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets generated for this study are included in the article/**Supplementary Material**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

CB, NH, and SC designed and performed the experiments. CB, NH, SC, MR, SR, and AD analyzed the corresponding results. CB and NH wrote the paper with SR, MR, and AD. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

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, The ANR. This project has been funded with support of the European Commission. This publication reflects the view only of the authors, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to all members of the Cell Energetic Metabolism team for discussions and proofreading of this manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fonc.2020.01333/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Induction of the Warburg effect in *S. cerevisiae* $\Delta h x k 2$. The growth medium of *S. cerevisiae* was supplemented with 60 mM of glucose at T0 (■ $\Delta h x k 2$) and (x) WT or not (● $\Delta h x k 2$) and (+) WT. (A) Growth was followed for 8 h. Results shown are means of at least five separate experiments \pm SD. (B) The respiratory rate was followed for 8 h. Results shown represent means of at least five separate experiments \pm SD. (C) Glucose consumption (● $\Delta h x k 2$) or (x) WT and ethanol production (▲ $\Delta h x k 2$) or (x) WT were quantified. Results shown represent means of at least seven separate experiments \pm SD.

Supplementary Figure 2 | Induction of the Warburg effect in *S. cerevisiae* $\Delta h a p 4 \uparrow$. The growth medium of *S. cerevisiae* was supplemented with 60 mM of glucose at T0 (■ $\Delta h a p 4 \uparrow$) and (x) WT or not (● $\Delta h a p 4 \uparrow$) and (+) WT. (A) Growth was followed for 8 h. Results shown are means of at least five separate experiments \pm SD. (B) The respiratory rate was followed for 8 h. Results shown represent means of at least five separate experiments \pm SD. (C) Glucose consumption (● $\Delta h a p 4 \uparrow$) or (x) WT and ethanol production (▲ $\Delta h a p 4 \uparrow$) or (x) WT were quantified. Results shown represent means of at least seven separate experiments \pm SD.

REFERENCES

- Warburg O. The metabolism of carcinoma cells. *Cancer Res.* (1925) 9:148–63. doi: 10.1158/jcr.1925.148
- Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science.* (1956) 123:309–14. doi: 10.1126/science.123.3191.309
- Crabtree HG. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *Biochem J.* (1929) 23:536–45. doi: 10.1042/bj0230536
- Rosignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res.* (2004) 64:985–93. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-03-1101
- Rodríguez-Enriquez S, Gallardo-Perez JC, Marin-Hernandez A, Carreno-Fuentes L, Maldonado-Lagunas V, Moreno-Sanchez R. Energy metabolism transition in multi-cellular human tumor spheroids. *J Cell Physiol.* (2008) 216:189–97. doi: 10.1002/jcp.21392
- Smolková K, Bellance N, Scandurra F, Génot E, Gnaiger E, Plecita-Hlavata L, et al. Mitochondrial bioenergetic adaptations of breast cancer cells to aglycemia and hypoxia. *J Bioenerg Biomembr.* (2010) 42:55–67. doi: 10.1007/s10863-009-9267-x
- Moreno-Sanchez R, Rodríguez-Enriquez S, Marin-Hernandez A, Saavedra E. Energy metabolism in tumor cells. *FEBS J.* (2007) 274:1393–418. doi: 10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x
- Martin M, Beauvoit B, Voisin PJ, Canioni P, Guerin B, Rigoulet M. Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine. *J Bioenerg Biomembr.* (1998) 30:565–78. doi: 10.1023/A:1020584517588
- Guppy M, Leedman P, Zu X, Russell V. Contribution by different fuels and metabolic pathways to the total ATP turnover of proliferating MCF-7 breast cancer cells. *Biochem J.* (2002) 364:309–15. doi: 10.1042/bj3640309
- Pasdois P, Deveaud C, Voisin P, Bouchaud V, Rigoulet M, Beauvoit B. Contribution of the phosphorylatable complex i in the growth phase-dependent respiration of C6 glioma cells *in vitro*. *J Bioenerg Biomembr.* (2003) 35:439–50. doi: 10.1023/A:1027391831382
- Rodríguez-Enriquez S, Vital-González PA, Flores-Rodríguez FL, Marin-Hernández A, Ruiz-Azuara L, Moreno-Sánchez R. Control of cellular proliferation by modulation of oxidative phosphorylation in human and rodent fast-growing tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* (2006) 215:208–17. doi: 10.1016/j.taap.2006.02.005
- Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, Wergin MC, Verrax J, Rabbani ZN, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *J Clin Invest.* (2008) 118:3930–42. doi: 10.1172/JCI36843
- Diaz-Ruiz R, Avéret N, Araiza D, Pinson B, Uribe-Carvajal S, Devin A, et al. Mitochondrial oxidative phosphorylation is regulated by fructose 1,6-bisphosphate: a possible role in crabtree effect induction? *J Biol Chem.* (2008) 283:26948–55. doi: 10.1074/jbc.M800408200
- Lemus MR, Roussarie E, Hammad N, Mougeolle A, Ransac S, Issa R, et al. The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the crabtree effect. *J Biol Chem.* (2018) 293:12843–54. doi: 10.1074/jbc.RA118.003672
- Locasale JW, Cantley LC. Review metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth. *Cell Metab.* (2011) 14:443–51. doi: 10.1016/j.cmet.2011.07.014
- Lunt SY, Vander Heiden MG. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* (2011) 27:441–64. doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237
- Wu W, Zhao S. Metabolic changes in cancer: beyond the warburg effect. *Acta Biochim Biophys Sin.* (2013) 45:18–26. doi: 10.1093/abbs/gms104
- Diaz-ruiz R, Uribe-carvajal S, Devin A, Rigoulet M. Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism. *BBA - Rev Cancer.* (2009) 1796:252–65. doi: 10.1016/j.bbcan.2009.07.003
- Diaz-Ruiz R, Rigoulet M, Devin A. The warburg and crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* (2011) 1807:568–76. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.010
- Gari E, Piedrafita L, Aldea M, Herrero E. A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* (1997) 13:837–48. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<837::AID-YEA145>3.0.CO;2-T
- Chevtzoff C, Yoboue ED, Galinier A, Casteilla L, Daignan-Fornier B, Rigoulet M, et al. Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* (2010) 285:1733–42. doi: 10.1074/jbc.M109.019570
- Beauvoit B, Rigoulet M, Bunoust O, Raffard G, Canioni P, Guérin B. Interactions between glucose metabolism and oxidative phosphorylations on respiratory-competent *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Eur J Biochem.* (1993) 214:163–72. doi: 10.1111/j.1432-1033.1993.tb17909.x
- Dejean L, Beauvoit B, Guérin B, Rigoulet M. Growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* on a non-fermentable substrate: Control of energetic yield by the amount of mitochondria. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* (2000) 1457:45–56. doi: 10.1016/S0005-2728(00)00053-0
- Laemmler UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* (1970) 227:680–5. doi: 10.1038/227680a0
- Warburg O. On respiratory impairment in cancer cells. *Science.* (1956) 124:269–70.
- Rickey TM, Lewin AS. Extramitochondrial citrate synthase activity in bakers' yeast. *Mol Cell Biol.* (1986) 6:488–93. doi: 10.1128/MCB.6.2.488
- Lewin AS, Hines V, Small GM. Citrate synthase encoded by the CIT2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal. *Mol Cell Biol.* (1990) 10:1399–405. doi: 10.1128/MCB.10.4.1399
- Van Rossum HM, Kozak BU, Niemeijer MS, Duine HJ, Luttk MAH, Boer VM, et al. Alternative reactions at the interface of glycolysis and citric acid cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* (2016) 16:1–13. doi: 10.1093/femsyr/fow017
- Olesen J, Hahn S, Guarente L. Yeast HAP2 and HAP3 activators both bind to the CYC1 upstream activation site, UAS2, in an interdependent manner. *Cell.* (1987) 51:953–61. doi: 10.1016/0092-8674(87)90582-4
- Forsburg SL, Guarente L. Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the CYC1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a HAP2-HAP3-responsive site. *Mol Cell Biol.* (1988) 8:647–54. doi: 10.1128/MCB.8.2.647
- Hahn S, Pinkham J, Wei R, Miller R, Guarente L. The HAP3 regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts. *Mol Cell Biol.* (1988) 8:655–63. doi: 10.1128/MCB.8.2.655
- Lascaris R, Bussemaker HJ, Boorsma A, Piper M, van der Spek H, Grivell L, et al. Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol.* (2003) 4:R3. doi: 10.1186/gb-2002-4-1-r3
- Dang V-D, Valens M, Bolotin-Fukuhara M, Daignan-Fornier B. A Genetic screen to isolate genes regulated by the yeast CCAAT-box binding protein Hap2p. *Yeast.* (1994) 10:1273–83. doi: 10.1002/yea.320101004
- Fondrat C, Kalogeropoulos A. Approaching the function of new genes by detection of their potential upstream activation sequences in *Saccharomyces cerevisiae*: application to chromosome III. *Curr Genet.* (1994) 25:396–406. doi: 10.1007/BF00351777
- Buschlen S, Amillet JM, Guiard B, Fournier A, Marcireau C, Bolotin-Fukuhara M. The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comp Funct Genomics.* (2003) 4:37–46. doi: 10.1002/cfg.254
- Randez-gil F, Sanz P, Entian K, Prieto JA. Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Mol Cell Biol.* (1998) 18:2940–8. doi: 10.1128/MCB.18.5.2940
- Rodríguez A, de la Cera T, Herrero P, Moreno F. HXK2 genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* (2001) 355:625–31. doi: 10.1042/bj3550625
- Ahuatzi D, Herrero P, Cera T, Moreno F. The glucose-regulated nuclear localization of hexokinase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* is mig1-dependent. *J Biol Chem.* (2004) 279:14440–6. doi: 10.1074/jbc.M313431200
- Ahuatzi D, Riera A, Pela R, Herrero P, Moreno F. Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J Biol Chem.* (2007) 282:4485–93. doi: 10.1074/jbc.M606854200
- Ohnishi T. Factors controlling the occurrence of site i phosphorylation in *C. Utilis* mitochondria. *FEBS Lett.* (1972) 24:305–9. doi: 10.1016/0014-5793(72)80378-8

41. Coles CJ, Gutman M, Singer TP. On the reaction of piericidin A with the reduced nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase of *Candida utilis*. *J Biol Chem.* (1974) 249:3814–8.
42. Avéret N, Jobin ML, Devin A, Rigoulet M. Proton pumping complex I increases growth yield in *Candida utilis*. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg.* (2015) 1847:1320–6. doi: 10.1016/j.bbabi.2015.07.001
43. Duszynski J, Bogucka K, Letko G, Kuster U, Kunz W, Wojtczak L. Relationship between the energy cost of Atp transport and Atp synthesis in mitochondria. *BBA - Bioenerg.* (1981) 637:217–23. doi: 10.1016/0005-2728(81)90160-2
44. Stoner CD. Determination of the P/2e- stoichiometries at the individual coupling sites in mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem.* (1987) 262:10445–53.
45. Fitton V, Rigoulet M, Ouhabi R, Guérin B. Mechanistic stoichiometry of yeast mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochemistry.* (1994) 33:9692–8. doi: 10.1021/bi00198a039
46. Ouhabi R, Boue-Grabot M, Mazat J-P. Mitochondrial ATP synthesis in permeabilized cells : assessment of the ATP/O values *in Situ*. *Anal Biochem.* (1998) 263:169–75. doi: 10.1006/abio.1998.2776
47. Nosek J, Fukuhara H. NADH dehydrogenase subunit genes in the mitochondrial DNA of yeasts. *J Bacteriol.* (1994) 176:5622–30. doi: 10.1128/JB.176.18.5622-5630.1994
48. Friedrich T, Steinmtiller K, Weiss H. The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue in chloroplasts. *FEBS Lett.* (1995) 367:107–11. doi: 10.1016/0014-5793(95)00548-N
49. Italiano A, Chen C, Sung Y, Singer S, DeMatteo RP, LaQuaglia MP, et al. SDHA loss of function mutations in a subset of young adult wild-type gastrointestinal stromal tumors. *BMC Cancer.* (2012) 12:1–7. doi: 10.1186/1471-2407-12-408
50. Comono-Méndez I, de Cubas AA, Bernal C, Alvarez-Escola C, Sanchez-Malo C, Ramirez-Tortosa CL, et al. Tumoral EPAS1 (HIF2A) mutations explain sporadic pheochromocytoma and paraganglioma in the absence of erythrocytosis. *Hum Mol Genet.* (2013) 22:2169–76. doi: 10.1093/hmg/ddt069
51. Clark GR, Sciacovelli M, Gaude E, Walsh DM, Kirby G, Simpson MA, et al. Mutations presenting with pheochromocytoma. *JCEM.* (2014) 99:2046–50. doi: 10.1210/jc.2014-1659
52. Tsai T-H, Lee W-Y. Succinate dehydrogenase – deficient renal cell. *Arch Pathol Lab Med.* (2019) 143:643–7. doi: 10.5858/arpa.2018-0024-RS
53. Kilburn DG, Lilly MD, Webb FC. The energetics of mammalian cell growth. *J Cell Sci.* (1969) 4:645–54.
54. Hernández-Reséndiz I, Gallardo-Pérez JC, Lopez-Macay A, Robledo-Cadena DX, Garcia-Villa E, Gariglio P, et al. Mutant p53 R248Q downregulates oxidative phosphorylation and upregulates glycolysis under normoxia and hypoxia in human cervix cancer cells. *J Cell Physiol.* (2019) 234:5524–36. doi: 10.1002/jcp.27354
55. Marin-Hernandez A, Gallardo-Pérez JC, Hernández-Reséndiz I, Del Mazo-Monsalvo I, Robledo-Cadena DX, Moreno-Sanchez R, et al. Hypoglycemia enhances epithelial-mesenchymal transition and invasiveness, and restrains the warburg phenotype, in hypoxic HeLa cell cultures and microspheroids. *J Cell Physiol.* (2017) 232:1346–59. doi: 10.1002/jcp.25617
56. Jose C, Bellance N, Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation : A tumor' s dilemma? *BBA - Bioenerg.* (2011) 1807:552–61. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.10.012

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bouchez, Hammad, Cuvellier, Ransac, Rigoulet and Devin. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Review

Mitochondrial Biogenesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS): A Complex Relationship Regulated by the cAMP/PKA Signaling Pathway

Cyrielle Bouchez ^{1,2} and Anne Devin ^{1,2,*}

¹ Université Bordeaux, IBGC, UMR 5095, Bordeaux cedex 33077, France; cyrielle.bouchez@ibgc.cnrs.fr

² Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, CNRS UMR 5095, 1, rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux Cedex, France

* Correspondence: anne.devin@ibgc.cnrs.fr; Tel.: +33-556-999-035; Fax: +33-556-999-040

Received: 28 February 2019; Accepted: 20 March 2019; Published: date

Abstract: Mitochondrial biogenesis is a complex process. It requires the contribution of both the nuclear and the mitochondrial genomes and therefore cross talk between the nucleus and mitochondria. Cellular energy demand can vary by great length and it is now well known that one way to adjust adenosine triphosphate (ATP) synthesis to energy demand is through modulation of mitochondrial content in eukaryotes. The knowledge of actors and signals regulating mitochondrial biogenesis is thus of high importance. Here, we review the regulation of mitochondrial biogenesis both in yeast and in mammalian cells through mitochondrial reactive oxygen species.

Keywords: mitochondrial biogenesis; ROS; cAMP signaling; yeast

1. Introduction

1.1. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation

In eukaryotic cells, energy conversion processes are mandatory for both cell biomass generation and cellular maintenance. Adenosine triphosphate (ATP) is the cellular energy currency, and mitochondria play a crucial role in ATP synthesis thanks to the oxidative phosphorylation system (OXPHOS) located in the mitochondrial inner membrane. The oxidative part of this energy conversion process takes place in the four enzymatic complexes of the mitochondrial respiratory chain and leads to substrates—nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH₂)—oxidation. Activity of the respiratory chain is based on the transfer of two electrons from above-mentioned substrates to their final acceptor, the dioxygen. These redox reactions are coupled to proton extrusion at the level of complexes I, III, and IV in mammalian cells (Figure 1A); thus, thanks to the inner mitochondrial membrane being quite impermeable, a proton gradient is generated across this membrane. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria do not harbor a proton-pumping complex I but rather a number of dehydrogenases (Figure 1B) in the inner mitochondrial membrane [1]. The phosphorylating part of this process involves the ATP synthase, the adenine nucleotide translocator (ANT), and the phosphate carrier. The proton gradient generated by the mitochondrial respiratory chain activity is used by the ATP synthase for ATP synthesis from ADP and Pi and by a number of mitochondrial carriers.

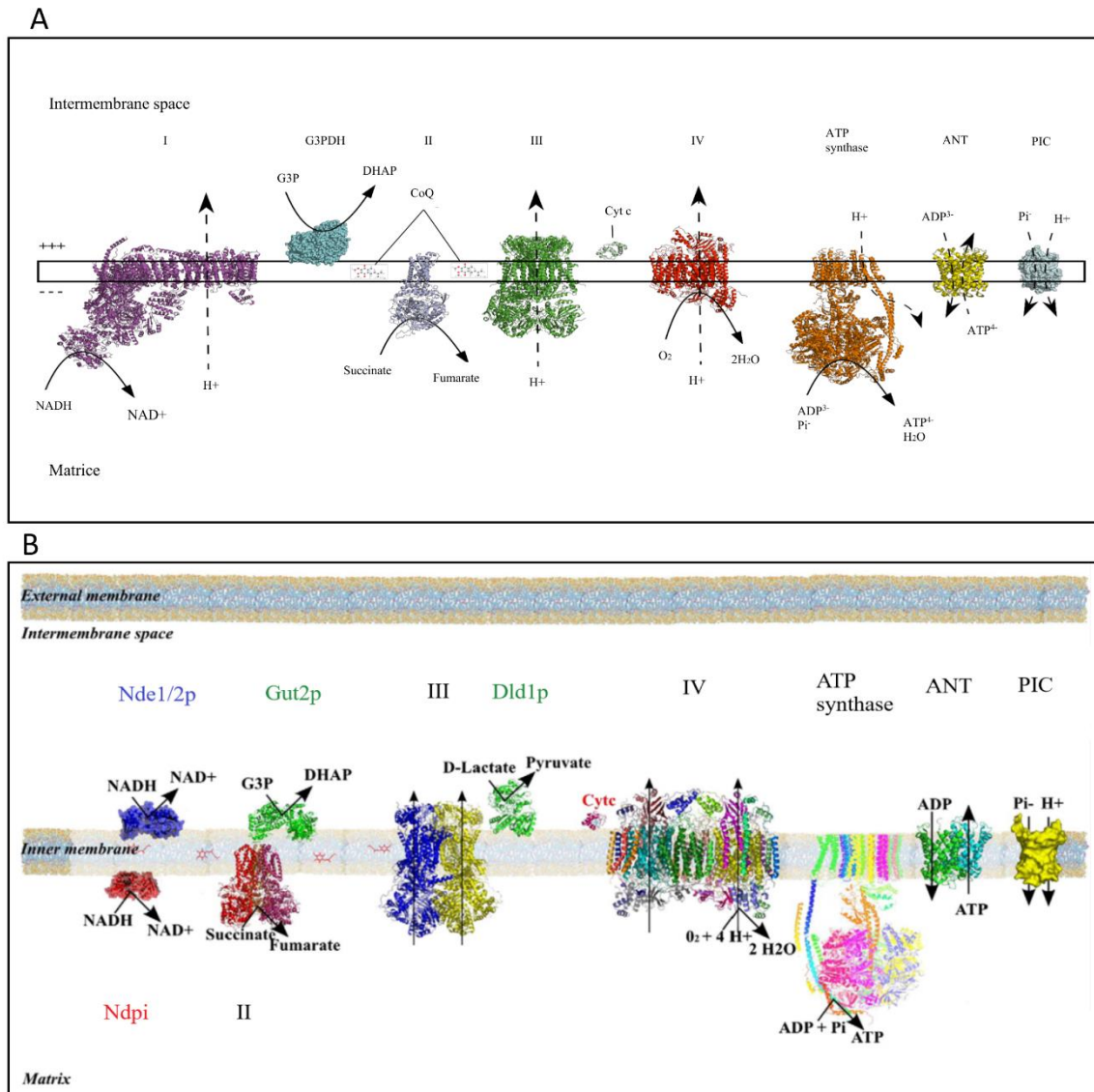


Figure 1. The oxidative phosphorylation system (OXPHOS) system in mammalian cells (**A**) and in yeast (**B**) (modified from Rigoulet et al. 2010 [2]). Numbers represent respiratory chain complexes. I: proton-pumping nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase, II: Succinate dehydrogenase; III: Cytochrome c reductase; IV: Cytochrome c oxidase. Adenine nucleotide translocator (ANT) and Phosphate inorganic carrier are mitochondrial carriers. Gut2p is the glycerol-3-phosphate dehydrogenase in yeast. Dld1p is the lactate dehydrogenase in yeast.

1.2. Mitochondrial ROS Production

The main superoxide ($O_2^{\cdot-}$) producer in the cell is the mitochondrial respiratory chain. This production leads to hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical ($\cdot HO$) formation. Superoxide formation occurs when a unique electron is accepted by the ground state oxygen. Consequently, any electron transfer that involves a unique electron is susceptible of superoxide generation. This is particularly true in membranes, where oxygen solubility is high. The respiratory chain complexes I and III have long been studied for their contribution to mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production [3–8]. In complex III, superoxide formation is due to the Q cycle [9], and ROS production can take place both in the mitochondrial matrix and in the intermembrane space. Besides the contribution of these complexes to mitochondrial ROS production, mitochondrial dehydrogenases are involved in ROS formation as well. For example, α -ketoglutarate dehydrogenase catalyses the oxidation of α -ketoglutarate in succinyl-coA with the generation of NADH. Single electron transfer occurs within this enzyme, and its activity can thus be associated with ROS production in the Krebs

cycle [10]. For the same reason, the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) produces ROS [11,12]. As stated above, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* harbors two NADH-dehydrogenases, which are sites of ROS production as well.

In this review, we will address the relationships between mitochondrial ROS production and the regulation of mitochondrial biogenesis (i.e., the biogenesis of the whole compartment and more particularly of the OXPHOS system) both in yeast and in mammalian cells.

2. Mitochondrial Compartment Biogenesis

Mitochondrial biogenesis is a complex process. Indeed, mitochondria are organelles that harbor their own genome (mtDNA). In mammalian cells, mtDNA is a circular molecule, which encodes for 13 mRNAs, 22 tRNAs, and 2 rRNAs. All 13 mRNAs of mtDNA encode 11 subunits of the ETC complexes I (7), III (1) and IV (3), and 2 subunits of ATP synthase (complex V). However, mitochondria are genetically semiautonomous and strongly rely on the nuclear genome for their biological function. Thus, mitochondrial biogenesis necessitates the coordinated expression of both mitochondrial and nuclear genomes.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (Figure 2), mitochondrial biogenesis is regulated at the transcriptional level, by nuclear proteins. The main actor of this process is a transcription complex composed of four proteins that belong to the same family: heme activator proteins (Hap) 2, 3, 4, and 5 [13–17]. Hap2p, Hap3p, and Hap5p form a complex that is bound to nuclear DNA, and Hap4p is the co-activator of this complex, a functional homolog of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator-1 (PGC-1 α , see below). Hence, activity of the overall complex is mostly dependent on Hap4p. The HAP complex regulates the expression of genes encoding several proteins such as proteins of the Krebs cycle or proteins of the OXPHOS system [18]. Mitochondrial genes expression depends on the RNA polymerase Rpo41 and its accessory transcription factor Mtf1 [19]. mRNA translation is regulated by specific translation factors such as Pet111 for COX2, Pet309 or Mss51 for COX1, and Atp22 for ATP6/8 [20]. These factors regulate protein synthesis, assembly, and function [21,22]. The homologue of the well-known mammalian transcription factor, the mitochondrial transcription factor A (TFAM), does not interact with the transcriptional machinery but seems to be implicated in mtDNA replication [23].

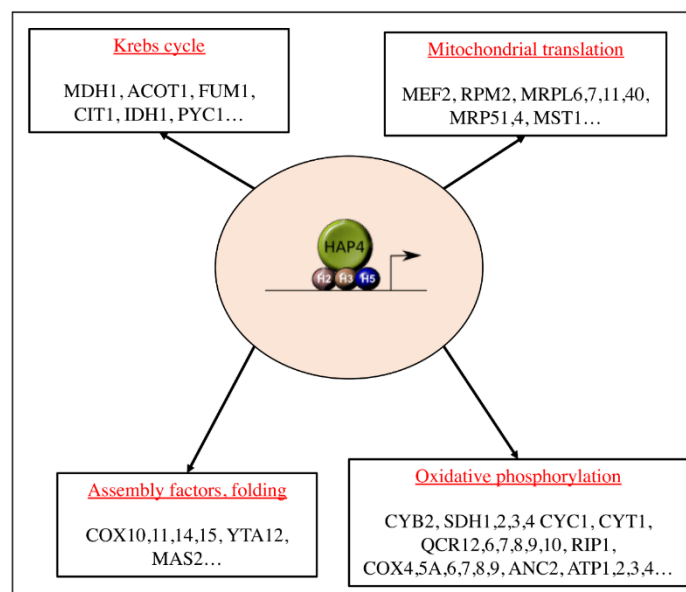


Figure 2. The heme activator proteins (HAP) complex. The master regulator of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. The four subunits constituting the complex are represented here, HAP2 (H2), HAP3 (H3), and HAP5 (H5) are the DNA-binding subunits and HAP4 is the activating subunit. Modified from [24].

In mammalian cells (Figure 3), the main actors of mitochondrial biogenesis are the Nuclear Respiratory Factors (NRF), in particular NRF1 [25,26]. The NRF transcription factors are known to be involved in the transcription of several mitochondrial genes in particular genes encoding subunits of the mitochondrial respiratory chain complexes. Moreover, mitochondrial biogenesis is also regulated by the transcriptional family of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) coactivator-1 (PGC-1). This family is composed of PGC-1 α , PGC-1-related coactivators (PRC), and PGC-1 β . These proteins can interact with other transcription factors involved in the expression of mitochondrial proteins. Moreover, PGC-1 transcription factors activators interact with transcription factors such as NRF1 and 2 and regulate the expression of these proteins. These nuclear transcription factors regulate the transcription of the majority of mitochondrial proteins, including proteins that are required for the transcription of the mitochondrial genome such as TFAM (or mtTFA). The mtDNA encodes 13 components of OXPHOS system complexes: ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 (subunits of complex I); CYTb (subunit of complex III); COX1, COX2, COX3 (subunits of complex IV); ATP6, ATP8 (subunits of ATPsynthase) [27]; as well as 22 tRNA and 2rRNA [28].

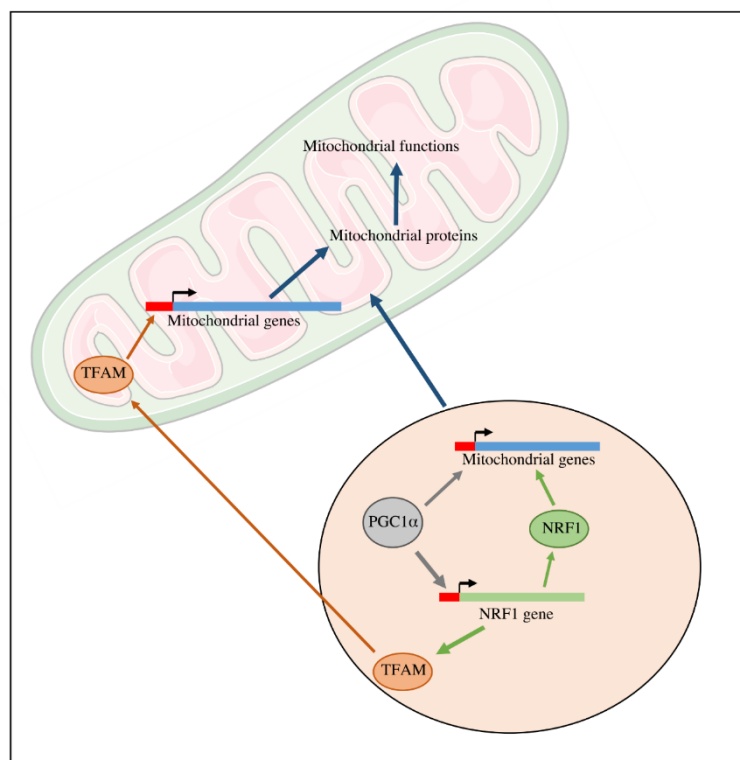


Figure 3. Transcriptional regulation of mitochondrial biogenesis. The expression of mitochondrial genes encoded by the nuclear genome is regulated by transcriptional factors such as NRF1 and its coactivator PGC1 α . TFAM is implicated in the expression of the genes encoded by the mtDNA.

3. ROS-Induced Downregulation of Mitochondrial Biogenesis in Yeast

3.1. cAMP Signaling and Mitochondrial Biogenesis

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the cyclic adenosine monophosphate (cAMP) signaling pathway can be activated by two distinct mechanisms. The first one is an extracellular glucose dependent system based on G-protein-coupled glucose receptor (Gpr1) activity. This G-protein-coupled receptor (GPCR) system activates adenylate cyclase, i.e., the enzyme that catalyses cAMP synthesis, which leads to an increase in intracellular cAMP [29]. The second one depends on the activity of the small RAS proteins regardless of the carbon source present in the medium [29]. These proteins belong to the small guanosine triphosphatases (GTPases) family, therefore their activity depends on GTP/GDP exchange. Yeast exhibits two Ras isoforms: Ras1 and Ras2, highly homologous

to mammalian RAS. The adenylate cyclase is activated by RAS-GTP. Yeast protein kinase A (PKA) is a hetero-tetramer composed of two regulatory subunits and two catalytic subunits. The catalytic subunits are encoded by three genes: Tpk1, Tpk2, and Tpk3 [30], and the regulatory subunit is encoded by the Bcy1 (bypass of cAMP requirement) gene [31] (Figure 4).

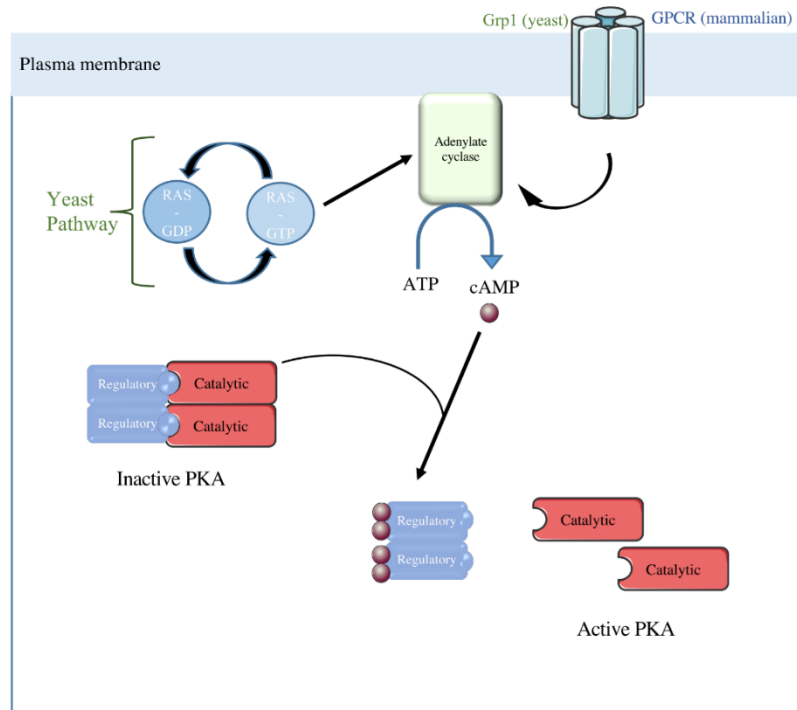


Figure 4. The Ras-cAMP/PKA Pathway in yeast and mammalian cells. In yeast, adenylate cyclase can be activated by two systems: Grp1 or the RAS pathway. In mammalian cells, adenylate cyclase activity is controlled by GPCR. cAMP synthesized by the adenylate cyclase binds to PKA regulatory subunits leading to the activation of the PKA catalytic subunit thanks to its dissociation from its regulatory subunits.

Previous work from our laboratory has shown a tight link between the activity of this signaling pathway and the cellular content in mitochondria [24,32–35]. It should be stressed here that throughout this review, mitochondrial content will refer to the cellular amount of mitochondrial cytochromes, a robust parameter that allows cellular quantitation of mitochondrial respiratory chain amount [36]. Whenever such a quantitation is not doable, more often than not by restriction on available “material”, cellular mitochondrial content is assessed by citrate synthase activity measurement, a well-recognized method for such a quantitation [37–39]. The relationship between the activity of this signaling pathway and the cellular content in mitochondria is such that mutants exhibiting an increase in this pathways’ activity have an increased amount of mitochondria, whereas mutants exhibiting a decrease in this pathways’ activity have a decreased amount of mitochondria. Indeed, Dejean et al. showed that a disruption of the small GTPases or their inhibitors, IRA1 and IRA2 (Inhibitory Regulator of the RAS-cAMP pathway 1 and 2), triggers a reduction in cellular mitochondrial content, whereas an over-activation of these GTPases increases this content [40]. Moreover, in an OL556 strain, which is mutated in the *cdc25* gene and the *rca1* allele of the PDE2 gene [41,42], allowing modulation of cAMP intracellular concentration by addition in the extracellular medium, the increase in intracellular cAMP concentration increases both the growth and respiration rate, in non-fermentable medium [43]. In such a medium, growth is directly dependent on ATP production by the OXPHOS [36]. Thus, an increase in both growth and respiratory rate points to an increase in mitochondrial OXPHOS activity. Moreover, we have shown that an increase in intracellular cAMP concentration induces an increase in both mitochondrial enzyme activities and

mitochondrial cytochromes. This raised the question of the origin of the increase (or decrease) in cellular mitochondrial content upon cAMP signaling. Stationary state mitochondrial content is the result of two processes: its biogenesis and its degradation. Since no mitophagy (degradation) could be assessed, we assessed the regulation of mitochondrial biogenesis (activity of the HAP complex) when cAMP intracellular concentration was modulated (OL556 strain, see above). Exogenous cAMP addition to this strain increases HAP complex activity and thus mitochondrial biogenesis. cAMP triggers an enhancement of Hap4p stability, the regulator of the HAP complex [32]. Consequently, an increase in the cAMP pathway activity positively regulates mitochondrial biogenesis.

3.2. cAMP Signaling and Oxidative Stress

As stipulated above, previous work from our laboratory has shown a tight link between the activity of the cAMP signaling pathway and the cellular content in mitochondria. This was done through modulation of the activity of this pathway upstream of the PKA. Yeast has three A kinase catalytic subunits, which have greater than 75% identity and are encoded by the TPK (TPK1, TPK2, and TPK3) genes [30]. Although they are redundant for viability and functions such as glycogen storage regulation, the three A kinases are not redundant for other functions [44–47]. In the absence of the yeast protein kinase Tpk3p, there is a significant decrease in cellular mitochondrial content, when cells are grown in non-fermentable medium whereas deletion of either Tpk1 or Tpk2 has no consequences on mitochondrial activity/amount [47]. This points to a specific function of Tpk3p in the regulation of cellular mitochondrial content. Further studies allowed us to show that the downregulation of mitochondrial content in the absence of Tpk3p is due to an oxidative stress that originates at the mitochondrial level [47]. Moreover, reconstitution of cAMP-induced signaling on isolated mitochondria allowed us to show that Tpk3p-induced phosphorylation was involved in the regulation of mitochondrial ROS production i.e., in the absence of Tpk3p, mitochondrial ROS were increased [33]. Thus, an alteration of the cAMP pathway through *Tpk3* deletion induces a mitochondrial oxidative stress. It should be stressed that in this model, the priming event is the increase in mitochondrial ROS due to a defect in Tpk3p-induced phosphorylation at the level of mitochondrial respiratory chain. This increase then leads to a decrease in mitochondrial biogenesis.

3.3. Oxidative Stress and Mitochondrial Biogenesis Regulation

In order to decipher the molecular mechanisms involved in the decrease of cellular mitochondria content upon oxidative stress in the Δ tpk3 strain, regulation of mitochondrial biogenesis in this strain was studied. Enhancement of ROS production in this strain triggers a decrease in the HAP complex activity that correlates with a decrease in the cellular amount of the Hap4p protein, the co-activator of the HAP complex (Figure 5). Evidence that the decrease in mitochondrial biogenesis originates in Hap4p decrease came from a full reversion of this decrease upon overexpression of this protein [33]. Further, it was shown that this protein's stability is highly decreased upon any kind of oxidative stress applied to cells [34]. Evidence that Δ tpk3-induced mitochondrial ROS were responsible for the decrease came from the restoration of a wild type phenotype (activity of the complex, stability of Hap4p, mitochondrial content) in the presence of an antioxidant (N-acetyl cystein or NAC) or overexpression of superoxide dismutase (SOD1) [33]. Thus, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, mitochondrial ROS are able to down-regulate mitochondrial biogenesis.

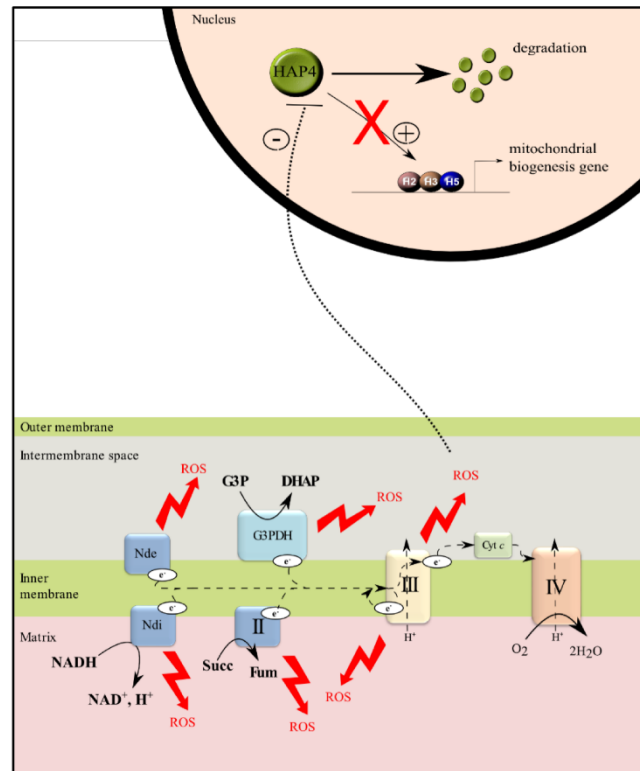


Figure 5. Regulation of mitochondrial biogenesis by mitochondrial reactive oxygen species (ROS) in *Saccharomyces cerevisiae*. All dehydrogenases are able to generate ROS. Mitochondrial ROS production induces an enhancement of HAP4 degradation and consequently a decrease in mitochondrial biogenesis.

3.4. The Role of Glutathione in ROS-Induced Down-Regulation of Mitochondrial Biogenesis

One of the best indicators of the cellular redox state is the glutathione [48]. Indeed, the glutathione has a high concentration in the cytoplasm (of the order of 1mM) and the GSSG/GSH couple has a very high redox potential. Therefore, glutathione is considered one of the main cellular redox buffer [48]. The glutathione redox state is mostly maintained within the cell thanks to the glutathione reductase (GLR1), which reduces back the oxidized form (GSSG). Consequently, the glutathione redox state is decreased, i.e., more oxidized, in the null mutant for this enzyme. Even though this mutant is sensitive to oxidative stress [49], it is perfectly viable and the glutathione redox state can be increased in the mutant by addition of exogenous reduced glutathione to the culture medium [50]. We were able to show that the amount of transcription co-activator Hap4p (and consequently mitochondrial biogenesis) was decreased in the $\Delta glr1$ strain and its amount increased back when reduced glutathione was added to the culture medium, whereas ascorbate and lipoate had no effect on Hap4p amount either in the wild type cells or in the $\Delta glr1$ cells [32]. This supports a specific role of the glutathione redox state in the control of the biogenesis of the mitochondrial compartment through Hap4p.

4. ROS and Its Regulation of Mitochondrial Biogenesis in Mammalian Cells

4.1. Cellular cAMP Signaling and Mitochondrial Biogenesis

In mammalian cells, the consequences of the cAMP/PKA pathway signaling at the mitochondrial level has been very much studied and led to the discovery of a PKA and sAC (soluble adenylate cyclase) in the mitochondrial matrix [51,52] (Figure 6). It has been shown that induction of this mitochondrial matrix signaling pathway led to an increase of OXPHOS activity [53,54]. Intramitochondrial cAMP has been shown to regulate cytochrome c oxidase (complex IV). Indeed,

cAMP/PKA-induced phosphorylation of complex IV subunit IV induces an increase in complex IV activity [55,56]. Moreover, PKA-dependent phosphorylation of several subunits of complex I appears to be involved in the assembly and enzymatic activity of this complex [57].

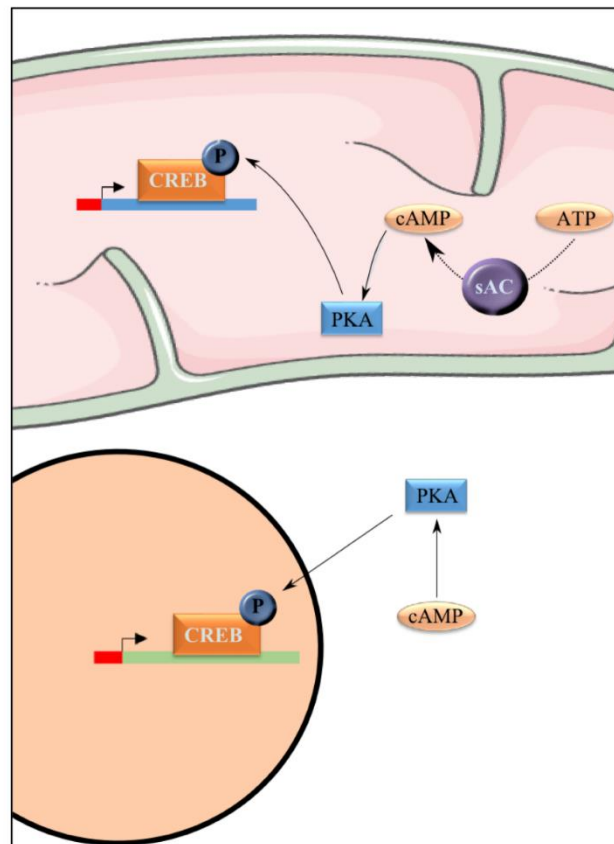


Figure 6. PKA activates CREB. PKA is able to phosphorylate cAMP response element binding protein (CREB) and consequently activates this transcription co-factor. CREB is present in the nucleus and in the mitochondria.

Beyond sAC and mitochondrial cAMP production, the cAMP/PKA pathway signaling regulates mitochondrial responses to cellular stimulations through cytosolic PKA. Upon signaling, PKA is mostly localized within membranes: both plasma and organelles membranes; of interest here is its localization in the mitochondrial membrane. This membranal localization requires an interaction with A-kinase anchor proteins (AKAP) [58,59]. In mitochondria, AKAPs are present in the outer membrane [60]. These anchor proteins tether PKA near cAMP production sites and PKA targets. This enhances cAMP transduction signal in apoptotic inhibition [61] and mitochondrial dynamics mechanisms [62] for example. Moreover, it has been shown that the cAMP/PKA pathway via the AKAPs can regulate the OXPHOS activity. PKA can phosphorylate a subunit of complex I, NDUFS4, which triggers its mitochondrial localization and a functional assembly of complex I [62,63]. On the other hand, in the presence of a high ATP/ADP ratio, PKA phosphorylates COX and promotes its inhibition by ATP. This allows a decrease in membrane potential and consequently in ROS production [64].

At the nuclear level, PKA phosphorylates and consequently activates cAMP response element binding protein (CREB), a transcriptional co-factor whose binding sequence is present on several promoters (Figure 6). Once activated, it initiates transcriptional cascades involved in multiple mechanisms such as mitochondrial biogenesis [65,66]. Indeed, the PGC-1 α promotor as well as some mitochondrial genes, such as ND2, ND4, and ND5, encoding complex I subunits, have a CREB binding sequence [65]. Hence, activation of the cAMP pathway not only leads to mitochondrial biogenesis but also increases mitochondrial activities that are regulated by PKA induced

phosphorylation [67]. An alteration of this pathway induces alterations of both mitochondrial respiration and ATP synthesis and enhancement of ROS production, that can be restored with restoration of the pathway [68].

It should be stressed here that CREB is a nuclear transcription factor that is able to localize in the mitochondria [69]. Indeed, despite the absence of mitochondrial localization signals on CREB, this transcription factor gets imported into mitochondria through the TOM complex in a membrane potential-dependent manner with the aid of mitochondrial matrix-residing heat shock protein, mtHSP70 [65]. Moreover, chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay have evidenced CREB-binding sites on the D-loop of mitochondrial genome [70]. In order to decipher an eventual role of mitochondrial imported CREB, this transcription factor was depleted within the mitochondria. Such a depletion induced a decrease in the expression of several mitochondria-encoded RNAs of complex I with a concomitant reduction in complex I activity [65].

Mitochondrial dynamics (fission/fusion) and mtDNA maintenance are also essential for mitochondrial biogenesis. It has been shown that the cAMP/PKA pathway regulates mitochondrial dynamics thanks to PKA-induced DRP1 phosphorylation [71]. However, to date, very few data are available on the role of cAMP/PKA signaling on the molecular players of mitochondrial fusion. PKA can phosphorylate Mfn2, leading to cell growth arrest in rat vascular smooth muscle cells [72]. The relationships between cAMP signaling and mitochondrial dynamics have been reviewed in [73].

4.2. cAMP Signaling and Oxidative Stress

As stipulated above, the activities of at least two complexes of the respiratory chain have been shown to be regulated by cAMP-induced phosphorylation [57]. Such a regulation has consequences on mitochondrial ROS production that are highly dependent on both mitochondrial respiratory chain activity and the proton motive force across the mitochondrial membrane. Papa and his team showed that mitochondrial ROS production is enhanced under serum-limitation conditions in human and murine cells. This can be limited by addition of dibutyryl cAMP to the cells, a permeant derivative of cAMP that is able to activate PKA [74]. Moreover, in these conditions, cAMP has been shown to stimulate complex I activity and consequently mitochondrial respiratory chain activity [75]. Further studies have shown that in cancer cells (K-ras-transformed mouse fibroblast cells as well as in breast cancer cells), the cAMP/PKA pathway is altered [68]. This alteration is associated to an increase in ROS production and an alteration of mitochondrial activity. Moreover, the team of Papa showed that, in these different cell lines, Forskolin addition, an activator of AC, induces an increase in cellular cAMP level. This triggers an activation of the cAMP/PKA signaling pathway and consequently an increase in CREB phosphorylation and an enhancement in mitochondrial activity associated to a decrease in mitochondrial ROS [68]. Hence, cAMP pathway activation led to a decrease in mitochondrial ROS production.

These results clearly show that, similarly to what has been shown in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a defect in the cAMP/PKA-induced phosphorylation of complexes of the respiratory chain leads to an increase in the oxidative stress at the mitochondrial level.

However, conflicting results regarding mitochondrial ROS production and the cAMP/PKA signaling pathway have been published. Indeed, a study by Westerblad and his team has shown that application of forskolin increases mitochondrial ROS production in isolated cardiomyocytes. Moreover, this increase in mitochondrial ROS can be prevented by PKA inhibitor pre-treatment [76], clearly showing it requires PKA activity. This result was further confirmed by Zhang et al. who showed that after an isoproterenol stimulation (that induces cAMP/PKA signaling) or forskolin treatment, mitochondrial ROS production is enhanced. In their study, the cAMP/PKA pathway triggered a rapid rise in mitochondrial ROS in neonatal murine cardiomyocytes [77].

In conclusion, unlike what was shown in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, in mammalian cells, the role of cAMP/PKA pathway is much more ambiguous regarding the regulation of mitochondrial ROS production.

4.3. Oxidative Stress and Mitochondrial Biogenesis Regulation

In mammalian cells, it has been shown that mitochondrial biogenesis is tightly linked to ROS production [78–80]. In their studies, Lee et al. bring to light that an indoxyl sulfate-induced oxidative stress triggers a decrease in cellular mitochondrial content through a decrease in the biogenesis of this compartment in human umbilical vein endothelial cells. This ROS-induced trigger can be counteracted by antioxidant treatment such as NAC [81]. Similarly, resveratrol, a natural antioxidant, protects cells against HFD-induced apoptosis by reducing oxidative stress and stimulates mitochondrial biogenesis in T-reg [82].

Nevertheless, in neural cells, Spiegelman and colleagues show that upon oxidative stress expression of PGC-1 α is enhanced as well as the expression of components of the mitochondrial ROS defense system such as SOD1, SOD2, catalase or glutathione peroxidase (GPX) [80]. Similar results have been shown in melanoma tumors. Indeed, in PGC-1 α negative cells, ROS production is enhanced and induces apoptosis [83]. Moreover, Sharma et al. show, after a pre-treatment of rat brain cells with quercetin, a reduction of ROS production associated to an enhancement of PGC-1 α expression and consequently an increase mitochondrial biogenesis [84].

Moreover, conflicting results were published: treatment of human preadipocytes with forskolin, which leads to an overactivation of the cAMP/PKA pathway -and a decrease in mitochondrial ROS production-, increased mitochondrial DNA copy number [85]. Further, in HeLa cells, respiratory uncoupling, which is well known to decrease mitochondrial reactive oxygen species production, activates NRF-1 (nuclear respiratory factor-1) [86].

Hence, in mammalian cells, ROS induced regulation of mitochondrial biogenesis can lead to either an increase or a decrease of this process in response to an increase of mitochondrial ROS.

One possible explanation for such conflicting results in the literature might be that the effect of oxidative stress on mitochondrial biogenesis depends on the severity and duration of the stress. Acute/mild stress can stimulate PGC-1 α expression and mitochondrial biogenesis due to the involvement of mitochondrial quality control [80]. However, severe and permanent stress can have the opposite effects. For example, heart failure induced by aortic banding [87] and myocardial infarction [88] decreased mitochondrial transcription factors, including PGC-1 α as well as NRF1, NRF2, MTF. This decrease in mitochondrial transcription factors is associated with a decrease in mitochondrial content/activities.

5. Conclusion

It is well known mitochondria are the first site of ROS production. The generation of these species is controlled by multiple parameters. In mammalian cells as well as in yeast, ROS-induced signaling is able to regulate mitochondrial biogenesis. In yeast, the role of ROS is primarily a down-regulation by its action on Hap4p, the main regulator of mitochondrial biogenesis (homologous of PGC-1 α). In mammalian, the situation is less straightforward: ROS formation can trigger PGC-1 α induction and induces an enhancement of mitochondrial biogenesis, however PGC-1 α is also induced under uncoupling conditions where mitochondrial ROS production rate are the lowest. Mitochondrial ROS are clearly involved in the cross talk between this compartment and the nucleus. However, conflicting results regarding their role in the regulation of mitochondrial biogenesis in mammalian cells show that further studies will be necessary to clarify the situation.

Author Contributions: CB: writing the manuscript and designing the figures. AD: writing, review & editing the manuscript.

Funding: This work was supported by the Ligue contre le Cancer, the Agence Nationale de la Recherche and the CNRS (Conseil National de la Recherche Scientifique).

Acknowledgments: The authors would like to thank Michel Rigoulet for his critical reading of the paper, and Thibault Molinié for his help in elaborating Figure 1.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

ATP: adenosine triphosphate; OXPHOS: oxidative phosphorylation; NADH: nicotinamide adenine dinucleotide; FADH₂: flavin adenine dinucleotide; ANT: adenine nucleotide translocator; O₂⁻: superoxide; H₂O₂: hydrogen peroxide; ·HO: hydroxyl radical; ROS: reactive oxygen species; G3PDH: glycerol-3-phosphate dehydrogenase; HAP: heme activator proteins; TFAM: mitochondrial transcription factor A; NRF: nuclear respiratory factors; PPAR γ : peroxisome proliferator-activated receptor γ ; PGC-1: PPAR γ coactivator-1; PRC: PGC-1-related coactivators; cAMP: cyclic adenosine monophosphate; Gpr1: G-protein-coupled glucose receptor; GPCR: G-protein-coupled receptor; Bcy1: bypass of cAMP requirement; NAC: N-acetyl cysteine; SOD1: superoxide dismutase; GLR1: glutathione reductase; CREB: cAMP response element binding protein; GPX: glutathione peroxidase; AKA : A-kinase anchor protein.

References

1. de Vries, S.; Marres, C.A.M. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **1987**, *895*, 205–239.
2. Rigoulet, M.; Mourier, A.; Galinier, A.; Casteilla, L.; Devin, A. Electron competition process in respiratory chain: Regulatory mechanisms and physiological functions. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, *1797*, 671–677.
3. Turrens, J.F.; Alexandre, A.; Lehninger, A.L. Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **1985**, *237*, 408–414.
4. Turrens, J.F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **2003**, *552*, 335–344.
5. Sun, J.; Trumpower, B.L. Superoxide anion generation by the cytochrome bc₁ complex. *Arch. Biochem. Biophys.* **2003**, *419*, 198–206.
6. Hinkle, P.C.; Butow, R.A.; Rackers, E. Partial Resolution Phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **1967**, *242*, 5169–5173.
7. Takeshige, K.; Shigeki, M. NADH- and NADPH-Dependent Formation of Superoxide Anions by Bovine Heart Submitochondrial Particles and NADH-Ubiquinone Reductase Preparation. *Biochem. J.* **1979**, 129–135.
8. Turrens, J.F.; Boveris, A. Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **1980**, *191*, 421–427.
9. Chance, B.; Hollunger, G. The interaction of energy and electron transfer reactions in mitochondria. VI. The efficiency of the reaction. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 1577–1584.
10. Starkov, A.A. Mitochondrial -Ketoglutarate Dehydrogenase Complex Generates Reactive Oxygen Species. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 7779–7788.
11. Gyulkhandanyan, A. V.; Pennefather, P.S. Shift in the localization of sites of hydrogen peroxide production in brain mitochondria by mitochondrial stress. *J. Neurochem.* **2004**, *90*, 405–421.
12. Kwong, L.K.; Sohal, R.S. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse Mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **1998**, *350*, 118–126.
13. Forsburg, S.L.; Guarente, L. Identification and characterization of HAP4: A third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes Dev.* **1989**, 1166–1178.
14. Hahn, S.; Pinkham, J.; Wei, R.; Miller, R.; Guarente, L. The HAP3 regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts. *Mol. Cell. Biol.* **1988**, *8*, 655–663.
15. Guarente, L.; Lalonde, B.; Gifford, P.; Alani, E. Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the CYC1 gene of *S. cerevisiae*. *Cell* **1984**, *36*, 503–511.
16. McNabb, D.S.; Xing, Y.; Guarente, L. Cloning of yeast HAP5: A novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 47–58.
17. Pinkham, J.L.; Guarente, L. Cloning and molecular analysis of the HAP2 locus: a global regulator of respiratory genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1985**, *5*, 3410–3416.
18. Buschlen, S.; Amillet, J.M.; Guiard, B.; Fournier, A.; Marcireau, C.; Bolotin-Fukuhara, M. The *S. cerevisiae* HAP complex, a key regulator of mitochondrial function, coordinates nuclear and mitochondrial gene expression. *Comp. Funct. Genomics* **2003**, *4*, 37–46.
19. Deshpande, A.; Patel, S.S. Mechanism of transcription initiation by the yeast mitochondrial RNA polymerase. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1819*, 930–938.
20. Herrmann, J.M.; Woellhaf, M.W.; Bonnefoy, N. Control of protein synthesis in yeast mitochondria: The concept of translational activators. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2013**, *1833*, 286–294.
21. Fox, T.D. Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics* **2012**, *192*, 1203–1234.

22. Rak, M.; Zeng, X.; Brière, J.-J.; Tzagoloff, A. Assembly of F0 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1793*, 108–116.
23. Miyakawa, I. Organization and dynamics of yeast mitochondrial nucleoids. *Proc. Japan Acad. Ser. B* **2017**, *93*, 339–359.
24. Yoboue, E.D.; Devin, A. Reactive oxygen species-mediated control of mitochondrial biogenesis. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, *2012*.
25. Evans, M.J.; Scarpulla, R.C. NRF-1: A trans-activator of nuclear-encoded respiratory genes in animal cells. *Genes Dev.* **1990**, *4*, 1023–1034.
26. Evans, M.J.; Scarpullas, C. Interaction of Nuclear Factors with Multiple Sites in the Somatic Cytochrome c Promoter. *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 14361–14368.
27. Kehrein, K.; Bonnefoy, N.; Ott, M. Mitochondrial Protein Synthesis: Efficiency and Accuracy. *Antioxid. Redox Signal.* **2013**, *19*, 1928–1939.
28. Scarpulla, R.C.; Vega, R.B.; Kelly, D.P. Transcriptional Integration of Mitochondrial Biogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.* **2012**, *23*, 459–466.
29. Thevelein, J.M.; De Winde, J.H. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **1999**, *33*, 904–918.
30. Toda, T.; Cameron, S.; Sass, P.; Zoller, M.; Wigler, M. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **1987**, *50*, 277–287.
31. Toda, T.; Cameron, S.; Sass, P.; Zoller, M.; Scott, J.D.; McMullen, B.; Hurwitz, M.; Krebs, E.G.; Wigler, M. Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **1987**, *7*, 1371–1377.
32. Yoboue, E.D.; Augier, E.; Galinier, A.; Blancard, C.; Pinson, B.; Casteilla, L.; Rigoulet, M.; Devin, A. cAMP-induced mitochondrial compartment biogenesis: Role of glutathione redox state. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 14569–14578.
33. Chevtzoff, C.; Yoboue, E.D.; Galinier, A.; Casteilla, L.; Daignan-Fornier, B.; Rigoulet, M.; Devin, A. Reactive oxygen species-mediated regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 1733–1742.
34. Yoboue, E.D.; Mougeolle, A.; Kaiser, L.; Averet, N.; Rigoulet, M.; Devin, A. The role of mitochondrial biogenesis and ROS in the control of energy supply in proliferating cells. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2014**, *1837*, 1093–1098.
35. Rigoulet, M.; Yoboue, E.D.; Devin, A. Mitochondrial ROS Generation and Its Regulation: Mechanisms Involved in H₂O₂ Signaling. *Antioxid. Redox Signal.* **2011**, *14*, 459–468.
36. Devin, A.; Dejean, L.; Beauvoit, B.; Chevtzoff, C.; Avéret, N.; Bunoust, O.; Rigoulet, M. Growth yield homeostasis in respiring yeast is due to a strict mitochondrial content adjustment. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 26779–26784.
37. Mogensen, M.; Bagger, M.; Pedersen, P.K.; Fernström, M.; Sahlin, K. Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency. *J. Physiol.* **2006**, *571*, 669–681.
38. Larsen, S.; Nielsen, J.; Hansen, C.N.; Nielsen, L.B.; Wibrand, F.; Stride, N.; Schroder, H.D.; Boushel, R.; Helge, J.W.; Dela, F.; et al. Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects. *J. Physiol.* **2012**, *590*, 3349–3360.
39. Rabøl, R.; Svendsen, P.F.; Skovbro, M.; Boushel, R.; Haugaard, S.B.; Schjerling, P.; Schrauwen, P.; Hesselink, M.K.C.; Nilas, L.; Madsbad, S.; et al. Reduced skeletal muscle mitochondrial respiration and improved glucose metabolism in nondiabetic obese women during a very low calorie dietary intervention leading to rapid weight loss. *Metabolism.* **2009**, *58*, 1145–1152.
40. Dejean, L.; Beauvoit, B.; Bunoust, O.; Guérin, B.; Rigoulet, M. Activation of Ras cascade increases the mitochondrial enzyme content of respiratory competent yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *293*, 1383–1388.
41. Camonis, J.H.; Kalekine, M.; Garreau, H.; Boy-marcotte, E. Characterization, cloning and sequence analysis of the CDC25 gene which controls the cyclic AMP level of *Saccharomyces cerevisiae*. **1986**, *5*, 375–380.
42. Wilson, R.B.; Renault, G.; Jacquet, M.; Tatchell, K. The pde2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is allelic to rca1 and encodes a phosphodiesterase which protects the cell from extracellular cAMP. *FEBS Lett.* **1993**, *325*, 191–195.

43. Dejean, L.; Beauvoit, B.; Alonso, A.P.; Bunoust, O.; Guérin, B.; Rigoulet, M. cAMP-induced modulation of the growth yield of *Saccharomyces cerevisiae* during respiratory and respiro-fermentative metabolism. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2002**, *1554*, 159–169.
44. Robertson, L.S.; Fink, G.R. The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 13783–13787.
45. Robertson, L.S.; Causton, H.C.; Young, R.A.; Fink, G.R. The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2000**, *97*, 5984–5988.
46. Pan, X.; Heitman, J. Protein Kinase A Operates a Molecular Switch That Governs Yeast Pseudohyphal Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* **2002**, *22*, 3981–3993.
47. Chevtzoff, C.; Vallortigara, J.; Avéret, N.; Rigoulet, M.; Devin, A. The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, *1706*, 117–125.
48. Schafer, F.Q.; Buettner, G.R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic. Biol. Med.* **2001**, *30*, 1191–1212.
49. Grant, C.M.; Collinson, L.P.; Roe, J.H.; Dawes, I.W. Yeast glutathione reductase is required for protection against oxidative stress and is a target gene for yAP-1 transcriptional regulation. *Mol. Microbiol.* **1996**, *21*, 171–179.
50. Østergaard, H.; Tachibana, C.; Winther, J.R. Monitoring disulfide bond formation in the eukaryotic cytosol. *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 337–345.
51. Schwoch, G.; Trinczek, B.; Bode, C. Localization of catalytic and regulatory subunits of cyclic AMP-dependent protein kinases in mitochondria from various rat tissues. *Biochem. J.* **1990**, *270*, 181–188.
52. Zippin, J.H.; Chen, Y.; Nahirney, P.; Kamenetsky, M.; Wuttke, M.S.; Fischman, D.A.; Levin, L.R.; Buck, J. Compartmentalization of bicarbonate-sensitive adenyl cyclase in distinct signaling microdomains. *FASEB J.* **2003**, *17*, 82–84.
53. Acin-Perez, R.; Salazar, E.; Kamenetsky, M.; Buck, J.; Levin, L.R.; Manfredi, G. Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell* **2010**, *9*, 265–276.
54. Papa, S.; Sardelli, A.M.; Cocco, T.; Speranza, F.; Scacco, S.C.; Technikova-Dobrova, Z. The nuclear-encoded 18kDa (IP) AQDQ subunit of bovine heart complex I is phosphorylated by the mitochondrial cAMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett.* **1996**, *379*, 299–301.
55. Bender, E.; Kadenbach, B. The allosteric ATP-inhibition of cytochrome c oxidase activity is reversibly switched on by cAMP-dependent phosphorylation. *FEBS Lett.* **2000**, *466*, 130–134.
56. Acin-Perez, R.; Gatti, D.L.; Bai, Y.; Manfredi, G. Protein phosphorylation and prevention of cytochrome oxidase inhibition by ATP: coupled mechanisms of energy metabolism regulation. *Cell Metab.* **2011**, *13*, 712–719.
57. Valsecchi, F.; Ramos-Espiritu, L.S.; Buck, J.; Levin, L.R.; Manfredi, G. cAMP and Mitochondria. *Physiology* **2013**, *28*, 199–209.
58. Carr, D.W.; Stofko-Hahn, R.E.; Fraser, I.D.C.; Cone, R.D.; Scott, J.D. Localization of the cAMP-dependent protein kinase to the postsynaptic densities by A-Kinase Anchoring Proteins: Characterization of AKAP 79. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 16816–16823.
59. Hirsch, A.H.; Glantz, S.B.; Li, Y.; You, Y.; Rubin, C.S. Cloning and expression of an Intron-less gene for AKAP75, an Anchor Protein for Regulatory Subunit of cAMP-dependent protein kinase IIb. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2131–2134.
60. Sardanelli, A.M.; Signorile, A.; Nuzzi, R.; De Rasmio, D.; Technikova-Dobrova, Z.; Drahotova, Z.; Occhiello, A.; Pica, A.; Papa, S. Occurrence of A-kinase anchor protein and associated cAMP-dependent protein kinase in the inner compartment of mammalian mitochondria. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 5690–5696.
61. Harada, H.; Becknell, B.; Wilm, M.; Mann, M.; Jun-Shen Huang, L.; Taylor, S.S.; Scott, J.D.; Korsmeyer, S.J. Phosphorylation and Inactivation of BAD by Mitochondria-Anchored Protein Kinase A. *Mol. Cell* **1999**, *3*, 413–422.
62. Carlucci, A.; Lignitto, L.; Feliciello, A. Control of mitochondria dynamics and oxidative metabolism by cAMP, AKAPs and the proteasome. *Trends Cell Biol.* **2008**, *18*, 604–613.
63. Papa, S.; De Rasmio, D.; Scacco, S.; Signorile, A.; Technikova-Dobrova, Z.; Palmisano, G.; Sardanelli, A.M.; Papa, F.; Panelli, D.; Scaringi, R.; et al. Mammalian complex I: A regulable and vulnerable pacemaker in mitochondrial respiratory function. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2008**, *1777*, 719–728.

64. Helling, S.; Vogt, S.; Rhiel, A.; Ramzan, R.; Wen, L.; Marcus, K.; Kadenbach, B. Phosphorylation and Kinetics of Mammalian Cytochrome c Oxidase. *Mol. Cell. Proteomics* **2008**, *7*, 1714–1724.
65. Lee, J.; Kim, C.; Simon, D.K.; Aminova, L.R.; Alexander, Y.; Kushnareva, Y.E.; Murphy, A.N.; Lonze, B.E.; Ginty, D.D.; Ferrante, R.J.; et al. Mitochondrial Cyclic AMP Response Element-binding Protein (CREB) Mediates Mitochondrial Gene Expression and Neuronal Survival. *J Biol Chem Author Manuscr.* **2005**, *280*, 40398–40401.
66. Cammarota, M.; Paratcha, G.; Bevilacqua, L.R.; Levi de Stein, M.; Lopez, M.; Pellegrino de Iraldi, A.; Izquierdo, I.; Medina, J.H. Cyclic AMP-responsive element binding protein in brain mitochondria. *J. Neurochem.* **1999**, *72*, 2272–2277.
67. Kumar, S.; Kostin, S.; Flacke, J.P.; Reusch, H.P.; Ladilov, Y. Soluble adenylyl cyclase controls mitochondria-dependent apoptosis in coronary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 14760–14768.
68. Palorini, R.; De Rasmio, D.; Gaviraghi, M.; Danna, L.S.; Signorile, A.; Cirulli, C.; Chiaradonna, F.; Alberghina, L.; Papa, S. Oncogenic K-ras expression is associated with derangement of the cAMP/PKA pathway and forskolin-reversible alterations of mitochondrial dynamics and respiration. *Oncogene* **2013**, *32*, 352–362.
69. Sepuri, N.B.V.; Tammineni, P.; Mohammed, F.; Paripati, A. Nuclear Transcription Factors in the Mitochondria: A New Paradigm in Fine-Tuning Mitochondrial Metabolism. In *Pharmacology of mitochondria*; Singh, H.; Sheu, S.-S.; Eds.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2017; Volume 240, pp. 3–20.
70. Marinov, G.K.; Wang, Y.E.; Chan, D.; Wold, B.J. Evidence for Site-Specific Occupancy of the Mitochondrial Genome by Nuclear Transcription Factors. *PLoS ONE* **2014**, *9*, 1–24.
71. Cribbs, J.T.; Strack, S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* **2007**, *8*, 939–944.
72. Zhou, W.; Chen, K.H.; Cao, W.; Zeng, J.; Liao, H.; Zhao, L.; Guo, X. Mutation of the protein kinase A phosphorylation site influences the anti-proliferative activity of mitofusin 2. *Atherosclerosis* **2010**, *211*, 216–223.
73. Di Benedetto, G.; Gerbino, A.; Lefkimiatis, K. Shaping mitochondrial dynamics: The role of cAMP signalling. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *500*, 65–74.
74. Piccoli, C.; Scacco, S.; Bellomo, F.; Signorile, A.; Iuso, A.; Boffoli, D.; Scrima, R.; Capitanio, N.; Papa, S. cAMP controls oxygen metabolism in mammalian cells. *FEBS Lett.* **2006**, *580*, 4539–4543.
75. Pasdois, P.; Deveaud, C.; Voisin, P.; Bouchaud, V.; Rigoulet, M.; Beauvoit, B. Contribution of the Phosphorylatable Complex I in the Growth Phase-Dependent Respiration of C6 Glioma Cells in Vitro. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2003**, *35*, 439–450.
76. Andersson, D.C.; Fauconnier, J.; Yamada, T.; Lacampagne, A.; Zhang, S.J.; Katz, A.; Westerblad, H. Mitochondrial production of reactive oxygen species contributes to the β -adrenergic stimulation of mouse cardiomyocytes. *J. Physiol.* **2011**, *589*, 1791–1801.
77. Zhang, J.; Xiao, H.; Shen, J.; Wang, N.; Zhang, Y. Different roles of β -arrestin and the PKA pathway in mitochondrial ROS production induced by acute β -adrenergic receptor stimulation in neonatal mouse cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2017**, *489*, 393–398.
78. Baldelli, S.; Aquilano, K.; Ciriolo, M.R. PGC-1 α buffers ROS-mediated removal of mitochondria during myogenesis. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1515-13.
79. Thirupathi, A.; de Souza, C.T. Multi-regulatory network of ROS: the interconnection of ROS, PGC-1 α , and AMPK-SIRT1 during exercise. *J. Physiol. Biochem.* **2017**, *73*, 487–494.
80. St-Pierre, J.; Drori, S.; Uldry, M.; Silvaggi, J.M.; Rhee, J.; Jäger, S.; Handschin, C.; Zheng, K.; Lin, J.; Yang, W.; et al. Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell* **2006**, *127*, 397–408.
81. Lee, W.C.; Li, L.C.; Chen, J.B.; Chang, H.W. Indoxyl sulfate-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impaired biogenesis are partly protected by vitamin C and N-Acetylcysteine. *Sci. World J.* **2014**, 2015.
82. Wang, B.; Sun, J.; Ma, Y.; Wu, G.; Tian, Y.; Shi, Y.; Le, G. Resveratrol Preserves Mitochondrial Function, Stimulates Mitochondrial Biogenesis, and Attenuates Oxidative Stress in Regulatory T Cells of Mice Fed a High-Fat Diet. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, H1823–H1831.

83. Vazquez, F.; Lim, J.-H.; Chim, H.; Bhalla, K.; Girnun, G.; Pierce, K.; Clish, C.B.; Granter, S.R.; Widlund, H.R.; Spiegelman, B.M.; et al. PGC1 α Expression Defines a Subset of Human Melanoma Tumors with Increased Mitochondrial Capacity and Resistance to Oxidative Stress. *Cancer Cell* **2013**, *55*, 6197–6214.
84. Sharma, D.R.; Sunkaria, A.; Wani, W.Y.; Sharma, R.K.; Verma, D.; Priyanka, K.; Bal, A.; Gill, K.D. Quercetin protects against aluminium induced oxidative stress and promotes mitochondrial biogenesis via activation of the PGC-1 α signaling pathway. *Neurotoxicology* **2015**, *51*, 116–137.
85. Bogacka, I.; Ukropcova, B.; McNeil, M.; Gimble, J.M.; Smith, S.R. Structural and Functional Consequences of Mitochondrial Biogenesis in Human Adipocytes *in Vitro*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 6650–6656.
86. Li, B.; Holloszy, J.O.; Semenkovich, C.F. Respiratory uncoupling induces delta-aminolevulinate synthase expression through a nuclear respiratory factor-1-dependent mechanism in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 17534–17540.
87. Garnier, A.; Fortin, D.; Deloménie, C.; Momken, I.; Veksler, V.; Ventura-Clapier, R. Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol.* **2003**, *551*, 491–501.
88. Javadov, S.; Purdham, D.M.; Zeidan, A.; Karmazyn, M. NHE-1 inhibition improves cardiac mitochondrial function through regulation of mitochondrial biogenesis during postinfarction remodeling. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **2006**, *291*, H1722–H1730.



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Cell energy metabolism: An update

M. Rigoulet^{a,b}, C.L. Bouchez^{a,b}, P. Paumard^{a,b}, S. Ransac^{a,b}, S. Cuvellier^{a,b}, S. Duvezin-Caubet^{a,b}, J.P. Mazat^{a,b}, A. Devin^{a,b,*}

^a CNRS, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France

^b Université de Bordeaux, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mitochondria
Cell energetic metabolism
Thermodynamics
Kinetics
Crabtree effect
Warburg effect
Metabolism modeling

ABSTRACT

In living cells, growth is the result of coupling between substrate catabolism and multiple metabolic processes that take place during net biomass formation and maintenance processes. During growth, both ATP/ADP and NADH/NAD⁺ molecules play a key role. Cell energy metabolism hence refers to metabolic pathways involved in ATP synthesis linked to NADH turnover. Two main pathways are thus involved in cell energy metabolism: glycolysis/fermentation and oxidative phosphorylation. Glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation are intertwined through thermodynamic and kinetic constraints that are reviewed herein. Further, our current knowledge of short-term and long term regulation of cell energy metabolism will be reviewed using examples such as the Crabtree and the Warburg effect.

1. Introduction: cell energy metabolism, a definition

In living cells, growth is the result of coupling between substrate catabolism and multiple metabolic processes that take place during net biomass formation and maintenance processes (i.e. maintenance of ionic gradients, protein, lipid, and nucleic acid turnover). During growth, both ATP/ADP and NADH/NAD⁺ molecules play a key role (Scheme 1). Anabolic pathways required for biosynthesis will consume ATP and generate NADH. Catabolic pathways, such as mitochondrial oxidative phosphorylation will generate ATP from ADP + Pi and oxidize NADH in NAD⁺. Consequently, both ATP and NAD⁺ are central molecules to allow growth which will depend on their respective availability. Cell energy metabolism hence refers to metabolic pathways involved in ATP synthesis linked to NADH turnover. ATP synthesis occurs either through substrate-level phosphorylation (glycolysis and Krebs cycle, Scheme 2) or through oxidative phosphorylation (Scheme 3). NADH can be oxidized either by fermentation (lactate dehydrogenase in mammals, alcohol dehydrogenase in yeast) or by the respiratory chain which is localized in the mitochondrial inner membrane (complex I in mammals, inner and out NADH dehydrogenases in yeast). Glycolysis is a cytosolic pathway that catabolizes glucose into pyruvate and produces 2 ATP per glucose catabolized. Mitochondrial oxidative phosphorylations are located in the mitochondrial inner membrane, which contains all the proteins involved in this process i.e. the transformation of redox energy into phosphate potential (that is the free

energy of ATP synthesis) with the proton electrochemical potential across the membrane as an intermediary. The respiratory chain is defined as an ensemble of complexes (I, II, III, and IV), some of which (I, III & IV) couple redox reaction to proton extrusion. Such complexes are called coupling sites and generate the proton electrochemical potential. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria are slightly peculiar since they do not exhibit a complex I but have a number of external and internal dehydrogenases in the inner mitochondrial membrane that give their electrons via the quinones pool to the complex III. Substrate oxidation leads to electron transfer through the respiratory chain, with the terminal electron acceptor being oxygen. The respiratory flux thus reflects the substrate oxidation flux. The proton motive force is consumed by the phosphorylating systems (ATP synthase, ATP/ADP carrier and Pi/H⁺ carrier) that lead to ATP production.

2. Short term relationships between the two energetic pathways: glycolysis and mitochondria

2.1. Thermodynamic control

Glycolysis and mitochondrial oxidative phosphorylation are intertwined through thermodynamic and kinetic constraints. From a thermodynamic point of view, two forces are involved in both pathways: the cytosolic ΔG_{redox} (NADH/NAD⁺) and the cytosolic ΔG_p (ATP)/(ADP.Pi). In glycolysis, this thermodynamic control lies at the level of

Abbreviations: ATP, Adenosine triphosphate; ΔG_p , phosphate potential; ΔG_{redox} , redox potential; O₂, dioxygen; ANT, adenine nucleotides translocator

* Corresponding author at: IBGC du CNRS, Bioenergetics and Cell Metabolism Laboratory, 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux cedex, France.

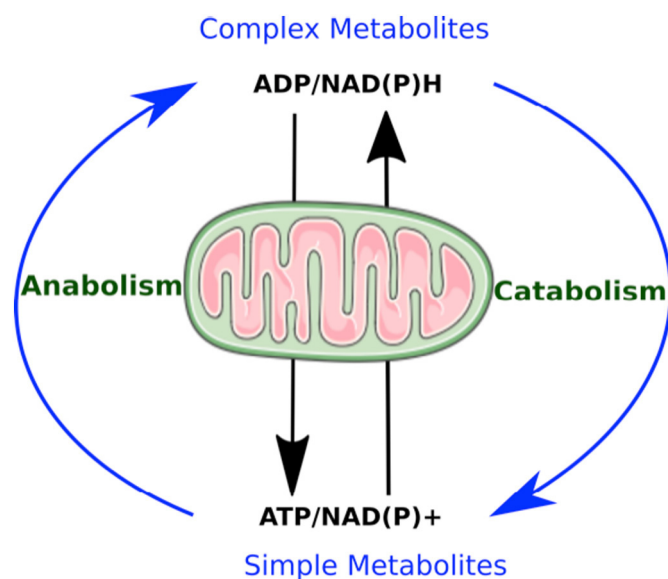
E-mail address: anne.devin@ibgc.cnrs.fr (A. Devin).

<https://doi.org/10.1016/j.bbambio.2020.148276>

Received 4 May 2020; Received in revised form 7 July 2020; Accepted 8 July 2020

Available online 24 July 2020

0005-2728/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.



Scheme 1. Cell energetic metabolism. Anabolic pathways required for biosynthesis will consume ATP and generate NADH. Catabolic pathways, such as mitochondrial oxidative phosphorylation will generate ATP from ADP + Pi and oxidize NADH in NAD⁺.

kinases and glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase. In oxidative phosphorylation, cytosolic ΔG_p and mitochondrial ΔG_p are connected through mitochondrial carriers (ANT and Pi) that depend on the mitochondrial membrane proton electrochemical potential for their functioning. Mitochondrial respiratory chain can participate to two mechanisms of cytosolic NADH oxidation: either by direct oxidation of cytosolic NADH (yeast, see [Scheme 3A](#)) or by accepting electrons from a cytosolic dehydrogenase (such as glycerol 3 phosphate dehydrogenase). Moreover, due to the different organization of mitochondrial NADH dehydrogenases in mammals and yeast *Saccharomyces cerevisiae*, their response to the ΔG_{redox} is very different. In mammals ([Scheme 3B](#)), NADH can only be oxidized by the respiratory chain in the mitochondrial matrix which implies that reduced equivalent must be imported through mechanisms such as the malate/aspartate shuttle ([Scheme 4](#)) to be oxidized by a NADH dehydrogenase on the internal face of the inner mitochondrial membrane. Whereas in yeast, the existence of a NADH dehydrogenase on the external face of the inner membrane allows for direct oxidation of cytosolic NADH. Of note, the shuttles such as the malate/aspartate shuttle depend on the mitochondrial membrane proton electrochemical potential for their functioning since glutamate/aspartate exchange is electrogenic. The thermodynamic connection between glycolysis and oxidative phosphorylation has been proposed for some time [1–4]. Further, it should be stressed that it has been shown on near-equilibrium metabolic pathways segments that such a thermodynamic control exists [5–7]. However, some enzymatic steps of metabolic pathways are far from equilibrium or irreversible which implies that these enzymes play a key role in the kinetic control of these metabolic pathways. These are key steps targeted for kinetic regulation by substrates or products of the metabolic pathway.

2.2. Kinetic control

As stated above, another degree of complexity is that molecules involved in the thermodynamic control of glycolysis and oxidative phosphorylation are also involved in the kinetic control of some enzymatic reactions. It is well known that in glycolysis, enzymatic steps working far from equilibrium are kinetically regulated by a number of metabolites, some of which being involved in thermodynamic forces (ATP, ADP, Pi, NAD⁺, NADH). This has also been shown for

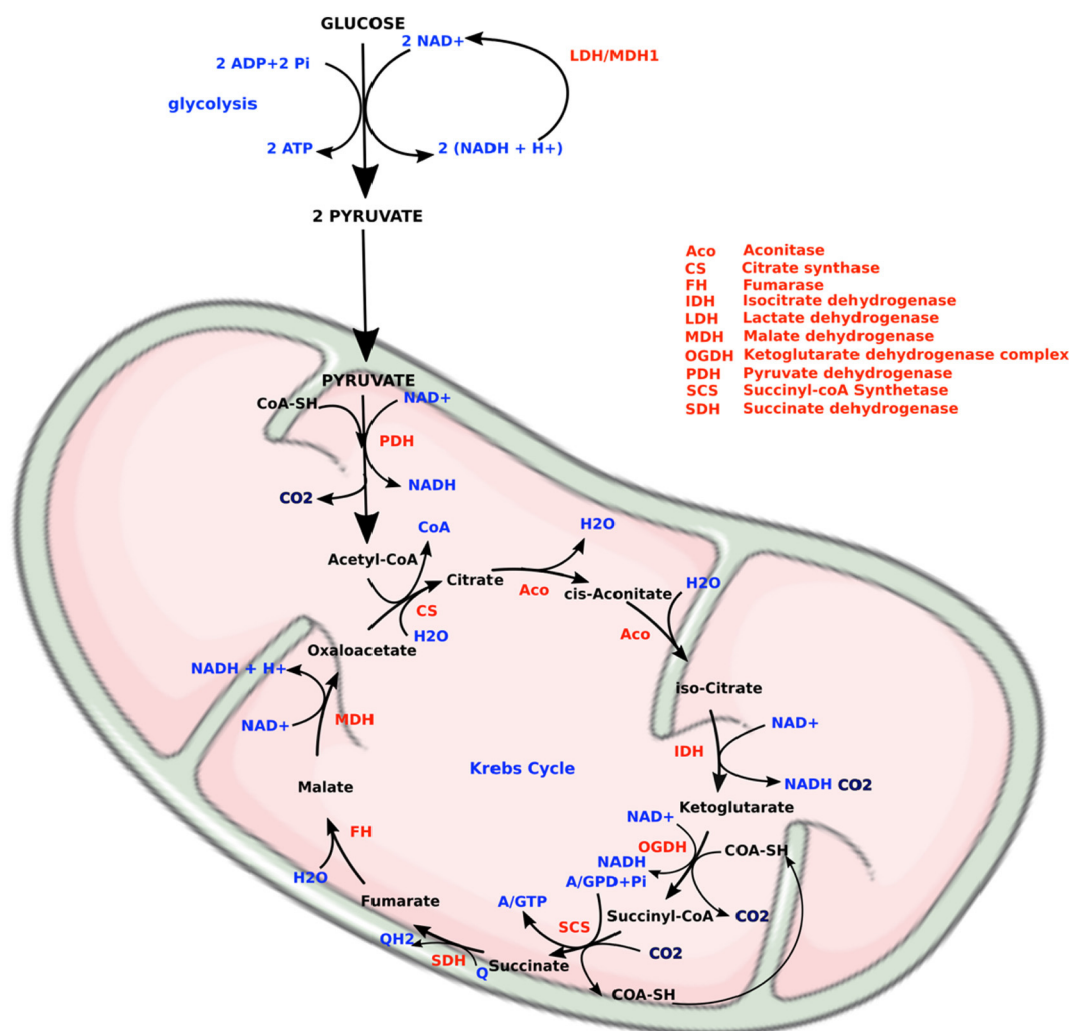
cytochrome oxidase (oxidative phosphorylation complex IV) which works far from equilibrium and is well known to be regulated by ATP and ADP [8]. A well-known example of kinetic interrelation between glycolysis and oxidative phosphorylation is the Crabtree effect. This effect is defined as the inhibition of cellular oxygen consumption upon glucose addition to cells [9]. Since it occurs within seconds, this regulation is a kinetic regulation and authors have been trying to understand which of the metabolite(s) common to both pathways is (are) involved in that process and/or which glucose induced signaling molecule(s) could regulate oxidative phosphorylation. Studies have revealed three main possible mechanisms for the induction of the Crabtree effect: 1- glucose addition induces a competition between glycolysis and oxidative phosphorylation for some metabolites (such as ADP, Pi; [10]); 2- glucose addition induces an increase in cytosolic Ca²⁺ which itself induces an increase in matrix Ca²⁺ which inhibits ATPsynthase [11] 3- glucose addition induces an important glycolytic flux which changes the concentrations of these metabolic pathway intermediaries, some of which have an indirect, such as NADH on porin [12] or direct regulation effect such as G6P and F16bP on mitochondrial respiratory chain that was evidenced in our laboratory [13,14]. Moreover, mathematical modeling of yeast glycolysis and oxidative phosphorylation, showed that an inhibition of oxidative phosphorylation as a function of the ratio Fructose-1,6-bisphosphate/Glucose-6-phosphate was mandatory to simulate the Crabtree effect. The plot of all our data and data of the literature on mammalian cells are remarkably plotted on the same curve which reinforces both our results and the interest of using a theoretical model to integrate data from different origins [15].

2.3. Channeling

Some metabolic networks are organized, partly or as a whole (metabolon). This supramolecular organization, called channeling, allows for better kinetic efficiency, allows to avoid the release of potential harmful or “fragile” metabolic intermediaries and avoids competition processes (in terms of substrates or inhibitors) since intermediaries are not released in the bulk phase but transferred from one enzyme’s active site to another’s. Further, as pointed out by Srere [16], about 80% of the metabolic intermediates have just one use in the cell. If these intermediates each had to fill the water volume of the cell to attain its operating concentration it would be quite a wasteful process. Atkinson [17] has suggested that a limiting factor in cell structure is its solvation capacity. Sequential multienzyme complexes and their channeling capabilities would allow overcoming this difficulty. Here we will shortly review where channeling has been shown to be involved in the regulation of cell energy metabolism.

2.3.1. Channeling of cytosolic NADH in yeast

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, it has been shown that intermediaries from glycolysis such as NADH were channeled to the mitochondrial NADH dehydrogenase located on the external face of the inner membrane (see [Scheme 3](#)). Indeed, based on kinetic studies on isolated mitochondria and permeabilized spheroplasts, it was shown that on permeabilized spheroplasts, the K_{app} of the mitochondrial NADH dehydrogenase for NADH was much lower (better affinity) when NADH was produced by glycolysis (from fructose 1,6-bisphosphate) than when it was externally added. This suggests a channeling process which was shown to go through mitochondrial porin, located in the external mitochondrial membrane [18,19]. This process increases respiratory chain efficiency for glycolytic NADH oxidation, a crucial step of cell energy metabolism. Further, this increase in efficiency is reinforced by the electron competition process that favors external NADH oxidation by the respiratory chain when present simultaneously with other substrates [20,21].



Scheme 2. Glycolysis and Krebs Cycle. ATP synthesis can occur through substrate level phosphorylation in these pathways.

2.3.2. Supramolecular organization of the respiratory chain

It has been shown that mitochondrial complexes are associated into supramolecular ensembles in a whole range of organisms [22–24]. As explained above, general functional advantages of supercomplexes compared to separated complexes would be catalytic enhancement, substrate channeling, sequestration of reactive intermediates, and structural stabilization of one specific complex by supercomplex formation. On mitochondria isolated from the yeast *S. cerevisiae*, structural studies have shown that the formation of yeast respiratory chain supercomplexes (i.e. association of complexes III and IV) depends on the growth conditions [22]. However, to this day, the actual advantages of supercomplexes remain ambiguous. Structural and biophysical information are not in favor of catalysis enhancement by channeling substrates [25]. Moreover, structural information for these supercomplexes has been interpreted either in support [26,27] or in dismissal [28,29]. A destabilization of these complexes has been shown in a yeast mutant deleted for the cardiolipin synthase, indicating that cardiolipins are necessary for the supramolecular organization of the respiratory chain [30–32]. Our study of such a mutant has shown that in the absence of any detectable supramolecular organization of the respiratory chain, the respiratory fluxes assessed for any substrates or substrates combinations are similar for the wild type and the cardiolipin-deficient mitochondria. [21]. Consequently, there does not seem to be a kinetic advantage when mitochondrial respiratory chain is organized in supercomplexes. On the other hand, it has been shown that in Barth Syndrome Patients, mitochondrial supercomplexes were strongly

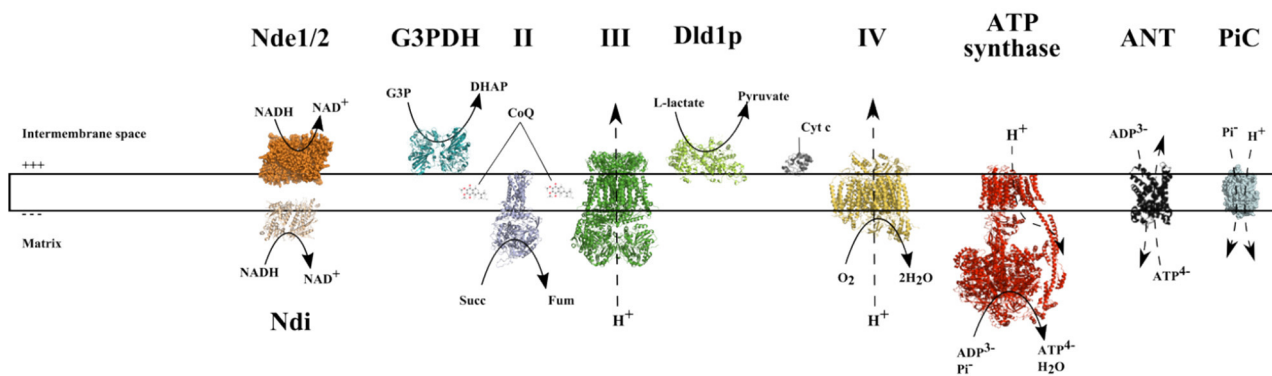
destabilized and this was associated with energetic deficiencies [33,34]. Whether the energetic deficiency originates in super complexes destabilization is hard to conclude since cardiolipins have been shown to be required for some mitochondrial respiratory chain complexes activities.

Another way to look at these ensembles is that in oxidative phosphorylation protein-protein associations do not involve just the respiratory complexes (respirasomes) but include proteins that sequester sections of the internal membrane, optimizing delta pH formation and consequently phosphorylation of ADP as well as nucleotide transport and ion gradients within a secluded space [35,36]. In the mentioned papers, the well-known role of ATPsynthase dimers along with other cristae-shaping proteins was investigated in terms of oxidative phosphorylation functionality (ATPsynthesis, electron transfer, ROS production, local membrane proton electrochemical potential...). Because numerous relationships have been reported for cristae morphology and metabolic, physiological, or pathological states, it deems necessary to integrate this aspect of mitochondrial physiology to mitochondrial bioenergetics studies.

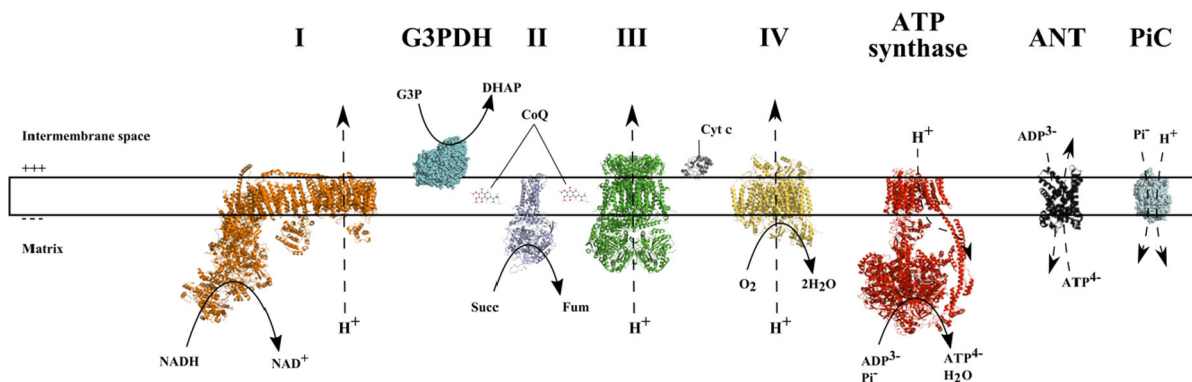
2.3.3. ATP channeling in the heart (Scheme 5)

Mitochondria in cardiac muscle cells are highly organized following a “crystal-like” pattern [37,38]. In these muscle cells, each sarcomere that consumes ATP has a mitochondrion that synthesizes ATP and which, together with the phosphotransfer system -compartmentalized isoforms of creatine kinase- and the feed-back metabolic signaling, creates the intracellular energy unit [39]. When adenine nucleotides

A



B



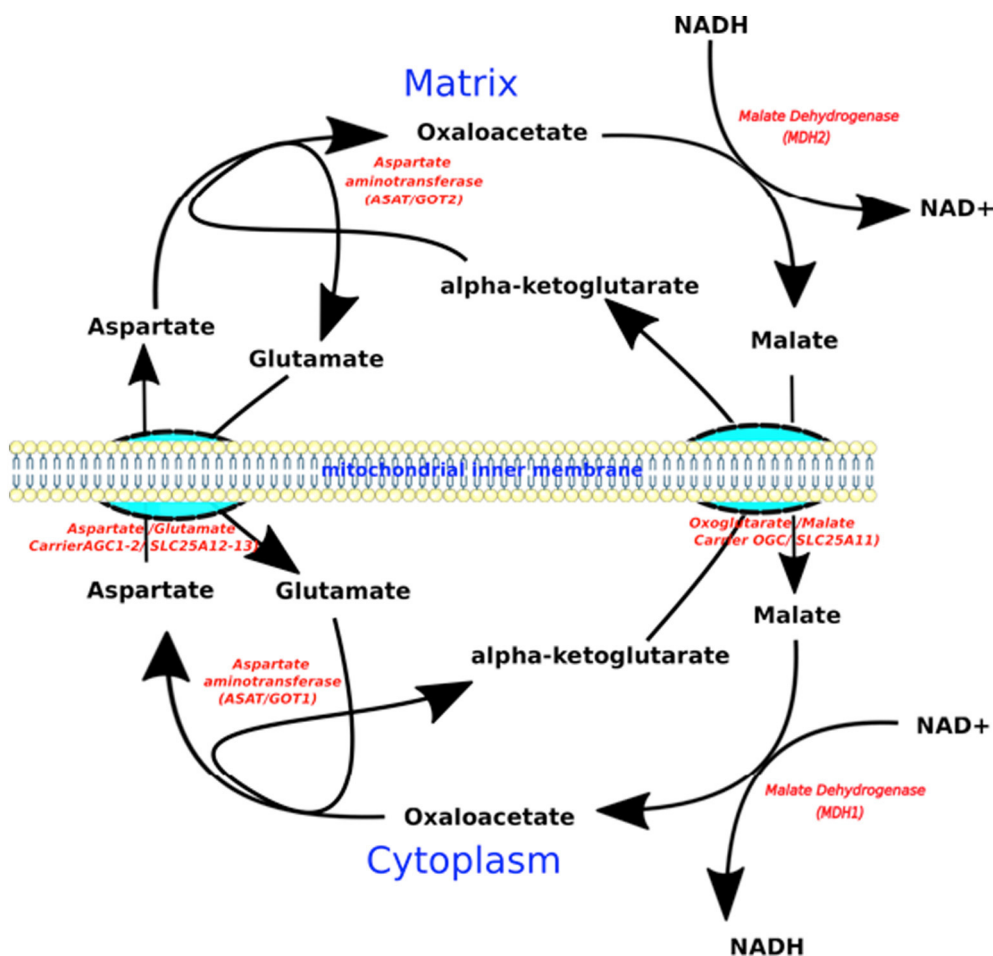
Scheme 3. Oxidative phosphorylation in yeast (A) and mammals (B). The OXPHOS system can be described as two functional entities: The respiratory chain (RC) and the phosphorylating system. The RC is composed by holoenzymes as the NADH dehydrogenase (complex I; Nde&Ndi in yeast), succinate dehydrogenase (complex II), cytochrome-c reductase (complex III), and cytochrome-c oxidase (complex IV). There are also others dehydrogenases such as the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) which can be connected to the RC. The RC is also composed by mobile electron carriers as coenzyme Q and cytochrome-c. The RC is functionally coupled to the phosphorylating system composed by the ATP synthase, adenine nucleotide transporter (ANT), and phosphate inorganic carrier (PiC). The following PDB structures were used for this figure: (A) Ndi: PDB: [4G9K](#) from *S. cerevisiae*; Nde1/2: PDB: [4G6H](#) (NDH with NADH from *S. cerevisiae*); Complex II: PDB: [1ORZ](#) from *S. cerevisiae*; Gut2p: PDB: [3PYM](#) from *S. cerevisiae*; Complex III: PDB: [1KB9](#) from *S. cerevisiae* Complex IV: PDB: [1V54](#) from *Bos Taurus*; Cyt c: PDB: [1CRH](#) from *S. cerevisiae*; L-LDH: PDB: [1LDC](#) from *S. cerevisiae*; ATPsynthase: PDB: [6O7V](#) from *S. cerevisiae*; ANT: PDB: [4C9G](#) from *S. cerevisiae* (B) Complex I, III and IV: PDB: [5GPN](#) from *Bos Taurus* (respirasome); Complex II: PDB: [3SFD](#) from *Sus scrofa*; ATPsynthase: PDB: [5FIL](#) from *Bos Taurus*; Cyt c: PDB: [2B4Z](#) from *Bos Taurus*; ANT: PDB: [1OKC](#) from *Bos Taurus*; Glycerol-3-phosphate Dehydrogenase: PDB: [2QCU](#) from *Escherichia coli*.

diffusion is restricted (channeling), the energy of the phosphorylation potential is exported from heart mitochondria by phosphocreatine which is produced by mitochondrial creatine kinase (MtCK) from mitochondrial ATP and creatine (Scheme 5). The role of these functional and structural supercomplexes is to increase the efficiency of the oxidative ATP synthesis and peripheral ATP hydrolysis. These structures represent a type of supramolecular organization that operates far from equilibrium.

2.3.4. Glycolysis channeling

The existence of a “team of glycolytic enzymes” bound to membranes in erythrocytes and yeast was proposed quite some time ago [40]. This was later confirmed in skeletal muscle where glycolytic

enzyme associations with cytoskeleton elements were described [41]. Glycolytic enzymes that interact with cytoskeletal elements have been shown to be aldolase and phosphofruktokinase, which are stabilized by microtubules, optimizing their combined activity [42]. Moreover, in Chinese Hamster Ovary Cells (CHO), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and lactate dehydrogenase participate in a glycolytic metabolon bound to actin [43]. Convincing evidence regarding channeling of the glycolytic pathway was obtained by adding radioactive glucose to cells and showing that in permeabilized cells, there is no dilution of this glucose from endogenous substrates [44]. Moreover, this channeling process has been shown to be dynamic in yeast where withdrawal of the carbon source results in detachment of glycolytic enzymes from the cytoskeleton and in actin reorganization [45].



Scheme 4. The malate-aspartate shuttle. The malate-aspartate shuttle allows for the translocation of reducing equivalents across the mitochondrial inner membrane. This shuttle is required because the mitochondrial inner membrane is impermeable to NADH. The shuttle consists of four enzymes: malate dehydrogenase in the mitochondrial matrix and cytosol, aspartate aminotransferase in the mitochondrial matrix and cytosol, malate-alpha-ketoglutarate antiporter in the inner membrane, glutamate-aspartate antiporter in the inner membrane

3. Long-term regulation of mitochondrial metabolism

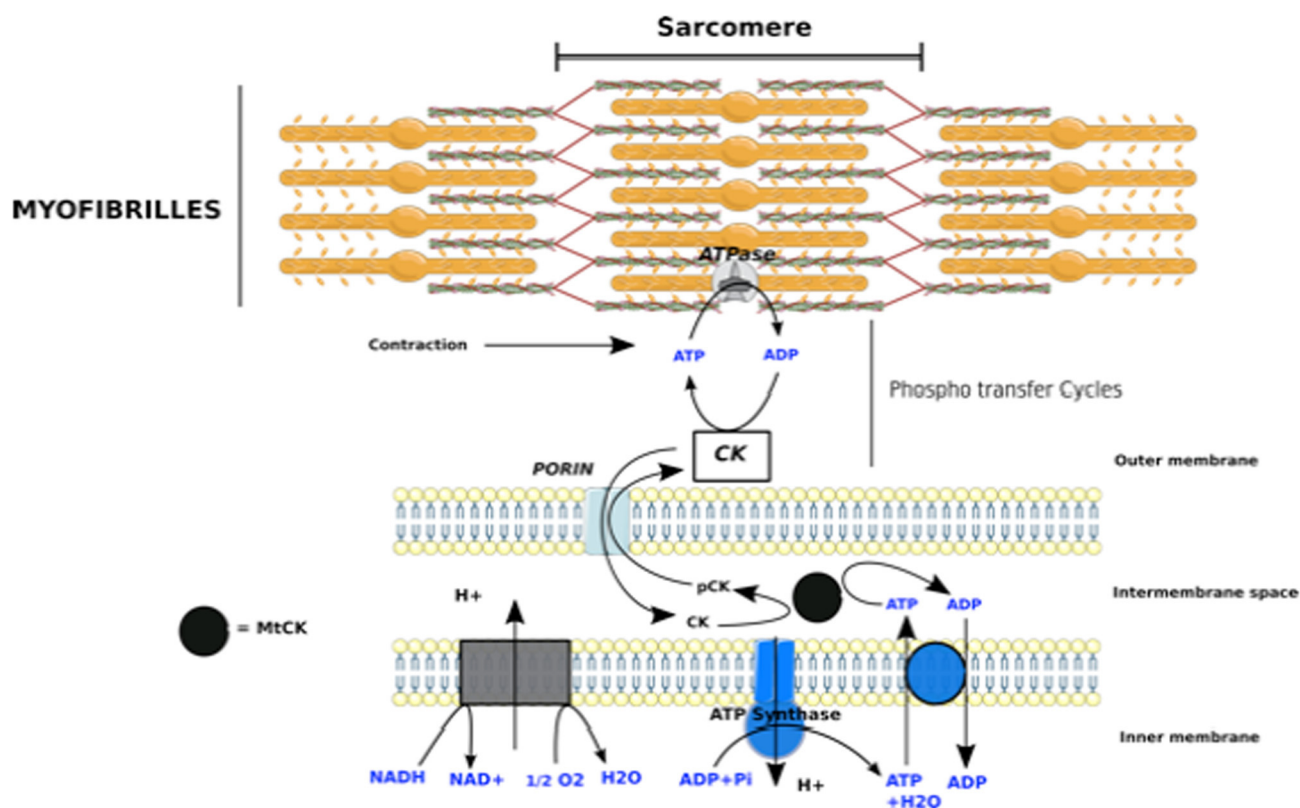
There are two ways, non-exclusive, to regulate mitochondrial oxidative phosphorylation within cells. It can be regulated kinetically, allowing an increase or a decrease in ATP synthesis flux in response to modulation in ATP demand. It can also be regulated by increasing or decreasing the « amount » of mitochondria within the cell (hereby defined as the number of mitochondrial respiratory chain units). Indeed, for a constant flux through respiratory chains, doubling the amount of respiratory chains per cell will double the flux per cell. Both processes have been evidenced in proliferating cells. In C6 glioma cells, a decrease in oxidative phosphorylation activity has been shown when cells reach confluence. This is due to a decrease in complex I specific activity through phosphorylation of one of its subunits, without any change in mitochondrial amount [46]. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae* grown on non-fermentable substrate, growth yield is constant thanks to a strict and linear relationship between growth rate and oxidative phosphorylation activity. Moreover, oxidative phosphorylation activity in this model is strictly controlled by the number of respiratory chain units, assessed by the amount of mitochondrial cytochromes in the cells [47].

3.1. Evaluation of mitochondrial amount

A number of studies have evidenced a modulation of cellular oxidative phosphorylation activity either in yeast during diauxic shift [48–53] or in mammals in different tissues, during development and

cell differentiation, and in various physio-pathological situations [54–63]. However, in order to decipher the origin and molecular mechanisms involved in this process, a robust evaluation and definition of mitochondrial content and activity in cells is required. The question raised here is how to best define mitochondrial content in a cell. A number of parameters can be assessed such as their number, their size, their volume, the amount of mitochondrial cytochromes, the amount of mitochondrial DNA, the amount of lipids, proteins or enzymatic activities. Here we will briefly review the different parameters that are assessed as well as their advantages and drawbacks.

As stated above, when cultured on glucose the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a low mitochondrial content before the diauxic shift whereas this content increases greatly during and after this shift. Early studies from Yotsuyanagi et al have shown by electronic microscopy that before the diauxic shift, the yeast *Saccharomyces cerevisiae* exhibited very few mitochondria. Upon the diauxic shift, the amount of mitochondria increased and looked like a network of interconnected filaments that correlated with the increase in cellular oxidative phosphorylation activity [64]. Later on, serial section and 3D reconstruction showed that before the diauxic shift mitochondria would account for about 3% of the cellular volume and up to 10–12% after the diauxic shift [65]. A very recent study confirmed by 3D reconstruction of confocal images that mitochondria represent around 5% of cellular volume when grown in glucose, and this volume increases to 11% during diauxic shift and up to 35% during growth in ethanol [48]. Fluorescent proteins addressed to the mitochondrial compartment have



Scheme 5. Channeling in the heart. Respiration, ATP synthesis and ATP export through the inner mitochondrial membrane via adenine nucleotide transporter (ANT) are tightly coupled to trans-phosphorylation of ATP to PCr by MtCK and export of PCr into the cytosol by the outer membrane voltage-dependent anion channel (Porin).

also been used in mammalian cells to assess mitochondrial volume and this parameter correlates well with other mitochondrial markers such as citrate synthase or mitochondrial DNA amount [66]. Mitochondrial volume has also been assessed, either with radioactive probes [67,68] or fluorescent probes [69]. However, fluorescent probes have been shown to be highly sensitive to mitochondrial potential, pH and ROS and thus should be used with caution [70–72]. While the number and/or size or interconnectivity of mitochondrial tubules measured in numerous studies is highly dependent on the cell type and physiological conditions [57,73–76], the overall mitochondrial volume within a cell can be very informative (see above). However, it has been shown that the mitochondrial compartment might not vary as a whole but that there could be specific enrichment of some components and metabolic pathways [48,59,62,77,78] hinting that the volume of the organelle might be useful but not sufficient to depict the amount of material depending on the question addressed. Another approach would be to quantify mitochondrial proteins or lipids such as cardiolipin that only belong to the mitochondrial membrane. Quantification of cardiolipin for instance proved useful but often relies on fluorescent probes with the limits stated above [56,71,79–81]. Quantification of individual mitochondrial proteins in situ or by western blot is predominantly used [46,55,57,63]. However, attention should be paid to the fact that conclusions drawn will depend on the proteins probed and as said before there could be specific enrichment of some metabolic pathways. It might be insightful to use protein markers from different mitochondrial compartments and processes, for instance components of the oxidative phosphorylation and metabolic pathways, but also of house-keeping functions such as protein import, chaperones, or mtDNA maintenance and expression. Proteomics approaches may be necessary to appreciate the overall differential regulation of mitochondrial proteins [62]. The amount of mitochondrial DNA has often been shown to correlate well with the amount of mitochondria and mitochondrial proteins

[55–57,60,66,82]. Last but not least, when one is interested in the activity of oxidative phosphorylation, the amount of mitochondrial cytochromes is a robust and quantitative measurement of mitochondrial complexes [47,83–85]. However, this requires significant amounts of biological material and might not be applicable to all models and conditions. Mitochondrial citrate synthase (a matrix enzyme) is often used as a marker of mitochondrial amount [86–88] and to this day has proven a quite relevant measurement. Of note, while only a mitochondrial citrate synthase isoform is found in mammals, an additional cytosolic isoform of the enzyme is present in yeast. Nevertheless, this activity proved also relevant in yeast grown on non-fermentable substrate as it correlated well with cytochromes measurements [89].

In conclusion, although all parameters outlined above are of interest for assessing mitochondrial content when taken individually, the choice of best suited parameters strongly depends on the model and question addressed. Moreover, it is advisable to use a combination of parameters, as illustrated in some studies cited throughout this section, in order to avoid any bias and to raise more robust conclusions.

3.2. The Warburg effect: an example of long term mitochondrial oxidative phosphorylation regulation

O. Warburg conducted one of the first studies on tumor energy metabolism. His early discoveries pointed out that cancer cells display a decreased respiration and an increased glycolysis proportional to the increase in their growth rate, suggesting that they depend mainly on fermentative metabolism for ATP generation. Because the repression of oxidative metabolism occurs even if oxygen is plentiful, this metabolic phenomenon was named “aerobic glycolysis”. Warburg later proposed that dysfunctional mitochondria are the root of aerobic glycolysis [90] and further hypothesized that this event is the primary cause of cancer. The first consequence of these mitochondrial defects is a decrease in

oxidative phosphorylation activity [91]. The increase in glycolytic flux and fermentation concomitant to the decrease in oxidative phosphorylation compensates for the ATP synthesis decrease by oxidative phosphorylations as well as NADH oxidation through fermentation. As stated above, the decrease in oxidative phosphorylation evidenced in cancer cells has been proposed to be due to defective mitochondria. However, it has been shown that this decrease can also be linked to a decrease in the cellular amount of mitochondria (without mitochondrial defects). Skildum et al. have shown, in breast cancer cell lines, that an increase in mitochondrial biogenesis decreased cell proliferation and increased cell sensitivity to drugs, thanks to an increase in oxidative phosphorylation activity [92]. Jiang et al. have shown that in Warburg positive cells, addition of non-dysfunctional mitochondria induces a decrease in glycolytic flux as well as in cell proliferation which reinforces the idea that a decrease in oxidative phosphorylation induces the Warburg metabolic switch [93]. Fantin et al. have shown that in the absence of fermentation, a decrease in tumor cell proliferation as well as an increase in oxidative phosphorylation could be evidenced [94]. This suggests that the cellular redox balance is a key player in the Warburg effect [95]. Nonetheless, there is a considerable body of evidence that challenges the paradigm of the purely “glycolytic” cancer cell [96]. Some glioma, hepatoma and breast cancer cell lines possess functional mitochondria and they obtain their ATP mainly from oxidative phosphorylation [46,97–99]. This points out that the metabolic plasticity observed in vitro may have an impact on tumor physiology in vivo.

A more finalist way of analyzing the Warburg effect is to investigate its added value to promote cell growth. A review of the literature shows that the possible benefits of this energy metabolism rewiring for cancer cell growth are not clear. Aerobic glycolysis is inefficient in terms of ATP synthesis yield when compared with mitochondrial respiration. However, in mammals, the rate of glucose metabolism through aerobic glycolysis is 10 to 100 higher than complete oxidation of glucose by mitochondrial oxidative phosphorylation. One could thus hypothesize that one of the functions of the Warburg effect would be to support the rapid production of ATP that can be rapidly tuned to support the demand for ATP synthesis. It has also been proposed that intense aerobic glycolysis was necessary to ensure the supply of glycolytic intermediates as building blocks to biosynthetic pathways. To this day, and despite numerous studies, the possible advantages of this metabolic rewiring are still under investigation. From a metabolic point of view, the fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* and tumor cells share several features [100,101]. In both cell proliferation. The role of oxidative phosphorylation in the presence of glucose, and fermentation is a good model to study the Warburg effect, where all parameters can be reconstituted. However, contrary to what was proposed by Warburg and in accordance with a number of reports from the literature, we show that in this model mitochondria are not dysfunctional: there are fewer mitochondria respiratory chain units per cell. Identification of the molecular mechanisms involved in this process allowed us to dissociate the parameters involved in the Warburg effect and we showed that oxidative phosphorylation repression is not mandatory to favor cell growth. Last but not least, we were able to show that cellular ATP synthesis flux does not control cellular growth rate [102].

4. The input of modeling to the study of cell energy metabolism

4.1. The control of oxidative phosphorylation

The fundamental question that was tackled is: what step controls oxidative phosphorylation? Based on Metabolic Control Theory (MCT), this was beautifully answered by two groups, one in Amsterdam [103] and the other in Magdeburg [104]. MCT addresses a simple question: how is the whole flux of a metabolic network such as oxidative phosphorylations, (respiration or ATP synthesis) modulated when a single step (cytochrome *c* oxidase for instance) is modulated? The theory

initiated for linear pathway [105–107] and in all its generality by Christine Reder naturally defines the control coefficient C_i^F of a step *i* on a flux *F* at steady-state as $C_i^F = \Delta F/\Delta v_i$, where ΔF is the change induced by the change Δv_i in *vi* [108]. This is a quantitative measure of the control of a step on the whole flux at a given steady state. In order to induce a variation of *vi*, it is necessary to change a parameter influencing *vi* which can be, for instance, the enzyme concentration *Ei*, an inhibitor of *Ei*, the temperature etc.... So that the definition of C_i^F is $C_i^F = (\Delta F/\Delta p_i)/(\Delta v_i/\Delta p_i) = (\partial F/\partial p_i)/(\partial v_i/\partial p_i)$ where p_i is a parameter which specifically acts on *vi*. This is at the same time a mathematical definition and an experimental one when ΔF and Δp_i are experimentally measured under the effect of Δp_i (for details on the theory, see [109–113]).

One of the most important result of this theory is that, in a metabolic network, the sum of control coefficients of all the steps on a flux *F* at steady-state in this network is equal to one:

$C_1^F + C_2^F + \dots + C_n^F = 1$ where *n* is the number of steps in the network.

The control coefficient of the different steps of oxidative phosphorylations on mitochondrial respiration were measured for the first time in [103,104] and showed three important results: (i) that the control of the respiratory rate can be shared among several steps, namely the adenylate carrier, the dicarboxylate carrier, respiratory substrate supply and the proton leak, (ii) that the sum of control coefficient amounts to nearly one and (iii) that the distribution of control coefficients varies according to the steady-state *i. e.* the physiological conditions. These results were confirmed on yeast [114], on brain in pathological situations [115], on mammalian muscle [116] and on other pathways such as fermentation. In that case, four main controlling steps were evidenced: glucose and lactate transport, hexokinase and phosphofructokinase [117]. Pyruvate kinase can also have a significant control depending on the conditions.

4.2. Channeling and supercomplexes

In the metabolic control theory, it is supposed that enzymes and metabolites are free to interact according to the collision theory. This is why the control coefficients are most of the time weak. The inhibition of a step increases the concentration of substrates which usually tends to increase the reaction rate, such that a new steady-state is reached with an intermediate value of the whole flux between 0 and Δv_i : the variations of metabolites concentrations buffer the changes in enzymes activities. This condition of free interactions between the enzymes and their substrates and products is mandatory for the fundamental summation theorem *i.e.* the sum of control coefficient equal to 1. Conversely, in the case of channeling and supercomplexes, the sum of control coefficient can vary from less than one to the total number of steps because inhibiting one step in a supercomplex inhibits all the steps [118]. This property was elegantly exploited experimentally to evidence a partial supramolecular organization of the respiratory chain [119]. In this work the authors, using bovine heart mitochondria and submitochondrial particles showed a possible association of complexes I and III (sum of control coefficient > 1) while the other complexes (II and IV) appear functionally independent. Similar results were obtained on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* at the cellular level [120].

MCT has been a great tool to solve the long-standing riddle of the control of oxidative phosphorylation. The consideration of oxidative phosphorylations in pathologies in term of MCT has also been fruitful to understand the “threshold effect” in mitochondrial diseases [121,122] and is still fruitful in the search for the best targets (the most controlling steps) of anti-cancer drugs for instance [117] and parasites [123].

4.3. Modeling the Warburg effect

There have been several attempts to model the Warburg effect in order to better understand the forces at work in this effect and whether

they were required for cancer cell proliferation. Minimal models were particularly interesting because they revealed the fundamental constraints leading to the Warburg effect [124–127]. The simplest models, combining three reactions representing glycolysis and the bifurcation towards lactate or oxidative phosphorylation, showed that aerobic glycolysis is favored in presence of large amounts of glucose [124,125]. On the contrary, when glucose is scarce, oxidative phosphorylation is favored. A more realistic model was developed taking into account not only the bifurcation of pyruvate but also the necessary reoxidation of NADH [126]. By sampling at random a large number of flux ensembles of this simple metabolic network at steady state, these authors analyzed how cell proliferation rate, ATP production and NADH oxidation are intertwined. In many instances they found a combination of fluxes illustrating the Warburg effect, but they also evidenced situations in which proliferating cells do not necessarily exhibit the Warburg effect. This result is in accordance with recent data from our laboratory showing that repression of mitochondrial metabolism is not a prerequisite to promote cell proliferation [102,128].

5. Concluding remarks

Studies of cell energy metabolism and more particularly the relationships between glycolysis and oxidative phosphorylations mostly relied on thermokinetic analyses with great focus on the role of intermediaries, their peculiarities (glycolysis and oxidative phosphorylations are not equivalent in terms of NADH/NAD⁺ turnover) and the availability of substrates (glucose, oxygen etc.) for these pathways. Further, what was investigated in depth was how these pathways adjusted to modulations either of energy (the phosphate potential) or in redox constraints (the redox potential). The underlying trend was that ATP synthesis fluxes adjusted to ATP consumption fluxes and/or redox constraints. Recent studies have shown that when both glycolysis and oxidative phosphorylations are active simultaneously, the fluxes through these pathways and their interdependencies do not seem controlled by the ATP synthesis flux required for cellular functions. Moreover, predominance of one pathway over the other seem to mostly depend on the cell physiology i.e. whether the cell is proliferating or not for example. It still seems necessary to elucidate the relationships between cell energy metabolism and a number of cellular functions that require energy.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

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, The ANR. This project has been funded with support of the European Commission. This publication reflects the view only of the author, and the Commission cannot be held responsible for any use which may be made of the information contained therein.

References

- [1] R.L. Veech, J.W.R. Lawson, N.W. Cornell, H.A. Krebs, Cytosolic phosphorylation potential, *J. Biol. Chem.* 254 (1979) 6538–6547.
- [2] A. Carmona, R. Freedland, Effect of glycerol and dihydroxyacetone on hepatic lipogenesis, *Arch. Biochem. Biophys.* 271 (1989) 130–138.
- [3] M.N. Berry, E. Kun, H.V. Werner, Regulatory role of reducing-equivalent transfer from substrate to oxygen in the hepatic metabolism of glycerol and sorbitol, *Eur. J. Biochem.* 33 (1973) 407–417.

- [4] E.A. Siess, E. Banik, S. Neugebauer, Control of pyruvate carboxylase activity by the pyridine-nucleotide redox state in mitochondria from rat liver, *Eur. J. Biochem.* 173 (1988) 369–374.
- [5] M. Erecinska, R.L. Veech, F.D. Wilson, Thermodynamic relationships between the oxidation-reduction reactions and the ATP synthesis in suspensions of isolated pigeon heart mitochondria, *Arch. Biochem. Biophys.* 160 (1974) 412–421.
- [6] M. Erecinska, D.F. Wilson, Regulation of cellular energy metabolism, *J. Membr. Biol.* 70 (1982) 1–14.
- [7] M. Erecinska, D.F. Wilson, K. Nishiki, Homeostatic regulation of cellular energy metabolism: experimental characterization in vivo and fit to a model, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 234 (1978) 82–89, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1978.234.3.C82>.
- [8] S. Helling, S. Vogt, A. Rhiel, R. Ramzan, L. Wen, K. Marcus, B. Kadenbach, Phosphorylation and kinetics of mammalian cytochrome c oxidase, *Mol. Cell. Proteomics* 7 (2008) 1714–1724, <https://doi.org/10.1074/mcp.m800137-mcp200>.
- [9] H.G. Crabtree, Observations on the carbohydrate metabolism of tumours, *Biochem. J.* 23 (1929) 536–545.
- [10] S. Gatt, E. Racker, Regulatory mechanisms in carbohydrate: I. Crabtree effect in reconstructed systems, *J. Biol. Chem.* 234 (1959) 1015–1023.
- [11] L. Wojtczak, V.V. Teplova, K. Bogucka, A. Czyz, A. Makowska, M.R. Wieckowski, J. Duszynski, 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 Further arguments for the role of Ca²⁺ in the mechanism of the Crabtree effect, *Eur. J. Biochem.* 263 (1999) 495–501.
- [12] M. Zizi, M. Forte, E. Blachly-Dysons, M. Colombinis, NADH Regulates the Gating of VDAC, the Mitochondrial Outer Membrane Channel*, (1994), pp. 1614–1616.
- [13] M. Rosas Lemus, E. Roussarie, N. Hammad, A. Mougeolle, S. Ransac, R. Issa, J.-P. Mazat, S. Uribe-Carvajal, M. Rigoulet, A. Devin, The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect, *J. Biol. Chem.* (2018), <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003672> jbc.RA118.003672.
- [14] 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, <https://doi.org/10.1074/jbc.M800408200>.
- [15] M.R. Lemus, E. Roussarie, N. Hammad, A. Mougeolle, S. Ransac, R. Issa, J.-P. Mazat, S. Uribe-Carvajal, M. Rigoulet, A. Devin, The role of glycolysis-derived hexose phosphates in the induction of the Crabtree effect, *J. Biol. Chem.* 293 (2018) 12843–12854, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.003672>.
- [16] P.A. Srere, Complexes of sequential metabolic enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 56 (1987) 89–124.
- [17] D.E. Atkinson, Cellular Energy Metabolism and its Regulation, (1977).
- [18] M. Rigoulet, H. Aguilaniu, N. Avéret, O. Bunoust, N. Camougrand, X. Grandier-Vazeille, C. Larsson, L.-L. Pahlman, S. Manon, L. Gustafsson, Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biochem.* 257–257 (2004) 73–81.
- [19] N. Avéret, V. Fitton, O. Bunoust, M. Rigoulet, B. Guérin, Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study, *Mol. Cell. Biochem.* 184 (1998) 67–79.
- [20] O. Bunoust, A. Devin, N. Avéret, N. Camougrand, M. Rigoulet, Competition of electrons to enter the respiratory chain, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 3407–3413, <https://doi.org/10.1074/jbc.M407746200>.
- [21] M. Rigoulet, A. Mourier, A. Galinier, L. Casteilla, A. Devin, Electron competition process in respiratory chain: regulatory mechanisms and physiological functions, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 1797 (2010) 671–677, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.030>.
- [22] H. Schägger, K. Pfeiffer, Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.* 19 (2000) 1777–1783.
- [23] H. Schägger, Respiratory chain Supercomplexes, *IUBMB Life* 52 (2001) 119–128.
- [24] I. Wittig, R. Carozzo, F.M. Santorelli, H. Schägger, Supercomplexes and sub-complexes of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochim. Biophys. Acta* 1757 (2006) 1066–1072, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.05.006>.
- [25] D. Milenkovic, J.N. Blaza, N.-G. Larson, J. Hirst, The enigma of the respiratory chain supercomplex, *Cell Metab.* 25 (2017) 765–776, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.009>.
- [26] T. Althoff, D.J. Mills, J.-L. Popot, W. Kühlbrandt, Arrangement of electron transport chain components in bovine mitochondrial supercomplex I1III2IV1, *EMBO J.* 30 (2011) 4652–4664, <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.324>.
- [27] J.S. Sousa, D.J. Mills, J. Vonck, W. Kühlbrandt, Functional asymmetry and electron flow in the bovine respirasome, *Elife*. 5 (2016) 1–17, <https://doi.org/10.7554/eLife.21290>.
- [28] N.V. Dudkina, M. Kudryashev, H. Stahlberg, E.J. Boekema, Interaction of complexes I, III, and IV within the bovine respirasome by single particle cryoelectron tomography, *PNAS* 108 (2011) 15196–15200, <https://doi.org/10.1073/pnas.1107819108/-/DCSupplemental>. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1107819108.
- [29] J.A. Letts, K. Fiedorczuk, L.A. Sazanov, The architecture of respiratory super-complexes, *Nat. Publ. Gr.* 537 (2016) 644–648, <https://doi.org/10.1038/nature19774>.
- [30] K. Pfeiffer, V. Gohil, R.A. Stuart, C. Hunte, U. Brandt, M.L. Greenberg, H. Schägger, Cardiolipin stabilizes respiratory chain supercomplexes*, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52873–52880, <https://doi.org/10.1074/jbc.M308366200>.
- [31] C. Arnarez, J. Mazat, J. Elezgaray, S. Marrink, X. Periole, Evidence for cardiolipin binding sites on the membrane-exposed surface of the cytochrome bc₁, *J. Am. Chem. Soc.* 135 (2013) 3112–3120, <https://doi.org/10.1021/ja310577u>.
- [32] C. Arnarez, S.J. Marrink, X. Periole, Molecular mechanism of cardiolipin-mediated

- assembly of respiratory chain supercomplexes †, *Chem. Sci.* 7 (2016) 4435–4443, <https://doi.org/10.1039/c5sc04664e>.
- [33] A. Bashir, K.L. Bohnert, D.N. Reeds, L.R. Peterson, A.J. Bittel, Impaired cardiac and skeletal muscle bioenergetics in children, adolescents, and young adults with Barth syndrome, *Physiological Reports*. 5 (2017) 1–12.
- [34] M. McKenzie, M. Lazarou, D.R. Thorburn, M.T. Ryan, Mitochondrial respiratory chain supercomplexes are destabilized in Barth syndrome patients, *J. Mol. Biol.* 361 (2006) 462–469, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.06.057>.
- [35] L. Plecita-Hlavata, P. Jezek, The international journal of biochemistry integration of superoxide formation and cristae morphology for mitochondrial redox signaling, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 80 (2016) 31–50, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.010>.
- [36] M. Strauss, G. Hofhaus, R.R. Schröder, W. Kühlbrandt, Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane, *EMBO. J.* 27 (2008) 1154–1160, <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>.
- [37] M. Vendelin, N. Béraud, K. Guerrero, T. Andrienko, A.V. Kuznetsov, J. Olivares, L. Kay, V.A. Saks, N. Be, K. Guerrero, A.V. Kuznetsov, J. Olivares, L. Kay, V.A. Saks, Methods in cell physiology mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a “crystal-like” pattern, *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 288 (2005) C757–C767, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00281.2004>.
- [38] N. Beraud, S. Pelloux, Y. Usson, A.V. Kuznetsov, X. Ronot, Y. Tourneur, 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, <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9214-x>.
- [39] 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, *BBA - Bioenerg.* 1797 (2010) 678–697, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.011>.
- [40] D.E. Green, E. Murer, H.O. Hultin, S.H. Richardson, B. Salmon, G.P. Brierley, H. Baum, Association of integrated metabolic pathways with membranes, *Arch. Biochem. Biophys.* 112 (1965) 635–647.
- [41] F.M. Clarke, C.J. Masters, On the association of glycolytic enzymes with structural proteins of skeletal muscle, *Biochim. Biophys. Acta* 381 (1975) 37–46.
- [42] B. Raïs, F. Ortega, J. Puigjaner, B. Comin, F. Orosz, J. Ovadi, M. Cascante, Quantitative characterization of homo- and heteroassociations of muscle phosphofructokinase with aldolase, *Biochim. Biophys. Acta* 1479 (2000) 303–314.
- [43] A. Hudder, L. Nathanson, M.P. Deutscher, Organization of Mammalian Cytoplasm, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003) 9318–9326, <https://doi.org/10.1128/MCB.23.24.9318>.
- [44] J.S. Clegg, S.A. Jackson, Glucose metabolism and the channeling of glycolytic intermediates in Permeabilized L-929 cells, *Arch. Biochem. Biophys.* 278 (1990) 452–460.
- [45] E. Espinoza-Simon, N. Chiquete-Felix, L. Morales-Garcia, U. Pedroza-Davila, X. Pérez-Martinez, D. Araiza-Olivera, F. Torres-Quiroz, S. Uribe-Carvajal, In *Saccharomyces cerevisiae*, withdrawal of the carbon source results in detachment of glycolytic enzymes from the cytoskeleton and in actin reorganization, *Fungal Biol.* 124 (2020) 15–23, <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2019.10.005>.
- [46] 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, <https://doi.org/10.1023/A:1027391831382>.
- [47] A. Devin, L. Dejean, B. Beauvoit, C. Chevzoff, N. Avéret, O. Bunoust, M. Rigoulet, Growth yield homeostasis in respiring yeast is due to a strict mitochondrial content adjustment, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 26779–26784, <https://doi.org/10.1074/jbc.M604800200>.
- [48] F. Di Bartolomeo, C. Malina, K. Campbell, M. Mormino, J. Fuchs, E. Vorontsov, C.M. Gustafsson, J. Nielsen, Absolute yeast mitochondrial proteome quantification reveals trade-off between biosynthesis and energy generation during diauxic shift, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2020), <https://doi.org/10.1073/pnas.1918216117>.
- [49] C.P. Henson, P. Perlman, C.N. Weber, H.R. Mahler, Formation of yeast mitochondria. II. Effects of antibiotics on enzyme activity during derepression, *Biochemistry* 7 (1968) 4445–4454, <https://doi.org/10.1021/bi00852a041>.
- [50] A.J. Lamb, G.D. Clark-Walker, A.W. Linnane, The biogenesis of mitochondria 4. The differentiation of mitochondrial and cytoplasmic protein synthesizing systems in vitro by antibiotics, *Biochim. Biophys. Acta* 161 (1968) 415–427.
- [51] T.G. Cartledge, D. Lloyd, Subcellular fractionation by differential and zonal centrifugation of aerobically grown glucose-de-repressed *Saccharomyces carlsbergensis*, *Biochem. J.* 126 (1972) 381–393.
- [52] C.P.M. Görts, A. Hasilik, Effects of antibiotics on the development and stability of mitochondrial enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.* 29 (1972) 282–287.
- [53] H.R. Mahler, P. Perlman, C.P. Henson, C.N. Weber, Selective effects of chloramphenicol, cycloheximide and nalidixic biosynthesis of respiratory enzymes in yeast, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 31 (1968) 474–480.
- [54] T. Akimoto, S.C. Pohnert, P. Li, M. Zhang, C. Gumbs, P.B. Rosenberg, R.S. Williams, Z. Yan, Exercise stimulates Pgc-1 α transcription in skeletal muscle through activation of the p38 MAPK pathway, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 19587–19593, <https://doi.org/10.1074/jbc.M408862200>.
- [55] C. Giordano, L. Iommarini, L. Giordano, A. Maresca, A. Pisano, M.L. Valentino, L. Caporali, R. Liguori, S. Deceglie, M. Roberti, F. Fanelli, F. Fracasso, F.N. Ross-Cisneros, P. D'Adamo, G. Hudson, A. Pyle, P. Yu-Wai-Man, P.F. Chinnery, M. Zeviani, S.R. Salomao, A. Berezovsky, R. Belfort, D.F. Ventura, M. Moraes, M. Moraes Filho, P. Barboni, F. Sadun, A. De Negri, A.A. Sadun, A. Tancredi, M. Mancini, G. d'Amati, P. Loguercio Polosa, P. Cantatore, V. Carelli, Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy, *Brain A J. Neurol.* 137 (2014) 335–353, <https://doi.org/10.1093/brain/awt343>.
- [56] S.-K. Kim, Y. Joe, M. Zheng, H.J. Kim, J.-K. Yu, G.J. Cho, K.C. Chang, H.K. Kim, J. Han, S.W. Ryter, H.T. Chung, Resveratrol induces hepatic mitochondrial biogenesis through the sequential activation of nitric oxide and carbon monoxide production, *Antioxid. Redox Signal.* 20 (2014) 2589–2605, <https://doi.org/10.1089/ars.2012.5138>.
- [57] 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.
- [58] K. Weber, D. Ridderskamp, M. Alfert, S. Hoyer, R.J. Wiesner, Cultivation in glucose-deprived medium stimulates mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in HepG2 hepatoma cells, *Biol. Chem.* 383 (2002) 283–290, <https://doi.org/10.1515/BC.2002.030>.
- [59] S. Benlamara, L. Aubry, J. Fabregue, P. Bénit, P. Rustin, M. Rak, Distinctive Krebs cycle remodeling in iPSC-derived neural and mesenchymal stem cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 511 (2019) 658–664, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.02.033>.
- [60] E. Fernández-Vizarra, J.A. Enríquez, A. Pérez-Martos, J. Montoya, P. Fernández-Silva, Tissue-specific differences in mitochondrial activity and biogenesis, *Mitochondrion*. 11 (2011) 207–213, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2010.09.011>.
- [61] D.-F. Dai, M.E. Danoviz, B. Wiczler, M.A. Laflamme, R. Tian, Mitochondrial maturation in human pluripotent stem cell derived cardiomyocytes, *Stem Cells Int.* 2017 (2017) 5153625, <https://doi.org/10.1155/2017/5153625>.
- [62] Y. Kim, D.S. Yang, P. Katti, B. Glancy, Protein composition of the muscle mitochondrial reticulum during postnatal development, *J. Physiol.* 597 (2019) 2707–2727, <https://doi.org/10.1113/JP277579>.
- [63] G. Benard, B. Faustin, E. Passerieux, A. Galinier, C. Rocher, N. Bellance, J.-P. Delage, L. Casteilla, T. Letellier, R. Rossignol, Physiological diversity of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 291 (2006) C1172–C1182, <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00195.2006>.
- [64] Y. Yotsuyanagi, Study of yeast mitochondria. I. Variations in mitochondrial ultrastructure during the aerobic growth cycle, *J. Ultrastruct. Res.* 7 (1962) 121–140, [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(62\)80031-8](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(62)80031-8).
- [65] B. Stevens, Mitochondrial structure, in: J.N. Strathern, E.W. Jones, J.R. Broach (Eds.), *Mol. Biol. Yeast *Saccharomyces cerevisiae**, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1981, pp. 471–504.
- [66] A. Costanzini, G. Sgarbi, A. Maresca, V. Del Dotto, G. Solaini, A. Baracca, Mitochondrial mass assessment in a selected cell line under different metabolic conditions, *Cells*. 8 (2019) 1454, <https://doi.org/10.3390/cells8111454>.
- [67] P. Espié, A. Devin, B. Guérin, M. Rigoulet, Energetics of isolated hepatocyte swelling induced by sodium co-transported amino acids, *J. Bioenerg. Biomembr.* 29 (1997) 591–601, <https://doi.org/10.1023/a:1022487119390>.
- [68] A. Devin, P. Espié, B. Guérin, M. Rigoulet, Energetics of swelling in isolated hepatocytes: a comprehensive study, *Mol. Cell. Biochem.* 184 (1998) 107–121 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9746316>.
- [69] A. Chevrollier, J. Cassereau, M. Ferré, J. Alban, V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, P. Amati-Bonneau, V. Procaccio, D. Bonneau, P. Reynier, Standardized mitochondrial analysis gives new insights into mitochondrial dynamics and OPA1 function, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 980–988, <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.03.006>.
- [70] C. Cotte-Rousselle, X. Ronot, X. Lerverve, J.-F. Mayol, Cytometric assessment of mitochondria using fluorescent probes, *Cytom. Part A*. 79A (2011) 405–425, <https://doi.org/10.1002/cyto.a.21061>.
- [71] E. Doherty, A. Perl, Measurement of Mitochondrial Mass by Flow Cytometry during Oxidative Stress, *React. Oxyg. Species (Apex, N.C.)*, 4 (2017), pp. 275–283, <https://doi.org/10.20455/ros.2017.839>.
- [72] B. Glancy, Visualizing mitochondrial form and function within the cell, *Trends Mol. Med.* 26 (2020) 58–70, <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.09.009>.
- [73] R.K. Dagda, S.J. Cherra, S.M. Kulich, A. Tandon, D. Park, C.T. Chu, Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress and mitochondrial fission, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13843–13855, <https://doi.org/10.1074/jbc.M808515200>.
- [74] C. Sauvanet, S. Duvezin-Caubet, J.-P. di Rago, M. Rojo, Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics, *Semin. Cell Dev. Biol.* 21 (2010) 558–565, <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.12.006>.
- [75] L. Wiemerslage, D. Lee, Quantification of mitochondrial morphology in neurites of dopaminergic neurons using multiple parameters, *J. Neurosci. Methods* 262 (2016) 56–65, <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.01.008>.
- [76] S. Duvezin-Caubet, R. Jagasia, J. Wagener, S. Hofmann, A. Trifunovic, A. Hansson, A. Chomyn, M.F. Bauer, G. Attardi, N.-G. Larson, W. Neupert, A.S. Reichert, Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology *, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 37972–37979, <https://doi.org/10.1074/jbc.M606059200>.
- [77] S. Schmitt, S. Schulz, E.-M. Schropp, C. Eberhagen, A. Simmons, W. Beisker, M. Aichler, H. Zischka, Why to compare absolute numbers of mitochondria, *Mitochondrion*. 19 (2014) 113–123, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.06.005>.
- [78] C. Fecher, L. Trovò, S.A. Müller, N. Snaidero, J. Wettmarhausen, S. Heink, O. Ortiz, I. Wagner, R. Kühn, J. Hartmann, R.M. Karl, A. Konnerth, T. Korn, W. Wurst, D. Merkler, S.F. Lichtenthaler, F. Perocchi, T. Miggel, Cell-type-specific profiling of brain mitochondria reveals functional and molecular diversity, *Nat. Neurosci.* 22 (2019) 1731–1742, <https://doi.org/10.1038/s41593-019-0479-z>.
- [79] J. Jacobson, M.R. Duchon, S.J.R. Heales, Intracellular distribution of the fluorescent dye nonyl acridine orange responds to the mitochondrial membrane potential: implications for assays of cardiolipin and mitochondrial mass, *J.*

- Neurochem. 82 (2002) 224–233, <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00945.x>.
- [80] A. Maftah, J.M. Petit, M.-H. Ratinaud, R. Julien, 10-N nonyl-acridine orange: a fluorescent probe which stains mitochondria independently of their energetic state, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164 (1989) 185–190, [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(89\)91700-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(89)91700-2).
- [81] J.-M. Petit, A. Maftah, M.-H. Ratinaud, R. Julien, 10N-Nonyl acridine orange interacts with cardiolipin and allows the quantification of this phospholipid in isolated mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 209 (1992) 267–273, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17285.x>.
- [82] C. Deveaud, B. Beauvoit, B. Salin, J. Schaeffer, M. Rigoulet, Regional differences in oxidative capacity of rat white adipose tissue are linked to the mitochondrial content of mature adipocytes, *Mol. Cell. Biochem.* 267 (2004) 157–166, <https://doi.org/10.1023/b:mcbi.0000049374.52989.9b>.
- [83] W.H. Vanneste, Molecular proportion of the fixed cytochrome components of the respiratory chain of Keilin-Hartree particles and beef heart mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 113 (1966) 175–178, [https://doi.org/10.1016/s0926-6593\(66\)80132-7](https://doi.org/10.1016/s0926-6593(66)80132-7).
- [84] T. Onishi, A. Kröger, H.W. Heldt, E. Pfaff, M. Klingenberg, The response of the respiratory chain and adenine nucleotide system to oxidative phosphorylation in yeast mitochondria, *Eur. J. Biochem.* 1 (1967) 301–311, <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1967.tb00074.x>.
- [85] R.W. Estabrook, A. Holowinsky, Studies on the content and organization of the respiratory enzymes of mitochondria, *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 9 (1961) 19–28, <https://doi.org/10.1083/jbc.9.1.19>.
- [86] M. Mogensen, M. Bagger, P.K. Pedersen, M. Fernström, K. Sahlin, Cycling efficiency in humans is related to low UCP3 content and to type I fibres but not to mitochondrial efficiency, *J. Physiol.* 571 (2006) 669–681, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2005.101691>.
- [87] S. Larsen, J. Nielsen, C.N. Hansen, L.B. Nielsen, F. Wibrand, N. Stride, H.D. Schroder, R. Boushel, J.W. Helge, F. Dela, M. Hey-Mogensen, Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects, *J. Physiol.* 590 (2012) 3349–3360, <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230185>.
- [88] R. Rabøl, P.F. Svendsen, M. Skovbro, R. Boushel, S.B. Haugaard, P. Schjerling, P. Schrauwen, M.K.C. Hesselink, L. Nilas, S. Madsbad, F. Dela, Reduced skeletal muscle mitochondrial respiration and improved glucose metabolism in non-diabetic obese women during a very low calorie dietary intervention leading to rapid weight loss, *Metabolism.* 58 (2009) 1145–1152, <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.03.014>.
- [89] C.L. Bouchez, E.D. Yoboue, L.E. De la Rosa Vargas, B. Salin, S. Cuvellier, M. Rigoulet, S. Duvezin-caubet, A. Devin, “Labile” heme critically regulates mitochondrial biogenesis through the transcriptional co-activator Hap4p in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 295 (2020) 5095–5109, <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.012739>.
- [90] O. Warburg, On the origin of cancer cells, *Science* (80-) 123 (1956) 309–314 <http://www.sciencemag.org/content/123/3191/309.full.pdf>.
- [91] O. Warburg, On respiratory impairment in cancer cells, *Science* (80-) 124 (1956) 269–270.
- [92] A. Skildum, K. Dornfeld, K. Wallace, Mitochondrial amplification selectively increases doxorubicin sensitivity in breast cancer cells with acquired antiestrogen resistance, *Breast Cancer Res. Treat.* 129 (2011) 785–797, <https://doi.org/10.1007/s10549-010-1268-2>.
- [93] X.-P. Jiang, R.L. Elliott, J.F. Head, Exogenous normal mammary epithelial mitochondria suppress glycolytic metabolism and glucose uptake of human breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 153 (2015) 519–529, <https://doi.org/10.1007/s10549-015-3583-0>.
- [94] V.R. Fantin, J. St-Pierre, P. Leder, Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance, *Cancer Cell* 9 (2006) 425–434, <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.023>.
- [95] J.W. Locasale, L.C. Cantley, Review metabolic flux and the regulation of mammalian cell growth, *Cell Metab.* 14 (2011) 443–451, <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.07.014>.
- [96] R. Moreno-Sanchez, S. Rodríguez-Enriquez, A. Marin-Hernandez, E. Saavedra, Energy metabolism in tumor cells, *FEBS J.* 274 (2007) 1393–1418, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.05686.x>.
- [97] M. Martin, B. Beauvoit, P.J. Voisin, P. Canioni, B. Guerin, M. Rigoulet, Energetic and morphological plasticity of C6 glioma cells grown on 3-D support; effect of transient glutamine, *J. Bioenerg. Biomembr.* 30 (1998) 565–578.
- [98] 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.
- [99] S. Rodríguez-Enriquez, 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, <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.02.005>.
- [100] R. Diaz-ruiz, S. Uribe-carvajal, A. Devin, M. Rigoulet, Tumor cell energy metabolism and its common features with yeast metabolism, *BBA - Rev. Cancer.* 1796 (2009) 252–265, <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2009.07.003>.
- [101] 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 Bioenerg.* 1807 (2011) 568–576, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.08.010>.
- [102] C.L. Bouchez, N. Hammad, S. Cuvellier, M. Rigoulet, A. Devin, The Warburg Effect: Repression of Mitochondrial Metabolism Is Not a Prerequisite to Promote Cell Proliferation, *IN PRESS, Frontiers (Boulder)*, 2020, pp. 1–18.
- [103] A.K. Groen, R.J.A. Wanders, H.V. Westerhoff, R. Van der Meer, J.M. Tager, Quantification of the contribution of various steps to the control of mitochondrial respiration, *J. Biol. Chem.* 257 (1982) 2754–2757.
- [104] R. Bohnensack, U.W.E. Kuster, G. Letko, Rate-controlling steps of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. A synoptic approach of model and experiment, *Biochim. Biophys. Acta* 680 (1982) 271–280.
- [105] R. Heinrich, T.A. Rapoport, A linear steady-state treatment of enzymatic chains. general properties, control and effector strength, *Eur. J. Biochem.* 42 (1974) 89–95.
- [106] R. Heinrich, T.A. Rapoport, Linear theory of enzymatic chains; its application for the analysis of the crossover theorem and of the glycolysis of human, *Acta Biol Med Ger.* 31 (1973) 479–494.
- [107] H. Kacser, J.A. Burns, The control of flux, *Symp. Soc. Exp. Biol.* 27 (1973) 65–104.
- [108] C. Reder, Metabolic control theory: a structural approach, *J. Theor. Biol.* 135 (1988) 175–201.
- [109] D.A. Fell, *Understanding the Control of Metabolism*, Protland P (1997).
- [110] E. Klipp, W. Liebermeister, C. Wierling, A. Kowald, H. Lehrach, R. Herwig, *Systems Biology: A Textbook*, 2nd edition, Wiley-Blac, 2016.
- [111] R. Heinrich, S. Schuster, *The Regulation of Cellular Systems*, (1996).
- [112] J.-P. Mazat, E. Jean-Bart, How can two steps simultaneously control a flux? *Biochem. Educ.* 16 (1988) 28–30.
- [113] A. Cornish-bowden, M.L. Cardenas, *Control of Metabolic Processes*, (1990).
- [114] J.-P. Mazat, E. Jean-Bart, M. Rigoulet, B. Guérin, Control of oxidative phosphorylations in yeast mitochondria. Role of the phosphate carrier, *Biochim. Biophys. Acta* 846 (1986) 7–15.
- [115] M. Rigoulet, N. Avéret, J.-P. Mazat, B. Guerin, F. Cohadon, Redistribution of the flux-control coefficients in mitochondrial oxidative phosphorylations in the course of brain edema, *Biochim. Biophys. Acta* 932 (1988) 116–123.
- [116] T. Letellier, M. Malgat, J.-P. Mazat, Control of oxidative phosphorylation in rat muscle mitochondria: implications for mitochondrial myopathies, *Biochim. Biophys. Acta* 1141 (1993) 58–64.
- [117] L. Bahati Tanner, A.G. Goglia, M.H. Wei, T. Sehgal, L.R. Parson, J.O. Park, E. White, J.E. Toettcher, J.D. Rabinowitz, Four key steps control glycolytic flux in mammalian cells, *Cell Syst.* 7 (2018) 49–62.e8, <https://doi.org/10.1016/j.cels.2018.06.003>.
- [118] B.N. Kholodenko, H.V. Westerhoff, Metabolic channelling and control of the flux, *FEBS* 320 (1993) 71–74.
- [119] C. Bianchi, M.L. Genova, G. Parenti Castelli, G. Lenaz, The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 36562–36569, <https://doi.org/10.1074/jbc.M405135200>.
- [120] H. Boumans, L.A. Grivell, J.A. Berden, The respiratory chain in yeast behaves as a single functional unit, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 4872–4877.
- [121] T. Letellier, R. Heinrich, M. Malgat, J.-P. Mazat, The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach, *Biochem. J.* 302 (1994) 171–174.
- [122] R. Rossignol, B. Faustin, C. Rocher, M. Malgat, J.-P. Mazat, T. Letellier, Mitochondrial threshold effects, *Biochem. J.* 370 (2003) 751–762.
- [123] E. Saavedra, Z. Gonzalez-Chavez, R. Moreno-Sánchez, P.A.M. Michels, Drug target selection for *Trypanosoma cruzi* metabolism by metabolic control analysis and kinetic modeling, *Curr. Med. Chem.* 26 (2019) 6652–6671.
- [124] T. Pfeiffer, S. Schuster, S. Bonhoeffer, Cooperation and competition in the evolution of ATP-producing pathways, *Science* (80-) 292 (2001) 504–508.
- [125] P. Möller, X. Liu, S. Schuster, D. Boley, Linear programming model can explain respiration of fermentation products, *PLoS One* 13 (2018) 1–18.
- [126] Z. Dai, A.A. Shestov, L. Lai, J.W. Locasale, A flux balance of glucose metabolism clarifies the requirements of the Warburg effect, *Biophys. J.* 111 (2016) 1088–1100, <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.07.028>.
- [127] J.-P. Mazat, S. Ransac, The fate of glutamine in human metabolism. The interplay with glucose in proliferating cells, *Metabolites* 9 (2019) 1–22.
- [128] N. Slavov, B.A. Budnik, D. Schwab, E.M. Airoldi, A. Van Oudenaarden, Constant growth rate can be supported by decreasing energy flux and increasing aerobic glycolysis, *Cell Rep.* 7 (2014) 705–714, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.03.057>.

LETTER TO THE EDITOR

INHIBITION OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME C OXIDASE BY METABOLIZED NOBILETIN IN YEAST

N. SHARIKADZE^{1,2,3}, N. HAMMAD^{1,2}, C.L. BOUCHEZ^{1,2}, N. AVERET^{1,2},
M. RIGOULET^{1,2}, E. ZHURAVLIOVA^{3,4}, D.G. MIKELADZE^{3,4} and A. DEVIN^{1,2}

¹Department of Life and Health Sciences Bordeaux University, Bordeaux, France; ²Institute of Cellular Biochemistry and Genetics, Bordeaux, France; ³Institute of Chemical Biology, Ilia State University, Tbilisi, Georgia; ⁴Department of Biochemistry, I. Beritashvili Center of Experimental Biomedicine, Tbilisi, Georgia

Received November 26, 2018 – Accepted April 10, 2019

To the Editor,

Nobiletin (3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone) is a flavonoid and a major component of citrus fruits, particularly in the peel of sweet oranges (*Citrus sinensis*) and mandarin oranges (*Citrus reticulata*). Nobiletin attracts special attention because of its anti-inflammatory, antitumor, and neuroprotective properties. Without a glycoside moiety, Nobiletin is easily absorbed, due to its high lipophilic nature and high permeability (1). Recent evidence shows that Nobiletin is a multifunctional pharmaceutical agent, and its various pharmacological activities include neuroprotection, cardiovascular protection, antimetabolic disorder, anticancer, anti-inflammation, and antioxidation (2). Even though the beneficial physiological and biological effects of Nobiletin have been widely studied (2), very few studies have addressed the possible modulation of cell energy metabolism by this molecule (3, 4). Here, we investigated the influence of Nobiletin on cellular energetic metabolism in two distinct yeast strains: *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. The *Saccharomyces cerevisiae* strain exhibits two external Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenases and one internal NADH dehydrogenase that have no proton pumping activity.

The yeast *Candida utilis* mitochondria exhibits a complex I that is proposed to pump protons and an external NADH dehydrogenase that does not pump protons. We have shown that Nobiletin temporarily inhibits mitochondrial respiratory chain on whole cells in a similar fashion to *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. The observed inhibition of mitochondrial respiratory chain, and more specifically mitochondrial cytochrome c oxidase, requires cellular incubation in the presence of Nobiletin or treatment of isolated mitochondria with metabolites extracted from cells incubated with Nobiletin. We therefore propose that this inhibition is not a direct inhibition by Nobiletin but is more likely due to one of its metabolites.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, culture medium and growth conditions

The yeast strains *C. utilis* CBS621 and *Saccharomyces cerevisiae* (yeast foam) were used in this study. Cells were grown aerobically at 28°C in the following medium: 0.175% yeast nitrogen base w/o sulphate (Difco), 0.2% casein hydrolysate (Merck), 0.5% (NH₄)₂SO₄, 0.1% KH₂PO₄, 2% lactate (w/v) (Prolabo), pH 5.5, 20mg/L L-tryptophan (Sigma), 40mg/L adenine hydrochloride

Key words: Nobiletin, yeast, mitochondria, respiratory chain, cytochrome oxidase

Corresponding Author:

Prof. David Mikeladze,
Director of Institute of Chemical Biology,
Ilia State University,
Cholokashvili av., 3/5 Tbilisi, 0162, Georgia
Tel.: +995 32 2998571
e-mail: davit_mikeladze@iliauni.edu.ge

(Sigma) and 20mg/L uracil (Sigma). 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.

Mitochondria preparation

Yeast cells were harvested in the exponential growth phase and spheroplasts were obtained by enzymatic digestion of the cell wall with Zymolyase 10 mg/g dry weight (ICN iomedicals) as previously described with small modifications (5).

Cells were pelleted at room temperature by centrifugation at 3000g for 10 min and washed three times with distilled water. The obtained yeast pellet was resuspended in prewarmed SH buffer (100 mM Tris, pH 9.3, 0.5 M β -mercaptethanol, 20ml/g DW) and shaken slowly (approx 80 rpm) at 32°C for 10 min. After centrifugation at 3000g for 5 min, the pellet was washed three times in KCl buffer (KCl 0.5M, Tris 10 mM, pH 7) and then resuspended in zymolyase buffer (1.35 M sorbitol, EGTA 1mM; 0.2M sodium phosphate, pH 7.4) 10ml/g DW containing 10 mg zymolyase per gram wet weight and shaken slowly at 30°C for 30–45 min. Cell wall digestion was followed by assessing OD_{600nm} in water. The cells were harvested by centrifugation at 13000g for 10 min and the pellet was washed with zymolyase buffer. The obtained pellet was resuspended in ice-cold homogenization buffer (0.5 M mannitol, 10 mM Tris-Maleate, pH 7.4, 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EGTA), 10 mM Tris-orthophosphate, 0.2% (w/v) bovine serum albumin pH6.8). Spheroplasts were homogenized with 15 strokes using a glass-Teflon homogenizer, then the sample was diluted twofold with homogenization buffer and centrifuged at 600g for 10 min to pellet cell debris and nuclei. The obtained supernatant was centrifuged at 13000g for 10 min. Crude mitochondrial pellet was washed in ice-cold homogenization buffer and centrifuged again at 600g for 10 min to pellet cell debris and nuclei. Supernatant then was centrifuged at 13000g for 10 min and the obtained mitochondrial pellet was gently resuspended in the following buffer: 0.6 M mannitol, 10 mM Tris-Maleate, pH 7.4, 2 mM EGTA, 10 mM Tris-orthophosphate, pH 6.8 to a final concentration of 60mg/mL protein with ice-cold buffer.

Protein concentration was measured by the biuret

method using bovine serum albumin as standard (6).

Spheroplasts preparation

Spheroplasts were obtained according to Avéret et al. (7) and were resuspended 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, 4 mM iodoacetate, and 1% bovine serum albumin, pH 6.8 and, permeabilized by nystatin, as described (8). If unspecified, respiratory substrates were 10 mM, Cytochrome c oxidase activity measurement was carried out in the presence of 5 μ M antimycin A, 0.25 mM N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-benzenediamine, dihydrochloride (TMPD) and 1 mM ascorbate.

Respiration assay

The oxygen consumption was measured polarographically at 28°C using a Clark oxygen electrode in a 1-ml thermostatically controlled chamber. Respiratory rates (JO₂) were determined from the slope of a plot of O₂ concentration *versus* time. For whole cells, oxygen consumption rate, growing cell suspension (1 ml) was quickly transferred to the respirometer and the “spontaneous cell respiration” was determined. The uncoupled respiratory rate was assessed in the presence of 100 mM ethanol (to avoid a kinetic control upstream the respiratory chain) and 10 μ M carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP). The non-phosphorylating respiratory rate was assessed in the presence of 0.2 mM triethyltin bromide (TET), an inhibitor of mitochondrial ATP synthase (8). For isolated mitochondria respiration measurements, mitochondria (0.33 mg/mL) were incubated in 1 mL mitochondrial buffer (0.65 M mannitol, 0.36 mM EGTA, 10 mM Tris-maleate, 10 mM Tris-phosphate, pH 6.8). Respiratory rates (JO₂) were then determined from the slope of a plot of O₂ concentration *versus* time, and expressed as nanoatoms O/min/OD (cells) or nanoatoms O/min/mg mitochondrial protein (mitochondria).

Metabolites extraction

Cellular extracts were prepared by an ethanol extraction method adapted from the one described by Loret et al. (9). Briefly, cells were harvested by rapid filtration on nitrocellulose filter (1 μ m). The filter was immediately dropped into a glass tube containing 5 ml

ethanol/Hepes 10 mM 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 resuspended in a final volume of DMSO equivalent to twice the cellular volume). Insoluble particles were eliminated by centrifugation (12 000g, 10 min, 4°C).

RESULTS

Nobiletin influence on cellular energy metabolism was investigated in two yeast strains: *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*. Whereas *Candida utilis* harbours a proton pumping complex I at the level of mitochondrial respiratory chain (10), the *Saccharomyces cerevisiae* strain harbours two external NADH dehydrogenases and one internal NADH dehydrogenase. The cellular respiratory rate in the absence of Nobiletin was shown to be stable all throughout the experiment (Fig. 1, A and B). Upon Nobiletin addition (250 and 500 μ M), spontaneous cell respiration was greatly decreased (about 65% \pm 4%) in both yeast strains (Fig. 1, A and B). After one hour of incubation in the presence of Nobiletin, spontaneous cell respiration tended to recover from the induced decrease and after five hours, only a fraction of the initial inhibition could be assessed in both strains (Fig. 1, A and B).

In order to decipher whether the decrease in spontaneous cellular respiration is due to an inhibition of mitochondrial respiratory chain and/or of the phosphorylating systems, we assessed the uncoupled respiratory rate on both strains in the presence of the well-known uncoupler carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP). The uncoupled respiratory rate in the absence of Nobiletin was shown to be stable all throughout the experiment (Fig. 1, C and D). Upon Nobiletin addition (250 and 500 μ M), uncoupled respiratory rate was greatly decreased (60% \pm 4%) in the *Saccharomyces cerevisiae* cells and 50% \pm 3.7% in the *Candida utilis* cells) (Fig. 1, C and D). After one hour of incubation in the presence of Nobiletin, uncoupled cell respiration tended to recover from the induced decrease, and after five hours, only a

fraction of the initial inhibition could be assessed in both strains (Fig. 1, A and B).

Under non-phosphorylating respiration condition, *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* cells exhibited an inhibition profile upon Nobiletin treatment similar to that assessed under spontaneous and uncoupled respiration, again pointing to a respiratory chain inhibition by Nobiletin rather than an effect on the phosphorylating systems (data not shown).

To further study the kinetics of respiratory rate inhibition by Nobiletin, we assessed all three respiratory states (spontaneous, uncoupled, non-phosphorylating) every 10 min after Nobiletin addition during the first hour of treatment. Fig. 1E shows that spontaneous and non-phosphorylating respiratory rates reached their maximal inhibition rate after about 10 min in *Saccharomyces cerevisiae* cells whereas uncoupled respiratory rate was fully inhibited after 40 min. This inhibition was quite stable afterward up until 1 h of incubation. The respiratory rate inhibition profile in *Candida utilis* cells was a bit different since spontaneous and uncoupled respiratory rates reach their maximal inhibition after 30 min of incubation with Nobiletin and this inhibition tended to reverse slowly thereafter (Fig. 1F).

In order to identify the respiratory chain target of Nobiletin, we investigated the induced inhibition on mitochondria isolated from either *Saccharomyces cerevisiae* cells or *Candida utilis* cells. Because Nobiletin partition is mostly membranous, the concentration used on isolated mitochondria was decreased compared that used on whole cells. When Nobiletin addition to isolated mitochondria was acute (i.e. injected directly into the oxygraph chamber), no respiration inhibition was observed (data not shown). Three distinct respiratory rates were assessed: non-phosphorylating (ethanol as a respiratory substrate), phosphorylating [in the presence of adenosine diphosphate (ADP)] and uncoupled (in the presence of CCCP). These were assessed either after 5 min preincubation with Nobiletin (Fig. 2A) *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* mitochondria (Fig. 2C) or after 10 min preincubation with Nobiletin *Saccharomyces cerevisiae* (Fig. 2B) and *Candida utilis* mitochondria (Fig. 2D). Fig. 2 shows that, whichever the

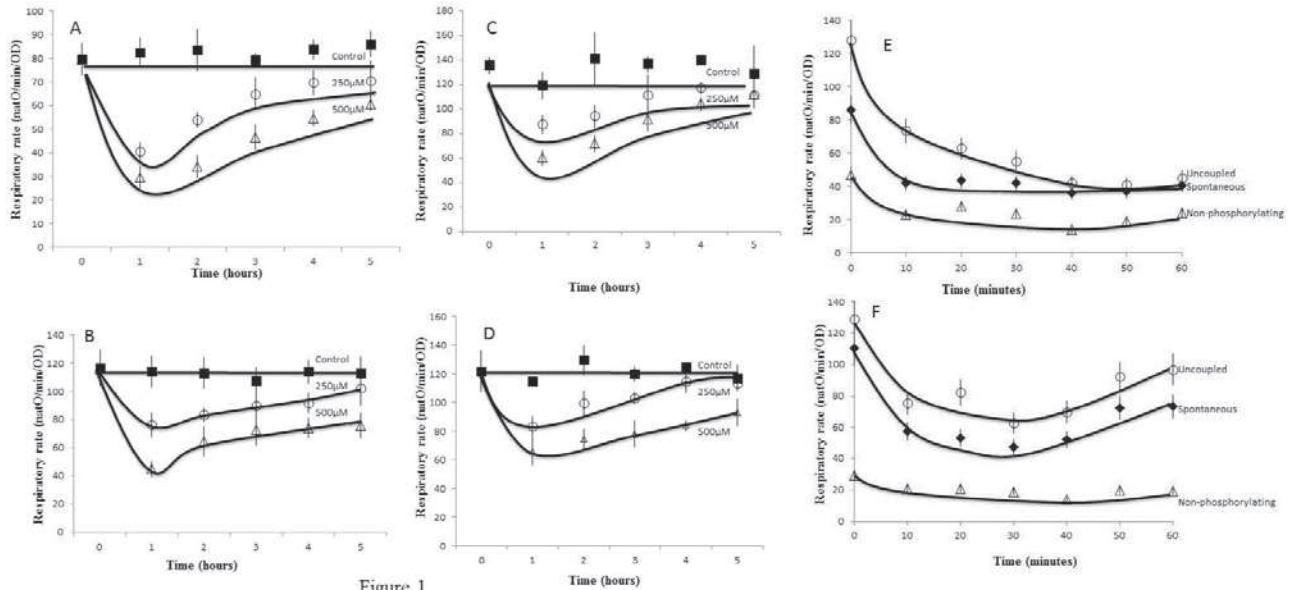


Figure 1

Fig. 1. Influence of Nobiletin on cellular and uncoupled respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* cells. **A)** *Saccharomyces cerevisiae*; **(B)** *Candida utilis*. **C)** *Saccharomyces cerevisiae* uncoupled respiratory rate; **(D)** *Candida Utilis* uncoupled respiratory rate. Black squares - control, empty circle 250 μM - Nobiletin, empty triangle – 500 μM Nobiletin. The uncoupled respiratory rate was assessed in the presence of 40 μM carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazine (CCCP) as described under “Experimental Procedures.” Short term kinetics of the influence of 250 μM Nobiletin on cellular, uncoupled and non-phosphorylating cellular respiration of *Saccharomyces cerevisiae* **(E)**; and *Candida utilis* **(F)**. The respiratory rate in the absence of phosphorylation (empty triangle), indicated by triethyltin (TET) was assessed in the presence of 0.2 mM triethyltin and the uncoupled respiratory rate (empty circle) was assessed in the presence of 40 μM carbonyl cyanide *p*-chlorophenylhydrazine (CCCP) as described under “Experimental Procedures.” Respiratory rates were assessed on cells grown aerobically in minimal medium containing 2% (w/v) DL-lactate. Spontaneous respiratory rate was directly assessed on cells from the growth medium. Results are mean \pm S.D. of at least three measurements performed on three independent cell cultures.

experimental condition, there was no significant inhibition of mitochondrial respiratory chain by Nobiletin on isolated mitochondria.

To decipher the origin of the absence of inhibition of mitochondrial respiratory chain by Nobiletin on isolated mitochondria, we studied the effect of that molecule on spheroplasts isolated from *Candida utilis* cells. When Nobiletin (up to 250 μM) addition to permeabilized spheroplasts was acute (i.e. injected directly in the oxygraph chamber), no respiration inhibition was observed whichever the respiratory substrate used (data not shown). A comparable result was obtained when Nobiletin (up to 250 μM) was added to unpermeabilized spheroplasts with 5 and 10 min incubation (Fig. 3A) or without any incubation

(data not shown). Since Nobiletin-induced maximal respiration inhibition on whole cells required about 30 min, we decided to add Nobiletin on whole cells for 30 min before spheroplast isolation. Then the spheroplasts were isolated and permeabilized according to the experimental procedures section. The respiratory rate was then assessed with various respiratory substrates without any further addition of Nobiletin. Fig. 3B shows that, whichever the respiratory substrate, the respiratory rate was inhibited in spheroplasts isolated from cells treated with 250 μM Nobiletin for 30 min. Furthermore, assessment of cytochrome c oxidase activity in these spheroplasts (Fig. 3B) clearly shows that this enzyme is strongly inhibited in spheroplasts isolated

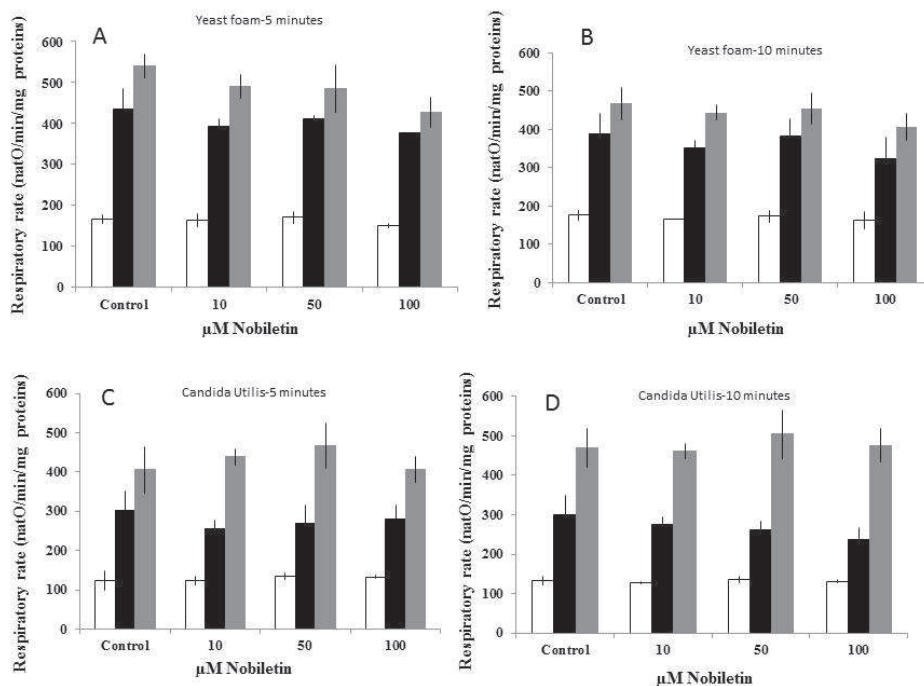


Fig. 2. Influence of Nobiletin on mitochondrial respiration in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* isolated mitochondria. Mitochondria were isolated from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* cells as described under “Experimental procedures”. Respiratory rates were assessed using ethanol (100 mM) as a respiratory substrate. White - non-phosphorylating respiratory rate, black- phosphorylating respiratory rate in the presence of 1mM ADP and gray - uncoupled respiratory rate in the presence of 10 μM CCCP. **A)** *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria incubated for 5 min with Nobiletin; **(B)** *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria incubated for 10 min with Nobiletin; **(C)** *Candida utilis* mitochondria incubated for 5 min with Nobiletin; **(D)** *Candida utilis* mitochondria incubated for 5 min with Nobiletin. Results are mean ± S.D. of at least three measurements performed on three independent mitochondria preparation.

from cells treated with 250 μM Nobiletin for 30 min.

The above-mentioned results led us to hypothesize that, since Nobiletin had no effect on isolated mitochondria but the mitochondrial respiratory chain was inhibited in cells/spheroplasts treated with this flavonoid, the observed inhibition might arise from Nobiletin metabolism within the cell. We thus extracted cellular metabolites from both control cells and cells treated with Nobiletin for 30 minutes. These metabolite extracts were then used on isolated mitochondria while monitoring distinct respiratory states. Fig. 3C shows that all three respiratory states were significantly inhibited by cellular metabolites from Nobiletin-treated cells compared to untreated cells.

DISCUSSION

In this paper we investigated the influence of Nobiletin, a flavonoid abundantly present in citrus peel, on yeast energy metabolism. Studies on yeast cells harboring either a proton pumping complex I or NADH dehydrogenases that do not pump protons showed a comparable inhibition of mitochondrial respiration in both strains, indicating that the observed inhibition did not rely on the presence of a proton pumping complex I. Further studies of cellular respiration in distinct respiratory states (i.e. uncoupled or non-phosphorylating) showed a comparable inhibition of mitochondrial respiration whichever the respiratory state, pointing

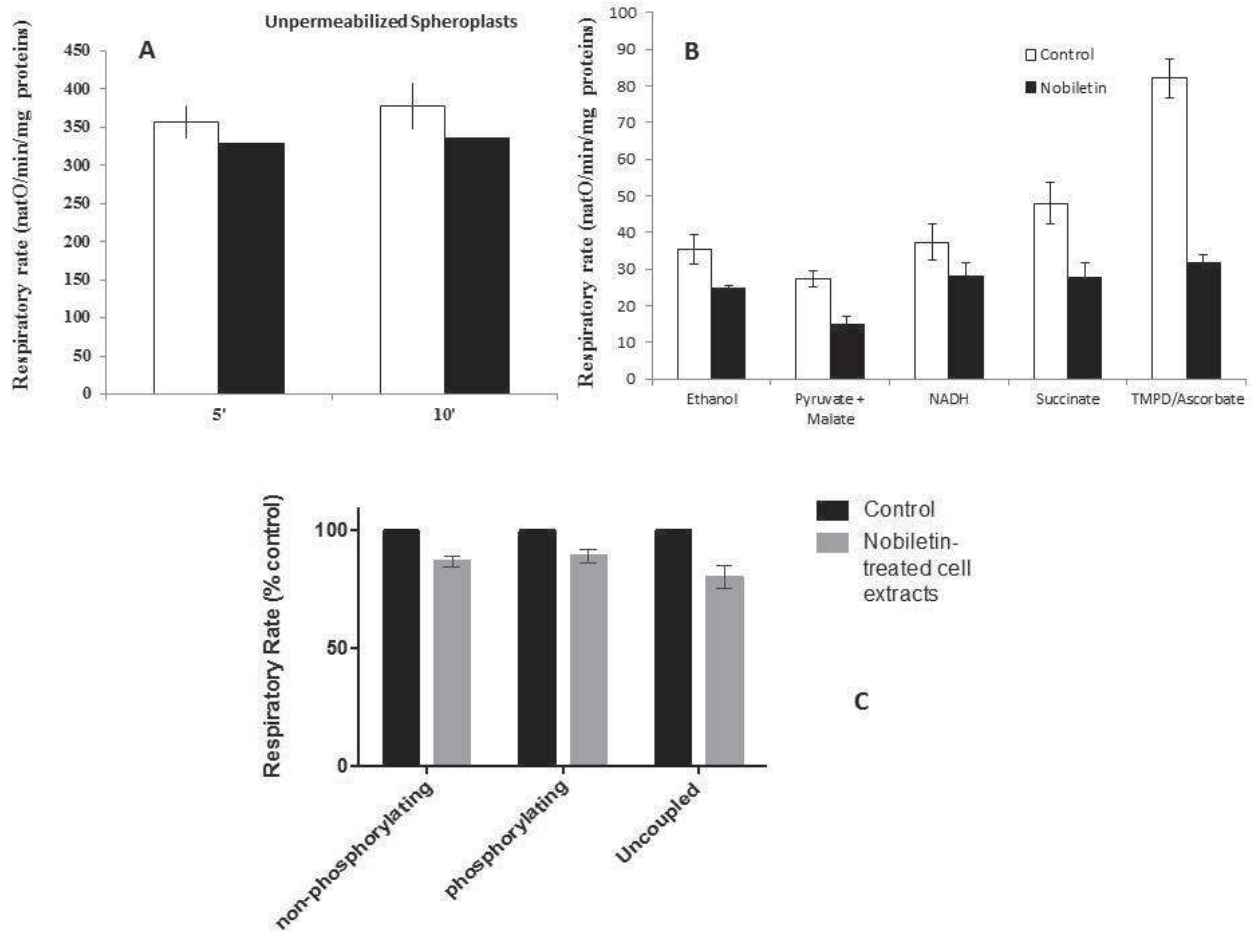


Fig. 3. Influence of Nobiletin on isolated spheroplasts respiration and Nobiletin's metabolites on mitochondrial respiration. Spheroplasts were isolated as described under "Experimental procedures". Respiratory rates were assessed using ethanol as a respiratory substrate (unpermeabilized spheroplasts) (A); or the indicated substrate for spheroplasts permeabilized from cells treated for 30 min with 250 μ M Nobiletin (B). C) Respiratory substrate, non-phosphorylating respiratory rate, phosphorylating respiratory rate in the presence of 1mM ADP, ethanol (100 mM) and uncoupled respiratory rate in the presence of 10 μ M CCCP. *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria were incubated with metabolites from cells treated with Nobiletin (gray) or from control cells (black). Results are mean \pm S.D. of at least three measurements performed on three independent mitochondria and spheroplasts preparation.

to a respiratory chain inhibition upon Nobiletin addition to cells. Short term kinetic experiments showed a maximal inhibition of mitochondrial respiratory chain after about 30 minutes of cell incubation with Nobiletin, whichever the yeast strain under consideration. Surprisingly, acute Nobiletin addition on isolated mitochondria or spheroplasts (either permeabilized or not) showed no respiratory chain inhibition. Observed cellular respiratory chain inhibition in spheroplasts isolated from cells

preincubated with Nobiletin for 30 minutes clearly points to a required cellular metabolism of Nobiletin in order to obtain a respiration inhibition. Moreover, the cellular metabolites from Nobiletin-treated cells inhibit mitochondrial respiratory chain. We have shown that inhibition of respiration in yeast cells by Nobiletin requires its intracellular metabolism and is thus due to an intermediate of Nobiletin metabolism.

Nobiletin's and its metabolites' effect on the mitochondria could be also explained by the

involvement of yeast's certain regulatory systems. One of the possible candidates is cAMP-dependent protein kinase that is known as one of the main target of Nobiletin (11). This type of protein kinase involves in the regulation of mitochondrial cytochrome c content as well as cytochrome-c-oxidase activity (12). Further studies will be required to assess the consequences of this respiration inhibition on cell physiology.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Association pour la Recherche contre le Cancer, the Agence Nationale de la Recherche, the CNRS (Conseil National de la Recherche Scientifique) and the Comité de Dordogne & Gironde de la Ligue Nationale Contre le Cancer. N. Sharikadze was the beneficiary of Erasmus Mundus exchange program.

REFERENCES

1. Singh SP, Wahajuddin, Tewari D, Patel K, Jain GK. Permeability determination and pharmacokinetic study of Nobiletin in rat plasma and brain by validated high-performance liquid chromatography method. *Fitoterapia* 2011; 82(8):1206-14.
2. Huang H, Li L, Shi W, Liu H, Yang J, Yuan X, Wu L. The multifunctional effects of nobiletin and its metabolites in vivo and in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016; 2918796; Epub.
3. Jojua N, Sharikadze N, Zhuravliova E, Zaalishvili E, Mikeladze DG. Nobiletin restores impaired hippocampal mitochondrial bioenergetics in hypothyroidism through activation of matrix substrate-level phosphorylation. *Nutr Neurosci* 2015; 18(5):225-31.
4. Sharikadze N, Jojua N, Sepashvili M, Zhuravliova E, Mikeladze DG. Mitochondrial target of Nobiletin's action. *Nat Prod Commun* 2016; 11(12):1833-38.
5. Meisinger C, Pfanner N, Truscott KN. Isolation of yeast mitochondria. *Methods Mol Biol* 2006; 313:33-39.
6. Itzhaki RF, Gil DM. A micro-biuret method for estimating proteins. *Anal Biochem* 1964; 9:401-10.
7. Averet N, Fitton V, Bunoust O, Rigoulet M, Guerin B. Yeast mitochondrial metabolism: from in vitro to in situ quantitative study. *Mol Cell Biochem* 1998; 184(1-2):67-79.
8. Cain K, Griffiths DE. Studies of energy-linked reactions. Localization of the site of action of trialkyltin in yeast mitochondria. *Biochem J* 1977; 162:575-80.
9. Loret MO, Pedersen L, François J. 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* 2007; 24(1):47-60.
10. Avéret N, Jobin ML, Devin A, Rigoulet M. Proton pumping complex I increases growth yield in *Candida utilis*. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1847(10):1320-26.
11. Nakajima A, Ohizumi Y, Yamada K. Anti-dementia activity of nobiletin, a citrus flavonoid: A review of animal studies. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2014; 12(2):75-82.
12. Chevtzoff C, Vallortigara J, Avéret N, Rigoulet M, Devin A. The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim Biophys Acta* 2005; 1706(1-2):117-25.

Étude de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Résumé : Dans la cellule, les fonctions cellulaires majeures, telles que la prolifération cellulaire, impliquent une consommation très importante d'énergie sous forme d'Adénosine Triphosphate (ATP). Pour répondre à l'augmentation de la demande énergétique, une production continue d'ATP est nécessaire. Dans ce contexte, les mitochondries sont les principaux producteurs d'ATP via le système des oxydations phosphorylantes (ou OXPHOS). Ce système couple l'activité de la chaîne respiratoire (consommation d'oxygène) à celle de l'ATP synthase grâce au gradient électrochimique en protons de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale. Ceci fait de la mitochondrie un élément central qui peut être régulé pour s'adapter aux demandes énergétiques de la cellule. En effet, une régulation cinétique de l'activité de la mitochondrie peut mener à une régulation plus globale du flux de production d'ATP tout comme une régulation du nombre de mitochondries au sein la cellule. Le réseau mitochondrial dans la cellule est géré par deux phénomènes : leur synthèse (biogénèse) et leur dégradation (ou mitophagie). Dans la souche de levure *S. cerevisiae*, la biogenèse mitochondriale est contrôlée par un hétérotétramère formé par les facteurs de transcription Hap2/3/4/5. L'activation du complexe dépend de la présence de la sous-unité régulatrice Hap4p, homologue fonctionnel de PGC1 α . Ce complexe transcriptionnel est responsable de l'activation de l'expression de nombreux gènes codant pour les enzymes du cycle de Krebs, les enzymes de biosynthèse de l'hème et les enzymes de la chaîne respiratoire. Nous nous sommes intéressés aux différentes voies de régulation de la biogenèse mitochondriale et ce, par l'étude de la régulation de la protéine Hap4p. Nos résultats sont les premiers à clairement mettre en évidence une régulation de Hap4p par l'hème labile. Nous avons également étudié le rôle de la répression glucose sur la biogenèse mitochondriale et avons pu mettre en évidence un parallèle avec l'effet Warburg mis en place dans les cellules cancéreuses. Nos résultats ont notamment montré une décorrélation entre le remodelage métabolique dû à l'effet Warburg et l'augmentation de la vitesse de prolifération. Cette étude suggère également que l'augmentation du flux glycolytique n'a pas pour conséquence une augmentation de la production d'ATP dans les cellules. L'ensemble de ce travail permet un apport supplémentaire dans la compréhension de l'effet Warburg et dans l'étude de la régulation de la biogenèse mitochondriale chez *S. cerevisiae*.

Mots-clés : Mitochondrie ; Métabolisme énergétique ; Hap4p ; *S. cerevisiae* ; Hème ; Warburg

Study of the regulation of mitochondrial biogenesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract: In cells, major cellular functions such as cell growth involve a very high consumption of energy in the form of ATP. To answer the increased demand for energy, continued production of Adenosine Triphosphate (ATP) is required. In this context, mitochondria are the main producers of ATP *via* the phosphorylating oxidation system (or OXPHOS). This system couples the activity of the respiratory chain (oxygen consumption) to that of ATP synthase thanks to the electrochemical gradient in protons across the mitochondrial inner membrane. This makes the mitochondria a central key that can be regulated to adapt to the energy demands of the cell. Indeed, a kinetic regulation of the activity of the mitochondria can lead to a more global regulation of the ATP production flow just like a regulation of the number of mitochondria within the cell. The mitochondrial pool in the cell is driven by two phenomena: their synthesis (biogenesis) and their degradation (or mitophagy). In the *S. cerevisiae* yeast strain, mitochondrial biogenesis is controlled by a heterotetramer formed by the transcription factors Hap2/3/4/5. Activation of the complex depends on the presence of the Hap4p regulatory subunit, a functional homolog of PGC1 α . This transcriptional complex is responsible for activating the expression of many genes encoding Krebs cycle enzymes, heme biosynthetic enzymes and respiratory chain enzymes. We are therefore interested in the different regulatory pathways of mitochondrial biogenesis, through the study of the regulation of the Hap4p protein. Our results are the first to clearly show a regulation of Hap4p by labile heme. We have also studied the role of glucose repression on mitochondrial biogenesis and were able to demonstrate a parallel with the Warburg effect established in cancer cells. Our results notably showed a decorrelation between the metabolic switch due to the Warburg effect and the increased proliferation rate. This study also suggests that increased glycolytic flow does not result in increased ATP production in cells. All of this work provides additional input in the understanding of this mechanism and in the study of the regulation of mitochondrial biogenesis in *S. cerevisiae*.

Keywords: Mitochondria; Energy metabolism; Hap4p; *S. cerevisiae*; Heme; Warburg