



HAL
open science

Identification et caractérisation d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain

Florian Beignon

► **To cite this version:**

Florian Beignon. Identification et caractérisation d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2022. Français. NNT : 2022ANGE0016 . tel-03907982

HAL Id: tel-03907982

<https://theses.hal.science/tel-03907982>

Submitted on 20 Dec 2022

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.

THESE DE DOCTORAT

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité: «Biologie cellulaire, Biologie du Développement»

Par

Florian BEIGNON

« Identification et caractérisation d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain »

Thèse présentée et soutenue à Angers le 08 Juillet 2022

Unité de recherche MitoVasc – Equipes MitoLab-CarMe – UMR CNRS 6015, INSERM U1083

Rapporteurs avant soutenance :

Bruno Constantin DR, STIM, ERL 7003, EA 7349, Poitiers
Damien Roussel MCF, LEHNA, CNRS 5023, Lyon

Composition du Jury :

Examineurs :	Christian Legros François Casas Alexandra Henrionnet Malgoyre Sylvie Ducreux	PU, MitoVasc, INSERM U1083, CNRS 6015, Angers DR, INRAE, Montpellier Médecin Chercheur, IRBA, Bretigny-sur-Orge MCF, CarMeN, INSERM U1060, INRA U1397, Lyon
Dir. de thèse :	Guy Lenaers	DR, MitoVasc, INSERM U1083, CNRS 6015, Angers
Co-dir. de thèse :	César Mattei	MCF, MitoVasc, INSERM U1083, CNRS 6015, Angers

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :
<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



Remerciements

Je tiens d'abord à remercier tous les membres de ce jury de thèse. Merci à **Damien Roussel, Bruno Constantin, Alexandra Malgoyre, Sylvie Ducreux, Christian Legros et François Casas** pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie également le **conseil de la région Pays de la Loire** et la **direction Générale de l'Armement (DGA)**, notamment **Emmanuelle Guillot-Combe**, sans qui je n'aurais jamais pu réaliser cette thèse.

Je remercie naturellement mes encadrants, **Guy Lenaers** et **César Mattei**, pour la confiance que vous m'avez accordé pour développer ce projet passionnant que vous avez initié.

Je remercie aussi **Daniel Henrion** qui a dirigé l'unité Mitovasc pendant la quasi-totalité de ma thèse. Merci de m'avoir accueilli et permis de réaliser ma thèse.

Je remercie **Aubin Penna, Paule Bénit** et **Alexandra Malgoyre**. Merci de m'avoir accompagné et suivi tout au long de ma thèse. Votre enthousiasme pour le projet, votre aide et votre soutien ont été très importants pour moi et m'ont permis de rebondir quand il le fallait.

Merci à **Pierre Rustin, Malgorzata Rak** et **Dominique Chrétien** sans qui ce projet n'aurait jamais vu le jour. Votre travail et vos conseils ont été indispensables dans le développement de ce projet.

Je tiens à remercier une nouvelle fois **Sylvie Ducreux** pour ta collaboration. Ton expertise a été très importante pour le projet. Merci aussi pour ta bienveillance et ton soutien qui ont été très précieux pour moi.

Je remercie toute l'équipe **Carme**,

Merci à **Claire et Christian** pour faire vivre la petite équipe des canaux ioniques ! C'est toujours un plaisir d'échanger avec vous. Vos retours et vos conseils sont toujours pertinents.

Merci **Hélène** de m'avoir encadré lors mon stage de M2 et pour ton aide lors de la thèse. Merci aussi pour ta gentillesse et ta bienveillance.

Merci **Agnès** pour ta bonne humeur, ton sourire et pour ton aide en bio mol lors de mon M2.

Merci **Zenouba** pour ces longues journées en électrophysiology pleines de rebondissements !

Merci **Joohee** et **Coralyne** pour votre extrême gentillesse et pour les bons moments passé lors de mon M2 et pendant ma thèse.

Merci **Louis** de m'avoir aidé à maîtriser l'indomptable FlexStation ainsi que pour les soirées passées ensemble.

Merci à **Linda, Anne-Laure, Emilie, Sophie et Mathilde** ainsi qu'à **l'ensemble** des membres de l'équipe Carme pour m'avoir accueilli parmi vous et pour votre aide, vos conseils et les échanges scientifiques.

Je remercie toute l'équipe **Mitolab**,

Merci **Olivier** pour ta bienveillance, ton écoute et tes conseils ainsi que pour les petits interludes musicaux.

Merci **Salim** pour toutes tes réflexions : scientifiques qui sont toujours très pertinentes, et personnelles qui sont souvent drôles !

Merci **Arnaud** ton aide sur la microscopie et pour tous nos échanges (PS : Cette petite soirée d'été dans ton jardin était vraiment super !).

Merci **Yannick** pour ton dévouement, tu m'as tellement aidé au début de ma thèse et même après. Ton aide et tes conseils ont été très important pour moi.

Merci **Cinzia, Morgane** et **Nancy** pour ces moments improbables et assez drôles en salle de pause qui m'ont beaucoup appris sur des sujets nouveaux pour moi !

Merci **Anais** et **Aurélié** pour votre gentillesse et votre dévouement, l'ensemble du labo vous doit beaucoup ! Merci aussi pour tous ces bons moments autour d'un verre (ou deux !).

Un grand merci au **FC Dédé** parce que ces années de thèse n'auraient pas été les mêmes sans vous. Merci **Jade, Magalie** et **Jérémy** et **Alexia** car je pourrais essayer de citer tous les moments avec vous qui ont

rendu ces années au labo (et en dehors) aussi géniales mais je ne suis pas sûr d'y arriver. J'ai vraiment eu beaucoup de chance de pouvoir faire ma thèse avec vous et j'espère que ça continuera toujours après !
=)

Merci aux futurs docteurs de MitoLab, **Charlène, Charlotte, Nolwenn, Théophile** et **Cléis**. J'imagine qu'en ce moment même vous êtes en train de flipper en pensant que c'est bientôt votre tour, mais ça va bien se passer =) Courage !

Merci aux nouveaux arrivants : **Federica, Claudie et Mireille** et aux anciens de MitoLab : **Caroline, Sophie, Steph, Anaïs** que j'ai eu la chance de côtoyer. Merci pour cet esprit d'entraide quotidien qui est tellement appréciable.

Merci à **Majida** et **Val** pour votre gentillesse à tout épreuve et pour votre aide sur la bio mol et le séquençage.

Merci **Naig** pour ton aide plus que précieuse ! La mito n'a plus de secret pour moi (enfin beaucoup moins).
Merci à **Méline** et **David** pour votre aide sur la partie bioinfo. Sans vous je serais probablement encore à comparer mes séquences une par une !

Merci à **Carole** et **Catherine** pour votre travail indispensable pour le labo !

Merci à tous les stagiaires qui ont fait un séjour au labo pour tous les bons moments passés : **Paul, Rodrigo, Sarah, Apolline, Ghita, Aymane, Cécile, Valentin, Louis, Benoit, Tiffany, Zouhair**.

Je remercie énormément **Léa** et **Margaux** que j'ai eu la chance de pouvoir encadrer pour leur stage de Master 2. Merci pour toute l'aide que vous m'avez apporté, pour votre implication et votre dynamisme. Sans vous, cette thèse ne serait pas ce qu'elle est aujourd'hui.

Un grand merci à mes amis,

Merci à **Antoine, Guillaume** et **Jérémy**. Après toutes ces années, vous êtes clairement des piliers pour moi. Malgré le temps qui passe ou la distance, je sais que je pourrais toujours compter sur vous (et inversement)! Merci à **Claire** et **Laetitia** parce que vous êtes adorables et que vous faites le bonheur de mes amis !

Merci à **Nathan**. On a partagé tellement de choses (C'est même devenu difficile de me rappeler de toutes nos conneries) et on est toujours resté proche. Merci d'être la Bob !

Merci à **Florian**. On se connaît depuis moins de temps mais j'ai passé de très bons moments avec toi ! Hâte de battre des records d'échappée (ou au moins les finir à temps !).

Merci **Pauline** car c'est un peu grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui ! Je me souviens encore très bien de ce que tu m'as dit au moment de choisir la thèse. Et bah finalement je crois que tu avais raison ! Merci pour ton soutien et d'être toujours là depuis la fin du Master ! Jamais sans mon Hibou !

Merci à **Yohann** parce que j'ai passé un Master de fou en grande partie grâce à toi ! Je suis vraiment heureux que l'on soit resté en contact. Restes comme tu es et j'ai hâte de continuer à passer des soirées et des moments ensemble !

Merci à **Paul** parce que toi aussi tu as largement participé à me donner des souvenirs inoubliables ces dernières années !

Merci à **Anthony** et **Angélique** avec qui j'ai passé des supers soirées/week-ends, c'est toujours un plaisir de passer des moments tous ensemble !

Merci à ma famille,

Merci à **mes parents** pour le cadre de vie que vous m'avez offert. Vous m'avez toujours encouragé, relevé, permis de me tromper et de recommencer. Je ne serais jamais là où j'en suis sans vous. Merci à **mes sœurs et Fabien** pour tous ces bons moments en famille qui ne me laisseront jamais ! Même si je ne le dis pas assez, vous savez que je vous aime !

Merci à **mes grands-parents, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines** parce que je sais à quel point j'ai eu de la chance de naître et de grandir dans une famille comme la mienne. Merci pour votre soutien et pour tous ces bons moments passés et à venir !

Merci à **ma belle-famille**, merci de m'avoir si bien accueilli et pour tous les bons moments que vous m'avez offerts !

Merci **Léa** pour ton amour et ce que tu m'apportes quotidiennement. Ta présence et ton soutien m'ont permis d'arriver jusqu'ici et me permettront d'avancer encore plus loin, j'en suis sûr. Peu importe ce que l'avenir nous réserve, je sais que l'on y fera face ensemble. Je t'aime.

Je tiens également à remercier celui qui m'a accompagné tout au long de ma thèse. Celui qui m'a convaincu de travailler avec lui pendant presque 4 ans. Notre relation n'a pas toujours été facile et tes caprices m'ont mené la vie dure mais au final je ne regrette pas d'avoir eu un partenaire de travail aussi fascinant, alors merci **TRPV1**.

Merci à **toi** qui a lu ces quelques lignes jusqu'au bout. Tu l'auras peut-être compris mais je ne suis pas très doué pour m'exprimer. Alors dis-toi juste que ma gratitude et ma reconnaissance envers les personnes citées ci-dessus est bien plus importante que ce qui paraît.

Table des matières

ABREVIATIONS	2
INTRODUCTION	6
1. Contexte sociétal et scientifique.....	6
2. Mitochondrie et thermogénèse cellulaire	8
2.1. Généralités sur la mitochondrie	8
2.1.1. Morphologie et dynamique mitochondriale	8
2.1.2. Fonction dans le métabolisme énergétique	10
a) Cycle de Krebs	10
b) La phosphorylation oxydative	10
2.2. Calcium et Mitochondrie	10
2.2.1. Généralités sur le calcium	10
2.2.2. Localisation intracellulaire du calcium.....	12
2.2.3. Protéines impliquées dans les flux calciques cellulaires	12
2.2.4. La mitochondrie comme senseur et régulateur du calcium.....	14
a) Entrée du calcium mitochondrial	14
b) Sortie du calcium mitochondrial	16
c) Acteurs de la régulation du calcium mitochondrial	18
d) Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique cellulaire	18
2.2.5. Le calcium comme régulateur de la fonction mitochondriale	20
a) Synthèse d'ATP	20
b) Mort cellulaire	22
2.3. Mitochondrie et thermogénèse cellulaire.....	22
3. Le canal TRPV1	56
3.1. La superfamille des TRP	56
3.1.1. Historique	56
3.1.2. Structure générale	56
3.1.3. Les sous-familles et leurs fonctions.....	58
a) La sous-famille TRPC	58
b) La sous-famille TRPP	60
c) La sous-famille TRPM.....	60
d) La sous-famille TRPA	62
e) La sous-famille TRPML	62
f) La sous-famille TRPV	64
3.2. Structure de TRPV1 et perméabilité ionique	66
3.2.1. Structure	66
3.2.2. Perméabilité ionique.....	68
3.3. Régulation de TRPV1	68
3.3.1. Agonistes/Activateurs.....	70
a) Température.....	70
b) Protons	70
c) Voltage	70
d) Molécules pharmacologiques	72
3.3.2. Antagonistes/Inhibiteurs	74
3.3.3. Régulateurs.....	74
a) Lipides	76
b) Ions.....	76
c) Interactions protéiques.....	76
d) Autres médiateurs de TRPV1	78
3.4. Localisation de TRPV1	78
3.4.1. Distribution tissulaire	78
3.4.2. Localisation intracellulaire	80
3.4.3. Adressage	80
3.5. Fonctions de TRPV1.....	82
3.5.1. Dans les tissus neuronaux	82

a)	Nociception et inflammation	82
b)	Thermorégulation.....	84
c)	Transmission synaptique.....	86
3.5.2.	Dans les tissus non neuronaux	88
a)	Vasculaire	88
b)	Métabolisme énergétique	88
3.5.3.	Homéostasie calcique intracellulaire	90
3.5.4.	TRPV1 et mitochondrie	92
3.5.5.	Implications pathologiques de TRPV1 dans la thermogenèse cellulaire.....	94
OBJECTIFS	96
MATERIELS ET METHODES	98
1.	Prédiction et Identification des variants mitochondriaux de TRPV1	98
1.1.	Identification et expression du variant mitochondrial de TRPV1 humain	98
1.1.1.	Identification <i>in silico</i> du variant humain TRPV1mito	98
1.1.2.	Expression tissulaire de TRPV1 chez l'homme	98
1.2.	Prédiction <i>in silico</i> de TRPV1mito chez les mammifères placentaires	98
1.3.	Identification de TRPV1mito chez la souris.....	98
1.4.	Analyse et traitement des séquences ADN	100
2.	Construction des modèles d'étude pour la caractérisation de TRPV1mito humain ..	100
2.1.	Clonage et construction des plasmides	100
2.1.1.	Technique de clonage Infusion	100
2.1.2.	Méthodologie du clonage de TRPV1mito	100
2.1.3.	Méthodologie de clonage des versions fusion-GFP de TRPV1pm et TRPV1mito	102
2.1.4.	Protocole de clonage Infusion.....	102
a)	Préparation du plasmide linéarisé	102
b)	Préparation de l'insert de clonage	102
c)	Clonage Infusion	104
2.1.5.	Liste des plasmides de TRPV1 clonés	104
2.2.	Mise au point des transfections transitoires	104
2.2.1.	Culture cellulaire.....	104
2.2.2.	Transfection	106
2.2.3.	Efficacité de transfection.....	106
2.3.	Construction des lignées stables 293-TRPV1	106
2.3.1.	Principe du système Flp-In.....	106
2.3.2.	Protocole de construction d'une lignée stable avec le système 293-Flp	108
3.	Localisation du variant TRPV1mito humain	108
3.1.	Imagerie live de colocalisation.....	108
3.2.	Enrichissement des protéines mitochondriales	108
3.3.	Fractionnement cellulaire.....	110
3.4.	Test de protection à la protéinase K.....	110
3.5.	Immunoprécipitation	112
4.	Rôle du variant humain TRPV1mito dans l'homéostasie calcique	114
4.1.	Principe des sondes calciques fluorescentes	114
4.2.	Sondes calciques fluorescentes utilisées	114
4.3.	Protocole de marquage des cellules	116
4.3.1.	Sonde chimique organique : Fura-2 AM.....	116
4.3.2.	Sondes génétiques.....	116
4.4.	Acquisition de la fluorescence des sondes calciques	116
4.4.1.	Lecteur de plaque : Flexstation 3	116
4.4.2.	Microscope à fluorescence.....	116
4.5.	Analyse des acquisitions des flux calciques	118
4.5.1.	Taux de Ca ²⁺ basal.....	118
4.5.2.	Cinétique des flux calciques	118
5.	Caractérisation de l'implication du variant humain TRPV1mito sur la fonction mitochondriale	118
5.1.	Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules intactes	118

5.1.1.	Seahorse XF96 - Principe	118
5.1.2.	Seahorse XF96 - Protocole	118
5.1.3.	Seahorse XF96 – Analyse	120
5.2.	Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules perméabilisées	120
5.2.1.	Oroboros O2K - Principe	120
5.2.2.	Oroboros O2K – Protocole	122
	a) Préparation du matériel	122
	b) Perméabilisation des cellules	122
	c) Oxygraphie.....	122
5.2.3.	Oroboros O2K- Analyse	122
5.3.	Mesure du potentiel de membrane mitochondrial	122
5.3.1.	Principe	122
5.3.2.	Protocole.....	122
5.3.3.	Analyse.....	124
6.	Fiches techniques	124
6.1.	Biologie Moléculaire.....	124
6.1.1.	Amplification et isolement de fragment ADN	124
	a) PCR	124
	b) Electrophorèse	124
	c) Isolement de fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose	126
6.1.2.	Quantification de l'expression génique	126
	a) Principe de la qPCR	126
	b) Extraction d'ARNm	126
	c) Reverse Transcription	128
	d) qPCR relative sur TRPV1	128
6.1.3.	Amplification des plasmides	130
	a) Transformation bactérienne.....	130
	b) Sélection des clones et amplification en milieu liquide	130
	c) Extraction du plasmide	130
	d) Vérification de l'amplification	132
	Séquençage Sanger	132
6.2.	Biochimie	132
6.2.1.	Dosage de protéines	132
6.2.2.	Western blot.....	134
7.	Analyses statistiques	134
RESULTATS.....	136
1.	Prédiction et Identification des variants mitochondriaux de TRPV1	136
1.1.	Identification et expression du variant mitochondrial de TRPV1 humain	136
1.1.1.	Identification <i>in silico</i> du variant humain TRPV1mito	136
1.1.2.	Expression tissulaire de TRPV1 chez l'Homme	136
1.2.	Prédiction <i>in silico</i> de TRPV1mito chez les mammifères placentaires	138
1.3.	Identification de TRPV1mito chez la souris.....	138
2.	Mise au point des modèles cellulaires	140
2.1.	Expression transitoire.....	140
2.2.	Expression stable.....	140
3.	Localisation du variant TRPV1mito humain	142
3.1.	Microscopie à fluorescence.....	142
3.1.1.	Transfection transitoire.....	142
3.1.2.	Lignée stable 293-TRPV1mitoGFP	142
3.2.	Méthode biochimique	144
3.2.1.	Fractionnement cellulaire.....	144
3.2.2.	Localisation intra-mitochondriale	144
3.2.3.	Immunoprécipitation	146
4.	Implication du variant humain TRPV1mito dans l'homéostasie calcique intracellulaire.....	148
4.1.	Ca ²⁺ cytoplasmique	148

4.1.1.	A l'état basal	148
	a) Avec la Flexstation	148
	b) Par microscopie à fluorescence	150
4.1.2.	Activation pharmacologique de TRPV1	150
	a) Avec la Flexstation	150
	b) Par microscopie à fluorescence	150
4.2.	Ca ²⁺ dans le réticulum endoplasmique	152
4.3.	Ca ²⁺ au niveau des « hot spots » mitochondriaux	152
4.3.1.	A l'état basal	152
4.3.2.	Activation pharmacologique de TRPV1	152
4.4.	Ca ²⁺ mitochondrial	154
4.4.1.	A l'état basal	154
	a) Avec la Flexstation	154
	b) Par microscopie à fluorescence	154
5.	Implication du variant humain TRPV1mito dans la respiration mitochondriale	154
5.1.1.	Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules intactes	154
5.1.2.	Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules perméabilisées	156
5.1.3.	Mesure du potentiel de membrane mitochondrial	158
DISCUSSION	160	
6.	Rappel du contexte et hypothèse de travail	160
7.	Synthèse et interprétation des résultats	160
7.1.	Le variant TRPV1mito chez l'homme	160
7.1.1.	Rappel des résultats	160
7.1.2.	Mécanisme de formation de TRPV1mito	162
7.1.3.	Présence d'une MTS dans TRPV1mito	162
7.1.4.	Expression de TRPV1mito	164
7.2.	Le variant TRPV1mito dans le règne animal	164
7.2.1.	Rappel des résultats	164
7.2.2.	Intérêt évolutif lié à TRPV1mito	166
7.2.3.	Conservation du mécanisme d'épissage de TRPV1mito	166
7.3.	Modèle cellulaire utilisé	168
7.3.1.	Choix du modèle cellulaire	168
7.3.2.	Caractérisation des modèles cellulaires	168
7.4.	Localisation de TRPV1mito	170
7.4.1.	Rappel des résultats	170
7.4.2.	Localisation intracellulaire	170
7.4.3.	Localisation intra-mitochondriale	170
7.5.	Fonction de TRPV1mito dans l'homéostasie calcique	174
7.5.1.	Rappel des résultats	174
7.5.2.	Effets de TRPV1pm sur l'homéostasie calcique cellulaire	174
7.5.3.	Effets de TRPV1mito sur l'homéostasie calcique cellulaire	176
7.5.4.	TRPV1mito : un canal calcique mitochondrial supplémentaire ?	176
7.6.	TRPV1mito et la fonction mitochondriale	178
7.6.1.	Rappel des résultats	178
7.6.2.	Oxygraphie sur cellules intactes	178
7.6.3.	Oxygraphie sur cellules perméabilisées	180
7.6.4.	Potentiel de membrane mitochondrial	180
8.	Questions liées à l'identification de TRPV1mito	182
8.1.	Reconsidération de la fonction de TRPV1 au regard de sa localisation	182
8.2.	Régulation de l'activité de TRPV1mito	182
8.3.	Implications physiopathologiques potentielles	184
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	186	
BIBLIOGRAPHIE	188	
TABLE DES ILLUSTRATIONS	208	
TABLE DES TABLEAUX	212	

Abréviations

12-HPETE : 12-hydroperoxyeicosa-tetraénoïque

5'-iRTX: 5'-Iodo Résinifératoxine

AA : acide arachidonique

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADP: Adénosine Diphosphate

ANT: Translocase ATP/ADP

ARN: Acide ribonucléique

ATP: Adénosine Triphosphate

BLAST: Basic local alignment search tool (outil de recherche basique d'alignement local)

BRET: Bioluminescence resonance energy transfer (transfert d'énergie par résonance de bioluminescence)

BSA: Bovine serum albumin (albumine de sérum bovin)

CaM: Calmoduline

CaMKII: protéines kinases Ca^{2+} /Calmoduline-dépendante

CAP: Capsaïcine

CB1 : récepteurs aux cannabinoïdes

CCCP: Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone

CPZ: Capsazépine

CRAC: Ca^{2+} release- Ca^{2+} activated channels (canaux calciques activés par la libération de calcium)

DAG: Diacylglycerol

DRG: Dorsal root ganglion (ganglion de la racine dorsale)

DTT: Dithiothréitol

FCCP: Carbonyl cyanide 4-(trifluorométhoxy)phénylhydrazone

FRET: Förster resonance energy transfer (transfert d'énergie par résonance de type Förster)

GFP: Green fluorescent protein (protéine fluorescente verte)

IMM: inner mitochondrial membrane (membrane mitochondriale interne)

IMS: mitochondria intermembrane space (espace intermembranaire mitochondrial)

IP₃R: Inositol trisphosphate receptor (récepteur de l'inositol triphosphate)

MAM: Mitochondria-associated membranes (zone de contact entre le RE et la mitochondrie)

MCU: Mitochondrial calcium uniporter (uniporteur calcique mitochondrial)

mPTP: Mitochondrial permeability transition pore (pore de transition de perméabilité mitochondrial)

MTS: Mitochondria targeting sequence (séquence d'adressage mitochondriale)

MTY: Mito-Thermo Yellow

NADA: N-Arachidonoyl dopamine

OMM: outer mitochondrial membrane (membrane mitochondriale externe)

OPEX : opération extérieure

ORAI1: Calcium release-activated calcium channel protein 1 (protéine 1 du canal calcique activé par la libération de calcium)

ORF: open reading frame (cadre de lecture ouvert)

OXPPOS: phosphorylation oxydative
PBS: Phosphate-buffered saline (tampon phosphate salin)
PCR: Polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
PIP₂: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate
PKA: Protéine kinase A
PKC: Protéine kinase C
PLC : Phospholipase C
PMCA: Plasma membrane Ca²⁺-ATPase (Ca²⁺-ATPase de la membrane plasmique)
RE/SR : Réticulum endoplasmique/sarcoplasmique
RTX: Résinifératoxine
RyR: Ryanodin receptor (Récepteur à la ryanodine)
SERCA: sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (Ca²⁺-ATPase du réticulum sarco/endoplasmique)
SNC : système nerveux central
SNP: système nerveux périphérique
SOCE: Store-operated calcium entry (voie d'influx de calcium activée par la déplétion des stocks intracellulaires)
SPCAs: Secretory pathway Ca²⁺ ATPase (voie de transport de calcium du cytosol vers l'appareil de Golgi)
STIM1: Stromal interaction molecule 1 (protéine d'interaction stromale 1)
TFAM: Mitochondrial transcription factor A (facteur de transcription mitochondrial A)
TG: Thapsigargine
TIM : translocase de la membrane mitochondriale interne
TMRM: Ester méthylique de tétraméthylrhodamine
TOM : translocase de la membrane mitochondriale externe
TRP: Transient receptor potential
UCP: Uncoupling protein (protéine découplante)
VaTxS: Vanillotoxines
VDAC: Voltage-dependent anion channels (Porine de la membrane mitochondriale externe)
Δp: gradient de proton
Ψ_m: Potentiel de membrane mitochondrial

Introduction

1. Contexte sociétal et scientifique

L'évolution de l'être humain dans un milieu contraignant requiert une adaptation à des conditions particulières, ce qui implique des modifications physiologiques nombreuses et énergivores. Les sportifs d'activité d'endurance ou les personnels militaires peuvent être confrontés à ces situations qui s'ajoutent à l'effort à fournir. Les personnels déployés en opérations extérieures (OPEX), par exemple, œuvrent dans des situations de stress importantes, notamment en raison des contraintes géographiques (climat, relief) et humaines (conflit asymétrique, interaction civil/militaire) qui forment un environnement spécifique. Le métabolisme du personnel en OPEX est très fortement sollicité. Compte-tenu de la diversité des théâtres d'intervention de l'armée française, les enjeux physiologiques liées au climat (chaud/sec ou chaud/humide), et à des amplitudes thermiques importantes sont des facteurs majeurs susceptibles d'influencer la réussite ou l'échec d'une mission. La capacité opérationnelle du combattant subit de profondes perturbations au cours d'une activité physique en ambiance chaude, notamment si elle est couplée au port d'équipements lourds et à un surcroît d'attention et de vigilance¹. Cette contrainte thermique est génératrice de fatigue physique et de stress individuel. Certains effets de la déshydratation sur l'organisme mettent en jeu une désadaptation des systèmes de régulation thermique, impliquant une altération du métabolisme cellulaire. On retrouve ce type de troubles dans le coup de chaleur d'exercice, un syndrome caractérisé chez les sportifs et personnels militaires en OPEX par une brusque élévation de la température corporelle au cours d'une activité physique intense, malgré des températures pas nécessairement élevées. Les organismes homéothermes, comme l'homme, maintiennent leur température corporelle à une valeur constante de 37°C, grâce aux mitochondries, qui jouent le rôle de centrale thermique de nos cellules, et ce malgré des conditions environnementales changeantes. A une température ambiante normale, de l'ordre de 20°C, la régulation de la température interne mobilise des réactions du métabolisme cellulaire, nécessitant la production d'énergie sous la forme d'ATP, et la dissipation de chaleur. Pendant des décennies, on a estimé que les réactions mitochondriales s'effectuaient à 37°C en lien direct avec la température corporelle.

Néanmoins, des données récentes (Chrétien et al., 2018) indiquent que les mitochondries forment, au sein des cellules, des « hot spots », c'est-à-dire des micro-domaines où la température excède largement la température physiologique normale (37°C). L'activité enzymatique de la chaîne respiratoire mitochondriale est en effet maximale pour une température de 50°C. Cet excès de température dans des zones discrètes du cytoplasme traduit le rôle d'usine énergétique dévolue à la mitochondrie et permet la régulation de la température cellulaire. Pourtant, les senseurs thermiques mitochondriaux, qui leur permettent de mesurer la température ambiante pour adapter le niveau de chaleur à produire, ne sont pas connus. Nous formulons l'hypothèse à travers ce travail de thèse que des canaux ioniques de la famille des TRPV (Transient Receptor Potential Vallinoid) – notamment TRPV1 – connus pour assurer un rôle de thermo-senseur périphérique pourraient assurer un rôle

¹ Ministère de la défense, 2008. Mémento IA pour la mise en condition opérationnelle avant déploiement sous menace NRBC en milieu extrême Publication interarmées PIA-3.8.2_MCO -NRBC N° 864/DEF/EMA/MA4/NP du 03 juin 2008

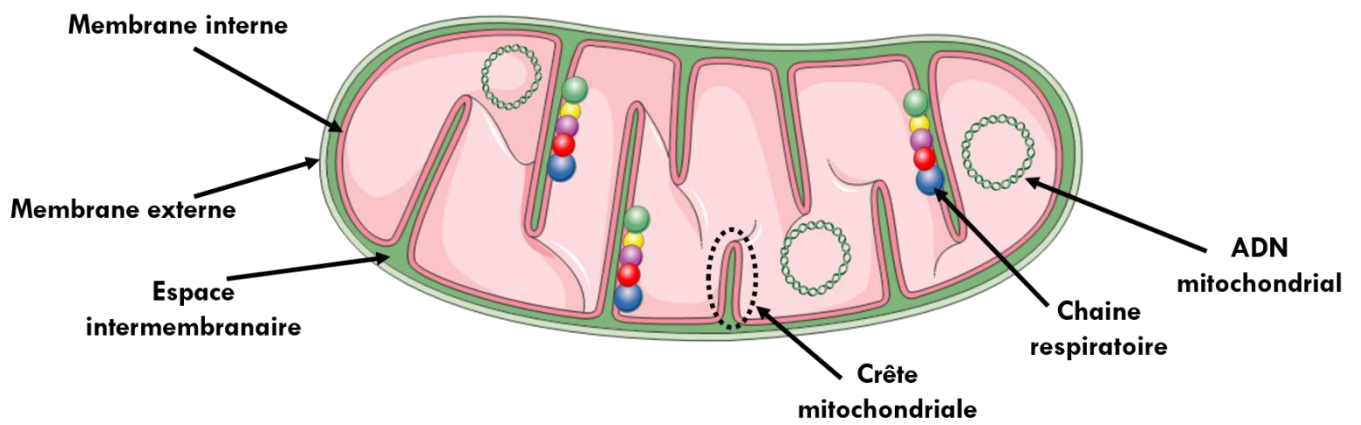


Figure 1: Représentation schématique de la structure mitochondriale et de ses principaux constituants

similaire dans la mitochondrie. Ce projet ambitionne d'éclairer l'expression et le rôle du canal TRPV1 au sein de la mitochondrie, c'est-à-dire de comprendre les mécanismes moléculaires à la base du rôle de thermostat physiologique occupé par la mitochondrie.

2. Mitochondrie et thermogénèse cellulaire

2.1. Généralités sur la mitochondrie

2.1.1. Morphologie et dynamique mitochondriale

La mitochondrie est l'organite responsable d'environ 90% de la production énergétique des cellules eucaryotes (Rolfe et Brown 1997). Ainsi, chaque cellule en contient, à l'exception des globules rouges matures. Dans les cellules humaines, le nombre de mitochondries varie en fonction du type cellulaire et des besoins énergétiques. Elles représentent par exemple 20% du volume cytosolique dans les cellules hépatiques et 40% dans les cellules cardiaques. De plus, les mitochondries sont en mouvement perpétuel dans la cellule afin de fournir l'énergie nécessaire à toutes les zones cellulaires actives. Cette dynamique est assurée par des processus de fusion/fission qui déterminent la morphologie mitochondriale (Jakobs 2006). Ainsi, grâce à des protéines comme OPA1, la fusion mitochondriale permet de former un réseau mitochondrial de filaments interconnectés (Delettre et al. 2000). A l'inverse, la fission mitochondriale grâce à DRP1, entre autres, permet de fragmenter le réseau mitochondrial en structures ponctiformes indépendantes (Smirnova et al. 2001). Lorsqu'une mitochondrie est sous une forme isolée, on peut distinguer sa compartimentation structurale qui est composée de deux membranes délimitant la matrice mitochondriale, l'espace intermembranaire (IMS) et le cytoplasme cellulaire (Figure 1).

La membrane externe (OMM) est une bicouche lipidique composée d'environ 60% de protéines et 40% de lipides. Cette membrane présente des transporteurs assurant le passage de diverses molécules et protéines. L'OMM est notamment composée de porines comme les Voltage Dependent Anion Channels (VDACs), qui sont des protéines transmembranaires, permettant la diffusion de molécules de faible poids moléculaire (< 5-10 kDa) (Grevel et Becker 2020). Les protéines de plus haut poids moléculaire peuvent traverser l'OMM par transport actif *via* une translocase de la membrane externe mitochondriale (TOM) (Kang, Fielden, et Stojanovski 2018). Grâce à la forte perméabilité de l'OMM, la composition de l'IMS est très proche de celle du cytoplasme.

La membrane interne (IMM) contient environ 80% de protéines et 20% de lipides dont la cardiolipine, un phospholipide spécifique qui rend cette membrane très peu perméable (Pennington et al. 2019). Ainsi, le passage de molécules à travers l'IMM nécessite des transporteurs spécifiques. Par exemple, les protéines sont importées dans la matrice mitochondriale grâce aux translocases de l'IMM (TIM) (Kang, Fielden, et Stojanovski 2018). Le transport du calcium (Ca^{2+}) est notamment assuré par un complexe protéique, le « mitochondrial Ca^{2+} uniporter » (MCU). L'IMM possède également de nombreux replis caractéristiques qui forment les crêtes mitochondriales (Figure 1), et enferme la matrice mitochondriale qui contient l'ADN mitochondrial, une molécule circulaire d'environ 16 Kb, dépourvue d'introns et qui codent pour 13 protéines de la chaîne respiratoire (Shadel et Clayton 1997). Au sein de la matrice mitochondriale siègent de nombreuses voies métaboliques, telles que le cycle de Krebs et l'oxydation des acides gras.

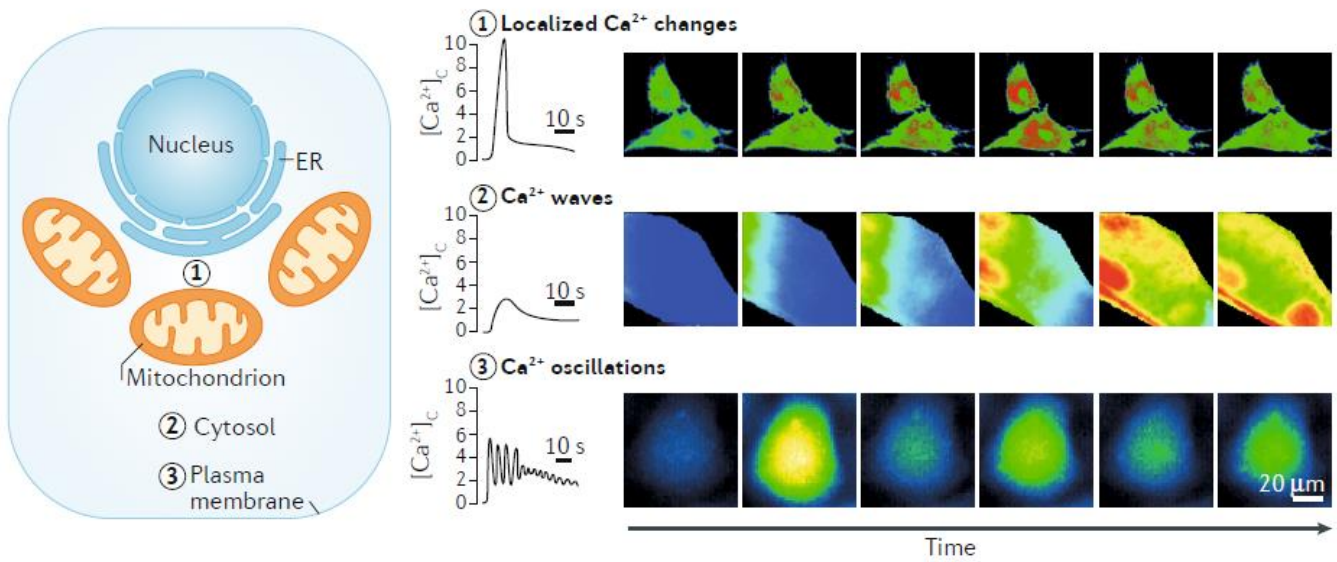


Figure 2: Différents types de variations du $[Ca^{2+}]_c$ au sein d'une cellule

2.1.2. Fonction dans le métabolisme énergétique

La mitochondrie est responsable de la majeure production d'ATP dans la cellule grâce à la phosphorylation oxydative (OXPHOS), dont les réactions sont assurées par les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire enchâssés dans l'IMM.

a) Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs est une voie métabolique localisée dans la matrice mitochondriale qui fait intervenir 8 enzymes. Il est alimenté par l'acétyl-CoA, issu de la β -oxydation des acides gras ou de la conversion du pyruvate produit par la glycolyse. En début de cycle, les deux carbones du groupement acétyl s'associent avec l'oxaloacétate pour former du citrate grâce à la citrate synthase. Ensuite, une séquence de 7 réactions enzymatiques aboutit à l'oxydation du citrate en oxaloacétate, réinitialisant le cycle, et la libération d'électrons captés par les cofacteurs NADH et FADH₂. En résumé, une molécule d'acétyl-CoA permet la production de 3 molécules de NADH et 1 molécule de FADH₂ qui serviront à alimenter la chaîne respiratoire mitochondriale (Martínez-Reyes et Chandel 2020).

b) La phosphorylation oxydative

La phosphorylation oxydative repose sur l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale associée à celle de l'ATP-synthase. La chaîne respiratoire est composée de 4 complexes enzymatiques situés dans l'IMM : la NADH déshydrogénase (complexe I), la succinate déshydrogénase (complexe II), la cytochrome-c réductase (complexe III) et la cytochrome c oxydase (complexe IV). Chaque complexe est composé de sous-unités codées par le génome nucléaire ou le génome mitochondrial. L'oxydation des cofacteurs réduits NADH et FADH₂ par les complexes I et II, respectivement, permet de générer un transfert d'électrons par oxydo-réduction à travers la chaîne respiratoire, notamment grâce aux transporteurs d'électrons, le coenzyme Q et le cytochrome c. Le transfert d'électrons, qui s'achève par la réduction de l'oxygène en eau par le complexe IV, est couplé à un transfert de protons de la matrice mitochondriale vers l'IMS par les complexes I, III et IV. Le gradient de proton (Δp) généré est alors dissipé par l'ATP-synthase qui utilise cette force protonotrice pour phosphoryler l'ADP en ATP dans la matrice mitochondriale (J. X. Tang et al. 2020).

2.2. Calcium et Mitochondrie

2.2.1. Généralités sur le calcium

L'ion Ca²⁺ est un second messager ubiquitaire qui transmet des informations permettant de déclencher des processus intracellulaires en réponse à des signaux intracellulaires ou extracellulaires. Une augmentation de la concentration de Ca²⁺ dans le cytosol ([Ca²⁺]_c) peut être provoquée par un grand nombre d'acteurs et peut induire une multitude de réponses cellulaires différentes. Afin de réaliser ce rôle complexe de signalisation, la distribution spatiale et temporelle du Ca²⁺ intracellulaire peut prendre différentes formes en fonction des fonctions impliquées (Figure 2) (Berridge, Lipp, et Bootman 2000). L'augmentation de [Ca²⁺]_c peut rester localisée afin d'induire une réponse locale (Figure 2) ou peut être diffuse dans le cas de vagues calciques (Figure 2). De plus, dans certains cas, la stimulation d'une cellule peut provoquer des augmentations transitoires, durables ou oscillatoires de [Ca²⁺]_c. Chaque type d'augmentation de [Ca²⁺]_c peut induire des réponses cellulaires différentes. Les régulations

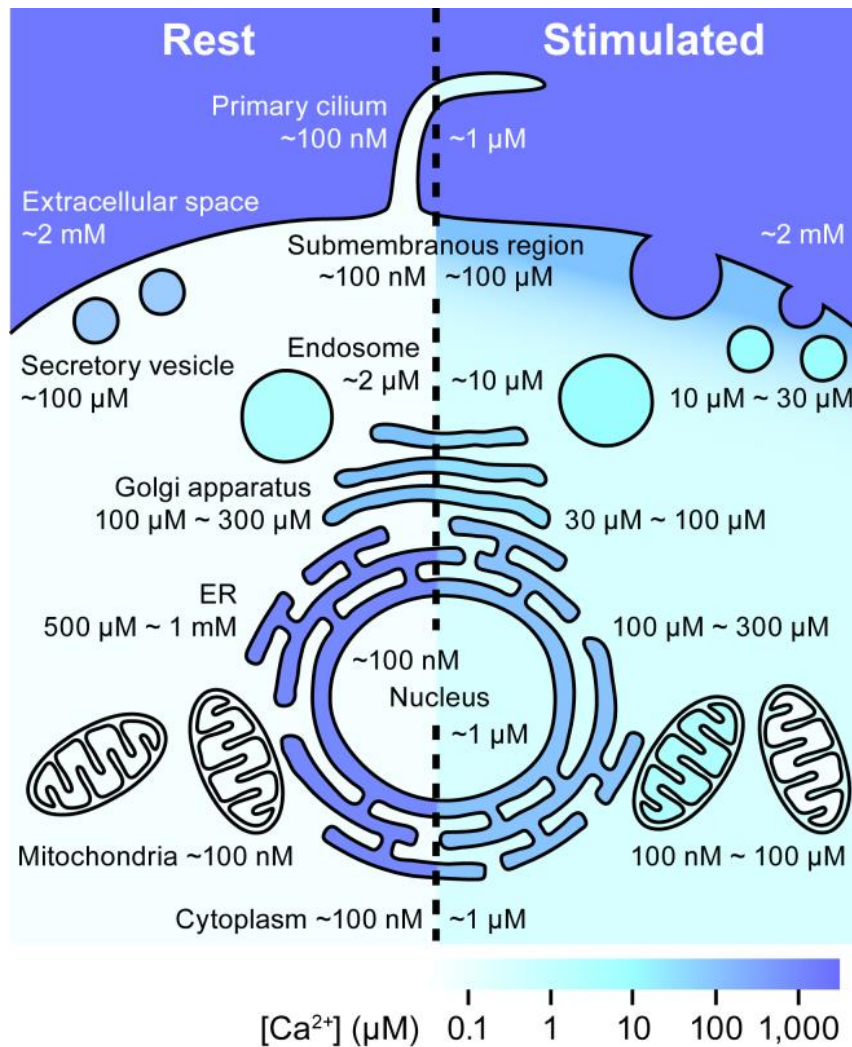


Figure 3 : Illustration de la répartition du Ca^{2+} dans la cellule avant et après stimulation. Au repos (gauche), la majorité du Ca^{2+} est localisée dans le réticulum endoplasmique avec une concentration de plusieurs centaines de μM . Après une stimulation (droite), l'entrée et la mobilisation du Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire et les stocks intracellulaires modifie drastiquement sa distribution intracellulaire. D'après (Suzuki, Kanemaru, et Iino 2016).

calciques interviennent en effet dans de nombreux processus biologiques comme la contraction musculaire, l'exocytose vésiculaire, ou la régulation de la transcription.

L'activité de nombreux types de protéines est régulée par le Ca^{2+} comme des kinases (PKC), des phosphatases (calcineurine B), des protéases (calpaïne) ou des facteurs de transcription (famille CREB) (Clapham 2007). La plupart de ces protéines possède un ou plusieurs motif(s) en main EF (EF hand) permettant la liaison avec les ions Ca^{2+} , ce qui provoque en général un changement de conformation de la protéine, avec des effets possibles sur sa localisation, ses interactions moléculaires et sa fonction. Cependant, le rôle du Ca^{2+} ne se limite pas spatialement à des modifications de sa concentration cytosolique. En effet, les variations de la concentration de Ca^{2+} au sein même des organites intracellulaires sont impliquées dans des voies de régulations Ca^{2+} -dépendantes. Par exemple, une augmentation de Ca^{2+} dans les lysosomes active la calcineurine qui permet la translocation du facteur de transcription EB (TFEB) dans le noyau afin d'activer l'expression de certains gènes (Medina et al. 2015).

2.2.2. Localisation intracellulaire du calcium

Comme évoqué précédemment, l'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_c$ est un processus important pour la régulation de diverses fonctions cellulaires, et résulte d'une coopération entre les deux sources principales de Ca^{2+} : le milieu extracellulaire – un réservoir quasiment illimité de Ca^{2+} avec une concentration millimolaire² – et le réticulum endoplasmique (RE), ou sarcoplasmique (SR) des cellules musculaires, dont la concentration calcique est supérieure à 100 μM (Rosario Rizzuto et al. 2012). Par ailleurs, d'autres organites intracellulaires comme l'appareil de Golgi, les endosomes et les lysosomes permettent également de stocker du Ca^{2+} dans la cellule (Pinton, Pozzan, et Rizzuto 1998; Calcraft et al. 2009). Ainsi, la mobilisation du Ca^{2+} par la cellule est réalisée grâce à des échanges d'ions Ca^{2+} entre le milieu extracellulaire, le cytosol et les organites intracellulaires, dont les concentrations en Ca^{2+} sont amenées à changer en fonction de l'activité cellulaire (Suzuki, Kanemaru, et Iino 2016) (Figure 3).

2.2.3. Protéines impliquées dans les flux calciques cellulaires

L'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_c$ est possible grâce à l'import du Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire par des protéines membranaires, principalement des canaux, qui permettent de générer des flux de Ca^{2+} selon le gradient de concentration donc du milieu extracellulaire vers le cytosol. Parmi ces canaux, on trouve notamment les « transient receptor potential channels » (TRPCs), les « Ca^{2+} release- Ca^{2+} activated » (CRAC) channels, et des canaux sensibles au potentiel de membrane (Ca_v) (Dietrich, Fahlbusch, et Gudermann 2014; Prakriya et Lewis 2015). L'entrée de Ca^{2+} peut également être assurée par des récepteurs ionotropiques, comme le récepteur nicotinique de l'acétylcholine, ou des échangeurs d'ions (échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en mode inverse). En ce qui concerne les flux sortants de Ca^{2+} depuis le cytosol vers le milieu extracellulaire, c'est-à-dire contre le gradient calcique, ce sont les pompes Ca^{2+} -ATPases de la membrane plasmique (PMCA) qui utilisent l'énergie de l'ATP pour exporter les ions Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018) ou l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.

² La calcémie humaine a une valeur comprise entre 2,2 et 2,6 mM

L'augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ est également possible par libération du Ca^{2+} depuis les réserves intracellulaires. Parmi les canaux impliqués dans la libération du Ca^{2+} depuis le RE, on retrouve les récepteurs à l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃Rs) et les récepteurs à la ryanodine (RyRs). La libération du Ca^{2+} depuis les lysosomes est quant à elle assurée par les canaux TRP Mucolipin 1 (TRPML1) (W. Wang et al. 2014). Le rétablissement du stock intracellulaire de Ca^{2+} est possible grâce aux pompes Ca^{2+} -ATPases (SERCA) qui transfèrent les ions Ca^{2+} vers la lumière du RE en hydrolysant de l'ATP (de Meis 2002). Le retour du Ca^{2+} dans l'appareil de Golgi est assuré par la « Secretory Pathway Ca^{2+} ATPase » (SPCAs) (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018).

Il faut noter que, même si les voies d'import et d'export du Ca^{2+} entre le milieu extracellulaire, le cytosol et les organites intracellulaires sont différentes, elles restent dépendantes les unes des autres notamment *via* le « Store-Operated Calcium Entry » (SOCE), qui est activé par la déplétion du Ca^{2+} du RE. Un efflux important de Ca^{2+} depuis le RE permet d'activer la protéine d'interaction stromale 1 (STIM1), localisée à la jonction entre le RE et la membrane plasmique qui va activer à son tour ORAI1, un canal CRAC, et induire une entrée de Ca^{2+} dans le cytosol notamment grâce au canal TRPC1 (K. T. Cheng et al. 2013; Prakriya et Lewis 2015). Certaines protéines appelées « Ca^{2+} -binding proteins » sont aussi capables de moduler le taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme.

2.2.4. La mitochondrie comme senseur et régulateur du calcium

Parmi les organites intracellulaires, la mitochondrie joue un rôle majeur, à la fois, dans la régulation des flux calciques et dans la réponse cellulaire médiée par le Ca^{2+} . En effet, la mitochondrie est capable d'accumuler une grande quantité de Ca^{2+} dans sa matrice. Depuis les 50 dernières années, de nombreuses recherches sur ce sujet ont clairement démontré le rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique cellulaire. A l'état de repos, la concentration mitochondriale de Ca^{2+} est identique à celle du cytosol (≈ 100 nM). Mais après une stimulation cellulaire induisant une augmentation du $[Ca^{2+}]_c$, la mitochondrie est capable d'accumuler 10 à 20 fois plus de Ca^{2+} dans sa matrice que la concentration présente dans le cytosol (Figure 3) (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). Dans ce sens, la capacité de la mitochondrie à accumuler le Ca^{2+} est favorisée par le potentiel de membrane mitochondrial (Ψ_m , de -120/-180 mV) généré par la chaîne respiratoire, et qui permet de produire un gradient électrochimique suffisant pour induire une entrée de Ca^{2+} (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). De plus, la mitochondrie est située à proximité des réserves internes de Ca^{2+} grâce à des zones de contact avec le RE, zones appelées « mitochondria-associated membranes » (MAMs), jouant un rôle clé dans un transfert direct de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018).

a) Entrée du calcium mitochondrial

Pour atteindre la matrice mitochondriale, les ions Ca^{2+} doivent traverser l'OMM et l'IMM. Chacune de ces membranes présente des transporteurs spécifiques qui régulent l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie.

L'OMM est définie comme hautement perméable au Ca^{2+} , grâce à l'abondance des porines VDAC. Cette protéine existe sous 3 isoformes (VDAC1, 2 et 3) qui sont exprimées de manière plus ou moins ubiquitaire en fonction des tissus (Messina et al. 2012). Les porines VDACs permettent la diffusion de petites molécules comme des ions, des nucléotides (ADP et ATP) et d'autres métabolites à travers l'OMM. VDAC peut se présenter sous la conformation fermée (diamètre du pore = 0,9 nm) ou ouverte (diamètre du pore = 2,5 nm) en fonction du potentiel de membrane. Un faible potentiel transmembranaire (-20 à +20 mV) favorise l'ouverture de VDAC avec une forte conductance, alors qu'un fort potentiel transmembranaire (> +/- 30-60 mV) réduit la conductance de

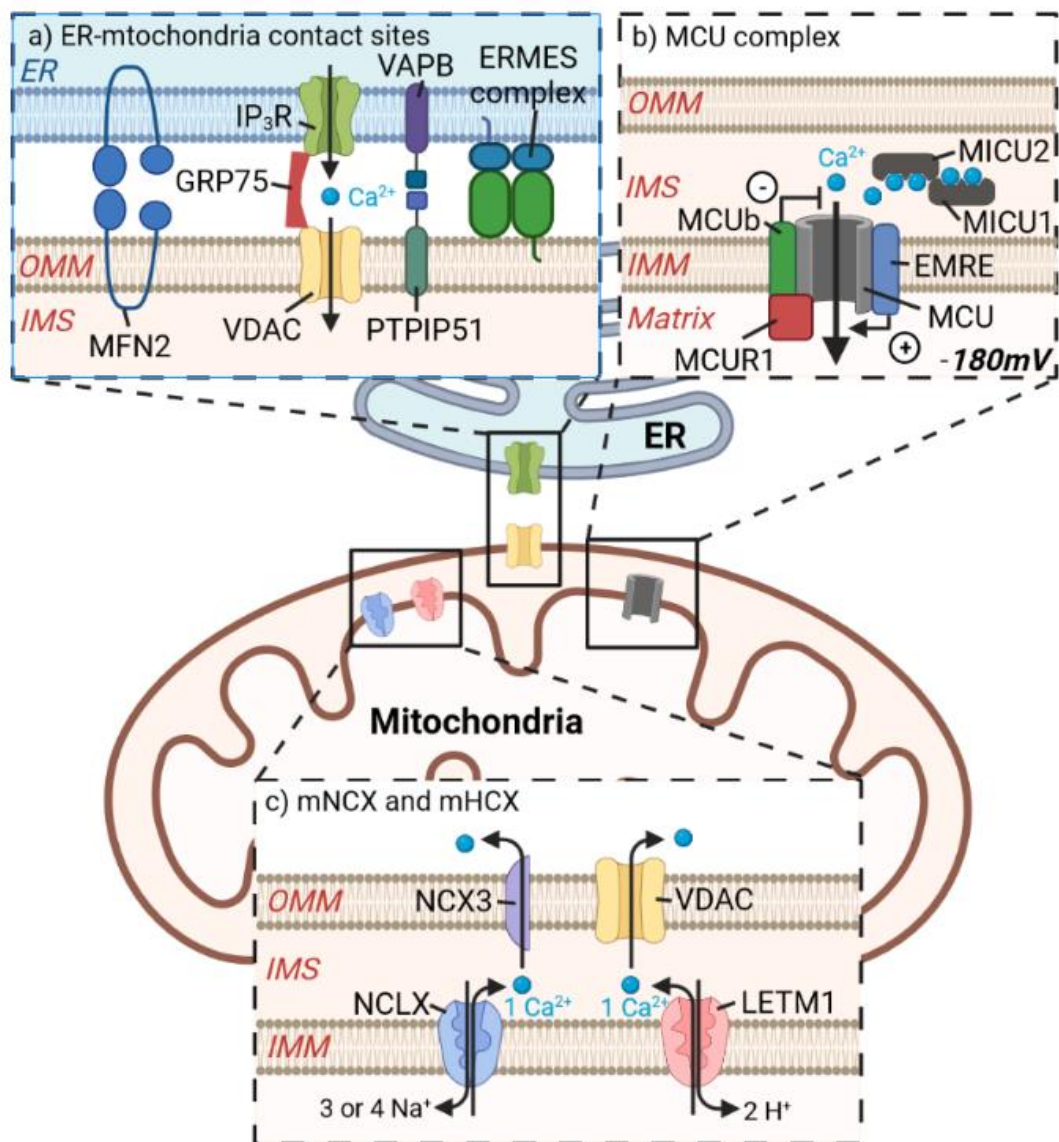


Figure 4 : Flux calciques mitochondriaux

(a) La formation de sites d'interaction entre le RE et la mitochondrie est due à différentes protéines comme MFN2, le complexe VAPB-PTPIP51 et, chez les levures, le complexe ERMES. La protéine GRP75 permet de former le complexe IP₃R-GRP75-VDAC pour le transfert de Ca²⁺ du RE vers l'espace intermembranaire de la mitochondrie. (b) Le transfert du Ca²⁺ depuis l'espace intermembranaire vers la matrice de la mitochondrie est possible grâce au potentiel de membrane mitochondrial et au complexe MCU. Celui-ci est constitué de la sous-unité du pore ainsi que de plusieurs sous-unités régulatrices comme MCUB, EMRE, MCUR1, MICU1 et MICU2. (c) La mitochondrie possède plusieurs voies pour exporter le Ca²⁺ vers le cytoplasme. On retrouve d'abord l'échangeur mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ (mNCX) identifié comme étant NCLX, puis l'échangeur mitochondrial H⁺/Ca²⁺ (mHCX) proposé comme étant LETM1. Adapté de (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018).

VDAC sous sa conformation fermée et le rend sélectif aux petits cations comme le Ca^{2+} (Shoshan-Barmatz, Krelin, et Shteinfer-Kuzmine 2018). Cependant, la forte perméabilité aux ions de l'OMM médiée par VDAC devrait limiter la génération de fort potentiel transmembranaire (Benz, Kottke, et Brdiczka 1990). Ainsi, VDAC se retrouverait majoritairement sous sa conformation ouverte. Néanmoins, il a été proposé que le potentiel de membrane de l'IMM peut influencer les pores de l'OMM, suggérant que VDAC, localisée au niveau des zones de contact entre l'IMM et l'OMM, pourrait se présenter sous sa conformation fermée (Adams et al. 1989). Globalement, VDAC dissipe des flux de Ca^{2+} dans sa conformation fermée et ouverte, et limite la formation de gradient de Ca^{2+} à travers l'OMM.

Une fois dans l'IMS, le Ca^{2+} doit ensuite traverser l'IMM pour atteindre la matrice mitochondriale. La voie majeure d'entrée de Ca^{2+} à travers l'IMM est le MCU (Figure 4), un complexe protéique qui comprend des sous-unités formant le pore du canal et des sous-unités régulatrices. La sous-unité MCU qui forme le pore est associée aux sous-unités régulatrices transmembranaires MCUB et EMRE, et aux sous-unités régulatrices de l'IMS MICU1 et MICU2, qui interagissent avec EMRE (Foskett et Philipson 2015). D'autres protéines ont été décrites comme sous-unités du MCU, comme MICU3 et MICU1.1, dont l'expression est limitée au système nerveux central et au muscle squelettique, respectivement (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). La protéine MCUR1 interagit aussi avec le MCU dans la matrice mitochondriale mais son mécanisme de régulation du MCU reste incertain (Mallilankaraman et al. 2012). Il a d'abord été proposé que MCUR1 est impliqué dans l'assemblage du MCU (Tomar et al. 2016) mais une étude protéique n'a pas identifié MCUR1 comme partenaire du MCU (Sancak et al. 2013). De plus, il a été montré que réduire l'expression de MCUR1 aboutit à une réduction du $\Delta\Psi_m$, indiquant un rôle plus complexe de celui-ci dans la régulation du Ca^{2+} mitochondrial (Ren et al. 2018). Les sous-unités régulatrices du MCU jouent un rôle clé dans sa fonction. En effet, dans l'IMS le Ca^{2+} entrant se lie au dimère protéique MICU1-MICU2 grâce à des motifs EF-hand. Le complexe MICU1-MICU2/ Ca^{2+} interagit ensuite avec la sous-unité EMRE afin de contrôler l'activation du MCU lorsque la concentration de Ca^{2+} dans l'IMS est élevée (J. C. Liu et al. 2016; Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). L'activation du MCU provoque alors une entrée importante de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale grâce au $\Delta\Psi_m$. En effet, le gradient de proton généré par le fonctionnement de la chaîne respiratoire induit une différence de potentiel membranaire de -150 à -180mV au niveau de l'IMM, avec une majorité de charges négatives dans la matrice mitochondriale. Le $\Delta\Psi_m$ est donc favorable à l'entrée de cations comme le Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). Par ailleurs, les voies d'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie interagissent fortement avec le RE au niveau des MAMs (Figure 4), où la distance entre le RE et la mitochondrie est de l'ordre de 10 à 60 nm (R. Rizzuto et al. 1998). Ainsi, lors d'une libération de Ca^{2+} par le RE, notamment via l' IP_3R localisé au niveau des MAMs, la mitochondrie est exposée à une augmentation très importante de la concentration locale de Ca^{2+} , jusqu'à 10 fois supérieure au reste du cytoplasme (Giacomello et al. 2010).

Bien que le MCU joue un rôle prépondérant dans l'import de Ca^{2+} dans la mitochondrie, d'autres mécanismes indépendants du MCU, ont également été décrits en faisant intervenir des RyRs, TRPC3, UCP2 ou UCP3 (Ryu et al. 2010; Feng et al. 2013; Trenker et al. 2007).

b) Sortie du calcium mitochondrial

Il existe 2 voies de sorties du Ca^{2+} mitochondrial : la voie de l'échangeur mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCC) et la voie de l'échangeur mitochondrial $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX). La nature moléculaire du mNCC a été identifiée comme

étant la protéine transmembranaire NCLX (ou SLC8B1), mais celle du mHCX est encore incertaine (Palty et al. 2010). En effet, LETM1 a été proposé comme étant le mHCX mais des résultats contradictoires semblent le remettre en question (U. De Marchi et al. 2014; Doonan et al. 2014). La voie du mNCX est prédominante dans les cellules excitables, alors que la voie du mHCX l'est dans les cellules non excitables (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). Le transport ionique généré par le mNCX est électrogénique car il transfère 3 ou 4 ions Na^+ pour un ion Ca^{2+} , alors que le transport du mHCX est électro-neutre car il transfère 2 ions H^+ pour un ion Ca^{2+} (Dash et Beard 2008; Gunter, Zuscik, et Gunter 1991). Ainsi, le mNCX et le mHCX exportent les ions Ca^{2+} de la matrice mitochondriale vers l'IMS, afin qu'ils regagnent le cytoplasme grâce à des protéines de l'OMM comme VDAC ou NCX3 (Figure 4) (Scorziello et al. 2013). Cependant, il semblerait que le mNCX et le mHCX ne soient pas les seules voies de sortie du Ca^{2+} mitochondrial. En effet dans certaines conditions, l'ouverture transitoire du pore de transition de perméabilité mitochondriale (mPTP) représenterait une voie alternative d'efflux du Ca^{2+} mitochondrial (E. De Marchi et al. 2014; X. Lu et al. 2016).

c) Acteurs de la régulation du calcium mitochondrial

Afin de maintenir l'homéostasie calcique cellulaire, un grand nombre de protéines ont été identifiées comme acteur de la régulation du Ca^{2+} mitochondrial en agissant sur les voies d'entrée et de sortie du Ca^{2+} mitochondrial. Ces régulations interviennent à différents niveaux.

Tout d'abord, les protéines de la famille BCL-2 interagissent avec VDAC afin de contrôler le passage des ions Ca^{2+} à travers l'OMM (Rostovtseva et Bezrukov 2008). Par exemple, BCL-XL interagit avec VDAC1 et VDAC3 afin de favoriser le transfert de Ca^{2+} à travers l'OMM (H. Huang et al. 2013). Par ailleurs, d'autres protéines impliquées dans le maintien des MAMs jouent un rôle dans la régulation du Ca^{2+} mitochondrial en assurant le transfert des ions Ca^{2+} des réserves du RE vers la mitochondrie. Par exemple, l'interaction entre la « protein tyrosine phosphatase- interacting protein 51 » (PTPIP51) et la « vesicle- associated membrane protein- associated protein B/C » (VAPB) est indispensable pour maintenir la structure des MAMs, et réduire leur expression aboutit à diminuer l'accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie (De Vos et al. 2012). D'autres part, des modifications post-traductionnelles sont également impliquées dans la régulation du Ca^{2+} mitochondrial, notamment la sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie peut être stimulée par la phosphorylation de NCLX par « PTEN- induced putative kinase 1 » (PINK1) ou la protéine kinase A (PKA) (Kostic et al. 2015). De plus, il a été montré que la phosphorylation du MCU au niveau de la Ser57 et la Ser92 par la « Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II » (CaMKII) augmente l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie (Joiner et al. 2012).

d) Rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique cellulaire

La capacité de la mitochondrie à accumuler le Ca^{2+} joue un rôle prépondérant dans l'homéostasie calcique cellulaire, car elle agit comme un véritable acteur qui « façonne » la réponse calcique dans le cytoplasme, en tamponnant le Ca^{2+} cellulaire. Par exemple, la surexpression du MCU augmente la capacité d'accumulation du Ca^{2+} par la mitochondrie, qui est observée par une nette réduction de l'amplitude du signal liée à l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique après un relargage de Ca^{2+} par l' IP_3R (De Stefani et al. 2011). A l'inverse, pour des neurones dépourvus de PDZD8, une protéine des MAMs, les zones de contact entre le RE et la mitochondrie sont réduites et le taux de Ca^{2+} cytosolique est augmenté proportionnellement à la réduction de la capacité de tampon de la mitochondrie (Hirabayashi et al. 2017).

Le tamponnage du Ca^{2+} par la mitochondrie est associé à son positionnement. En effet, dans le cytosol, une concentration locale importante de Ca^{2+} inhibe les canaux calciques membranaires qui transfèrent le Ca^{2+} comme l' IP_3R du RE ou ORAI1 à la membrane plasmique. Ainsi, le positionnement des mitochondries à proximité de ces canaux permet de réduire la concentration de Ca^{2+} localement pour maintenir un gradient de Ca^{2+} favorable à l'activité des canaux (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). Par exemple, la réduction de l'expression du MCU est associée à une réduction du relargage de Ca^{2+} par l' IP_3R et reflète l'inhibition de celui-ci par un déficit de l'accumulation de Ca^{2+} par la mitochondrie (K. Samanta, Douglas, et Parekh 2014). De plus, la mitochondrie peut contrôler la propagation des vagues calciques et donc réguler des fonctions spécifiques liées au Ca^{2+} (Wacquier et al. 2016). Par exemple, dans les cellules acineuses pancréatiques notamment, les mitochondries forment une véritable barrière autour des granules de zymogène et confine le relargage de Ca^{2+} de l' IP_3R au niveau de la zone sécrétoire (Tinel et al. 1999).

Même s'il est certain que la mitochondrie joue un rôle dans la régulation des flux calciques intracellulaires, certains aspects des mécanismes impliqués restent hypothétiques ou contradictoires, notamment concernant le lien entre l'accumulation de Ca^{2+} par la mitochondrie et le SOCE. Par exemple, dans des lignées cellulaires de cancer du sein, la réduction de l'expression du MCU provoque une réduction (S. Tang et al. 2015) ou une augmentation du SOCE (Tosatto et al. 2016). Le rôle de tamponnage calcique de la mitochondrie et les mécanismes impliqués nécessitent donc des recherches plus approfondies. Par ailleurs, en fonction du type cellulaire, la mitochondrie exerce un rôle plus ou moins important dans le tamponnage du Ca^{2+} . Par exemple, les cardiomyocytes disposent d'une capacité d'extrusion du Ca^{2+} du cytosol par les NCXs et la pompe SERCA très importante, qui font sortir le Ca^{2+} du cytoplasme 20 à 60 fois plus rapidement que les autres transporteurs mitochondriaux (Williams et al. 2013).

2.2.5. Le calcium comme régulateur de la fonction mitochondriale

a) Synthèse d'ATP

La dissipation d'un gradient de Ca^{2+} à travers les membranes cellulaires génère une signalisation rapide et importante, stimulant de nombreuses fonctions cellulaires consommatrices d'ATP, comme l'exocytose ou la mobilité cellulaire. De fait, l'augmentation de la concentration de Ca^{2+} et la production d'ATP sont intimement liées pour maintenir l'homéostasie métabolique cellulaire (Glancy et Balaban 2012). A cet égard, le Ca^{2+} joue un rôle majeur dans la régulation de l'activité mitochondriale, notamment pour la production d'ATP. Il est en effet décrit comme un élément important du maintien de l'homéostasie métabolique cellulaire, grâce à sa double action d'activation de la consommation et de production d'ATP.

D'un point de vue biochimique, plusieurs effets du Ca^{2+} aboutissent au contrôle de la production de l'ATP dans la mitochondrie. Tout d'abord, l'accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie est un élément clé dans la régulation de trois enzymes impliquées dans le cycle de Krebs : la pyruvate déshydrogénase (PDH), l' α -cétoglutarate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase. Ces trois enzymes sont activées par le Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale par différents mécanismes. En effet, l' α -cétoglutarate et l'isocitrate déshydrogénase sont directement activées par la liaison avec le Ca^{2+} , alors que l'activation de la PDH dépend de la déphosphorylation de sa sous-unité catalytique par une phosphatase Ca^{2+} -dépendante (Denton, Randle, et Martin 1972; Rutter et Denton 1988). De plus, il a été montré que l'oxydation de la durohydroquinone est activée par le

Ca²⁺ dans des mitochondries isolées, suggérant une activation du complexe III de la chaîne respiratoire par le Ca²⁺ (Murphy, Kelleher, et Fiskum 1990). De nombreuses études ont également démontré une augmentation de l'activité de l'ATP-synthase en présence de Ca²⁺ sur mitochondries isolées ou sur cellules intactes (Harris et Das 1991; Territo et al. 2000). Par ailleurs, le Ca²⁺ semble également contrôler l'activité de transporteurs comme la translocase ADP/ATP (ANT) ou l'échangeur aspartate/glutamate (Moreno-Sánchez 1983; Contreras et al. 2007). Le Ca²⁺ provoque donc une activation globale du métabolisme mitochondrial en interagissant avec plusieurs acteurs (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018).

b) Mort cellulaire

L'augmentation du Ca²⁺ dans la matrice mitochondriale peut également induire la mort cellulaire par activation du mPTP, un canal à très forte conductance, situé dans l'IMM. Son identité moléculaire reste à définir, mais l'hypothèse actuelle de sa composition le décrit comme un complexe protéique comprenant ANT, VDAC et la cyclophiline D (Bauer et Murphy 2020). Son ouverture augmente drastiquement la perméabilité de l'IMM et permet le passage de solutés de masse inférieure à 1500 Da (Bernardi et Forte 2007), ce qui dépolarise la membrane mitochondriale, et favorise le découplage de la phosphorylation oxydative et le gonflement des mitochondries (Lemasters et al. 2009). La dysfonction mitochondriale entraîne alors une déplétion d'ATP causant la mort cellulaire par nécrose, à moins qu'une source alternative de production d'ATP comme la glycolyse soit suffisante pour subvenir aux besoins cellulaires. Cependant, la libération massive de cytochrome c suite à la rupture des membranes mitochondriales aboutit quand même à la mort cellulaire par apoptose (Kim, Qian, et Lemasters 2003). Le rôle du mPTP dans la mort cellulaire est fortement soutenu par des données expérimentales pour un certain nombre de modèles de lésion cellulaire. Mais, l'importance du Ca²⁺ dans l'ouverture du mPTP semble dépendre d'autres facteurs. Par exemple, la surcharge de Ca²⁺ dans la matrice mitochondriale peut causer l'ouverture du mPTP ou n'être que la conséquence d'une dysfonction bioénergétique après une séquence d'ischémie/reperfusion de cardiomyocytes. De plus, l'ouverture transitoire du mPTP pourrait également servir de valve permettant de réduire le taux de Ca²⁺ matriciel (Elrod et al. 2010). À terme, l'identification précise de la nature du mPTP permettra de mieux définir son lien avec le Ca²⁺ mitochondrial.

2.3. Mitochondrie et thermogénèse cellulaire

Le rôle de la mitochondrie dans la production d'énergie cellulaire est universellement connu, mais son rôle dans la thermogénèse cellulaire reste peu considéré et étudié. La mitochondrie est le siège de nombreuses réactions biochimiques du métabolisme, notamment de la phosphorylation oxydative, qui libère de la chaleur. Pour mieux comprendre le lien entre la mitochondrie et la thermogénèse cellulaire, un article de revue a été réalisé et soumis dans le cadre de cette thèse. Il souligne le rôle-clé de la mitochondrie dans la thermogénèse cellulaire tout en décrivant l'ensemble des mécanismes cellulaires qui favorisent la production de chaleur par la mitochondrie. De plus, au regard des récentes avancées sur la mesure de la température mitochondriale, cette revue expose les interrogations actuelles, ainsi que des perspectives de recherche pour l'évolution de notre compréhension du rôle de la mitochondrie dans la thermogénèse cellulaire.

The multiple facets of mitochondrial regulations controlling cellular thermogenesis

Florian Beignon¹, Naig Gueguen^{1,2}, Hélène Tricoire-Leignel³, César Mattei³, Guy Lenaers^{1,4}.

(1) Univ Angers, MitoLab, Unité MITOVASC, UMR CNRS 6015, INSERM U1083, SFR ICAT, Angers, France

(2) Service de Biochimie et Biologie Moléculaire, CHU Angers, France

(3) Univ Angers, CarMe, Unité MITOVASC, UMR CNRS 6015, INSERM U1083, SFR ICAT, Angers, France

(4) Service de Neurologie, CHU d'Angers, Angers, France

Correspondence: guy.lenaers@inserm.fr, florian.beignon@univ-angers.fr.

Key-words: mitochondria, temperature, energy balance, thermogenesis, uncoupling

Abstract

Understanding temperature production and regulation in endotherm organisms becomes a crucial challenge facing the increased frequency and intensity of heat strokes related to global warming. Mitochondria, located at the crossroad of metabolism, respiration, Ca^{2+} homeostasis and apoptosis, were recently proposed to further act as cellular radiators, with an estimated inner temperature reaching 50°C in common cell lines. This inner thermogenesis might be further exacerbated in organs devoted to produce consistent efforts as muscles, or heat as brown adipose tissue, in response to acute solicitations. Consequently, pathways promoting respiratory chain uncoupling and mitochondrial activity, such as Ca^{2+} fluxes, uncoupling proteins, futile cycling and substrate supplies, provide the main processes controlling heat production and cell temperature. The mitochondrial thermogenesis might be further amplified by cytoplasmic mechanisms promoting the over-consumption of ATP pools.

Considering these new thermic paradigms, we discuss here all conventional wisdoms linking mitochondrial functions to cellular thermogenesis in different physiological conditions.

Internal heat production in endotherms

Body temperature in endotherms, such as mammals, is crucial for the management of most biological functions. The ability to produce internal heat and maintain a constant body temperature was acquired during animal evolution, and is closely linked to original processes controlling energy metabolism. Indeed, an increased metabolic rate in endotherm species produces sufficient heat to raise body temperature, even at rest (**Legendre et Davesne 2020**).

Thermodynamics laws help to understand the link between heat production and energy metabolism. Energetic metabolism combines catabolic reactions, which break down molecules into smaller units, and anabolic reactions, which promote the synthesis of complex molecules from smaller units. Catabolic reactions are spontaneous and exergonic, i.e. more energy is released than consumed, whereas anabolic reactions are non-spontaneous endergonic reactions, requiring energy input from exergonic reactions. However, the coupling between exergonic and endergonic reactions is imperfect, and a significant fraction of the energy dissipates as heat (**Ricquier 2006; Chouchani, Kazak, and Spiegelman 2018**).

In eukaryotic cells, mitochondria have a crucial role in ATP and heat productions, as the conjunction of most exergonic and endergonic reactions lies in this organelle especially through the oxidative phosphorylation (OXPHOS) (**Lowell et Spiegelman 2000; Ricquier 2006; Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018**).

I. Mitochondria: the center of cell energy or heat production?

As the center of ATP production, mitochondria are well-recognized as the powerhouses of eukaryotic cells. Indeed, the proton (H⁺) motive force (Δp) generated by the electron transfer chain (ETC) system drives the ATP synthesis by the mitochondrial F₀F₁-ATP synthase, thus converting a significant part of the energy released from substrate oxidation to ADP phosphorylation (OXPHOS, see box 1).

****Box 1****

While mitochondrial ATP synthesis is widely quoted, the thermogenic role of mitochondria is much more neglected. Yet the maximal overall thermodynamic efficiency of mitochondrial ATP synthesis is in the range of 40% (**Nath, 2016**), meaning that about 60% of the input energy is dissipated as heat (Figure 1, Box 2).

****Box 2****

Furthermore, this value is calculated with respect to the ideal OXPHOS coupling efficiency, while the effective one can be very different *in vivo*. Indeed, the degree of OXPHOS coupling is variable and modulated (**M D Brand, Harper, et Taylor 1993**) according to tissues and cells (**Cairns et al. 1998**), their energetic need and metabolic states. Thus, in mammalian cells, mitochondrial thermogenesis is the predominant form of energy production by respiration, far ahead of ATP synthesis. (**J. A. N. Nedergaard, Cannon, et Lindberg 1977**).

Two main mechanisms can further increase mitochondrial heat production rate: 1) the reduction of the thermodynamic efficiency of OXPHOS, at a constant or increased rate of substrate oxidation, thus increasing heat production at the expense of ATP production; 2) the increase in ATP turnover and consequently the substrate oxidation rate, with an inherent loss of energy as heat. Both mechanisms are not mutually exclusive, and will be discussed in the following sections.

II. Mitochondrial heat production through reduced OXPHOS efficiency

The coupling of redox reactions at the ETC to ATP synthesis by the F₀F₁-ATP synthase through H⁺ flux is not perfect and any alteration of OXPHOS efficiency will favor mitochondrial heat production. Two main mechanisms are known:

(A) the dissipation of the proton electrochemical gradient through the inner mitochondrial membrane (IMM), by uncoupling the use of Δp from ATP synthesis (Figure 2B).

(B) the modification of the stoichiometry between substrate oxidation, electron transfer reactions and proton translocation across the IMM (Figure 2A).

(A) Proton leak, the most powerful mechanism to support heat production.

a) Proton leak mechanisms

The most efficient way to increase thermogenesis consists in uncoupling. Mitochondrial uncoupling is a general term referring to any pathway that enables H⁺ reentry into the matrix independently of ATP production. Thus, uncoupling induces futile cycle, linking H⁺ leak through the inner mitochondrial membrane (IMM), via endogenous H⁺ conductance pathways, and subsequent backward H⁺ pumping by ETC in order to maintain the Δp across the IMM. This H⁺ leak leads to a decreased in ATP production, favoring heat production, consistent with the energy conservation law (**Ricquier 2006**) (Figure 3). This energy-dissipating cycling accounts for a varying proportion of cellular metabolism, depending on the tissue type, but involves remarkable energetic costs in endotherms, as up to 25% of rat basal metabolic rate can be related to H⁺ leak (**D. F. Rolfe et Brown 1997; D. F. Rolfe et al. 1999**). H⁺ leak may be a constitutive process related to IMM biochemical features, termed basal H⁺ leaks, or induced in specific conditions requiring thermogenesis.

Basal H⁺ leak is an unregulated process, which depends on the H⁺ driving force (Δp), being negligible at low potential at maximal phosphorylating rates, while increasing exponentially as Δp rises (**Nicholls 1974; Martin D. Brand et al. 2005**). Although poorly understood, the mechanisms of basal H⁺ leak depend on IMM physicochemical properties, such as its fatty acid composition. For instance, the amount and saturation of cardiolipin (**Hoch 1992**), together with the $\omega 6/\omega 3$ fatty acid ratio increase basal H⁺ leak intensity (**Bobyleva et al. 1997; Pehowich 1999**) (**Fontaine et al. 1996; Martin D Brand et al. 2003**). However, this concept remains debated (**Hulbert et Else 2004**), since no difference was found in H⁺ conductance in liposomes prepared from liver mitochondria from different species, despite a three-fold difference in the unsaturation index of the phospholipid fatty acyl groups (**Martin D. Brand et al. 2005**). Alternatively, the magnitude of H⁺ current across the IMM also correlates with the abundance of the adenine nucleotide translocase (ANT), a transmembrane IMM channel protein shuttling ADP for ATP (**Shabalina et al. 2006**). ANT may account for 50–70% of basal H⁺ leak in muscle mitochondria (**Martin D. Brand et al. 2005**). The related molecular mechanism still remains elusive, but is independent of ANT ATP/ADP exchange activity. Thus, the basal H⁺ leak may be related to IMM lipid composition and to the amount of restricted transmembrane carriers, such as ANT (**Shabalina et al. 2006; Jastroch et al. 2010**).

Besides this basal H⁺ leak, the most important uncoupling process corresponds to an induced and regulated Δp decrease, termed inducible H⁺ leaks, and related to the expression of specific mitochondrial carrier proteins, like the uncoupling proteins (UCPs). The best characterized process of thermogenesis arises from UCP1, which is required for the inducible H⁺ leak in brown and beige adipocytes. Conversely to heat shock proteins whose expression is induced by a hot stress, UCP1 expression is driven by a cold stress (**A. D. Nguyen et al. 2018**). UCP1 mediates H⁺ transport from the intermembrane space back to the matrix, consistently decreasing the Δp . This process induces a tremendous activation of oxidations to restore the Δp . Thus, once activated, UCP1 uncouples substrate oxidation from ATP production, converting most energy in heat (**Ricquier 2017**). Since UCP1 discovery (**Lin et Klingenberg 1980**), its key role in heat production in the brown adipose tissue (BAT) was evidenced (**Ricquier 2017**). As of today, UCP1 is considered a major thermogenesis player in BAT adaptive thermogenesis.

While mitochondria from BAT specifically produce heat through uncoupling, H⁺ leak is not a distinctive property of the mitochondria of the specialized thermogenic tissues. For instance, hepatocyte coupling efficiency in a broad range of species was

found in the range of 75-80% of the ideal value (M. D. Brand 2005), with H⁺ leak accounting for up to 26 and 22% of the oxygen consumption in resting and active rat hepatocytes, respectively (M. D. Brand et al. 1994; D. F. Rolfe et al. 1999). Similar coupling efficiencies were observed in other cell types (Buttgereit, Brand, et Müller 1992; Jekabsons et Nicholls 2004), while in perfused rat muscle, H⁺ leak could account for up to 55% of the mitochondrial oxygen consumption in resting condition (D. F. S. Rolfe et al. 1999) and up to 38% in contracting fibers (D. F. Rolfe et Brand 1996). These data indicate that H⁺ leak in tissues different from primary thermogenic ones can have a consistent contribution to heat production. The molecular identity of the uncoupling protein in non-thermogenic tissues has been a long matter of debates. On the basis of their sequence similarities, four additional UCP isoforms UCP 2 to 5 were discovered, with restricted expression patterns in tissues such as heart, kidney, pancreas, neurons, smooth muscles and skeletal muscles (Mao et al. 1999; Boss et al. 1997; Yu et al. 2000; Fleury et al. 1997). However, the functions of these UCPs are imperfectly known (Ježek et al. 2018). Although UCP3 has a possible *in vivo* effect on thermal homeostasis (Riley et al. 2016), UCP2 to 5 could regulate superoxide production (Ježek et al. 2018). Notably, the low contents of UCP2 to 5 in tissues do not allow a strong uncoupling, as does UCP1 in BAT. Indeed, the range of UCP1 uncoupling in BAT mitochondria is ≈55 mV, while UCP2 uncoupling in lung is lower than 12.5 mV (Ježek et al. 2004). Moreover, respiration analyses first pointed ANT as the main actor of the induced H⁺ leak in skeletal muscle and liver (Andreyev AY et al. 1989; M. D. Brand 2005). These results were further confirmed by direct patch-clamp measurements on IMM from several tissues such as skeletal muscle, heart, liver and kidney, using both pharmacological and genetic (ANT1/ANT2-deficient mice) approaches (Bertholet et al. 2019). The ANT-mediated uncoupling requires protonatable free fatty acids, which would act as cofactors in H⁺ translocation. The ubiquitous and high expression of ANT in many cell types may promote increased energy expenditure, i.e. in diet-induced thermogenesis. Thus, two proteins are nowadays considered as thermogenic uncoupling proteins: the ubiquitously expressed ANT and the fat-specific UCP1.

Finally, proton re-entry also accompanies metabolite and ion transports, therefore increasing conductance of any ion through the IMM could dissipate the Δp and uncouple the substrate oxidation by ETC from ATP synthesis. The most significant example is the mitochondrial Ca²⁺ cycling, which requires electrogenic ion-exchange and consequently induces mitochondrial uncoupling (Filadi et Greotti 2021). Furthermore, activities of K⁺ channels and electrogenic transporters embedded in the IMM (O'Rourke 2007; Urbani et al. 2021), can also induce uncoupling and reduce the OXPHOS efficiency, while supporting heat production. However, induced-H⁺ leak appears to be the only regulated mechanism specifically dedicated to thermogenesis.

b) Proton leak regulation

Regulations of H⁺ leak have been extensively studied in BAT, where UCP1-dependent thermogenesis prevails especially during adaptive non-shivering thermogenesis (Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018; Cohen et Kajimura 2021; Bertholet et Kirichok 2021). The regulation of UCP1 activity is not detailed in this review, but lipid and hormonal signaling as well as redox control are relevant pathways involved in UCP1-related inducible uncoupling.

Mitochondrial ROS production was described as a main regulator of BAT adaptive thermogenesis (Mills et al. 2018; Schneider et al. 2016; Chouchani et al. 2016; Lettieri-Barbato 2019) (reviewed by Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2017). Indeed, thermogenesis activation in mouse BAT by cold temperature (4°C) or β -adrenergic stimulation results in elevated production of mitochondrial superoxide, hydrogen peroxide and lipid hydroperoxides (Stier et al. 2014). Furthermore, genetic and pharmacological elevations of adipocyte ROS levels promote thermogenesis, while *in vivo* pharmacological depletion of mitochondrial lipid peroxides and superoxides impairs BAT thermogenic respiration (Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018). Mechanistically, thermogenic activation by mitochondrial ROS is mediated through reversible cysteine modifications of target proteins (Chouchani et al. 2016). For example, UCP1 Cys253 is targeted by oxidation, which increases UCP1 response to fatty acid (FA) during thermogenesis (Chouchani et al. 2016). In this respect, free long chain FAs are widely described as essential components of H⁺ leak activation by UCP1 and ANT (reviewed by Bertholet et Kirichok 2021). Indeed, free cytosolic FAs can

reach millimolar concentrations during active lipolysis in BAT (J. Nedergaard et Lindberg 1979), while micromolar concentrations are sufficient to activate H⁺ leak via UCP1 or ANT *in vitro* (Garlid et al. 1996; Brustovetsky et Klingenberg 1994). Conversely, free purine nucleotides, such as ATP and ADP, are described as the main physiological inhibitors of H⁺ leak (for a detailed review, see (Bertholet et Kirichok 2021)). Note that there is a competition between nucleotide exchange and FA-dependent H⁺ leak in the ANT translocation pathway. Thereby, in non-thermogenic tissues, ANT activity could switch from H⁺ leak, promoting heat production, to ATP/ADP translocation, promoting ATP production, and consequently act as a modulator of heat in energy balance (Bertholet et al. 2019).

Finally, T3 and T4 thyroid hormones (TH) are also involved in mitochondrial uncoupling (Yehuda-Shnaidman, Kalderon, et Bar-Tana 2014). Indeed, TH treatment is associated to decreased IMM potential in human lymphocyte (Mihara et al. 1999) and to an excessive increased TCA cycle flux, compared to the level of ATP synthesis (Johannsen et al. 2012). Even if TH mode of action in promoting mitochondrial uncoupling remains elusive, TH may favor Ca²⁺ release by IP₃ receptors on the endoplasmic reticulum membrane (Yehuda-Shnaidman, Kalderon, et Bar-Tana 2014; Teixeira, dos Santos, et Pazos-Moura 2020).

Finally, H⁺ leak increases the temperature which could itself enhance H⁺ leak process and decreases OXPHOS efficiency. Indeed, in liver mitochondria of *Bufo bufo*, the increase of temperature promotes H⁺ leak (Monternier et al. 2014; Roussel et Voituron 2020).

(B). Heat production through modulation of H⁺ pump stoichiometry

a) Electron and H⁺ slip

In theory, a decrease of the proton pumps efficiency would also result in a reduced P/O ratio (Figure 3). “Electron slip” refers to electron transfer without H⁺ pumping (decrease of the H⁺/e⁻ stoichiometry) through the cytochrome c oxidase (CIV) (Papa et al. 1991; Babcock et Wikström 1992; Ferguson-Miller 1996; Kadenbach 2003; Wikström et Springett 2020). Electron slip may represent a protection against ROS production at high $\Delta\psi_m$, but currently, little information is available on the use of this mechanism in a physiological context. However, evidences indicate that its contribution in the regulation of mitochondrial efficiency and heat production is negligible (M. D. Brand, Chien, et Dirolez 1994; M. P. Murphy 1989; Porter et Brand 1995; Kadenbach 2003).

“H⁺ slip”, or F₀F₁-ATP synthase uncoupling, refers to reduced coupling between the F₁ catalytic activities and the H⁺ translocation by F₀. The H⁺/ATP stoichiometry can be predicted from the ratio of catalytic β subunits number and that of H⁺ binding c subunits, c/β (Steigmiller, Turina, et Gräber 2008). However, the actual H⁺/ATP stoichiometry can vary, leading to energy dissipation by F₀F₁-ATP synthase as heat (Giovanna Lippe et al. 2019). The dissipative pathways and their modulation are still not well understood. 17 β -estradiol, at micromolar concentrations, can also induces an “intrinsically slipping state” of F₀-ATP synthase, resulting in a decreased ATP/O ratio (Moreno et al. 2013). Oxidative posttranslational modifications occur at a selective cysteine in ATP synthase subunits, which may act as a redox sensor modulating ATP synthase function (S.-B. Wang et al. 2011). Oxidation of thiol residues located in F₀ (Zanotti et al. 1992; Yagi et Hatefi 1987) and the formation of a disulphide bond between subunits b of two adjacent F-ATP synthase monomers (G Lippe, Dabbeni Sala, et Sorgato 1988) induce uncoupling of ATP synthase.

Thus, if slipping does not seem to be directly involved in the regulation of thermogenesis, these mechanisms could induce some heat production under cellular stress conditions.

b) Electron leak

A decreased coupling efficiency can also occur through electron leaks, when electrons “escape” the ETC pathway prior to the oxygen reduction by the cytochrome c oxidase, to generate superoxide (O₂⁻) (Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018; Jastroch et al. 2010). Within ETC, the sites of superoxide production are mainly associated to complex I (CI) and secondly to

complex III (CIII). Mitochondrial enzymatic complexes such as the dihydrolipoamide dehydrogenase, the flavoenzymes α -glycerophosphate dehydrogenase, or the electron-transferring flavoprotein:Q oxidoreductase (ETFQOR) of fatty acid β -oxidation were also reported to produce ROS. (St-Pierre et al. 2002; Tretter et Adam-Vizi 2007). Briefly, electron leaks in CI can occur at high NADH/NAD⁺ ratio eliciting an increased level of reduced FMN cofactor and O₂^{-•} production, or during reverse electron transport (Jastroch et al. 2010). Electron leaks in CIII can occur when Q_i site inhibitors prevent electron removal from the complex during the Q-cycle, leading to QH[•] formation in Q₀ site and O₂^{-•} production (Jastroch et al. 2010).

The *in vitro* superoxide production was estimated at 0.12-2% of O₂ consumption in isolated mitochondria (Kudin et al. 2004). However, experimental conditions may lead to overestimated values, leading to lower *in vivo* superoxide production (Michael P. Murphy 2009). Therefore, it is unlikely that this process significantly contributes to substantial heat production. Nevertheless, electron and H⁺ leaks are intricately related, as ROS production is highly sensitive to H⁺ leak-related Δp decrease (Michael P. Murphy 2009), while superoxide production can indirectly impact mitochondrial heat production by regulating H⁺ leak (cf. proton leak regulation) (Figure 3). Moreover, mitochondrial superoxide production is increased by heat stress (Belhadj Slimen et al. 2014).

c) Substrate utilization

In addition to the H⁺ leak amplitude, the OXPHOS efficiency also differs according to the catabolic routes feeding the ETC. Besides complex I which catalyzed NADH oxidation, several ETC oxidoreductases are unable to pump protons, particularly the complex II, the glycerol phosphate dehydrogenase and the ETFQOR linked to fatty acid oxidation (Adeva-Andany et al. 2019). Depending on whether the ETC is fed on NADH or a FAD prosthetic group, the H⁺/O₂ stoichiometry will differ :10H⁺/2e⁻ or 6H⁺/2e⁻, respectively (M. D. Brand 2005), ultimately modifying the ATP/O stoichiometry and thus, mitochondrial heat production. One main example could be the two NADH shuttles.

Indeed, 2 NADH per glucose molecule are formed in the cytosol during glycolysis which cannot cross the IMM, but have to be transported by two major shuttles into the mitochondrial matrix: (i) the malate-aspartate shuttle, which exchanges cytosolic NADH for mitochondrial NADH to supply the CI (Borst 2020), and (ii) the glycerol-3-phosphate (G3P) shuttle, which catalyzes an apparent exchange of cytosolic NADH for mitochondrial FADH through the cross talk between the NADH-dependent cytosolic G3P dehydrogenase (G3PDH) and the FADH-dependent mitochondrial G3PDH (mG3PDH). mG3PDH, located on the outer surface of the inner mitochondrial membrane directly transfers electrons to CIII via the ubiquinone pool (Mráček, Drahot, et Houšťek 2013). This last shuttle is less efficient, since only 2 ATPs are generated per oxygen reduced, the remaining energy being dissipated as heat (Dawson et Cooney 1978). Thus, the use of the G3P shuttle may promote heat production (Figure 3). The relative activity of these two shuttles is tissue dependent, G3P shuttle being highly active in muscle, BAT and brain (Mráček, Drahot, et Houšťek 2013). In this respect, using calorimetry and high resolution respirometry, Masson et al. 2017 demonstrated that mGPDH substrate oxidation increases heat production compared to NADH substrate oxidation in permeabilized flight muscles of bumblebees. The authors hypothesized that these insects use the mitochondrial G3P pathway to facilitate heat production in flight muscles (Masson et al. 2017). Transgenic mice lacking the mG3PDH showed a slight reduction in obligatory thermogenesis, compensated by increased BAT facultative thermogenesis (DosSantos et al. 2003).

III. Increasing mitochondrial heat production by increasing respiration rates

As mentioned earlier, the OXPHOS efficiency, which mainly depends on the H⁺ leak, is a major element in the regulation of mitochondrial heat production. However, energy can also be dissipated through mechanisms that do not involve mitochondrial uncoupling but stimulate cellular ATP hydrolysis. Increasing H⁺ flux through the ATP synthase to sustain ATP synthesis thereby stimulates both the substrate oxidation rate and inherent energy loss as heat (Figure 4).

a) Futile cycling

Mechanisms that increase ATP turnover include ATP-consuming futile cycles, such as the creatine/phosphocreatine (Cr/PCr) cycle and the calcium import/export cycle, which can be regulated by adjusting these cycle rates to cellular ATP requirements. Their dependence on ATP production underlines that mitochondrial oxidations coupled to ATP synthesis, not just uncoupling, may play a role in heat production (Figure 4).

Futile Cr/PCr cycle

Creatine Kinase (CK) catalyzes the reversible reaction: $\text{PCr}^{2-} + \text{MgADP}^{-} + \text{H}^{+} \leftrightarrow \text{MgATP}^{2-} + \text{Cr}$ and can either utilize PCr to regenerate ATP or synthesize PCr to generate ADP. The CK/PCr system displays tissue- and cell-specific CK isoforms with defined subcellular locations, connecting sites of ATP utilization (ATPases) with sites of ATP production, i.e. mitochondria, through PCr/Cr shuttling (Figure 4). The mitochondrial mtCK is located in the intermembrane space and is tightly coupled to ATP-synthesis and respiratory chain activity via the ANT, consuming ATP and releasing PCr and ADP. Thus mtCK maintains a high local ADP/ATP ratio and high phosphorylating rates in mitochondria (For review, see **Wallimann, Tokarska-Schlattner, et Schlattner 2011**). This process is crucial in cells with high energy and/or fluctuating requirements such as striated muscles, brain and neuronal cells (**T Wallimann et al. 1992; Theo Wallimann et al. 2007**). However, this energy transfer mechanism has recently been involved in the stimulation of heat production through substrate oxidation and futile cycle of creatine dephosphorylation in thermogenic fat cells (**Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018**). This futile cycle, associated with low creatine and ADP concentrations, drives ATP hydrolysis, resulting in the stimulation of mitochondrial respiration (**Kazak et al. 2015; Bertholet et al. 2017; Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018**). In addition, low creatine level itself is linked to thermogenesis deregulation (**Yamashita et al. 1995; Wakatsuki et al. 1996**). This process initially described in mitochondria isolated from beige fat of cold-exposed animals, and later in all adipose tissues, is considered as a key effector of non-shivering thermogenesis (**Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018**). In this respect, the deletion of the glycine aminotransferase prevents creatine biosynthesis, (Adipo-Gatm KO mice) and results in cold intolerance, independently of UCP1 protein abundance (**Kazak et al. 2017**). This creatine phosphorylation-dependent heat production process seems to be regulated by the tissue nonspecific alkaline phosphatase (TNAP) which hydrolyses phosphocreatine to initiate a futile cycle of creatine dephosphorylation and phosphorylation in mitochondria (**Sun et al. 2021**). Today, even if several *in vivo* studies demonstrated the implication of the creatine futile cycle in thermogenesis, further studies are required to understand its molecular process and regulations.

Futile calcium cycling

Ca^{2+} plays a central role in cell signaling and is involved in the regulation of multiple cellular functions related to the metabolism (**Glancy et Balaban 2012; Rizzuto et al. 2012**). Ca^{2+} homeostasis is driven by the ER and mitochondria. The latter one is a “sink” accumulating large amounts of Ca^{2+} in its matrix, by direct ER-mitochondria Ca^{2+} transfer (**Filadi et al. 2018**) through the Mitochondrial Calcium Uniporter (MCU) (**Rossi, Pizzo, et Filadi 2019**). An increase in the matrix Ca^{2+} concentration results in activation of three rate-limiting enzymes dehydrogenases in feeding electrons at complex I (CI): pyruvate (PDH), α -ketoglutarate (α KGDH), and isocitrate (ICDH) dehydrogenases (**McCormack, Halestrap, et Denton 1990**). PDH activation occurs through the dephosphorylation of the catalytic subunit by a Ca^{2+} -dependent phosphatase (**R M Denton, Randle, et Martin 1972**), which leads to an increase of pyruvate oxidation generating NADH for CI and acetyl-CoA for the TCA cycle. α KGDH and ICDH dehydrogenases are directly activated by Ca^{2+} binding, thereby enhancing TCA cycle flux (**Rutter et Denton 1988; Richard M. Denton 2009**). Finally, the two redox shuttles are activated by Ca^{2+} , the G3P (see section II.B.c) (**Hansford et Zorov 1998**) and by two mitochondrial metabolite transporters, aralar1 and citrin, which are isoforms of the malate-aspartate shuttle (**Contreras et al. 2007**). Thereby, Ca^{2+} also stimulates the mitochondrial NADH re-oxidation generated by glycolysis. Whether the activity of complex V (ATP synthase) rises directly in response to elevated mCa^{2+} is a matter of debate (**Wescott et al. 2019**). Thus, Ca^{2+}

plays an integrative role, increasing reduced equivalent (NADH and FADH₂) availability and enhancing the electron flow through the ETC, which supports mitochondrial energy metabolism in parallel to the activation of ATP consuming processes in the cytosol (**Jouaville et al. 1999; Balaban 2009**) with downstream consequences on heat production. Ca²⁺ mainly couples activation of oxidative metabolism with increased ATP use for cellular works, such as muscle contraction. Alternatively, another important process of non-shivering thermogenesis (NST) was recently discovered in skeletal muscle and implies futile ATP hydrolysis (**Blondin et Haman 2018**). This mechanism is based on futile Ca²⁺ cycling and ATP hydrolysis in the sarcoplasmic-reticulum (SR) or endoplasmic-reticulum (ER), and involves the transmembrane Ca²⁺-ATPase (SERCA) and the sarcolipin (Sl_n), a small peptide controlling SERCA-mediated ATP turnover in muscle (**Gamu et al. 2014**). In physiological conditions, SERCA couples ATP-hydrolysis to Ca²⁺ sequestration in the SR/ER (**L. de Meis 2002**). However, the direct binding of Sl_n to SERCA decreases the coupling efficiency between ATP hydrolysis and Ca²⁺ pumping back, thereby promoting both ATP hydrolysis and Ca²⁺ accumulation in the cytosol (**Smith et al. 2002; Chouchani, Kazak, et Spiegelman 2018**). This leads to heat production by the SERCA ATPase activity and the activation of the Ca²⁺-dependent pathways regulating muscle metabolism and mitochondrial activity (see below) (**Sahoo et al. 2013**). In this respect, overexpression of Sl_n in mice fed with high fat diet increases the metabolic rate: their muscle show enhanced oxidative capacity along with a rise of mitochondrial biogenesis and fatty acid transport protein expression (**Pant, Bal, et Periasamy 2016**). Clarke et al. (2012), further hypothesized that changes in calcium cycling and mitochondrial function may be involved in post-prandial heat production (**Clarke et al. 2012**). ATP-consuming Ca²⁺ futile cycling was also shown to contribute to beige fat energy expenditure and systemic glucose homeostasis in response to cold exposure through activation of the ryanodine receptor 2 (RyR₂), promoting the extrusion of ER-calcium. In addition of the futile ATP consumption responsible for energy dissipation, lower efficiency of SERCA2b leads to higher Ca²⁺ import into mitochondria, enhanced tricarboxylic acid and pyruvate dehydrogenase activity, and finally ATP synthesis for ATP-dependent thermogenesis (**Ikeda et al. 2017**). Interestingly, in BAT, SERCA 1 was localized at the fusion sites between the ER and mitochondrial outer membranes, and where it induces SERCA/RyR mediated Ca²⁺ futile cycling. This Ca²⁺ increases stimulates the rate of respiration and heat production both in coupled and uncoupled mitochondria, which can be inhibited by rotenone, KCN, and CI and CIV inhibitors, demonstrating the key role of ETC activation by Ca²⁺ in this thermogenesis (**Leopoldo de Meis et al. 2010**).

Consequently, dysregulations of mitochondrial Ca²⁺ signaling are featuring pathologies, such as neuronal, cardiac and muscle disorders, as well as diseases related to excessive body temperature. In this respect pathologic variants affecting Ca²⁺ channels, are causing malignant hyperthermia (MHT) and exertional heat stroke (EHS) (**Rosenberg et al. 2015; Rossi, Pizzo, et Filadi 2019**) (Figure 4, and box 3).

****Box 3****

b) Metabolic sensor

When ATP is used to drive cellular mechanical or metabolic pathways, the consecutive decrease in the mitochondrial ATP/ADP ratio rises ATP synthesis rate by F₀F₁-ATP synthase, which elevates mitochondrial oxidative metabolism and inherent heat production. Thus, mitochondrial thermogenesis is likely to vary depending on chronic or acute ATP global needs. For example, in muscles exposed to challenging efforts requiring tremendous high energetic input, myocytes mitochondria will exhibit higher OXPHOS rates than in resting conditions (**McLaughlin et al. 2020**), and consequently will produce more heat (**Yamada 2017**).

The equilibrium between ATP production and consumption represents a major cellular challenge, in order to maintain a physiological energy balance, whatever the internal or external solicitations. ATP hydrolysis results in ADP and inorganic phosphate, ADP being recycled by the adenylate kinase to ATP + AMP, according to the reaction 2ADP ↔ ATP + AMP. Thus,

following ATP consumption, both ADP/ATP and AMP/ATP ratios increase and are sensed by the AMP-activated protein kinase (AMPK). Once activated, the AMPK activates enzymes involved in catabolism, glucose uptake and mitochondrial biogenesis (Hardie, Ross, et Hawley 2012). In this respect, AMPK activation stimulates metabolism favoring heat production, as suggested by its crucial involvement in BAT thermogenesis (Q. Wang et al. 2021).

In parallel, sirtuin 3 (SIRT3), which is a mitochondrial NAD⁺-dependent deacetylase, acts as a cellular energetic sensor of the NADH/NAD⁺ ratio (Nogueiras et al. 2012). During the OXPHOS process, FADH₂ and NADH are oxidized in FAD and NAD⁺, which can lead to SIRT3 activation. Once activated, SIRT3 regulates many mitochondrial protein activity involved in metabolism, through post translational modifications (Nogueiras et al. 2012). For example, SIRT3 deacetylates and activates TCA cycle enzymes, the glutamate dehydrogenase (GDH), SDHA subunit of the CII and NDUFA9 from the CI (Schlicker et al. 2008; Cimen et al. 2010; Ahn et al. 2008; Shi et al. 2005). Furthermore, it has been suggested that SIRT3 mediated deacetylation in mitochondria is essential for UCP1-dependant BAT thermogenesis though the regulation of many substrate uptake and oxidation upstream of UCP1 (Sebaa et al. 2019). However, the links between SIRT3 and heat production in other tissues are not yet clarified.

V. Questions raised by considering mitochondria as cell radiators

Recent data disclosed that mitochondria could form "hot spots", namely micro-domains where the temperature greatly exceeds the body temperature set point of 37°C. Thanks to a variety of fluorochromes such as inorganic dyes, synthetic polymers or genetically-encoded fluorescent proteins, different studies have reported a temperature gradient between mitochondria and the cytoplasm (reviewed by (Macherel et al. 2021). In HeLa cells, mitochondrial uncoupling with FCCP protonophore (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone), leads to an increase of 6-9°C of the mitochondrial temperature (Nakano et al. 2017), while oleic acid as an alternative nutrient source or ionomycin, a calcium ionophore, increase temperature by ~2°C (Di et al. 2021).

Moreover, in HEK293 and human fibroblast cell lines grown in standard conditions, mitochondrial temperature surprisingly reaches a maximal temperature of 50°C, without any exogenous stimulation to promote uncoupling (Chrétien et al. 2018). Although the precise measurement of mitochondrial temperature differs depending on the nature of the method and the experimental conditions used, the fact that mitochondria is the most important source of heat production, acting as a cellular radiator, raises many conceptual questions.

First, a high intra-mitochondrial temperature challenges the activity and stability of proteins and DNA, together with the IMM fluidity (Slimen et al. 2016). In this respect, the presence of mitochondrial Heat Shock Protein 70 (HSP70), the high GC composition of the mitochondrial genome and the abundance of cardiolipins in the IMM might represent evolutionary adaptive mechanisms, coping with high local temperatures (Nasr et al. 2019).

Second, a mitochondrial temperature of 45-50°C must generate an important intracellular temperature gradient, which is predicted to be physically unsustainable across cells, according to theoretical rates of heat transfer through aqueous media (Baffou et al. 2014; 2015). However, the previous theoretical models assumed that mitochondria are spherical organites producing heat at their surface, a concept which contrasts with the existence of the outer and inner mitochondrial membranes, the latter forming dynamic cristae appearing as radiator lamellae, whose structure evolves according to the energetic state (Lane 2018; Joubert et Puff 2021). In addition, the IMM is an impermeable lipid bilayer composed of densely packed proteins and a peculiar phospholipid composition, including cardiolipins (Claypool et Koehler 2012), which might define a heat retention compartment (Lane 2018). Since the emergence of the concept of hot mitochondria, several studies have strengthened this concept with new experimental approaches to assess their temperature. For example, using a nanohybrid heater-thermometer combining fluorescent nanodiamond and polydopamine, variations in thermal conductivity were disclosed within a single cell (Sotoma et al. 2021), allowing the characterization of transient temperature spikes. A further reconciliation between theory and

practice was suggested by the observation of picosecond temperature-difference spikes, compatible with the 50°C temperature of mitochondria. Indeed, when these picosecond spikes were averaged over time, a 10°C difference of temperature was observed between mitochondria and cytoplasm, consistent with the maintenance of a chronic steady-state temperature gradient, rather than acute picosecond heat spikes **(Fahimi et Matta 2021)**. Moreover, the concept of transient heat release was also observed experimentally, as a transient heat shock of $\approx 7.5^\circ\text{C}$ was observed during proton uncoupling using the chemical uncoupler BAM15 **(Rajagopal et al. 2019)**. Nevertheless, more convincing physical explanations remain to be identified to support the concept of “hot” mitochondria” **(Macherel et al. 2021)**.

Finally, the optimal range of temperature for the CIV and possibly the ATPase activities could be 50°C, suggesting that the optimal condition for the respiratory chain is close to the high local temperature, and parallels the thermogenic function of mitochondria **(Chrétien et al. 2018)**. However, this result is surprising and does not agree with previous observations. For example, incubating the CIV of beef heart at 43-45°C lead to a decrease the H^+/e^- stoichiometry close to 0 **(Sone et Nicholls 1984)**. The positive influence of high temperature on respiratory chain complexes and ATP synthase remains to be determined but if this result was confirmed, links between heat and energy productions might represent a virtuous cycle: ATP production promotes heat production, and heat production could in turn favor ATP production. Moreover, this concept also reflects our questioning about the origin of mitochondrial endosymbiosis. Indeed, phylogenetic elements suggest that mitochondria ancestors were thermophile α -prokaryotes **(Nasr et al. 2019)**. Otherwise, it was suggested that proto-mitochondria endosymbiont permitted an internal heat production into the archaeal ancestor host, who lived in high temperature environment, allowing it to colonize cooler biotopes **(Dunn 2017)**. Thus, the understanding of mechanisms of mitochondrial temperature regulations is a research field to explore and some answer track begin to emerge. Indeed, mitochondrial heat production was recently associated with $\Delta 9$ -fatty acid desaturase DESAT1 activity which introduces a double bond at the $\Delta 9$ position of the acyl moiety of acyl-CoA, leading to the enhancement of F1Fo-ATPase-dependent mitochondrial respiration and consistent heat production **(Murakami et al. 2022)**.

Concluding remarks and future perspectives

Recent advances highlighted the large thermal heterogeneity at subcellular scales, exemplified by a possible physiological temperature of 45-50°C into mitochondria, promoting mitochondria as the cell radiators. Understanding how these radiators regulate and is regulated by heat production is intimately related to the generation and dissipation of the H⁺ gradient through the IMM and its connection or not to the ATP synthesis and consumption. At the crossroads between physics and cell biology, emerging studies are now required to determine thermogenesis levels in the different cellular compartments, and heat flows throughout the cell. Ultimately, mechanisms regulating mitochondrial thermogenesis could result in identifying novel heat-related messengers regulating crucial cellular processes.

Highlights:

Beyond its role as the principal source of ATP production, mitochondria can be considered as cellular radiators, with a possible local temperature of 50°C. This physiological contribution to heat production is regulated by many mechanisms targeting mitochondrial activity levels, and can be further stimulated by uncoupling the respiratory chain and membrane potential from ATP synthesis, to respond to drastic cold stresses. In addition, exergonic reactions using large ATP amounts in cell functions, like muscle shivering or Ca²⁺ leak from the SR, can contribute to generate heat by inducing an over-stimulation of mitochondrial activity to replenish ATP pools. Cell variations in thermal flows might thus promote heterogeneous subcellular temperature gradients that might contribute to novel regulatory pathways controlling cell physiology.

Outstanding Questions box

- Although robust experiments led to the conclusion that mitochondria temperature reaches 50°C *in vitro* in HEK293 and human fibroblast cell lines, there is a crucial need to confirm this observation in alternative cell models, and *in vivo*.
- In this respect, generating novel thermosensitive probes highly sensitive to faint temperature changes located in the different cellular components are mandatory to better explore dynamic changes and distribution of cellular temperature, and heat flows.
- If the different mechanisms involved in cellular thermogenesis are now well identified, future important challenges will consist in identifying local thermostats or thermal sensors, and how they control the ON-OFF switch to modulate or not mitochondrial heat production.
- Are there any physiological pathways that are controlled by temperature gradients and heat flows within or in-between different cellular compartments?
- How enzymatic activities from mitochondrial matrix proteins can cope with a local temperature of 50°C remains an open avenue?
- One might question the existence of all mechanisms described in this review, in endotherm or ectotherm animal species, or in other eukaryote phyla, and in mammals that escaped endothermy, like the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*) from Ethiopia.
- In this respect, there is an important challenge to understand heat over-production in life-threatening pathological conditions as malignant hyperthermia, exertional heat strokes, as well as local heat production in processes like inflammation and tumorigenesis.

Glossary

- **Adenine nucleotide translocase (ANT):** mitochondrial ADP/ATP carrier that exchanges ATP with ADP across the inner mitochondrial membrane.
- **Adenosine triphosphate (ATP) / Adenosine diphosphate (ADP):** key molecules in the management of cellular energy. The hydrolysis of ATP to ADP provides energy to drive most chemical reactions involved in all cellular processes.
- **Brown adipose tissue (BAT):** adipose tissue subtype which main function is to ensure thermogenesis, through lipolysis of adipocytes, in mammals.
- **Calcium (Ca²⁺):** ions that participate in many signaling pathways, as a second messenger regulating biological functions such as muscle contraction, nerve conduction and metabolism.
- **Exertional Heat Stroke (EHS):** severe pathological life threatening reaction characterized by a drastic increase in body temperature during a physical exertion, high external temperatures or both.
- **Endoplasmic reticulum (ER)/Sarcoplasmic reticulum (SR):** organelles involved in protein synthesis and folding, and lipid synthesis, which also constitute the main intracellular Ca²⁺ store, essential for muscular cell contraction.
- **Electron-transferring flavoprotein (ETF):** flavoprotein that function as an electron acceptor for dehydrogenases.
- **Heat shock protein (HSP):** family of proteins involved in cellular stress response such as un-physiological heat, cold, UV light or tissue damages.
- **Inositol triphosphate receptor 3 (IP₃R):** membrane glycoprotein complex localized in ER/SR that acts as a Ca²⁺ channel activated by inositol trisphosphate (IP₃).
- **Malignant Hyperthermia (MHT):** severe reaction in response to volatile anesthetic agents whose symptoms result in pathological muscle rigidity, fever and heart rate.
- **Mitochondrial calcium uniporter (MCU):** mitochondrial transmembrane protein described as the main actor in mitochondrial calcium uptake.
- **Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH/NAD⁺):** reduced and oxidized form of a coenzyme involved in redox reactions that carry electrons from one reaction to another.
- **Non-shivering thermogenesis (NST):** Process related to an increase in metabolic heat production that is not associated with muscle activity.
- **Oxidative phosphorylation (OXPHOS):** an aerobic metabolic pathway where NADH and FADH₂ are oxidized by a series of protein complexes within the mitochondria to produce ATP.
- **Proton gradient (Δp):** gradient associated to the higher H⁺ concentration in the intra-membrane space than in the matrix, which results from the respiratory chain activity and serving as the driving force for ATP synthesis by the mitochondrial ATP synthase.
- **Reactive oxygen species (ROS):** reactive chemicals formed from O₂, such as O₂^{-•}, that play a role in cell signaling and homeostasis, in addition to causing cellular damages by altering DNA, proteins or lipids, when over-produced.
- **Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA):** a Ca²⁺ ATPase that transports Ca²⁺ from the cytosol into the ER/SR lumen by hydrolyzing ATP.
- **Sarcoplipin (Sln):** small peptide regulating SERCA activity.
- **Sirtuin 3 (SIRT3):** a NAD-dependent deacetylase localized in mitochondria regulating many metabolic functions.
- **Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle):** a series of chemical reactions occurring in the mitochondrial matrix where the oxidation of Acetyl-CoA, derived from carbohydrates, lipids, and proteins, provides reduced cofactors to feed the OXPHOS.

- **Uncoupling proteins (UCPs):** mitochondrial inner membrane proteins acting as transporters to dissipate H⁺ gradient and generate heat, leading to mitochondrial stimulation.

Box 1: ATP production during OXPHOS

The electron transfer chain (ETC) includes multi-subunits complexes embedded within the inner mitochondrial membrane (IMM), which are functionally and physically linked together: the complex I (CI, NADH Ubiquinone Reductase), complex II (CII, succinate ubiquinone reductase), complex III (CIII, ubiquinol cytochrome c reductase) and complex IV (CIV, cytochrome c reductase). The ETC transfer the electron energetic potential from NADH/NAD⁺ (CI) and FADH₂/FAD⁺ (CII) to the electrochemical proton gradient known as the proton motive force (Δp). This process involves a series of oxidoreductase reactions in which electron flows sequentially "downhill" along the ETC from a reduced to an oxidized state, ending to molecular oxygen reduction into a water molecule. Free energy release during electron transfer drives the proton pumping across the IMM at complexes CI, CIII, and CIV, resulting in the proton gradient, Δp . The Δp consists in the charge ($\Delta\psi_m$) and chemical (ΔpH) components, and drives the endergonic ATP synthesis when the H⁺ flow back to the matrix and many transports through the inner mitochondrial membrane **(Hatefi 1985)**. The ATP synthesis module includes, in addition to the ATP synthase, the adenylate carrier (ANT) to exchange the ADP/ATP and the inorganic phosphate carrier (PiC). When Δp energy potential is used by the ATP synthase, the coupling between substrate oxidation and ATP synthesis is maximized. However, if H⁺ leak back across the IMM through alternative H⁺ conductance pathways, coupling efficiency is decreased, resulting in heat production at the expense of ATP synthesis.

Box 2: Theoretical estimates of mitochondrial heat production

Theoretically, the oxidation of one mole of glucose, which contains 2871 kJ of energy, produces 38 moles of ATP (2 by glycolysis, 2 by the TCA cycle and 34 by OXPHOS), which represents 1368kJ ($\approx 48\%$) (ΔG° ATP=36kJ/mol at 37°C, pH=7.5 and I 0.2 (Phillips, George, et Rutman 1969), plus ≈ 1503 kJ ($\approx 52\%$) dissipated as heat (Figure 1) (Cleri 2016). Alternatively, fatty acid breakdown by β -oxidation also provides NADH and FADH₂ to the mitochondrial respiratory chain (P. Nguyen et al. 2008). On the same principle, the oxidation of one mole of palmitate, which contains 9800kJ of energy, produces theoretically 129 moles of ATP, which represents 4644kJ ($\approx 47\%$), plus 5156kJ ($\approx 53\%$) dissipated as heat. These values are obtained by considering an historical mechanistic P/O ratio, which represent the amount of moles of ADP phosphorylated to ATP per two electrons transferred to oxygen, of 3 per NADH and 2 per FADH₂ (Nath 2016, 20).

However, it is now widely accepted that the mechanistic efficiencies are lower. Considering the mechanism of F-ATPase and its H⁺/ATP ratio of 2.7 in mammals, the calculated P/O ratio is 2.7 for NADH and 1.6 for FADH₂ (Watt et al. 2010), which approaches the experimental observed values of 2.5 and 1.5 (Hinkle 2005). According to these new P/O values, glucose oxidation result in the generation of only 30 - 32 ($\approx 40\%$), rather than 38, moles of ATP (Figure 1A) (for a highly readable review, see (Salway 2004). The comparable value for palmitate oxidation has been lowered from 129 to 106 ATP.

Moreover, estimates of coupling efficiency in cells and intact tissues indicate an overall effective efficiency in rats of 75%–80% (M D Brand, Harper, et Taylor 1993; D. F. S. Rolfe et al. 1999) because of uncoupling mechanisms (detailed in section II.) meaning that effective P/O ratio should be lowered to 1.8 *in vivo*. Thus, ATP/heat production balance is even lower than the predicted 40%/60% in physiological conditions (Figure 1B).

Box 3: Diseases associated to altered control of body temperature involve Ca²⁺ channels.

Malignant hyperthermia (MHT) and exertional heat strokes (EHS) are two human acute diseases related to a hyperpyrexia that are also encountered in other mammalian species, like dog and swine. Both diseases induce body over-heating and severe or even fatal outcomes, almost always associated to rhabdomyolysis and brain damages, and elevated creatine kinase activity in serum. MHT mendelian transmission was evidenced for long, and is today associated to 4 loci (Malignant Hyperthermia Susceptibility; MHS 2, 3, 4 and 6), in addition to variants in 3 genes: *RYR1* (MHS1), *CACNA1S* (MHS5) and *TRPV1* (**Rosenberg et al. 2015; Abeele et al. 2018**). Surprisingly, genetic analysis of EHS predisposition also revealed susceptibility variants in *RYR1* and *TRPV1* genes (**Bosson et al. 2020; Laitano, Murray, et Leon 2020**), but different from the ones identified in MHT, suggesting an alternative pathological mechanism. Interestingly, the function of RYR1, CACNA1S and TRPV1 proteins are all intimately related to their channel structure involved in calcium trafficking (**Kushnir, Wajsberg, et Marks 2018; Beam, Loudermilk, et Kisor 2017; Abeele et al. 2018**), suggesting that disruption of Ca²⁺ intracellular fluxes and homeostasis are causative of uncontrolled thermogenesis.

Figures

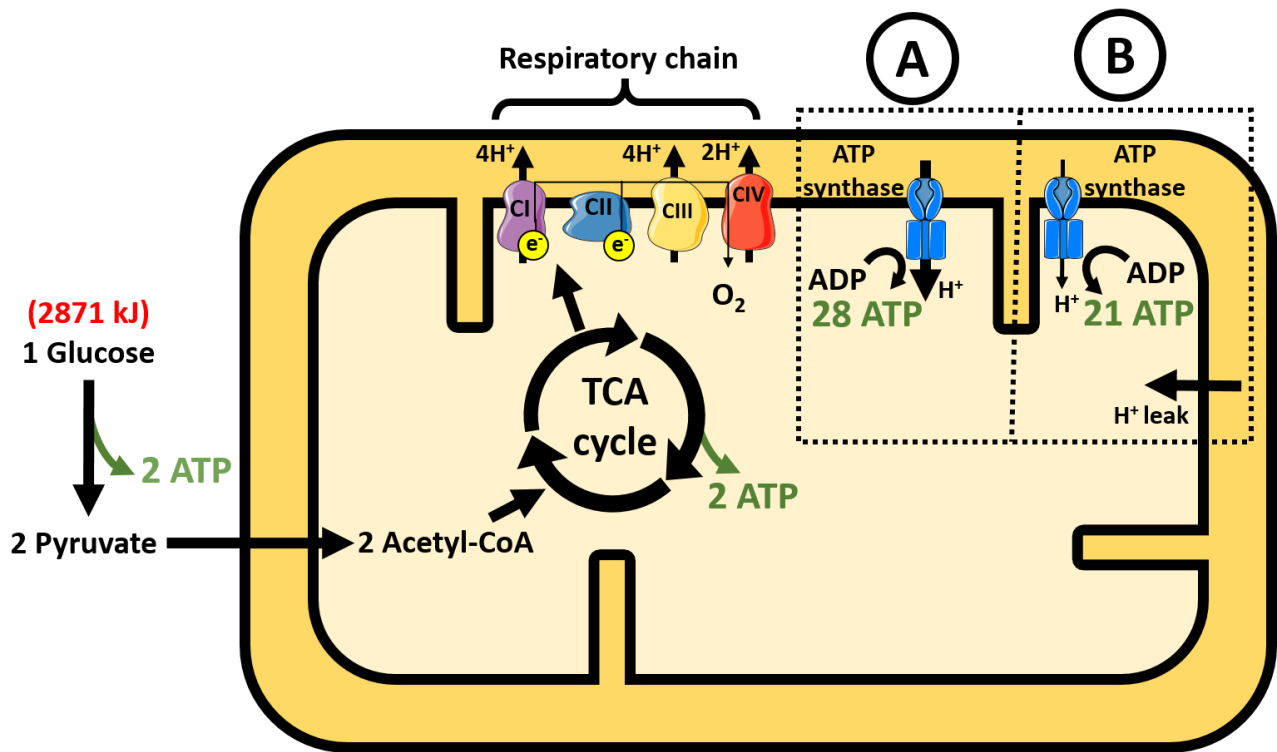


Figure 1: Theoretical energetic balance of ATP and heat productions in standard biochemical condition.

Under biological operating conditions (pH=7.5, I 0.2, T°=37°C), and considering a P/O ratio of 2.5 per NADH and 1.5 per FADH₂, the degradation of one molecule of glucose (2871kJ) successively through the glycolysis in the cytoplasm, the tri-carboxylic acid cycle and the oxidative phosphorylation in mitochondria produces:

- (A) 32 ATP (1152kJ ≈40%), including 28 OXPHOS-generated ATP and 1719kJ (≈60%) of heat.
- (B) 25 ATP (900 kJ≈30%), including 21 OXPHOS-generated ATP and 1971kJ (≈70%) of heat are produced from glucose oxidation when the mechanistic P/O ratios of NADH and FADH₂ are corrected for uncoupling mechanisms, considering a physiological efficiency of 75%–80%.

These values illustrate the major role of mitochondria in heat production linked to the energetic metabolism.

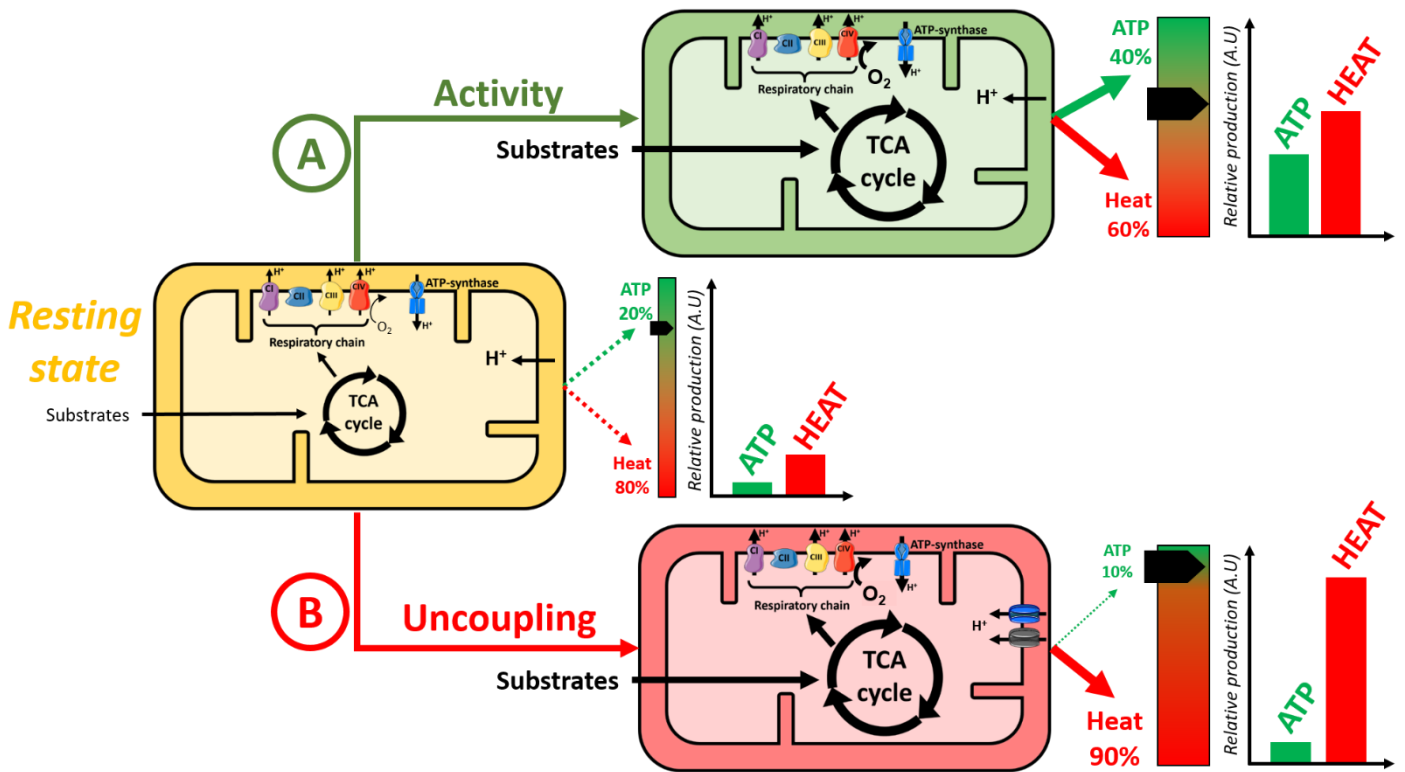


Figure 2: Mitochondrial energetic and thermogenesis balance

In mitochondria, substrate oxidation energy is converted into ATP and heat. The maximal global efficiency of OXPHOS is ~40%/60% for ATP/Heat. However, in resting rat muscle, H⁺ leak (detailed in section II.) could represent ≈50% of O₂ consumption. In this case, the ATP/O is reduced by an half and the ATP/Heat balance increases up to 20%/80%. According to cellular needs, ATP/heat balance in mitochondria can turn to either situations:

- a maximum phosphorylating activity, when the H⁺ leak represents an insignificant proportion of O₂ consumption. The ATP/Heat balance is close to the theoretical maximal global efficiency of 40%/60%. However, the increased oxidation rate results in an ATP rise and a consecutive heat production.
- an uncoupling activity with an increase of the oxidation rate. Thanks to uncoupling mechanisms, the ATP/Heat balance is modulated in favor of heat production.

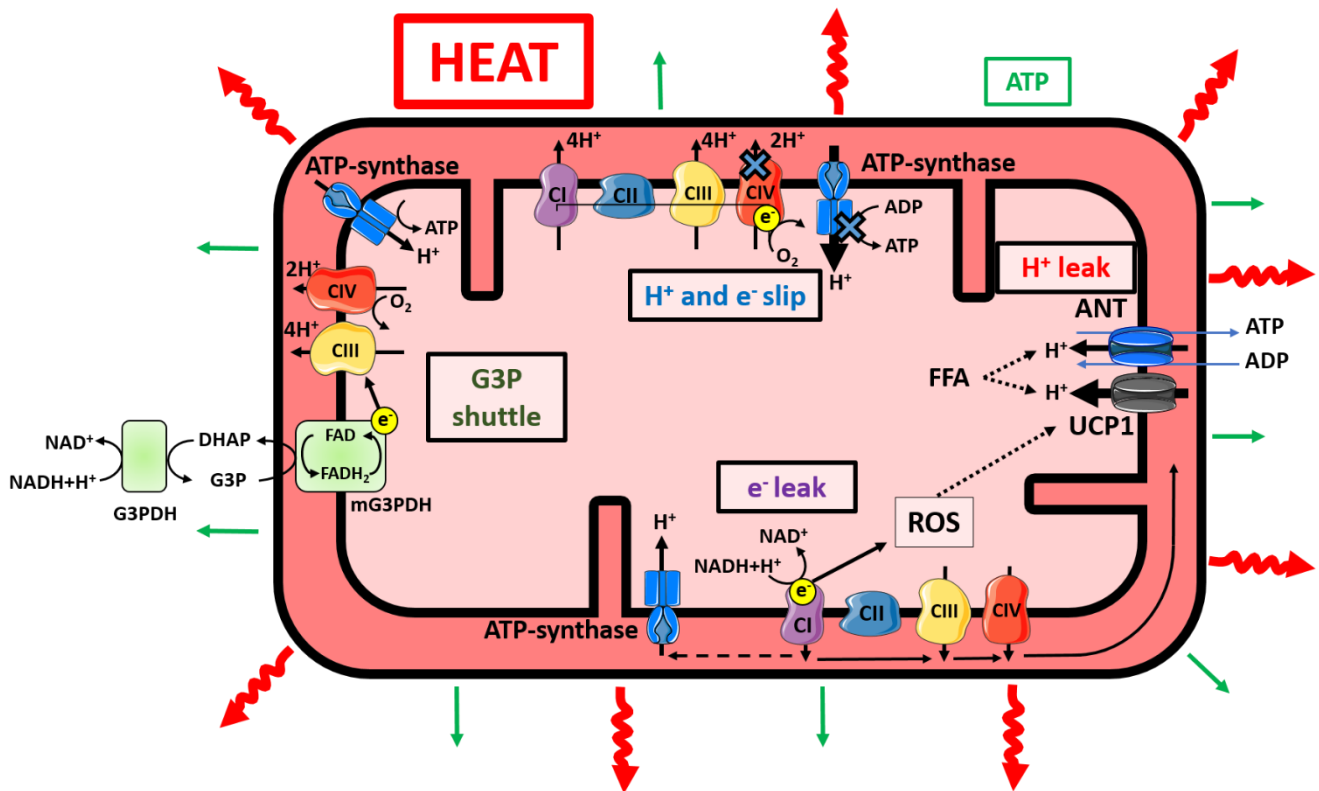


Figure 3: OXPHOS uncoupling mechanisms promote mitochondrial heat production

Mitochondrial uncoupling promotes heat production by reducing the ATP production efficiency. Uncoupling Protein 1 (UCP1) activation induces H⁺ leak, which dissipates the Δp thereby uncoupling substrate oxidation from ATP synthesis while increasing thermogenesis. The Adenine nucleotide translocator (ANT), in addition to its main function as ATP/ADP carrier, can also act as H⁺ transporter. ANT-mediated H⁺ leak requires protonatable Free Fatty Acids (FFA), which would act as cofactors. FFA-dependent H⁺ leak competes with nucleotide exchange activity in the ANT translocation pathway, switching from H⁺ leak, promoting heat production, to ATP/ADP translocation, promoting ATP production. e⁻ slip at CIV and H⁺ slip at ATP synthase could lower the P/O ratio. ROS production through e⁻ leak deflects electron transfer occurring from NADH (CI) or FADH₂ (CIII) oxidations. The glycerol-3-phosphate (G3P) shuttle catalyzes an apparent exchange of cytosolic NADH for mitochondrial FADH₂, directly transferring electrons to CIII via the ubiquinone. This reduces the H⁺/O₂ stoichiometry from 10H⁺/2e⁻ for NADH to 6H⁺/2e⁻ (M. D. Brand 2005), ultimately reducing the ATP/O stoichiometry and the efficiency of ATP production.

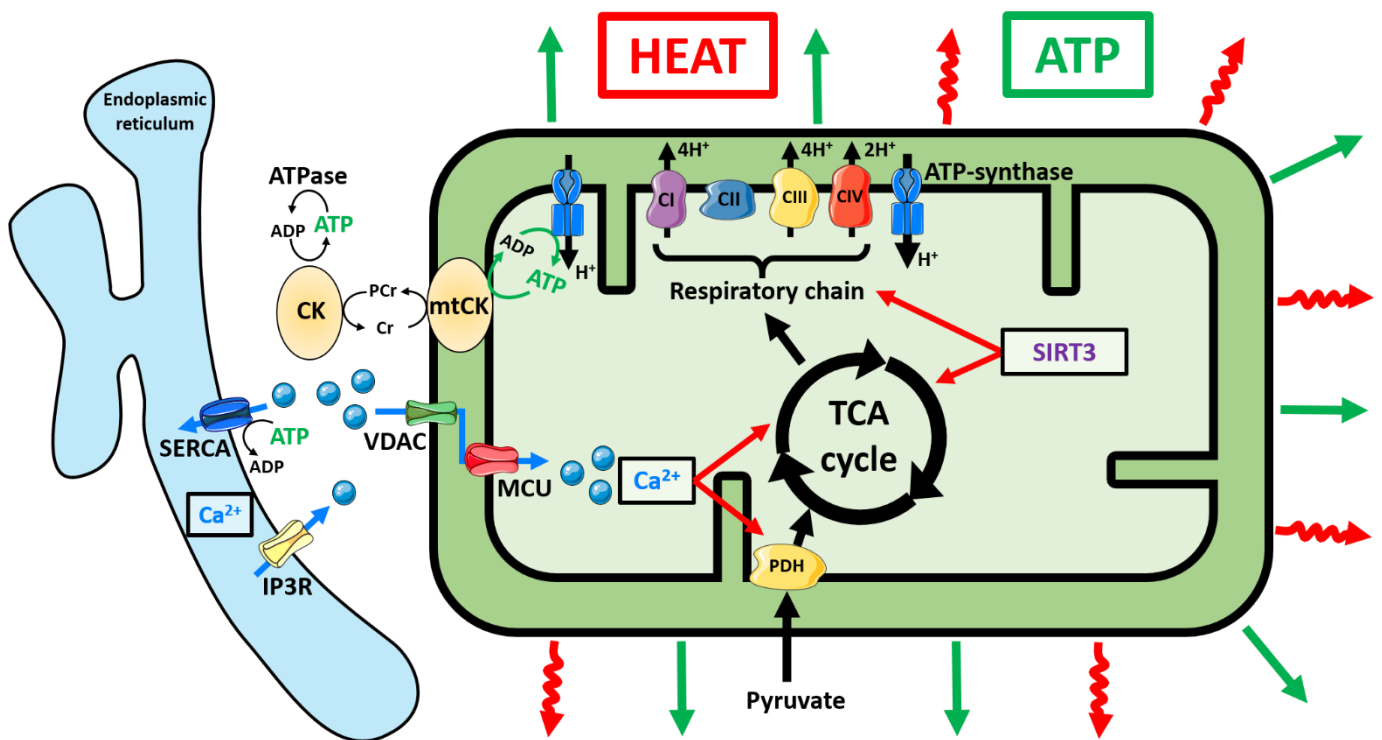


Figure 4: Mitochondrial respiration rate regulators impacting mitochondrial heat production

ATP-dependent futile cycles promote high ATP turnover, thereby increasing OXPHOS rate and inherent energy-loss as heat. Creatine Kinases (CK) connect the ATP-consumption to ATP-production sites through PhosphoCreatine (PCr)/Creatine (Cr) shuttle. Within mitochondria, mtCK in the intermembrane space is coupled to ADP phosphorylation through ANT, maintaining high ADP/ATP ratio within the mitochondrial matrix. Futile cycle of creatine dephosphorylation drives ATP hydrolysis, consequently increasing OXPHOS rate. Ca^{2+} cycling by SERCA in reticulum endoplasmic increases both ATP hydrolysis and Ca^{2+} accumulation in the cytosol. ATP hydrolysis promotes mitochondrial ATP re-synthesis while high substrate oxidation flux is sustained thanks to Ca^{2+} accumulation in mitochondria through mitochondrial calcium uniporter (MCU). Metabolic energy sensors such as (SIRT3) can also stimulate substrate supply and respiratory chain activity, by modulating the activity of TCA cycle enzymes and respiratory chain complexes.

Acknowledgement

We are indebted to the Direction Générale de l'Armement and to Région Pays de la Loire for providing the PhD grant to FB.

Bibliography

- Abeele, Fabien Vanden, Sabine Lotteau, Sylvie Ducreux, Charlotte Dubois, Nicole Monnier, Amy Hanna, Dimitra Gkika, et al. 2018. « TRPV1 Variants Impair Intracellular Ca²⁺ Signaling and May Confer Susceptibility to Malignant Hyperthermia ». *Genetics in Medicine*, juin. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0066-9>.
- Adeva-Andany, María M., Natalia Carneiro-Freire, Mónica Seco-Filgueira, Carlos Fernández-Fernández, et David Mouriño-Bayolo. 2019. « Mitochondrial β -Oxidation of Saturated Fatty Acids in Humans ». *Mitochondrion* 46 (mai): 73-90. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.009>.
- Ahn, Bong-Hyun, Hyun-Seok Kim, Shiwei Song, In Hye Lee, Jie Liu, Athanassios Vassilopoulos, Chu-Xia Deng, et Toren Finkel. 2008. « A Role for the Mitochondrial Deacetylase Sirt3 in Regulating Energy Homeostasis ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (38): 14447-52. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803790105>.
- Andreyev AYu, null, T. O. Bondareva, V. I. Dedukhova, E. N. Mokhova, V. P. Skulachev, L. M. Tsofina, N. I. Volkov, et T. V. Vygodina. 1989. « The ATP/ADP-Antiporter Is Involved in the Uncoupling Effect of Fatty Acids on Mitochondria ». *European Journal of Biochemistry* 182 (3): 585-92. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14867.x>.
- Babcock, G. T., et M. Wikström. 1992. « Oxygen Activation and the Conservation of Energy in Cell Respiration ». *Nature* 356 (6367): 301-9. <https://doi.org/10.1038/356301a0>.
- Baffou, Guillaume, Hervé Rigneault, Didier Marguet, et Ludovic Jullien. 2014. « A critique of methods for temperature imaging in single cells ». *Nature methods* 11 (9): 899.
- . 2015. « Reply to: "Validating subcellular thermal changes revealed by fluorescent thermosensors" and "The 10 5 gap issue between calculation and measurement in single-cell thermometry" ». *Nature methods* 12 (9): 803.
- Balaban, Robert S. 2009. « The Role of Ca(2+) Signaling in the Coordination of Mitochondrial ATP Production with Cardiac Work ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787 (11): 1334-41. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.05.011>.
- Beam, Teresa A., Emily F. Loudermilk, et David F. Kisor. 2017. « Pharmacogenetics and Pathophysiology of CACNA1S Mutations in Malignant Hyperthermia ». *Physiological Genomics* 49 (2): 81-87. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00126.2016>.
- Belhadj Slimen, Imen, Taha Najar, Abdeljelil Ghram, Hajer Dabbebi, Moncef Ben Mrad, et Manef Abdrabbah. 2014. « Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review ». *International Journal of Hyperthermia* 30 (7): 513-23. <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>.
- Bertholet, Ambre M., Edward T. Chouchani, Lawrence Kazak, Alessia Angelin, Andriy Fedorenko, Jonathan Z. Long, Sara Vidoni, et al. 2019. « H⁺ Transport Is an Integral Function of the Mitochondrial ADP/ATP Carrier ». *Nature* 571 (7766): 515-20. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1400-3>.
- Bertholet, Ambre M., Lawrence Kazak, Edward T. Chouchani, Marta G. Bogaczyńska, Ishan Paranjpe, Gabrielle L. Wainwright, Alexandre Bétourné, Shingo Kajimura, Bruce M. Spiegelman, et Yuriy Kirichok. 2017. « Mitochondrial patch clamp of beige adipocytes reveals UCP1-positive and UCP1-negative cells both exhibiting futile creatine cycling ». *Cell metabolism* 25 (4): 811–822.
- Bertholet, Ambre M., et Yuriy Kirichok. 2021. « Mitochondrial H⁺ Leak and Thermogenesis ». *Annual Review of Physiology*, novembre. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021119-034405>.
- Blondin, Denis P., et François Haman. 2018. « Shivering and Nonshivering Thermogenesis in Skeletal Muscles ». *Handbook of Clinical Neurology* 156: 153-73. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63912-7.00010-2>.
- Bobyleva, Valentina, Monica Bellei, Teresa Loredana Paziienza, et Umberto Muscatello. 1997. « Effect of Cardiolipin on Functional Properties of Isolated Rat Liver Mitochondria ». *IUBMB Life* 41 (3): 469-80. <https://doi.org/10.1080/15216549700201491>.
- Borst, Piet. 2020. « The Malate-Aspartate Shuttle (Borst Cycle): How It Started and Developed into a Major Metabolic Pathway ». *IUBMB Life* 72 (11): 2241-59. <https://doi.org/10.1002/iub.2367>.
- Boss, Olivier, Sonia Samec, Ariane Paoloni-Giacobino, Colette Rossier, Abdul Dulloo, Josiane Seydoux, Patrick Muzzin, et Jean-Paul Giacobino. 1997. « Uncoupling Protein-3: A New Member of the Mitochondrial Carrier Family with Tissue-Specific Expression ». *FEBS Letters* 408 (1): 39-42. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00384-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00384-0).
- Bosson, Caroline, John Rendu, Laurent Pelletier, Amandine Abriat, Amandine Chatagnon, Julie Brocard, Jacques Brocard, et al. 2020. « Variations in the TRPV1 Gene Are Associated to Exertional Heat Stroke ». *Journal of Science and Medicine in Sport*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.04.018>.
- Brand, M. D. 2005. « The Efficiency and Plasticity of Mitochondrial Energy Transduction ». *Biochemical Society Transactions* 33 (Pt 5): 897-904. <https://doi.org/10.1042/BST0330897>.
- Brand, M. D., L. F. Chien, E. K. Ainscow, D. F. Rolfe, et R. K. Porter. 1994. « The Causes and Functions of Mitochondrial Proton Leak ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1187 (2): 132-39. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(94\)90099-x](https://doi.org/10.1016/0005-2728(94)90099-x).
- Brand, M. D., L. F. Chien, et P. Diolez. 1994. « Experimental Discrimination between Proton Leak and Redox Slip during Mitochondrial Electron Transport ». *The Biochemical Journal* 297 (Pt 1) (janvier): 27-29. <https://doi.org/10.1042/bj2970027>.
- Brand, M D, M E Harper, et H C Taylor. 1993. « Control of the effective P/O ratio of oxidative phosphorylation in liver mitochondria and hepatocytes ». *Biochemical Journal* 291 (3): 739-48. <https://doi.org/10.1042/bj2910739>.
- Brand, Martin D., Julian L. Pakay, Augustine Ocloo, Jason Kokoszka, Douglas C. Wallace, Paul S. Brookes, et Emma J. Cornwall. 2005. « The Basal Proton Conductance of Mitochondria Depends on Adenine Nucleotide Translocase Content ». *Biochemical Journal* 392 (2): 353-62. <https://doi.org/10.1042/BJ20050890>.

- Brand, Martin D, Nigel Turner, Augustine Ocloo, Paul L Else, et A J Hulbert. 2003. « Proton conductance and fatty acyl composition of liver mitochondria correlates with body mass in birds. » *Biochemical Journal* 376 (Pt 3): 741-48. <https://doi.org/10.1042/BJ20030984>.
- Brustovetsky, N., et M. Klingenberg. 1994. « The Reconstituted ADP/ATP Carrier Can Mediate H⁺ Transport by Free Fatty Acids, Which Is Further Stimulated by Mersalyl ». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (44): 27329-36.
- Buttgereit, F., M. D. Brand, et M. Müller. 1992. « ConA Induced Changes in Energy Metabolism of Rat Thymocytes ». *Bioscience Reports* 12 (5): 381-86. <https://doi.org/10.1007/BF01121501>.
- Cairns, Charles B., James Walther, Alden H. Harken, et Anirban Banerjee. 1998. « Mitochondrial oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 274 (5): R1376-83. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1998.274.5.R1376>.
- Chouchani, Edward T., Lawrence Kazak, Mark P. Jedrychowski, Gina Z. Lu, Brian K. Erickson, John Szpyt, Kerry A. Pierce, et al. 2016. « Mitochondrial ROS Regulate Thermogenic Energy Expenditure and Sulfenylation of UCP1 ». *Nature* 532 (7597): 112-16. <https://doi.org/10.1038/nature17399>.
- Chouchani, Edward T., Lawrence Kazak, et Bruce M. Spiegelman. 2017. « Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Adipose Tissue Thermogenesis: Bridging Physiology and Mechanisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 292 (41): 16810-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.R117.789628>.
- . 2018. « New Advances in Adaptive Thermogenesis: UCP1 and Beyond ». *Cell Metabolism*, novembre. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2018.11.002>.
- Chrétien, Dominique, Paule Benit, Hyung-Ho Ha, Susanne Keipert, Riyad El-Khoury, Young-Tae Chang, Martin Jastroch, Howard T. Jacobs, Pierre Rustin, et Malgorzata Rak. 2018. « Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 C ». *PLoS biology* 16 (1): e2003992.
- Cimen, Huseyin, Min-Joon Han, Yongjie Yang, Qiang Tong, Hasan Koc, et Emine C. Koc. 2010. « Regulation of Succinate Dehydrogenase Activity by SIRT3 in Mammalian Mitochondria ». *Biochemistry* 49 (2): 304-11. <https://doi.org/10.1021/bi901627u>.
- Clarke, Scott D., Kevin Lee, Zane B. Andrews, Robert Bischof, Fahri Fahri, Roger G. Evans, Iain J. Clarke, et Belinda A. Henry. 2012. « Postprandial heat production in skeletal muscle is associated with altered mitochondrial function and altered futile calcium cycling ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 303 (10): R1071-79. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00036.2012>.
- Claypool, Steven M., et Carla M. Koehler. 2012. « The Complexity of Cardiolipin in Health and Disease ». *Trends in Biochemical Sciences* 37 (1): 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2011.09.003>.
- Cleri, Fabrizio. 2016. *The Physics of Living Systems*. Springer.
- Cohen, Paul, et Shingo Kajimura. 2021. « The Cellular and Functional Complexity of Thermogenic Fat ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, mars. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00350-0>.
- Contreras, Laura, Paulino Gomez-Puertas, Mikio Iijima, Keiko Kobayashi, Takeyori Saheki, et Jorgina Satrustegui. 2007. « Ca²⁺ Activation Kinetics of the Two Aspartate-Glutamate Mitochondrial Carriers, Aralar and Citrin: Role in the Heart Malate-Aspartate NADH Shuttle ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (10): 7098-7106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610491200>.
- Dawson, Anthony G., et Gregory J. Cooney. 1978. « Reconstruction of the α -Glycerolphosphate Shuttle Using Rat Kidney Mitochondria ». *FEBS Letters* 91 (2): 169-72. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(78\)81164-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(78)81164-8).
- Denton, R M, P J Randle, et B R Martin. 1972. « Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. » *Biochemical Journal* 128 (1): 161-63.
- Denton, Richard M. 2009. « Regulation of Mitochondrial Dehydrogenases by Calcium Ions ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1787 (11): 1309-16. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.01.005>.
- Di, Xiangjun, Dejiang Wang, Jiajia Zhou, Lin Zhang, Martina H. Stenzel, Qian Peter Su, et Dayong Jin. 2021. « Quantitatively Monitoring In Situ Mitochondrial Thermal Dynamics by Upconversion Nanoparticles ». *Nano Letters* 21 (4): 1651-58. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c04281>.
- DosSantos, Rosangela A., Assim Alfadda, Kazuhiro Eto, Takashi Kadowaki, et J. Enrique Silva. 2003. « Evidence for a Compensated Thermogenic Defect in Transgenic Mice Lacking the Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase Gene ». *Endocrinology* 144 (12): 5469-79. <https://doi.org/10.1210/en.2003-0687>.
- Dunn, Cory D. 2017. « Some Liked It Hot: A Hypothesis Regarding Establishment of the Proto-Mitochondrial Endosymbiont During Eukaryogenesis ». *Journal of Molecular Evolution* 85 (3): 99-106. <https://doi.org/10.1007/s00239-017-9809-5>.
- Fahimi, Peyman, et Chérif F Matta. 2021. « The Hot Mitochondrion Paradox: Reconciling Theory and Experiment », 12.
- Ferguson-Miller, S. 1996. « Mammalian Cytochrome c Oxidase, a Molecular Monster Subdued ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5265): 1125. <https://doi.org/10.1126/science.272.5265.1125>.
- Filadi, Riccardo, et Elisa Greotti. 2021. « The Yin and Yang of Mitochondrial Ca²⁺ Signaling in Cell Physiology and Pathology ». *Cell Calcium* 93 (janvier): 102321. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2020.102321>.
- Filadi, Riccardo, Nuno Santos Leal, Bernadette Schreiner, Alice Rossi, Giacomo Dentoni, Catarina Moreira Pinho, Birgitta Wiehager, et al. 2018. « TOM70 Sustains Cell Bioenergetics by Promoting IP3R3-Mediated ER to Mitochondria Ca²⁺ Transfer ». *Current Biology* 28 (3): 369-382.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.12.047>.
- Fleury, Christophe, Maria Neverova, Sheila Collins, Serge Raimbault, Odette Champigny, Corinne Levi-Meyrueis, Frederic Bouillaud, et al. 1997. « Uncoupling Protein-2: A Novel Gene Linked to Obesity and Hyperinsulinemia ». *Nature Genetics* 15 (3): 269-72. <https://doi.org/10.1038/ng0397-269>.

- Fontaine, E. M., M. Moussa, A. Devin, J. Garcia, J. Ghisolfi, M. Rigoulet, et X. M. Leverve. 1996. « Effect of Polyunsaturated Fatty Acids Deficiency on Oxidative Phosphorylation in Rat Liver Mitochondria ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1276 (3): 181-87. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(96\)00075-8](https://doi.org/10.1016/0005-2728(96)00075-8).
- Gamu, Daniel, Eric Bombardier, Ian C. Smith, Val A. Fajardo, et A. Russell Tupling. 2014. « Sarcolipin Provides a Novel Muscle-Based Mechanism for Adaptive Thermogenesis ». *Exercise and Sport Sciences Reviews* 42 (3): 136-42. <https://doi.org/10.1249/JES.000000000000016>.
- Garlid, K. D., D. E. Orosz, M. Modrianský, S. Vassanelli, et P. Jezek. 1996. « On the Mechanism of Fatty Acid-Induced Proton Transport by Mitochondrial Uncoupling Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (5): 2615-20. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.5.2615>.
- Glancy, Brian, et Robert S. Balaban. 2012. « Role of Mitochondrial Ca²⁺ in the Regulation of Cellular Energetics ». *Biochemistry* 51 (14): 2959-73. <https://doi.org/10.1021/bi2018909>.
- Hansford, R. G., et D. Zorov. 1998. « Role of Mitochondrial Calcium Transport in the Control of Substrate Oxidation ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 184 (1-2): 359-69.
- Hardie, D. Grahame, Fiona A. Ross, et Simon A. Hawley. 2012. « AMPK: A Nutrient and Energy Sensor That Maintains Energy Homeostasis ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 13 (4): 251-62. <https://doi.org/10.1038/nrm3311>.
- Hatefi, Y. 1985. « The Mitochondrial Electron Transport and Oxidative Phosphorylation System ». *Annual Review of Biochemistry* 54: 1015-69. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.005055>.
- Hinkle, Peter C. 2005. « P/O Ratios of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706 (1): 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.09.004>.
- Hoch, F. L. 1992. « Cardiolipins and Biomembrane Function ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1113 (1): 71-133. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(92\)90035-9](https://doi.org/10.1016/0304-4157(92)90035-9).
- Hulbert, A. J., et P. L. Else. 2004. « Basal Metabolic Rate: History, Composition, Regulation, and Usefulness ». *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ* 77 (6): 869-76. <https://doi.org/10.1086/422768>.
- Ikeda, Kenji, Qianqian Kang, Takeshi Yoneshiro, Joao Paulo Camporez, Hiroko Maki, Mayu Homma, Kosaku Shinoda, et al. 2017. « UCP1-independent signaling involving SERCA2b-mediated calcium cycling regulates beige fat thermogenesis and systemic glucose homeostasis ». *Nature medicine* 23 (12): 1454-65. <https://doi.org/10.1038/nm.4429>.
- Jastroch, Martin, Ajit S. Divakaruni, Shona Mookerjee, Jason R. Treberg, et Martin D. Brand. 2010. « Mitochondrial Proton and Electron Leaks ». *Essays in Biochemistry* 47: 53-67. <https://doi.org/10.1042/bse0470053>.
- Jekabsons, Mika B., et David G. Nicholls. 2004. « In Situ Respiration and Bioenergetic Status of Mitochondria in Primary Cerebellar Granule Neuronal Cultures Exposed Continuously to Glutamate ». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (31): 32989-0. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401540200>.
- Jezek, P., M. Záčková, M. Růžicka, E. Skobisová, et M. Jabůrek. 2004. « Mitochondrial Uncoupling Proteins--Facts and Fantasies ». *Physiological Research* 53 Suppl 1: S199-211.
- Ježek, Petr, Blanka Holendová, Keith D. Garlid, et Martin Jabůrek. 2018. « Mitochondrial Uncoupling Proteins: Subtle Regulators of Cellular Redox Signaling ». *Antioxidants & Redox Signaling* 29 (7): 667-714. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.7225>.
- Johannsen, Darcy L., Jose E. Galgani, Neil M. Johannsen, Zhengyu Zhang, Jeffrey D. Covington, et Eric Ravussin. 2012. « Effect of Short-Term Thyroxine Administration on Energy Metabolism and Mitochondrial Efficiency in Humans ». *PLoS One* 7 (7): e40837. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040837>.
- Jouaville, Laurence S., Paolo Pinton, Carlo Bastianutto, Guy A. Rutter, et Rosario Rizzuto. 1999. « Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (24): 13807-13812.
- Joubert, Frédéric, et Nicolas Puff. 2021. « Mitochondrial Cristae Architecture and Functions: Lessons from Minimal Model Systems ». *Membranes* 11 (7): 465. <https://doi.org/10.3390/membranes11070465>.
- Kadenbach, Bernhard. 2003. « Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1604 (2): 77-94.
- Kazak, Lawrence, Edward T. Chouchani, Gina Z. Lu, Mark P. Jedrychowski, Curtis J. Bare, Amir I. Mina, Manju Kumari, et al. 2017. « Genetic Depletion of Adipocyte Creatine Metabolism Inhibits Diet-Induced Thermogenesis and Drives Obesity ». *Cell Metabolism* 26 (4): 660-671.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.08.009>.
- Kazak, Lawrence, Edward T. Chouchani, Mark P. Jedrychowski, Brian K. Erickson, Kosaku Shinoda, Paul Cohen, Ramalingam Vetrivelan, et al. 2015. « A Creatine-Driven Substrate Cycle Enhances Energy Expenditure and Thermogenesis in Beige Fat ». *Cell* 163 (3): 643-55. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.035>.
- Kudin, Alexei P., Nana Yaw-B. Bimpong-Buta, Stefan Vielhaber, Christian E. Elger, et Wolfram S. Kunz. 2004. « Characterization of Superoxide-Producing Sites in Isolated Brain Mitochondria * ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4127-35. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310341200>.
- Kushnir, Alexander, Benjamin Wajsberg, et Andrew R. Marks. 2018. « Ryanodine Receptor Dysfunction in Human Disorders ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1865 (11 Pt B): 1687-97. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.07.011>.
- Laitano, Orlando, Kevin O. Murray, et Lisa R. Leon. 2020. « Overlapping Mechanisms of Exertional Heat Stroke and Malignant Hyperthermia: Evidence vs. Conjecture ». *Sports Medicine (Auckland, N.Z.)* 50 (9): 1581-92. <https://doi.org/10.1007/s40279-020-01318-4>.
- Lane, Nick. 2018. « Hot Mitochondria? ». *PLoS Biology* 16 (1): e2005113. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2005113>.
- Legendre, Lucas J., et Donald Davesne. 2020. « The evolution of mechanisms involved in vertebrate endothermy ». *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 375 (1793): 20190136. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0136>.

- Lettieri-Barbato, Daniele. 2019. « Redox Control of Non-Shivering Thermogenesis ». *Molecular Metabolism* 25 (juillet): 11-19. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.04.002>.
- Lin, C. S., et M. Klingenberg. 1980. « Isolation of the Uncoupling Protein from Brown Adipose Tissue Mitochondria ». *FEBS Letters* 113 (2): 299-303. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80613-2](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80613-2).
- Lippe, G, F Dabbeni Sala, et M C Sorgato. 1988. « ATP Synthase Complex from Beef Heart Mitochondria. Role of the Thiol Group of the 25-KDa Subunit of Fo in the Coupling Mechanism between Fo and F1. » *Journal of Biological Chemistry* 263 (35): 18627-34. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)37331-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)37331-9).
- Lippe, Giovanna, Gabriele Coluccino, Marco Zancani, Walter Baratta, et Paola Crusiz. 2019. « Mitochondrial F-ATP Synthase and Its Transition into an Energy-Dissipating Molecular Machine ». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019 (avril): e8743257. <https://doi.org/10.1155/2019/8743257>.
- Lowell, Bradford B., et Bruce M. Spiegelman. 2000. « Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis ». *Nature* 404 (6778): 652.
- Macherel, David, Francis Haraux, Hervé Guillou, et Olivier Bourgeois. 2021. « The Conundrum of Hot Mitochondria ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1862 (2): 148348. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148348>.
- Mao, Weiguang, Xing Xian Yu, Alan Zhong, Wenlu Li, Jennifer Brush, Steven W. Sherwood, Sean H. Adams, et Guohua Pan. 1999. « UCP4, a Novel Brain-Specific Mitochondrial Protein That Reduces Membrane Potential in Mammalian Cells ». *FEBS Letters* 443 (3): 326-30. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01713-X](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01713-X).
- Masson, Stewart W. C., Christopher P. Hedges, Jules B. L. Devaux, Crystal S. James, et Anthony J. R. Hickey. 2017. « Mitochondrial Glycerol 3-Phosphate Facilitates Bumblebee Pre-Flight Thermogenesis ». *Scientific Reports* 7 (1): 13107. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13454-5>.
- McCormack, J. G., A. P. Halestrap, et R. M. Denton. 1990. « Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism ». *Physiological Reviews* 70 (2): 391-425. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.391>.
- McLaughlin, Kelsey L., James T. Hagen, Hannah S. Coalson, Margaret A. M. Nelson, Kimberly A. Kew, Ashley R. Wooten, et Kelsey H. Fisher-Wellman. 2020. « Novel Approach to Quantify Mitochondrial Content and Intrinsic Bioenergetic Efficiency across Organs ». *Scientific Reports* 10 (1): 17599. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74718-1>.
- Meis, L. de. 2002. « Ca²⁺-ATPases (SERCA): Energy Transduction and Heat Production in Transport ATPases ». *The Journal of Membrane Biology* 188 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0171-5>.
- Meis, Leopoldo de, Luisa A. Ketzner, Rodrigo Madeiro da Costa, Ivone Rosa de Andrade, et Marlene Benchimol. 2010. « Fusion of the Endoplasmic Reticulum and Mitochondrial Outer Membrane in Rats Brown Adipose Tissue: Activation of Thermogenesis by Ca²⁺ ». *PLOS ONE* 5 (3): e9439. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009439>.
- Mihara, S., N. Suzuki, S. Wakisaka, S. Suzuki, N. Sekita, S. Yamamoto, N. Saito, T. Hoshino, et T. Sakane. 1999. « Effects of Thyroid Hormones on Apoptotic Cell Death of Human Lymphocytes ». *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 84 (4): 1378-85. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.4.5598>.
- Mills, Evanna L., Kerry A. Pierce, Mark P. Jedrychowski, Ryan Garrity, Sally Winther, Sara Vidoni, Takeshi Yoneshiro, et al. 2018. « Accumulation of Succinate Controls Activation of Adipose Tissue Thermogenesis ». *Nature* 560 (7716): 102-6. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0353-2>.
- Monternier, Pierre-Axel, Vincent Marmillot, Jean-Louis Rouanet, et Damien Roussel. 2014. « Mitochondrial Phenotypic Flexibility Enhances Energy Savings during Winter Fast in King Penguin Chicks ». *The Journal of Experimental Biology* 217 (Pt 15): 2691-97. <https://doi.org/10.1242/jeb.104505>.
- Moreno, António J. M., Paula I. Moreira, José B. A. Custódio, et Maria S. Santos. 2013. « Mechanism of Inhibition of Mitochondrial ATP Synthase by 17β-Estradiol ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 45 (3): 261-70. <https://doi.org/10.1007/s10863-012-9497-1>.
- Mráček, Tomáš, Zdeněk Drahota, et Josef Houštěk. 2013. « The Function and the Role of the Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase in Mammalian Tissues ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1827 (3): 401-10. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2012.11.014>.
- Murakami, Akira, Kohjiro Nagao, Reiko Sakaguchi, Keisuke Kida, Yuji Hara, Yasuo Mori, Kohki Okabe, Yoshie Harada, et Masato Umeda. 2022. « Cell-Autonomous Control of Intracellular Temperature by Unsaturation of Phospholipid Acyl Chains ». *Cell Reports* 38 (11): 110487. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110487>.
- Murphy, M. P. 1989. « Slip and Leak in Mitochondrial Oxidative Phosphorylation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 977 (2): 123-41. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(89\)80063-5](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(89)80063-5).
- Murphy, Michael P. 2009. « How mitochondria produce reactive oxygen species ». *Biochemical journal* 417 (1): 1–13.
- Nakano, Masahiro, Yoshiyuki Arai, Ipppei Kotera, Kohki Okabe, Yasuhiro Kamei, et Takeharu Nagai. 2017. « Genetically Encoded Ratiometric Fluorescent Thermometer with Wide Range and Rapid Response ». Édité par Takuya Matsumoto. *PLOS ONE* 12 (2): e0172344. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172344>.
- Nasr, Mohamed A., Galina I. Dovbeshko, Stephen L. Bearne, Nagwa El-Badri, et Chérif F. Matta. 2019. « Heat Shock Proteins in the "Hot" Mitochondrion: Identity and Putative Roles ». *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 41 (9): e1900055. <https://doi.org/10.1002/bies.201900055>.
- Nath, Sunil. 2016. « The Thermodynamic Efficiency of ATP Synthesis in Oxidative Phosphorylation ». *Biophysical Chemistry* 219 (décembre): 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2016.10.002>.
- Nedergaard, J. A. N., Barbara Cannon, et Olov Lindberg. 1977. « Microcalorimetry of isolated mammalian cells ». *Nature* 267 (5611): 518.

- Nedergaard, J., et O. Lindberg. 1979. « Norepinephrine-Stimulated Fatty-Acid Release and Oxygen Consumption in Isolated Hamster Brown-Fat Cells. Influence of Buffers, Albumin, Insulin and Mitochondrial Inhibitors ». *European Journal of Biochemistry* 95 (1): 139-45. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1979.tb12948.x>.
- Nguyen, Amy D., Nicola J. Lee, Natalie K. Y. Wee, Lei Zhang, Ronaldo F. Enriquez, Ee Cheng Khor, Tao Nie, et al. 2018. « Uncoupling Protein-1 Is Protective of Bone Mass under Mild Cold Stress Conditions ». *Bone* 106 (janvier): 167-78. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.05.037>.
- Nguyen, P., V. Leray, M. Diez, S. Serisier, J. Le Bloc'h, B. Siliart, et H. Dumon. 2008. « Liver Lipid Metabolism ». *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 92 (3): 272-83. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2007.00752.x>.
- Nicholls, D. G. 1974. « Hamster Brown-Adipose-Tissue Mitochondria. The Control of Respiration and the Proton Electrochemical Potential Gradient by Possible Physiological Effectors of the Proton Conductance of the Inner Membrane ». *European Journal of Biochemistry* 49 (3): 573-83. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03861.x>.
- Nogueiras, Ruben, Kirk M. Habegger, Nilika Chaudhary, Brian Finan, Alexander S. Banks, Marcelo O. Dietrich, Tamas L. Horvath, David A. Sinclair, Paul T. Pfluger, et Matthias H. Tschöop. 2012. « SIRTUIN 1 AND SIRTUIN 3: PHYSIOLOGICAL MODULATORS OF METABOLISM ». *Physiological reviews* 92 (3): 1479-1514. <https://doi.org/10.1152/physrev.00022.2011>.
- O'Rourke, Brian. 2007. « Mitochondrial Ion Channels ». *Annual review of physiology* 69: 19-49. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.69.031905.163804>.
- Pant, Meghna, Naresh C. Bal, et Muthu Periasamy. 2016. « Sarcoplipin: A Key Thermogenic and Metabolic Regulator in Skeletal Muscle ». *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 27 (12): 881-92. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.006>.
- Papa, S., N. Capitanio, G. Capitanio, E. De Nitto, et M. Minuto. 1991. « The Cytochrome Chain of Mitochondria Exhibits Variable H⁺/e⁻ Stoichiometry ». *FEBS Letters* 288 (1-2): 183-86. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)81030-c](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)81030-c).
- Pehowich, Daniel J. 1999. « Thyroid Hormone Status and Membrane N-3 Fatty Acid Content Influence Mitochondrial Proton Leak ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1411 (1): 192-200. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00041-9](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00041-9).
- Phillips, R. C., P. George, et R. J. Rutman. 1969. « Thermodynamic Data for the Hydrolysis of Adenosine Triphosphate as a Function of PH, Mg²⁺ Ion Concentration, and Ionic Strength ». *The Journal of Biological Chemistry* 244 (12): 3330-42.
- Porter, R. K., et M. D. Brand. 1995. « Mitochondrial Proton Conductance and H⁺/O Ratio Are Independent of Electron Transport Rate in Isolated Hepatocytes ». *The Biochemical Journal* 310 (Pt 2) (septembre): 379-82. <https://doi.org/10.1042/bj3100379>.
- Rajagopal, Manjunath C., Jeffrey W. Brown, Dhruv Gelda, Krishna V. Valavala, Huan Wang, Daniel A. Llano, Rhanor Gillette, et Sanjiv Sinha. 2019. « Transient Heat Release during Induced Mitochondrial Proton Uncoupling ». *Communications Biology* 2 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1038/s42003-019-0535-y>.
- Ricquier, Daniel. 2006. « Fundamental mechanisms of thermogenesis ». *Comptes rendus biologiques* 329 (8): 578–586.
- . 2017. « UCP1, the Mitochondrial Uncoupling Protein of Brown Adipocyte: A Personal Contribution and a Historical Perspective ». *Biochimie* 134 (mars): 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2016.10.018>.
- Riley, Christopher L., Christine Dao, M. Alexander Kenaston, Luigina Muto, Shohei Kohno, Sara M. Nowinski, Ashley D. Solmonson, et al. 2016. « The Complementary and Divergent Roles of Uncoupling Proteins 1 and 3 in Thermoregulation ». *The Journal of Physiology* 594 (24): 7455-64. <https://doi.org/10.1113/JP272971>.
- Rizzuto, Rosario, Diego De Stefani, Anna Raffaello, et Cristina Mammucari. 2012. « Mitochondria as Sensors and Regulators of Calcium Signalling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (9): 566-78. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>.
- Rolfe, D. F., et M. D. Brand. 1996. « Contribution of mitochondrial proton leak to skeletal muscle respiration and to standard metabolic rate ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 271 (4): C1380-89. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1996.271.4.C1380>.
- Rolfe, D. F., et G. C. Brown. 1997. « Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals ». *Physiological Reviews* 77 (3): 731-58. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>.
- Rolfe, D. F., J. M. Newman, J. A. Buckingham, M. G. Clark, et M. D. Brand. 1999. « Contribution of Mitochondrial Proton Leak to Respiration Rate in Working Skeletal Muscle and Liver and to SMR ». *The American Journal of Physiology* 276 (3): C692-699. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.3.C692>.
- Rolfe, David F. S., John M. B. Newman, Julie A. Buckingham, Michael G. Clark, et Martin D. Brand. 1999. « Contribution of mitochondrial proton leak to respiration rate in working skeletal muscle and liver and to SMR ». *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 276 (3): C692-99. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1999.276.3.C692>.
- Rosenberg, Henry, Neil Pollock, Anja Schiemann, Terasa Bulger, et Kathryn Stowell. 2015. « Malignant hyperthermia: a review ». *Orphanet Journal of Rare Diseases* 10 (1): 93. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0310-1>.
- Rossi, Alice, Paola Pizzo, et Riccardo Filadi. 2019. « Calcium, Mitochondria and Cell Metabolism: A Functional Triangle in Bioenergetics ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1866 (7): 1068-78. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2018.10.016>.
- Roussel, Damien, et Yann Voituron. 2020. « Mitochondrial Costs of Being Hot: Effects of Acute Thermal Change on Liver Bioenergetics in Toads (Bufo bufo) ». *Frontiers in Physiology* 11. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2020.00153>.
- Rutter, G A, et R M Denton. 1988. « Regulation of NAD⁺-linked isocitrate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase by Ca²⁺ ions within toluene-permeabilized rat heart mitochondria. Interactions with regulation by adenine nucleotides and NADH/NAD⁺ ratios ». *Biochemical Journal* 252 (1): 181-89. <https://doi.org/10.1042/bj2520181>.

- Sahoo, Sanjaya K., Sana A. Shaikh, Danesh H. Sopariwala, Naresh C. Bal, et Muthu Periasamy. 2013. « Sarcolipin Protein Interaction with Sarco(Endo)Plasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA) Is Distinct from Phospholamban Protein, and Only Sarcolipin Can Promote Uncoupling of the SERCA Pump ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (10): 6881-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.436915>.
- Salway, J. G. 2004. *Metabolism at a Glance*. Wiley.
- Schlicker, Christine, Melanie Gertz, Panagiotis Papatheodorou, Barbara Kachholz, Christian F. W. Becker, et Clemens Steegborn. 2008. « Substrates and Regulation Mechanisms for the Human Mitochondrial Sirtuins Sirt3 and Sirt5 ». *Journal of Molecular Biology* 382 (3): 790-801. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.048>.
- Schneider, Kevin, Joshua Valdez, Janice Nguyen, Marquis Vawter, Brandi Galke, Theodore W. Kurtz, et Jefferson Y. Chan. 2016. « Increased Energy Expenditure, Ucp1 Expression, and Resistance to Diet-Induced Obesity in Mice Lacking Nuclear Factor-Erythroid-2-Related Transcription Factor-2 (Nrf2) ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (14): 7754-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.673756>.
- Sebaa, Rajaa, Jeff Johnson, Chantal Pileggi, Michaela Norgren, Jian Xuan, Yuka Sai, Qiang Tong, et al. 2019. « SIRT3 Controls Brown Fat Thermogenesis by Deacetylation Regulation of Pathways Upstream of UCP1 ». *Molecular Metabolism* 25 (juillet): 35-49. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2019.04.008>.
- Shabalina, Irina G., Tatiana V. Kramarova, Jan Nedergaard, et Barbara Cannon. 2006. « Carboxyatractyloside Effects on Brown-Fat Mitochondria Imply That the Adenine Nucleotide Translocator Isoforms ANT1 and ANT2 May Be Responsible for Basal and Fatty-Acid-Induced Uncoupling Respectively ». *Biochemical Journal* 399 (3): 405-14. <https://doi.org/10.1042/BJ20060706>.
- Shi, Tong, Fei Wang, Emily Stieren, et Qiang Tong. 2005. « SIRT3, a Mitochondrial Sirtuin Deacetylase, Regulates Mitochondrial Function and Thermogenesis in Brown Adipocytes ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (14): 13560-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414670200>.
- Slimen, I. Belhadj, T. Najar, A. Ghram, et M. Abdrrabba. 2016. « Heat Stress Effects on Livestock: Molecular, Cellular and Metabolic Aspects, a Review ». *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100 (3): 401-12. <https://doi.org/10.1111/jpn.12379>.
- Smith, Wendy S., Robert Broadbridge, J. Malcolm East, et Anthony G. Lee. 2002. « Sarcolipin Uncouples Hydrolysis of ATP from Accumulation of Ca²⁺ by the Ca²⁺-ATPase of Skeletal-Muscle Sarcoplasmic Reticulum ». *The Biochemical Journal* 361 (Pt 2): 277-86. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3610277>.
- Sone, N., et P. Nicholls. 1984. « Effect of heat treatment on oxidase activity and proton-pumping capability of proteoliposome-incorporated beef heart cytochrome aa3 ». *Biochemistry* 23 (26): 6550-54. <https://doi.org/10.1021/bi00321a042>.
- Sotoma, Shingo, Chongxia Zhong, James Chen Yong Kah, Hayato Yamashita, Taras Plakhotnik, Yoshie Harada, et Madoka Suzuki. 2021. « In situ measurements of intracellular thermal conductivity using heater-thermometer hybrid diamond nanosensors ». *Science Advances* 7 (3). <https://doi.org/10.1126/sciadv.abd7888>.
- Steigmiller, Stefan, Paola Turina, et Peter Gräber. 2008. « The thermodynamic H⁺/ATP ratios of the H⁺-ATPsynthases from chloroplasts and Escherichia coli ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (10): 3745-50. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708356105>.
- Stier, Antoine, Pierre Bize, Caroline Habold, Frederic Bouillaud, Sylvie Massemin, et François Criscuolo. 2014. « Mitochondrial Uncoupling Prevents Cold-Induced Oxidative Stress: A Case Study Using UCP1 Knockout Mice ». *Journal of Experimental Biology* 217 (4): 624-30. <https://doi.org/10.1242/jeb.092700>.
- St-Pierre, Julie, Julie A. Buckingham, Stephen J. Roebuck, et Martin D. Brand. 2002. « Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain ». *The Journal of Biological Chemistry* 277 (47): 44784-90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207217200>.
- Sun, Yizhi, Janane F. Rahbani, Mark P. Jedrychowski, Christopher L. Riley, Sara Vidoni, Dina Bogoslavski, Bo Hu, et al. 2021. « Mitochondrial TNAP Controls Thermogenesis by Hydrolysis of Phosphocreatine ». *Nature* 593 (7860): 580-85. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03533-z>.
- Teixeira, Patrícia de Fátima dos Santos, Patrícia Borges dos Santos, et Carmen Cabanelas Pazos-Moura. 2020. « The role of thyroid hormone in metabolism and metabolic syndrome ». *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism* 11 (mai): 2042018820917869. <https://doi.org/10.1177/2042018820917869>.
- Tretter, Laszlo, et Vera Adam-Vizi. 2007. « Uncoupling Is without an Effect on the Production of Reactive Oxygen Species by in Situ Synaptic Mitochondria ». *Journal of Neurochemistry* 103 (5): 1864-71. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04891.x>.
- Urbani, Andrea, Elena Prosdocimi, Andrea Carrer, Vanessa Checchetto, et Ildikò Szabò. 2021. « Mitochondrial Ion Channels of the Inner Membrane and Their Regulation in Cell Death Signaling ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 8 (janvier): 620081. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.620081>.
- Wakatsuki, T., F. Hirata, H. Ohno, M. Yamamoto, Y. Sato, et Y. Ohira. 1996. « Thermogenic responses to high-energy phosphate contents and/or hindlimb suspension in rats ». *The Japanese journal of physiology* 46 (2): 171-175.
- Wallimann, T, M Wyss, D Brdiczka, K Nicolay, et H M Eppenberger. 1992. « Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis ». *Biochemical Journal* 281 (1): 21-40. <https://doi.org/10.1042/bj2810021>.
- Wallimann, Theo, Malgorzata Tokarska-Schlattner, Dietbert Neumann, Richard M. Epand, Raquel F. Epand, Robert H. Andres, Hans Rudolf Widmer, et al. 2007. « The Phosphocreatine Circuit: Molecular and Cellular Physiology of Creatine Kinases, Sensitivity to Free Radicals, and Enhancement by Creatine Supplementation ». In *Molecular Systems Bioenergetics*, 195-264. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <https://doi.org/10.1002/9783527621095.ch7>.

- Wallimann, Theo, Malgorzata Tokarska-Schlattner, et Uwe Schlattner. 2011. « The Creatine Kinase System and Pleiotropic Effects of Creatine ». *Amino Acids* 40 (5): 1271-96. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0877-3>.
- Wang, Qun, Jiayi Sun, Mengyu Liu, Yaqi Zhou, Lei Zhang, et Yanzhang Li. 2021. « The New Role of AMP-Activated Protein Kinase in Regulating Fat Metabolism and Energy Expenditure in Adipose Tissue ». *Biomolecules* 11 (12): 1757. <https://doi.org/10.3390/biom11121757>.
- Wang, Sheng-Bing, D. Brian Foster, Jasma Rucker, Brian O'Rourke, David A. Kass, et Jennifer E. Van Eyk. 2011. « Redox Regulation of Mitochondrial ATP Synthase ». *Circulation Research* 109 (7): 750-57. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246124>.
- Watt, Ian N., Martin G. Montgomery, Michael J. Runswick, Andrew G. W. Leslie, et John E. Walker. 2010. « Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (39): 16823-27. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011099107>.
- Wescott, Andrew P., Joseph P. Y. Kao, W. Jonathan Lederer, et Liron Boyman. 2019. « Voltage-Energized Calcium-Sensitive ATP Production by Mitochondria ». *Nature Metabolism* 1 (10): 975-84. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0126-8>.
- Wikström, Mårten, et Roger Springett. 2020. « Thermodynamic Efficiency, Reversibility, and Degree of Coupling in Energy Conservation by the Mitochondrial Respiratory Chain. » *Communications Biology*. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01192-w>.
- Yagi, Takao, et Youssef Hatefi. 1987. « Thiols in Oxidative Phosphorylation: Thiols in the F₀ of ATP Synthase Essential for ATPase Activity ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 254 (1): 102-9. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(87\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0003-9861(87)90085-3).
- Yamada, Kazuhiro. 2017. « Energetics of Muscle Contraction: Further Trials ». *The Journal of Physiological Sciences* 67 (1): 19-43. <https://doi.org/10.1007/s12576-016-0470-3>.
- Yamashita, Hitoshi, Yoshinobu Ohira, Toru Wakatsuki, Mikio Yamamoto, Takako Kizaki, Shuji Oh-ishi, et Hideki Ohno. 1995. « Increased Growth of Brown Adipose Tissue but Its Reduced Thermogenic Activity in Creatine-Depleted Rats Fed β -Guanidinopropionic Acid ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1230 (1): 69-73. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(95\)00067-S](https://doi.org/10.1016/0005-2728(95)00067-S).
- Yehuda-Shnaidman, Einav, Bella Kalderon, et Jacob Bar-Tana. 2014. « Thyroid Hormone, Thyromimetics, and Metabolic Efficiency ». *Endocrine Reviews* 35 (1): 35-58. <https://doi.org/10.1210/er.2013-1006>.
- Yu, Xing Xian, Weiguang Mao, Alan Zhong, Peter Schow, Jennifer Brush, Steven W. Sherwood, Sean H. Adams, et Guohua Pan. 2000. « Characterization of novel UCP5/BMCP1 isoforms and differential regulation of UCP4 and UCP5 expression through dietary or temperature manipulation ». *The FASEB Journal* 14 (11): 1611-18. <https://doi.org/10.1096/fj.99-0834com>.
- Zanotti, Franco, Ferruccio Guerrieri, Giuseppe Capozza, Maria Fiermonte, Jan Berden, et Sergio Papa. 1992. « Role of F₀ and F₁ Subunits in the Gating and Coupling Function of Mitochondrial H⁺-ATP Synthase ». *European Journal of Biochemistry* 208 (1): 9-16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1992.tb17153.x>.

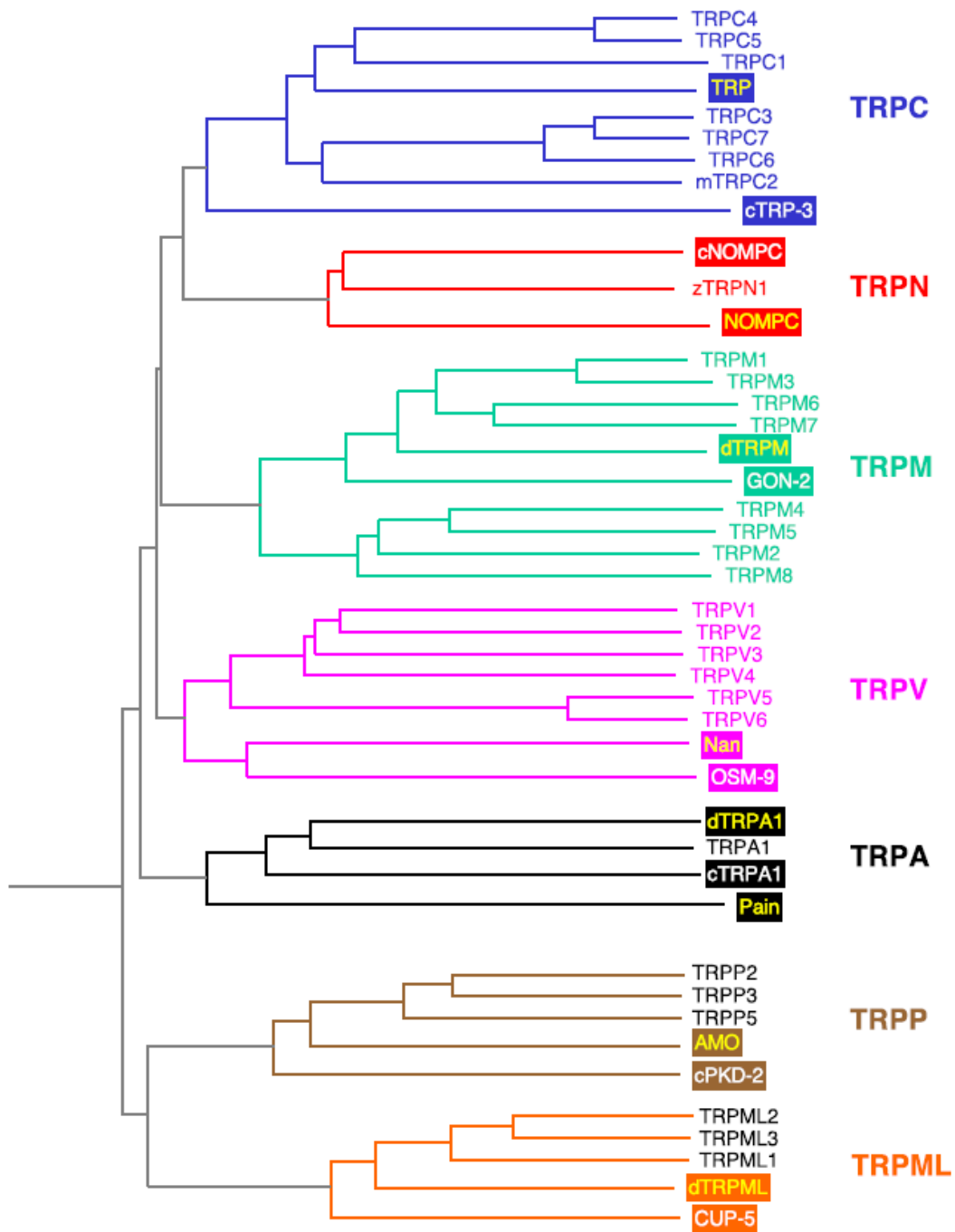


Figure 5: Dendrogramme montrant la parenté des protéines TRP

L'arbre phylogénétique comprend tous les TRP humains, TRPC2 de la souris, et TRPN1 du poisson-zèbre. Les TRP-like de la drosophile et du nématode *C. elegans* sont inclus et indiquées par des cases remplies. D'après (Montell 2005).

3. Le canal TRPV1

Des travaux récents suggèrent que le canal TRPV1 est présent dans les membranes cellulaires, en particulier dans la mitochondrie et son implication dans les fonctions mitochondriales – homéostasie calcique, production d'ATP – est proposée.

3.1. La superfamille des TRP

La superfamille des canaux TRP « Transient Receptor Potential » représente un ensemble de canaux ioniques largement exprimés et très conservés au sein des eucaryotes, puisqu'ils sont retrouvés de la levure à l'Homme. Les canaux TRP sont considérés, de par la grande diversité de mécanismes d'activation, comme des récepteurs sensoriels intégrant des stimuli environnementaux, tels que la lumière, la température ou le toucher. Chez l'Homme, ils jouent donc un rôle très important dans la perception des cinq sens (Venkatachalam et Montell 2007).

3.1.1. Historique

La découverte des canaux TRP est basée sur la caractérisation d'un mutant de la drosophile, *Drosophila melanogaster*, en 1969 (Cosens et Manning 1969). Chez ce mutant, une exposition prolongée à la lumière provoque une réponse transitoire des photorécepteurs suivie par leur désensibilisation, aboutissant à une cécité temporaire. Ces observations d'individus mutants ont donc permis d'identifier le gène responsable de la sensibilité à la lumière, nommé « TRP » pour Transient Receptor Potential (Minke, Wu, et Pak 1975; Minke 1982). Le gène TRP ne fut cloné qu'en 1989 (Montell et Rubin 1989) et une approche par patch-clamp en cellule entière a permis de montrer que le gène TRP codait pour un canal ionique sélectif du Ca^{2+} et sensible à la lumière (Hardie et Minke 1992). En parallèle, un second gène de la drosophile présentant une forte homologie de séquence avec le gène TRP, nommé TRPL pour « TRP-like », fut décrit comme un second canal responsable de la sensibilité à la lumière dont la sélectivité pour le Ca^{2+} est plus faible que TRP (Phillips, Bull, et Kelly 1992). Par la suite, de nombreux gènes homologues au gène TRP ont été identifiés chez d'autres invertébrés et vertébrés, dont les mammifères. A ce jour, la superfamille TRP comprend plus de 50 canaux cationiques divisés en 7 sous-familles sur la base de leur homologie structurale, dont 28 de ces canaux et 6 sous-familles sont présentes chez les mammifères : TRPC (Canonical), TRPP (Polycystin), TRPM (Melastatin), TRPA (Ankyrin), TRPML (Mucolipin), TRPV (Vanilloid) (Venkatachalam et Montell 2007; Nilius et Owsianik 2011) (Figure 5).

3.1.2. Structure générale

Tous les canaux de la superfamille TRP présentent une homologie structurale. Les canaux TRP sont composés de 4 sous-unités, dans la majorité des cas identiques formant des homotétramères, mais parfois différentes formant des hétérotétramères. Chaque sous-unité est composée de 6 segments transmembranaires (S1 à S6) interconnectés par de petites boucles, avec les domaines N-terminal et C-terminal intracellulaires (Figure 6). Le domaine du pore du canal est situé entre les domaines S5 et S6 et permet la conduction des ions (Venkatachalam et Montell 2007; Wu, Sweet, et Clapham 2010). Au sein du domaine C-terminal, on retrouve le domaine TRP, une séquence de 25 acides aminés bien conservée, qui comprend une séquence de 6 acides aminés extrêmement conservée – la TRP box – ainsi qu'une région riche en proline, la TRP box 2. Ce domaine TRP permettrait la liaison du phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP₂), un lipide polaire ubiquitaire qui régule

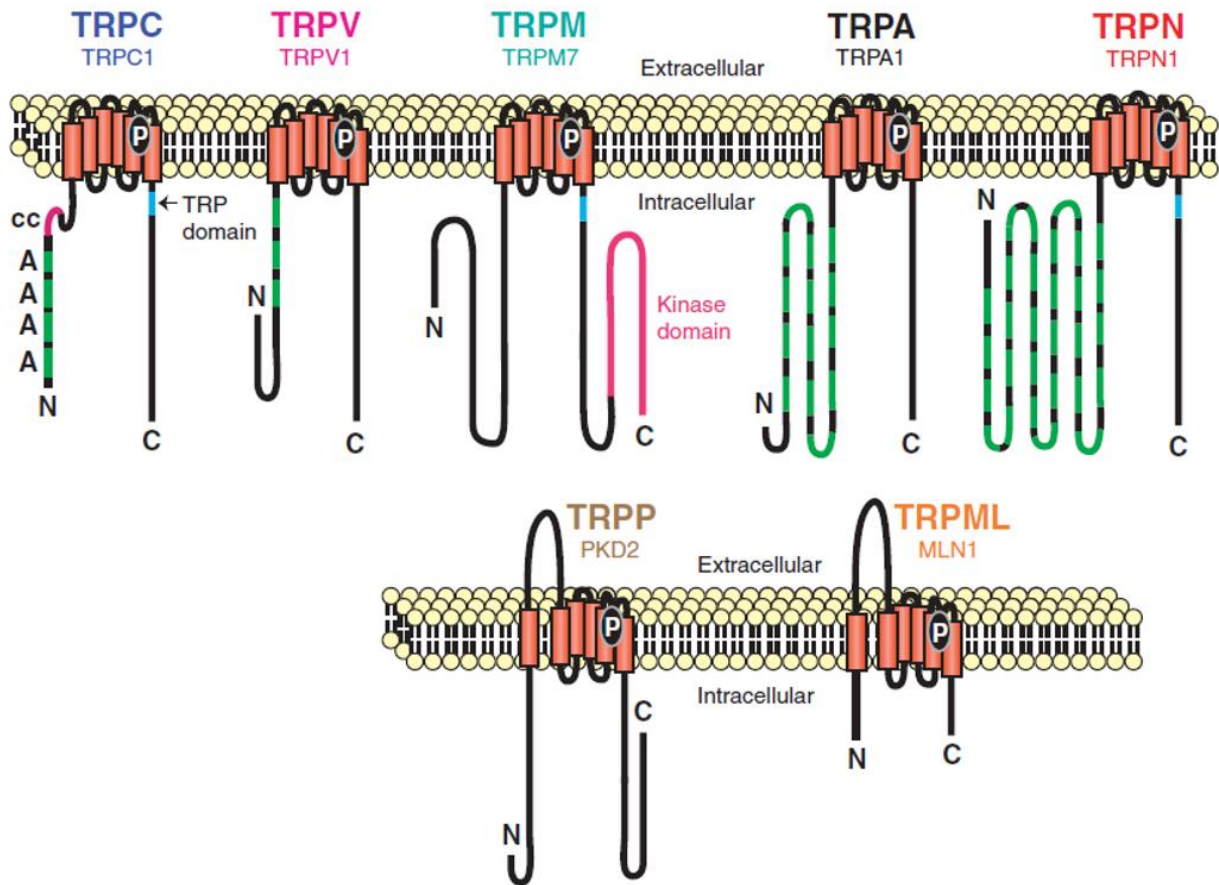


Figure 6 : Représentation schématique de la structure des sept sous-familles de TRP

Un représentant de chacune des sept sous-familles est schématisé, dont TRPN qui n'est pas présent chez les mammifères. Les caractéristiques structurales spécifiques de chaque sous-famille sont représentées : répétitions de domaines ankyrines (A), domaine « coiled coil » (cc), domaine de liaison à une protéine kinase (TRPM6 et 7 uniquement), les 6 segments transmembranaires, les extrémités N- et C-terminales, les boucles intra- et extracellulaires et le domaine TRP. D'après (Montell 2005).

l'activité des canaux (Ramsey, Delling, et Clapham 2006). PIP₂ est en effet capable de réguler positivement certains canaux (TRPV5, TRPM5, TRPM7, TRPM8) (D. Liu et Liman 2003; Rohács et al. 2005) et d'en inhiber d'autres (TRPV1) (Runnels, Yue, et Clapham 2002; Chuang et al. 2001). La présence de séquences ankyrines répétées dans le domaine N-terminal (Wu, Sweet, et Clapham 2010) contribuent à l'assemblage et à la régulation fonctionnelle des canaux (Montell et al. 2002). Les canaux TRP, comme de nombreux autres canaux ioniques, possèdent plusieurs sites de liaison à la calmoduline (CaM), une enzyme Ca²⁺-dépendante, qui permet de réguler l'activité de canal (Ramsey, Delling, et Clapham 2006). Les récentes études en cryo-microscopie électronique ont permis de déterminer avec précision la structure des canaux TRP et de mieux comprendre leurs mécanismes d'activation (Paulsen et al. 2015; Liao et al. 2013; Agarwala et al. 2016). De plus, les canaux TRP ne présentent que très peu de résidus arginine dans le domaine transmembranaire S4, dont la forte abondance engendre la sensibilité au voltage de certains canaux ioniques, ce qui explique que les canaux TRP sont très peu dépendants du potentiel membranaire (Montell 2005). La structure des canaux TRP est assez proche de la structure des canaux potassiques Kv 1.2, ce qui a été confirmé pour le canal TRPV1 par cryo-microscopie électronique (F. Zhang et al. 2018).

3.1.3. Les sous-familles et leurs fonctions

a) La sous-famille TRPC

La sous-famille TRPC comprend 7 membres (TRPC1 à 7) dont le premier a été découvert en 1995 et cloné grâce à son homologie de séquence avec le gène TRP de la drosophile (Wes et al. 1995). Au sein de cette sous famille, on distingue 4 groupes basés sur leurs homologies de séquences et de fonctions : (I) TRPC1 ; (II) TRPC2 ; (III) TRPC3, TRPC6, TRPC7 ; (IV) TRPC4, TRPC5. Les TRPC forment des homotétramères ou des hétérotétramères avec d'autres TRP, par exemple TRPC1 peut s'associer avec TRPC4, TRPV1 ou TRPP2 (Ong, de Souza, et Ambudkar 2016; Dietrich, Fahlbusch, et Gudermann 2014). Comme tous les canaux TRP, les TRPC sont des canaux cationiques non spécifiques, mais avec une sélectivité plus importante pour le Ca²⁺. Les mécanismes de régulation de ces canaux sont controversés et varient en fonction des groupes de TRPC, mais il a été démontré que les phospholipases C (PLC) sont indispensables à leur fonctionnement (Montell 2005). TRPC1 est largement exprimé dans de nombreux tissus chez les mammifères, il est impliqué dans le stockage de Ca²⁺ intracellulaire et il semble aussi impliqué dans la mécano-sensibilité (Dietrich, Fahlbusch, et Gudermann 2014). TRPC4 et TRPC5 ont la particularité de posséder un domaine C-terminal plus long et qui contient un site de liaison PDZ. Ainsi, le domaine PDZ de TRPC4 permet l'activation de récepteurs couplés aux protéines G, ainsi que de récepteurs à activité tyrosine kinase (Clapham et al. 2005). Les rôles physiologiques de TRPC4 et TRPC5 sont peu connus mais semblent agir comme des canaux de stockage calcique (A. Samanta, Hughes, et Moiseenkova-Bell 2018). Contrairement aux autres TRPC, dont l'activité peut être régulée par des lipides, TRPC3, TRPC6 et TRPC7 sont directement activables par ces mêmes lipides, notamment par le diacylglycerol (DAG). Chez l'homme, TRPC2 est un pseudogène : il n'est donc pas traduit en protéine fonctionnelle. De manière globale, les TRPC sont impliqués dans la régulation et la signalisation de nombreux processus cellulaires, et plusieurs variants génétiques ont des implications pathologiques (Curcic et al. 2019).

b) La sous-famille TRPP

La sous-famille des TRPP est composée de 8 membres. Elle est présente chez tous les organismes du règne animal et chez les levures, ce qui en fait probablement la sous-famille de TRP la plus ancienne (Venkatachalam et Montell 2007). Seuls TRPP2,3 et 5 présentent les caractéristiques structurales spécifiques des TRP. TRPP2 forme un canal tétramérique perméable au Ca^{2+} exprimé de manière ubiquitaire chez l'Homme. Il est impliqué dans un grand nombre de fonctions cellulaires telles que la prolifération et la mécano-sensibilité (Giamarchi et al. 2006). Les rôles physiologiques de TRPP3 et TRPP5 ne sont pas encore bien connus. TRPP1 présente une structure particulière composé de 11 segments transmembranaires et d'un domaine N-terminal beaucoup plus important, ce qui le différencie des autres TRP. Ce n'est pas un canal ionique fonctionnel : il a été renommé Polycystine 1 (PC1) en tant que glycoprotéine membranaire. Cependant, il peut s'associer à TRPP2 pour former un canal fonctionnel (A. Samanta, Hughes, et Moiseenkova-Bell 2018). De manière générale, les TRPP sont étudiés pour l'existence de variants impliqués dans la maladie polykystique rénale (MPR) (Peters et al. 1993).

c) La sous-famille TRPM

La sous-famille des TRPM est composée de 8 membres (TRPM1 à 8). Elle a la particularité de présenter un domaine spécifique TRPM dans la région N-terminale, impliqué dans l'assemblage et l'adressage des sous-unités (Kraft et Harteneck 2005). Initialement, la plupart des membres de cette sous-famille a été cloné à partir de tissus cancéreux et associés à la prolifération, la différenciation et la cancérogénèse. Les TRPM sont également impliqués dans la sensibilité thermique et gustative, et l'homéostasie du Mg^{2+} (Fujiwara et Minor 2008; Hashimoto et Kambe 2015). Les TRPM ont une grande variété de mécanismes d'activation, de sélectivités cationiques et de distributions tissulaires (Hofmann et al. 2003). Les canaux TRPM2,4,5 et 8 sont connus pour appartenir aux thermo-TRP, un groupe de TRP ayant la capacité d'être directement activés par la température ou indirectement influencés par cette dernière. En fonction de leurs homologies structurales, on peut distinguer 4 groupes de TRPM: (I) TRPM1 et TRPM3; (II) TRPM 4 et TRPM5; (III) TRPM2, TRPM6 et TRPM7; (IV) TRPM8.

TRPM1 est un canal cationique perméable au Ca^{2+} , considéré comme un suppresseur tumoral et un marqueur potentiel des mélanomes métastatiques (Brożyna et al. 2017). TRPM3 est également un canal cationique non sélectif qui peut former des hétérotétramères avec TRPM1. TRPM3 semble être impliqué dans la perception thermique et, moindrement, dans la libération gluco-dépendante d'insuline dans les cellules β du pancréas (Held, Voets, et Vriens 2015).

TRPM4 et TRPM5 sont des canaux TRP particuliers car ils sont imperméables au Ca^{2+} et uniquement perméables aux cations monovalents comme le sodium (Na^+) et le potassium (K^+) (Zholos et al. 2011). TRPM4 est exprimé de manière ubiquitaire, alors que TRPM5 est exprimé uniquement dans certains tissus comme les intestins, les papilles gustatives et le pancréas (Fonfria et al. 2006), car impliqué dans la perception du goût sucré et amer notamment, et la sécrétion d'insuline (Liman 2007; Colsoul et al. 2010).

TRPM2, TRPM6 et TRPM7 sont des canaux cationiques, avec une activité enzymatique grâce à un domaine enzymatique actif en C-terminal (Kraft et Harteneck 2005). TRPM2 est perméable au Ca^{2+} , au Mg^{2+} et aux cations monovalents. TRPM2 est largement exprimé dans le cerveau, les macrophages et la moelle osseuse, et est

impliqué dans la perception de l'équilibre d'oxydo-réduction (redox) cellulaire (Fonfria et al. 2006; Kraft et Harteneck 2005). TRPM6 et TRPM7 sont perméables au Mg^{2+} , au Zn^{2+} , au Ca^{2+} et sont associés à la régulation de l'homéostasie du Mg^{2+} (Komiya et Runnels 2015). TRPM6 et TRPM7 ont une distribution tissulaire assez variable et sont capables de former des hétérotétramères (M. Li, Jiang, et Yue 2006).

TRPM8 est le membre le mieux caractérisé des TRPM. C'est un canal cationique perméable au Ca^{2+} qui est connu pour être impliqué dans la thermorégulation, dans la modulation de certaines douleurs, et dans la carcinogénèse (Z. Liu et al. 2016). TRPM8 a initialement été caractérisé pour sa sensibilité au froid ($<28^{\circ}C$) et responsable de la sensation de fraîcheur induite par le menthol, un agoniste de TRPM8 (Peier et al. 2002; McKemy, Neuhauser, et Julius 2002).

d) La sous-famille TRPA

TRPA1 est l'unique membre de cette sous-famille de TRP. Il a été découvert comme une protéine transmembranaire possédant de nombreuses séquences ankyrines répétées (Jaquemar, Schenker, et Trueb 1999). TRPA1 présente toutes les caractéristiques structurales spécifiques des canaux TRP hormis le domaine TRP de la région C-terminale. TRPA1 est un canal cationique non sélectif qui est sensible au froid nociceptif ($<18^{\circ}C$) et appartient aux thermo-TRP (Story et al. 2003; Sawada et al. 2007). TRPA1 est également sensible à de nombreuses molécules endogènes et exogènes, comme les endocannabinoïdes et la bradykinine, l'isothiocyanate présent dans l'huile de moutarde, l'allicine présent dans l'ail etc. (Bandell et al. 2004; Jordt et al. 2004; Nilius, Appendino, et Owsianik 2012;). TRPA1 a initialement été proposé comme un acteur-clef de la nociception froide, également impliqué dans l'audition (Nagata et al. 2005), mais il est maintenant décrit comme un nocicepteur chimique (Story et al. 2003; Meents, Ciotu, et Fischer 2018). Il est exprimé dans les neurones du système nerveux périphérique sensoriel tels que les fibres $A\delta$, C et $A\beta$, et dans des cellules non neuronales comme les cellules épithéliales, les fibroblastes ou les mastocytes (Peter M. Zygmunt et Högestätt 2014).

e) La sous-famille TRPML

La sous-famille des TRPML est composée de 3 membres (TRPML1 à 3). Ce sont des canaux cationiques perméables au Ca^{2+} , qui peuvent former des homo- ou des hétéro-tétramères (Cuajungco et al. 2016). Les canaux TRPML sont les plus courts en terme de séquence protéique (<600 aa), ce qui explique qu'aucun domaine TRP complet ni aucune séquence ankyrine répétée n'aient été retrouvés dans leur séquence (Colletti et Kiselyov 2011; Flores et García-Añoveros 2011; Noben-Trauth 2011). Les canaux TRPML sont majoritairement localisés dans les compartiments intracellulaires plutôt qu'au niveau de la membrane plasmique et sont impliqués dans des fonctions de transport vésiculaire (Venkatachalam, Wong, et Zhu 2015). TRPML1 est associé à la mucopolysaccharidose de type IV (Bassi et al. 2000). C'est un canal exprimé de manière ubiquitaire, qui est impliqué dans l'homéostasie ionique et le transport des endosomes tardifs et les lysosomes (W. Wang et al. 2014). TRPML2 est le moins caractérisé des TRPML mais il est retrouvé dans les tissus lymphoïde et myéloïde, plusieurs études cherchent à étudier son rôle dans l'immunité (Cuajungco et al. 2016). TRPML3 est connu pour être impliqué dans le phénotype Varitint-Waddler chez la souris. En effet, une mutation de TRPML3 provoque une surcharge calcique dans les mélanocytes et est ainsi responsable d'une perte auditive et d'une pigmentation anormale de la peau (Cuajungco et al. 2016). TRPML3 est localisé dans les endosomes et les lysosomes des cellules avec une distribution tissulaire

assez large, on le retrouve cependant plus exprimé dans le système endocrinien et les poumons (Grimm, Barthmes, et Wahl-Schott 2014).

f) La sous-famille TRPV

La sous-famille des TRPV est composée de 6 membres (TRPV1 à 6) et représente la sous-famille de TRP la plus documentée à ce jour. L'origine de cette sous-famille est fondée sur la découverte du canal Vanilloid Receptor (VR1), le récepteur de la capsaïcine (CAP), une molécule appartenant aux vanilloïdes et responsable des effets irritants du piment (Michael J. Caterina et al. 1997). VR1 a ensuite été renommé TRPV1 grâce à son homologie structurale avec la famille des canaux TRP. Par la suite, 5 autres TRPV ont été identifiés (Liedtke et al. 2000; Kanzaki et al. 1999; Smith et al. 2002; Haoxing Xu et al. 2002; Strotmann et al. 2000; M. J. Caterina et al. 1999). Les TRPV sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la nociception, le goût, la perméabilité vasculaire, la régulation du Na⁺ dans les reins ou la contractilité utérine (Holzer 2011). TRPV1-4 forment des canaux cationiques non sélectifs alors que TRPV5 et TRPV6 sont des canaux cationiques hautement sélectifs pour le Ca²⁺ (A. Samanta, Hughes, et Moiseenkova-Bell 2018). Les canaux TRPV1-4 sont également connus pour être sensibles à la température et appartiennent aux thermo-TRP.

TRPV2 est décrit comme un senseur de température élevée car il est activé à une température supérieure à 52°C lorsqu'il est exprimé dans un système hétérologue (M. J. Caterina et al. 1999). Cependant son rôle dans la perception thermique n'est pas complètement élucidé et demeure controversé. En effet, des souris TRPV2^{-/-} ne présentent pas de phénotype suggérant une altération de la perception thermique (U. Park et al. 2011). TRPV2 est exprimé de manière ubiquitaire dans différents tissus neuronaux ou non-neuronaux et de nombreux rôles différents lui sont associés en fonction de sa localisation. Par exemple, il a été démontré que TRPV2 est impliqué dans la mécano-transduction des cellules cardiaques (Aguettaz et al. 2017) ou le développement du cancer de la prostate (Monet et al. 2010).

TRPV3 est exprimé dans différents tissus et organes, mais préférentiellement dans les cellules épithéliales, le tractus gastro-intestinal ou les kératinocytes de la peau. Il est impliqué dans différentes fonctions liées à la croissance capillaire ou la cicatrisation (P. Yang et Zhu 2014). Sensible à des températures comprises entre 31°C et 39°C, il est considéré comme un acteur de la thermorégulation (Haoxing Xu et al. 2002; Moqrich et al. 2005).

TRPV4 est exprimé de manière assez ubiquitaire dans l'organisme. Il est activé par différentes molécules endogènes et exogènes et par des températures comprises entre 27°C et 35°C (Grace et al. 2017). Cependant, son rôle dans la thermorégulation est controversé suite à l'accumulation de résultats contradictoires (Garcia-Elias et al. 2014; Güler et al. 2002; S. M. Huang et al. 2011). Il a été décrit comme un acteur de la différenciation des ostéoclastes et de la mécano-sensibilité urothéliale. De plus, certaines mutations de TRPV4 sont impliquées dans des dysplasies osseuses (Everaerts, Nilius, et Owsianik 2010). Il joue également un rôle dans la régulation osmotique et la mécano-transduction (Wegierski et al. 2009).

TRPV5 et TRPV6 forment des canaux ioniques très sélectifs pour le Ca²⁺. TRPV5 est majoritairement exprimé dans les reins alors que TRPV6 est exprimé plus largement, notamment dans les intestins et le pancréas. Ils sont tous deux présents dans la membrane apicale des cellules épithéliales et provoquent une entrée de Ca²⁺ pendant l'absorption et la réabsorption (A. Samanta, Hughes, et Moiseenkova-Bell 2018).

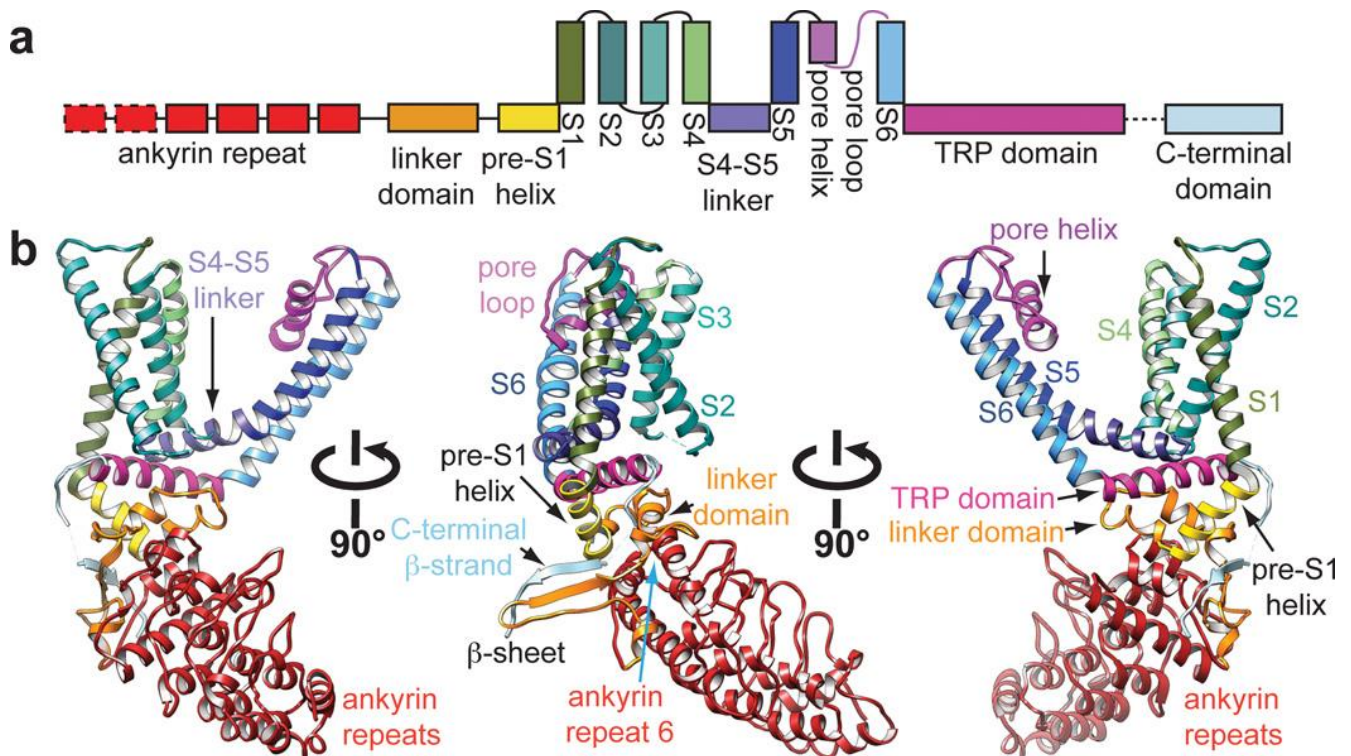


Figure 7 : Aspects structuraux de TRPV1

(a) Diagramme linéaire représentant les principaux domaines structuraux TRPV1, le code couleur correspond aux diagrammes en ruban ci-dessous. (b) Diagrammes en ruban représentant une sous-unité de TRPV1 de trois points de vue différents. D'après (Liao et al. 2013).

TRPV1 est le premier membre et le mieux caractérisé de la sous-famille des TRPV. Il a été découvert et cloné en 1997 (Michael J. Caterina et al. 1997). C'est un canal cationique non sélectif, avec une sélectivité plus importante pour le Ca^{2+} . Il est connu pour être activé par une température supérieure à 43°C , qui représente le seuil de la chaleur nociceptive chez l'Homme. TRPV1 est décrit comme un acteur majeur dans la thermo-sensation, la nociception, et l'inflammation (Danigo, Magy, et Demiot 2013). Depuis sa découverte, le canal TRPV1 est l'objet d'une recherche intensive, notamment comme cible thérapeutique dans le traitement des douleurs chroniques et inflammatoires. De nombreuses études ont mis en évidence une multitude de nouvelles fonctions et de localisations du canal TRPV1. Ainsi, il a récemment été découvert qu'il est exprimé dans différents organites cellulaires et permet de réguler plusieurs fonctions intracellulaires. L'identification et la caractérisation de ce canal comme première entité moléculaire de perception d'un stimulus douloureux ont valu le prix Nobel de Médecine 2021 au Pr. David Julius.

3.2. Structure de TRPV1 et perméabilité ionique

3.2.1. Structure

Le canal TRPV1 est un homotétramère : chaque sous-unité est codée par une séquence de 2514 nucléotides (ADNc) et aboutit à une protéine de 838 acides aminés et de 95 KDa (Michael J. Caterina et al. 1997). Globalement, la structure de TRPV1 respecte la structure générale des canaux TRP, avec une région N-terminale, une région transmembranaire et une région C-terminale.

La région N-terminale est composée de 6 séquences ankyrines répétées dont la structure ternaire forme 6 hélices α connectées (Figure 7) (Cao, Liao, et al. 2013). Le rôle de ces séquences ankyrines répétées n'est pas bien connu, mais il semble qu'elles soient importantes pour certaines interactions protéiques de régulation de TRPV1 (Rosenbaum et al. 2004; Lishko et al. 2007). La région N-terminale contient également un site de liaison à la CaM, situé entre les résidus F189 et E222 (Rosenbaum et al. 2004). On peut y trouver également des sites de phosphorylation par des protéines kinases, comme le résidu S116, important dans la régulation de TRPV1 (Bhave et al. 2002). Enfin, un « linker » connecte la région N-terminale à la région transmembranaire et permet l'assemblage des quatre sous-unités (Cao, Liao, et al. 2013).

La région transmembranaire de TRPV1 est constituée de 6 segments transmembranaires (S1 à S6). Les segments S5 et S6 bordent le pore du canal. Les segments S1 à S4 sont connectés aux segments S5 et S6 par un « linker », qui permet aux segments S1 à S4 de supporter le mouvement du linker et des segments S5 et S6 lors de l'ouverture du pore du canal (Figure 7) (Cao, Liao, et al. 2013).

La région C-terminale de TRPV1 est composée du domaine TRP, un domaine de 25 acides aminés hautement conservés chez la plupart des canaux TRP, impliqué dans la conformation et la structure du canal TRPV1 (Liao et al. 2013). On retrouve également plusieurs sites de phosphorylation par des protéines kinases ainsi qu'un site de liaison à la CaM et au PIP_2 (Cao, Liao, et al. 2013; Liao et al. 2013).

La détermination de sa structure tridimensionnelle en cryo-microscopie électronique a permis de mieux comprendre la conformation et les mécanismes d'activation de TRPV1 (Liao et al. 2013). Ces études ont montré que, malgré des séquences protéiques très différentes, sa structure est assez proche de certains canaux ioniques voltage-dépendants, comme le canal potassium Kv1.2 (Liao et al. 2013). Pourtant TRPV1 présente une faible dépendance au voltage, probablement en raison de la faible proportion de charges positives dans le segment

transmembranaire S4. En effet, TRPV1 ne possède qu'un seul résidu arginine au niveau de S4 (Baez-Nieto et al. 2013).

Le canal TRPV1 présente plusieurs sites de liaison pour des agonistes et des antagonistes. Par exemple, le site de liaison de la CAP, un agoniste de TRPV1, se trouve dans le segment transmembranaire S3 au niveau des résidus R491, Y511 et S512. La capsazépine (CPZ), un antagoniste, se fixe entre les résidus 481 et 550 (Jordt et Julius 2002).

Plusieurs variants d'épissage alternatif de TRPV1 ont été identifiés et présentent des structures différentes. Chez le rat, le variant VR.5'sv code pour un canal ionique tronqué dans la région N-terminale et non fonctionnel (Schumacher et al. 2000). De plus, ce variant agit comme dominant négatif lorsqu'il est coexprimé avec la version sauvage de TRPV1 dans un système hétérologue (Eilers et al. 2007). Chez la souris, TRPV1 β a été identifié comme un variant d'épissage alternatif avec une modification de la région N-terminale au niveau de l'exon 7. Ce variant est instable et ne forme pas de canal ionique fonctionnel (C. Wang et al. 2004). Chez l'homme, le variant TRPV1b a été identifié comme un variant d'épissage alternatif formant un canal ionique fonctionnel activable uniquement par la température (G. Lu et al. 2005).

3.2.2. Perméabilité ionique

TRPV1 est un canal ionique non sélectif qui présente une perméabilité équivalente pour les cations monovalents Na⁺, K⁺, Cs⁺, Li⁺ et Rb⁺ (Michael J. Caterina et al. 1997). Cependant, TRPV1 est plus sélectif pour les cations divalents, surtout le Ca²⁺. En effet, la perméabilité au Ca²⁺ est entre 5 et 10 fois plus importante que la perméabilité au Na⁺ lorsque TRPV1 est activé par la CAP (Ahern et al. 2005). La fraction de courant médiée par les ions Ca²⁺ lors d'une activation de TRPV1 à la CAP est d'environ de 4,3% dans les neurones sensoriels et de 3,5% dans un système hétérologue exprimant TRPV1 (Zeilhofer, Kress, et Swandulla 1997; Egan et Khakh 2004). TRPV1 est également perméable aux protons (P_{H+}~P_{Cs+}), ce qui pourrait expliquer l'acidification intracellulaire induite par l'activation de TRPV1 (Bevan, Quallo, et Andersson 2014). La sélectivité ionique de TRPV1 est assurée par un motif situé entre les segments transmembranaires S5 et S6 et très bien conservé entre TRPV1, TRPV2, TRPV3 et TRPV4 (Bevan, Quallo, et Andersson 2014). De plus, la perméabilité ionique de TRPV1 évolue au cours de son activation. En effet, lors d'une activation prolongée de TRPV1, le ratio de perméabilité entre le Ca²⁺ et le Na⁺ augmente progressivement. Le mécanisme responsable de la dilatation du pore n'est pas encore connu, mais il a été suggéré que son diamètre initial est de 10,1 Å et augmente à 12,3 Å au cours l'activation du canal (Chung, Güler, et Caterina 2008; Bevan, Quallo, et Andersson 2014). Par ailleurs, la conductance de TRPV1 activé par la CAP montre une rectification sortante avec une pente de conductance d'environ 100 pS³ pour des potentiels positifs (+60 mV) mais une pente de conductance plus faible (50 pS) pour des potentiels négatifs (Premkumar, Agarwal, et Steffen 2002).

3.3. Régulation de TRPV1

Le canal TRPV1 est un récepteur polymodal, ce qui signifie qu'il peut être activé par différents facteurs. Il est en effet sensible à un grand nombre de molécules, de facteurs protéiques et de paramètres physico-

³ picoSiemens

chimiques que l'on peut classer en fonction de leurs effets sur son activité. On retrouve d'abord les agonistes de TRPV1 qui interagissent directement avec le canal et provoquent son ouverture. Parallèlement, on retrouve des antagonistes qui bloquent le pore. Enfin, des régulateurs de TRPV1 interagissent avec le canal mais ne provoquent pas directement son ouverture. En effet, suite à leur interaction avec le canal TRPV1, ces régulateurs vont uniquement modifier la sensibilité chimique ou les propriétés biophysiques du canal. TRPV1 possède un fonctionnement que l'on peut qualifier d'allostérique.

3.3.1. Agonistes/Activateurs

a) Température

TRPV1 appartient aux thermo-TRP, il est donc sensible à la température, avec un seuil d'activation proche de 43-44°C (Michael J. Caterina et al. 1997). L'activation de TRPV1 par la température provoque son ouverture et une entrée de cations dans la cellule, majoritairement du Ca^{2+} . De nombreuses études ont cherché à déterminer la région responsable de la thermo-sensibilité de TRPV1 par des approches de mutagénèse. Les résultats sont assez divers et s'orientent vers la région C-terminale (Brauchi et al. 2006; 2007), alors que d'autres affirment que c'est le pore qui porte la thermo-sensibilité de TRPV1 (F. Yang et al. 2010; Valente et al. 2008). Globalement, le mécanisme responsable de la thermo-sensibilité des canaux ioniques reste assez controversé. En effet, les tenants de la thermo-sensibilité « locale » soutiennent l'existence d'une région protéique spécifique. A l'inverse, les défenseurs de la thermo-sensibilité « globale » défendent l'hypothèse que c'est la structure tridimensionnelle complète du canal qui procure la thermo-sensibilité (Arrigoni et Minor 2018). Concernant TRPV1, une étude récente a démontré que le pore du canal est impliqué, au moins en partie, dans sa thermo-sensibilité. En effet, des chimères ont été réalisées en transplantant des régions TM5 et TM6 (pore) du canal TRPV1 dans le canal potassique shaker, un canal ionique non thermo-sensible et structurellement très proche de TRPV1. Le canal K^+ chimérique résultant a acquis une sensibilité à la température comparable à celle de TRPV1 (F. Zhang et al. 2018).

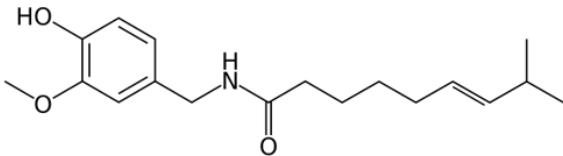
b) Protons

Le canal TRPV1 est également sensible aux protons, et cela de plusieurs manières. En effet, quand le pH s'acidifie ($\text{pH} < 6.0$), TRPV1 est directement activé par les protons (Tominaga et al. 1998). Cependant, à des valeurs plus neutres du pH ($6 < \text{pH} < 7$), les protons agissent plutôt comme un régulateur de TRPV1 (détaillé dans la section 2.3.3.b). De nombreux résidus ont été identifiés comme étant impliqués dans la sensibilité de TRPV1 aux protons, dont les résidus E600 et E648 (Grandl et al. 2010; Jordt et Julius 2002).

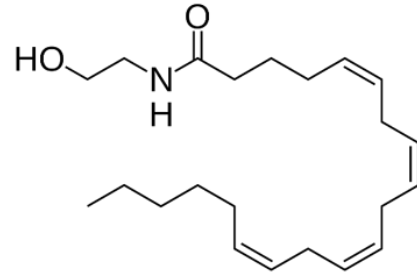
c) Voltage

Comme évoqué précédemment, le canal TRPV1 présente peu de résidus chargés positivement dans son domaine transmembranaire S4 contrairement aux canaux ioniques dépendants du potentiel. Cependant, il a été démontré que TRPV1 peut être activé par des variations de potentiel en absence d'agonistes (Vlachová et al. 2003). Cependant, il est difficile de considérer TRPV1 comme un canal ionique dépendant du potentiel, car sa sensibilité au potentiel est négligeable par rapport à d'autres canaux ioniques voltage dépendants. En revanche, plusieurs modèles suggèrent que sa voltage-dépendance est très importante pour son activation par d'autres agonistes (Voets 2012).

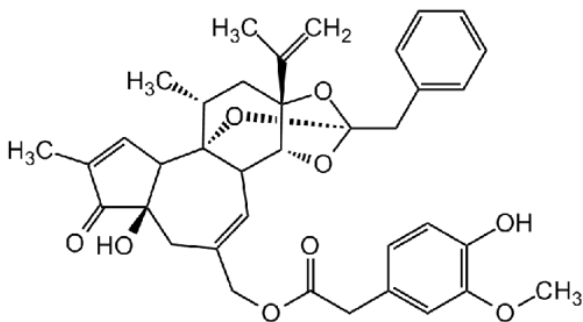
Capsaïcine



Anandamide



Résinifératoxine



12-HPETE

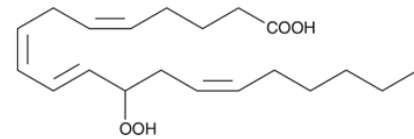


Figure 8 : Structure chimique des principaux agonistes de TRPV1

La capsaïcine et la résinifératoxine sont des molécules naturelles présentes dans les végétaux du genre *Capsicum* et dans *Euphorbia resinifera*, respectivement. L'anandamide et l'acide 12-hydroperoxyeicosa-tetraenoïque (12-HPETE) sont des agonistes endogènes synthétisés dans l'organisme.

d) Molécules pharmacologiques

Comme son nom l'indique, le canal TRPV1 est sensible à des molécules de la famille des vanilloïdes. L'agoniste de référence est la CAP, dont la formule chimique est N-(4-hydroxy-3-methoxybenzyl)-8-methylnon-6-encamide (Figure 8) (Michael J. Caterina et al. 1997). La CAP fait partie de la composition des piments, et est responsable de la sensation de chaleur et de brûlure buccale lorsque l'on en consomme, via l'activation de TRPV1. D'ailleurs la puissance d'un piment sur l'échelle de Scoville dépend majoritairement de la quantité de CAP qu'il contient. La CAP est composée d'un groupement vanillyle lié à une chaîne carbonée lipophile par un ester, ce qui lui permet de franchir les membranes cellulaires (Zhao et Tsang 2017). De nombreux résidus importants dans la liaison et l'effet de la CAP sur le canal TRPV1 ont été identifiés (Winter et al. 2013), ce qui a été confirmé avec la structure tridimensionnelle de TRPV1 (F. Yang et al. 2015). La CAP se lie dans un compartiment entre le segment S3 et S4 au niveau des résidus E571 et T551, induisant des modifications conformationnelles du canal, aboutissant à son ouverture (F. Yang et al. 2015). De nombreuses molécules homologues de la CAP activent le canal TRPV1, dont le nonivamide, appelé pseudoCAP, un analogue très proche de la CAP (Thomas et al. 2011). D'autres homologues sont aussi présents dans l'alimentation, notamment la pipérine, l'allicine et le gingerol (Nabissi et Santoni 2011). Des toxines comme la résinifératoxine (RTX), issue du cactus *Euphorbia resinifera*, sont capables d'activer TRPV1 à des concentrations de l'ordre du nanomolaire (Figure 8) (D. C. Brown 2016). Parmi les toxines capables d'activer TRPV1, on retrouve la famille des vanillotoxines (VaTxs) issues de venin de mygale *Psalmopoeus cambridgei* (Siemens et al. 2006), la RhTx issue de venin du mille-pattes à tête rouge de Chine, la Bmp01 issue de venin de scorpion (Geron, Hazan, et Priel 2017). Plus récemment, il a aussi été démontré que TRPV1 peut être activé par différents anesthésiques volatiles comme l'isoflurane, le desflurane et l'halothane (Garami et al. 2018; Kimball et al. 2015).

D'autres agonistes de TRPV1 sont considérés comme des agonistes endogènes, car ils sont naturellement présents dans l'organisme. Ces endovanilloïdes sont définis comme des composés formés par les cellules et libérés en quantités suffisantes pour activer TRPV1 par liaison directe. La libération et l'action des endovanilloïdes doit s'effectuer dans un court laps de temps pour permettre une régulation stricte de TRPV1 (Stelt et Marzo 2004). Actuellement, il a été identifié 3 classes d'endovanilloïdes : la N-Arachidonoyl dopamine (NADA), l'anandamide et les produits de dégradation de l'acide arachidonique (AA).

La NADA est l'activateur endogène de TRPV1 le plus puissant avec une EC₅₀ comparable à la CAP observée lors de plusieurs tests fonctionnels (Stelt et Marzo 2004). C'est un lipide retrouvé dans le système nerveux central dont le mécanisme de biosynthèse n'est pas connu. La N-oleoyldopamine, un homologue de la NADA, est également capable d'activer TRPV1 (Chu et al. 2003).

Plusieurs dérivés oxygénés de l'AA activent TRPV1 comme l'acide 12-hydroperoxyeicosa-tetraénoïque (12-HPETE) (Figure 8) (Hwang et al. 2000). Ces métabolites de l'AA sont produits par des lipoxygénases qui sont exprimées de manière assez ubiquitaire (Yoshimoto et Takahashi 2002). Le rôle physiologique de ces endovanilloïdes en lien avec TRPV1 n'est pas bien connu, en partie à cause de leur instabilité. Cependant, leur production est stimulée dans les neurones sensoriels lors d'une inflammation suggérant un rôle des endovanilloïdes dans le développement de l'inflammation (Shin et al. 2002).

L'anandamide est un lipide initialement caractérisé comme un agoniste des récepteurs aux cannabinoïdes (CBR) puis a été le premier ligand endogène de TRPV1 découvert (Figure 8) (P. M. Zygmunt et al. 1999).

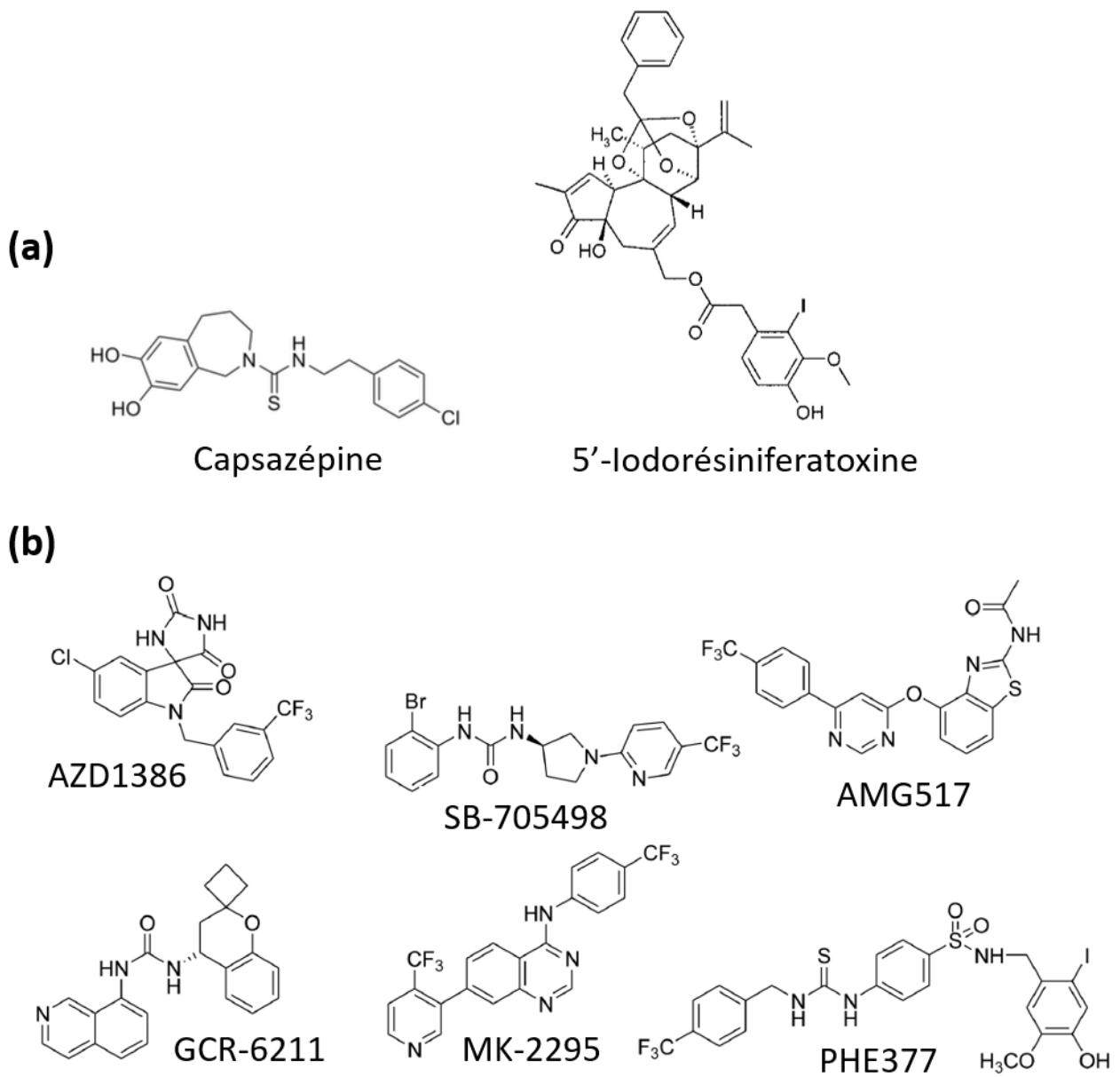


Figure 9 : Structure chimique d'antagonistes de TRPV1

(a) La capsazépine et la 5'-Iodorésiniferatoxine sont des molécules synthétiques dérivées de la capsaïcine et de la résiniferatoxine, respectivement. (b) Exemples d'antagonistes de TRPV1 inclus en essai clinique.

L'anandamide est produit de manière Ca^{2+} -dépendante par une phosphodiesterase et est retrouvé dans le système nerveux central, notamment dans l'hippocampe, la substance noire et le striatum. Il a également été retrouvé en grande quantité dans les neurones des ganglions de la racine dorsale (DRG) chez le rat (Ahluwalia et al. 2003). D'un point de vue pharmacologique, l'anandamide a une puissance et une efficacité assez faible sur TRPV1 comparé à la CAP, générant une activation variable de TRPV1 en fonction du tissu et du niveau d'expression de TRPV1 (Andersson et al. 2002). L'acide lysophosphatidique (LPA) est un autre lipide qui semble également activer TRPV1 (Nieto-Posadas et al. 2011). Pour le moment, très peu d'études se sont penchées sur le rôle physiologique de l'activation de TRPV1 par l'anandamide. Néanmoins, elle est impliquée dans la régulation de la transmission synaptique dans le gyrus denté (Chávez, Chiu, et Castillo 2010), et provoque un stress du réticulum endoplasmique et une cytotoxicité dans des cellules pulmonaires (Thomas et al. 2012).

En conclusion, les endovanilloïdes sont des agonistes endogènes de TRPV1 dont les rôles physiologiques sont mal connus. Cependant, il a été émise l'hypothèse qu'ils pourraient jouer un rôle important dans la signalisation calcique *via* leur interaction avec TRPV1 et les CBR (De Petrocellis et Di Marzo 2009).

3.3.2. Antagonistes/Inhibiteurs

Contrairement aux agonistes, les antagonistes de TRPV1 sont majoritairement des composés de synthèse. Développée en 1990, la CPZ est le premier antagoniste de TRPV1 (Figure 9) (Urban et Dray 1991). C'est un analogue structural de la CAP qui présente le même site de liaison à TRPV1, ce qui en fait un antagoniste compétitif. De la même manière, la 5'-iodoRTX est un analogue structural de la RTX et un antagoniste compétitif de TRPV1 (Figure 9) (Wahl et al. 2001). Ces deux antagonistes, la CPZ et la 5'-iodoRTX sont les antagonistes de TRPV1 les plus couramment utilisés. Cependant, il a été démontré par la suite que la CPZ n'est pas un antagoniste spécifique de TRPV1 puisqu'elle inhibe également TRPM8, des récepteurs nicotiniques et des canaux calciques voltage-dépendants (Szallasi et al. 2007; H. Xing et al. 2007).

Les antagonistes de TRPV1 suscitent beaucoup d'intérêt d'un point de vue clinique. En effet, TRPV1 joue un rôle dans la nociception, et ses antagonistes ont un potentiel analgésique. Ainsi, depuis une vingtaine d'années, les industries pharmaceutiques ont développé de nombreux antagonistes de TRPV1 (Tabrizi et al. 2017). Plusieurs d'entre eux ont fait ou font encore l'objet d'essais cliniques (Figure 9). Certaines molécules ont montré des résultats encourageants comme le SB705498, qui a permis de réduire des douleurs migraineuses, de réduire des épisodes de toux chroniques et de réduire des rhinites (Tabrizi et al. 2017). Cependant, aucun antagoniste n'a atteint la phase III d'un essai clinique en raison d'effets secondaires comme l'hyperthermie ou des sensations de brûlure. Ainsi, le développement de nouveaux antagonistes de TRPV1 se poursuit afin d'obtenir un effet analgésique sans effet indésirable. De plus, de nouvelles stratégies cliniques sont en développement, notamment en essayant d'administrer localement le traitement pour cibler spécifiquement les pathologies et éviter des effets secondaires systémiques (Tabrizi et al. 2017).

3.3.3. Régulateurs

En théorie, les régulateurs de TRPV1 peuvent être définis comme des modulateurs allostériques qui, en interagissant avec TRPV1, n'aboutissent pas directement à l'ouverture du canal mais modifient sa sensibilité à d'autres agonistes. Ces facteurs peuvent être de natures très différentes : des lipides, des ions, des protéines ou d'autres types de molécules.

a) Lipides

PIP₂ est un phosphoinositide membranaire. Il est clivé par la phospholipase C pour générer l'inositol trisphosphate (IP₃) et du diacylglycérol (DAG). PIP₂ est décrit comme un régulateur important de l'activité de TRPV1, même si les effets de son interaction avec TRPV1 sont controversés. En effet, il a initialement été proposé que PIP₂ inhibe l'activité de TRPV1 (Prescott et Julius 2003; Cao, Cordero-Morales, et al. 2013). Puis, d'autres études ont montré que l'interaction de PIP₂ avec TRPV1 dans la région C-terminale est indispensable à son activité (Brauchi et al. 2007; Morales-Lázaro, Simon, et Rosenbaum 2013). Par ailleurs, le cholestérol est un lipide qui régule l'activité de nombreux canaux ioniques (Levitan et al. 2010). Il semble également impliqué dans plusieurs processus de régulation de TRPV1, même si peu d'études ont été réalisées sur ce sujet (Morales-Lázaro et Rosenbaum 2019). Dans ce sens, une déplétion de cholestérol membranaire des neurones de DRG provoque une internalisation du canal (M. Liu et al. 2006), et l'ajout de cholestérol inhibe l'activité de TRPV1 (Picazo-Juárez et al. 2011). Enfin, les résolvines sont des molécules dérivées d'acides gras polyinsaturés, qui sont impliquées dans les processus de rétablissement post-inflammatoire (Weylandt et al. 2012). Il a été démontré que ces résolvines ont un effet inhibiteur sur TRPV1. En effet, elles inhibent la douleur induite par une administration intrathécale de CAP (Z.-Z. Xu et al. 2010; C.-K. Park et al. 2011).

b) Ions

Comme évoqué précédemment, TRPV1 présentent des sites de liaisons aux protons. Ils sont capables de l'activer lors d'une acidose (pH < 6). En revanche, pour des valeurs de pH plus neutre (6 < pH < 7), les protons agissent uniquement comme des modulateurs de l'activité de TRPV1 (Morales-Lázaro, Simon, et Rosenbaum 2013). De fait, pour un pH de 6,4, les protons sensibilisent TRPV1 et diminuent le seuil d'activation d'autres activateurs comme la CAP ou la température (Tominaga et al. 1998). Le Ca²⁺ joue également un rôle très important dans la régulation de l'activité de TRPV1. En effet, l'entrée de Ca²⁺ induite par son activation provoque un rétrocontrôle négatif, qui désensibilise TRPV1 afin de stopper l'entrée de Ca²⁺ (Rosenbaum et al. 2004). Par ailleurs, le Ca²⁺ entrant active la CaM qui se lie alors à TRPV1 dans la région N-terminale ou C-terminale afin d'inhiber son activité (E. Cao, Liao, et al. 2013). Plus généralement, le Ca²⁺ tout comme le Mg²⁺ sont des cations impliqués dans la régulation des canaux TRP (Dimke, Hoenderop, et Bindels 2011). Ces deux cations sensibilisent TRPV1 et une forte concentration extracellulaire de ces cations (>10 mM) peut directement activer TRPV1 (Ahern et al. 2005). Le Na⁺ semble également jouer un rôle très important dans la régulation de son activité. Le canal TRPV1 présente des sites de liaison au Na⁺ extracellulaire qui doivent être occupés pour que le canal reste fermé à des températures physiologiques (Jara-Oseguera, Bae, et Swartz 2016). Ces sites de liaison au Na⁺ semblent jouer un rôle physiologique important dans l'activation du canal par les protons (Jara-Oseguera, Bae, et Swartz 2016).

c) Interactions protéiques

La phosphorylation des protéines est un mécanisme de régulation ubiquitaire bien connu. TRPV1 présente de multiples sites de phosphorylation et son activité est sensibilisée et régulée par des événements de phosphorylation par des protéines kinases A (PKA) sur les résidus S116 et T370, des protéines kinases C (PKC) sur les résidus S502 et S800, des protéines kinases Src et des protéines kinases Ca²⁺/Calmoduline-dépendante

(CaMKII) (Premkumar et Ahern 2000; Bhave et al. 2003; Jung et al. 2004; Cesare et al. 1999). Il a notamment été démontré que les phosphorylations de TRPV1 par les PKA ou les PKC permettent de le sensibiliser à d'autres activateurs comme la température, la CAP ou les protons (Petrocellis et al. 2001; Ahern et Premkumar 2002; Vriens, Appendino, et Nilius 2009). Récemment, il a été rapporté que la fonction de TRPV1 est fortement modulée par la phosphorylation médiée par la kinase dépendante de la cycline 5 (Cdk5) (Jendryke et al. 2016). Le mécanisme de sensibilisation de TRPV1 par les phosphorylations est décrit comme une réduction du seuil d'activation au potentiel et permet une activation de TRPV1 à un potentiel membranaire physiologique (Bevan, Quallo, et Andersson 2014). De plus, la désensibilisation de TRPV1 induite par des activations répétées ou prolongées par des agonistes, est provoquée par la déphosphorylation par la calcineurine, une phosphatase Ca^{2+} -dépendante (Jung et al. 2004; Mohapatra et Nau 2005; Ruparel et al. 2008).

d) Autres médiateurs de TRPV1

De nombreux autres médiateurs chimiques ont été impliqués dans la sensibilisation de TRPV1 notamment lors d'une inflammation. Ainsi, la bradykinine, la sérotonine, des chimiokines, l'histamine ou le Nerve Growth Factor (NGF) sont décrits comme des régulateurs positifs de TRPV1 (Gouin et al. 2017). Par exemple, l'ATP est un médiateur chimique important impliqué dans la nociception, et est libéré par les tissus durant le processus d'inflammation (Bours et al. 2006). L'ATP a été décrit comme une molécule régulatrice de TRPV1, capable de le sensibiliser directement par une liaison dans la région N-terminale, mais aussi indirectement grâce à l'activation de la protéine kinase C (PKC) et de la phospholipase C (PLC) (Tominaga, Wada, et Masu 2001; Lishko et al. 2007). Par ailleurs, de manière Ca^{2+} -dépendante et *via* des phénomènes de phosphorylations/déphosphorylations, la bradykinine, la sérotonine et le NGF augmentent les courants induits par l'activation de TRPV1 par la CAP et la température (X. Zhang, Li, et McNaughton 2008; Sugiura et al. 2002).

En résumé, étant un récepteur polymodal, le canal TRPV1 est activé et régulé par de nombreux facteurs endogènes et exogènes de natures très différentes, tels que des protéines, des ions, des paramètres physico-chimiques et des lipides. Tous ces facteurs peuvent interagir avec TRPV1 simultanément et aboutissent à une régulation très complexe de son activité. D'ailleurs, pour tous ces facteurs, un effet spécifique d'activation ou de régulation de TRPV1 est souvent difficile à déterminer. En effet, il est difficile de prendre en compte l'ensemble des paramètres et des facteurs qui convergent vers la régulation de TRPV1 *in vitro* ou *in vivo*. Et bien souvent, ce sont les effets combinés de plusieurs facteurs qui modulent son activité globale.

3.4. Localisation de TRPV1

Depuis sa découverte, l'expression de TRPV1 a été largement étudiée dans différents modèles, et de nombreuses études ont été réalisées afin de déterminer sa localisation. Ces connaissances sur la distribution et la localisation du canal ont permis de mieux appréhender ses fonctions, dans des conditions physiologiques et pathologiques.

3.4.1. Distribution tissulaire

Initialement, le canal TRPV1 a été découvert et cloné à partir des neurones de DRG (Michael J. Caterina et al. 1997). Depuis il a été montré qu'il est fortement exprimé dans le système nerveux périphérique (SNP) notamment dans les neurones sensoriels somatiques et viscéraux, qui forment des fibres nerveuses définies

comme fibre C ou A δ , et qui se projettent dans la plupart des organes et des tissus. Ainsi on retrouve TRPV1 dans les DRG et le ganglion trigéminal (Helliwell et al. 1998). Il est également présent dans le noyau du tractus solitaire (Tominaga et al. 1998). TRPV1 est aussi exprimé dans le système nerveux central (SNC), notamment dans l'hypothalamus, le cervelet, l'hippocampe et le cortex (Bevan, Quallo, et Andersson 2014). Dans le SNC, il est exprimé tant au niveau post-synaptique et que pré-synaptique (Edwards 2014).

TRPV1 est également présent dans des tissus non neuronaux. Par exemple, TRPV1 est exprimé dans les kératinocytes (Inoue et al. 2002; Southall et al. 2003), dans les cellules musculaires lisses vasculaires (Kark et al. 2008; Cavanaugh et al. 2011) et dans les cellules endothéliales (D. Yang et al. 2010). L'expression de TRPV1 a aussi été trouvée dans d'autres tissus non neuronaux, mais cette expression est souvent simplement caractérisée au niveau de ses transcrits mais non confirmée au niveau protéique (Fernandes, Fernandes, et Keeble 2012). Cependant, des études fonctionnelles d'imagerie calcique ont prouvé la présence de TRPV1 dans des tissus non neuronaux. Par exemple, il a été montré que TRPV1 est présent et fonctionnel dans les adipocytes (L. L. Zhang et al. 2007).

3.4.2. Localisation intracellulaire

Comme décrit précédemment, TRPV1 est exprimé dans des tissus neuronaux et non neuronaux. Cependant sa localisation cellulaire ne se limite pas uniquement au niveau de la membrane plasmique puisque TRPV1 est exprimé dans les membranes d'organites cellulaires (Zhao et Tsang 2017). Dans des cellules COS-7, surexprimant TRPV1, on le retrouve dans le réticulum endoplasmique (RE) (Olah et al. 2001). De plus, dans des cellules HEK 293 surexprimant TRPV1, celui-ci est présent à la fois dans la membrane plasmique, et dans des structures intracellulaires (Hellwig et al. 2005; W. Cheng et al. 2007; J. Liu et al. 2015), comme dans des cellules HeLa (Ahn et al. 2014). Par la suite, l'utilisation des techniques d'immunomarquage et de fractionnement cellulaire a permis de démontrer que TRPV1 est localisé dans le RE de cellules Sf9 d'insectes transfectées (Wisnoskey, Sinkins, et Schilling 2003), des neurones de DRG de rat (M. Liu et al. 2003) et de cellules H4-IIE transfectées (Castro et al. 2009). De plus, TRPV1 est également présent le réticulum sarcoplasmique (SR) de muscle squelettique chez le rat et la souris (Xin et al. 2005; Lotteau et al. 2013). Par ailleurs, TRPV1 a été associé à l'appareil de Golgi dans les corps cellulaires des neurones de DRG (A. Guo et al. 1999) et semble être localisé dans les lysosomes de cellules microgliales (Miyake et al. 2015). Enfin, TRPV1 a été retrouvé dans les fractions purifiées de mitochondries provenant de tissu cardiaque (Lang et al. 2015). La présence de TRPV1 dans les mitochondries a aussi été observée dans les cellules microgliales et les cellules H9C2 (Luo et al. 2012; Miyake et al. 2015).

3.4.3. Adressage

Comme toutes les protéines membranaires, TRPV1 est traduit dans le réticulum endoplasmique et est transféré à l'appareil de Golgi afin de subir des modifications post-traductionnelles avant d'être adressé à la membrane plasmique par des vésicules intracellulaires. Il peut aussi être internalisé dans des vésicules intracellulaires afin d'être dégradé ou en attente d'un ré-adressage à la membrane (Zhao et Tsang 2017; Ferrandiz-Huertas et al. 2014). Son adressage à la membrane plasmique est un processus régulé et modifié dans différentes conditions, notamment durant l'inflammation, ce qui contribue à augmenter la sensibilité des neurones sensoriels (Bevan, Quallo, et Andersson 2014). En effet, certains médiateurs chimiques de l'inflammation

favorisent l'adressage de TRPV1 à la membrane plasmique, tels que le NGF, l'ATP ou IGF-I (Camprubí-Robles, Planells-Cases, et Ferrer-Montiel 2009). Les mécanismes d'adressage de TRPV1 sont peu connus, mais certaines protéines impliquées dans celui-ci ont été identifiées. Par exemple, AKAP79/150, dont la surexpression augmente l'adressage de TRPV1 à la membrane plasmique (X. Zhang, Li, et McNaughton 2008). Cdk5 est aussi impliquée dans l'adressage de TRPV1 *via* la phosphorylation de KIF13B qui se lie ensuite à TRPV1 afin de promouvoir son transport intracellulaire par des protéines cargo (B.-M. Xing et al. 2012). La sous-unité des canaux potassium Kvβ2 semble également être impliquée dans l'adressage de TRPV1 en exerçant un rôle de chaperonne favorisant son adressage à la membrane plasmique et sa sensibilité à la CAP (Bavassano et al. 2013). Hormis les interactions protéiques, certaines modifications post-traductionnelles pourraient aussi jouer un rôle dans cet adressage. Même si la N-glycosylation de TRPV4 ou de TRPM5 entraîne leur accumulation à la membrane plasmique, la N-glycosylation de TRPV1 n'a pas eu ce même effet (Hongshi Xu et al. 2006; Erler et al. 2006; Veldhuis et al. 2012).

3.5. Fonctions de TRPV1

De nombreuses fonctions ont été attribuées à TRPV1 en fonction du tissu et du type cellulaire dans lequel il est exprimé. Comme décrit précédemment, TRPV1 est présent dans les cellules excitables du système nerveux et dans des cellules non excitables. Cette hétérogénéité de distribution tissulaire contribue à la grande variabilité des fonctions de TRPV1, dont certaines seront présentées ci-dessous. De plus, la localisation de TRPV1 non seulement à la membrane plasmique mais aussi au niveau intracellulaire diversifie les mécanismes d'actions potentiels et les fonctions de TRPV1.

3.5.1. Dans les tissus neuronaux

a) Nociception et inflammation

TRPV1 est largement exprimé dans le système nerveux périphérique, notamment dans les neurones de DRG et des ganglions trigéminaux. Comme décrit précédemment, TRPV1 est activé par une température élevée (>43°C) ou par des agonistes comme la CAP, et induit une entrée de cations qui dépolarise les membranes, favorisant la genèse de potentiels d'action par l'ouverture de canaux Na⁺. C'est ce qui est à l'origine d'une activation des nocicepteurs, provoquant une sensation de brûlure (Szolcsanyi 1977; Woolf et Salter 2000). Ainsi, étant largement exprimé dans les neurones sensoriels, notamment les fibres C, TRPV1 est décrit comme un acteur majeur de la douleur induite par la chaleur nociceptive et de la douleur inflammatoire. Ainsi, la sensation de brûlure induite par des températures élevées est réduite chez les souris TRPV1^{-/-} (Davis et al. 2000; Michael J. Caterina et al. 2000; Woodbury et al. 2004). De plus, les essais cliniques avec des antagonistes de TRPV1 ont montré que l'inhibition de TRPV1 entraîne une baisse de la sensibilité à la chaleur et à la douleur chez l'homme (R. Eid 2011; Rowbotham et al. 2011).

Par ailleurs, TRPV1 semble exercer un rôle très important dans l'hyperalgésie inflammatoire. En effet, les souris TRPV1^{-/-} ne présentent pas d'hyperalgésie durant une inflammation contrairement aux souris sauvages (Michael J. Caterina et al. 2000; Davis et al. 2000; Bölcskei et al. 2005). Ce phénomène est expliqué par les résultats *in vitro* qui montrent que les médiateurs chimiques de l'inflammation sensibilisent TRPV1 en réduisant son seuil d'activation à la température (Hung et Tan 2018; Tominaga, Wada, et Masu 2001). En effet, les médiateurs chimiques de l'inflammation activent des récepteurs couplés aux protéines G et entraînent l'activation

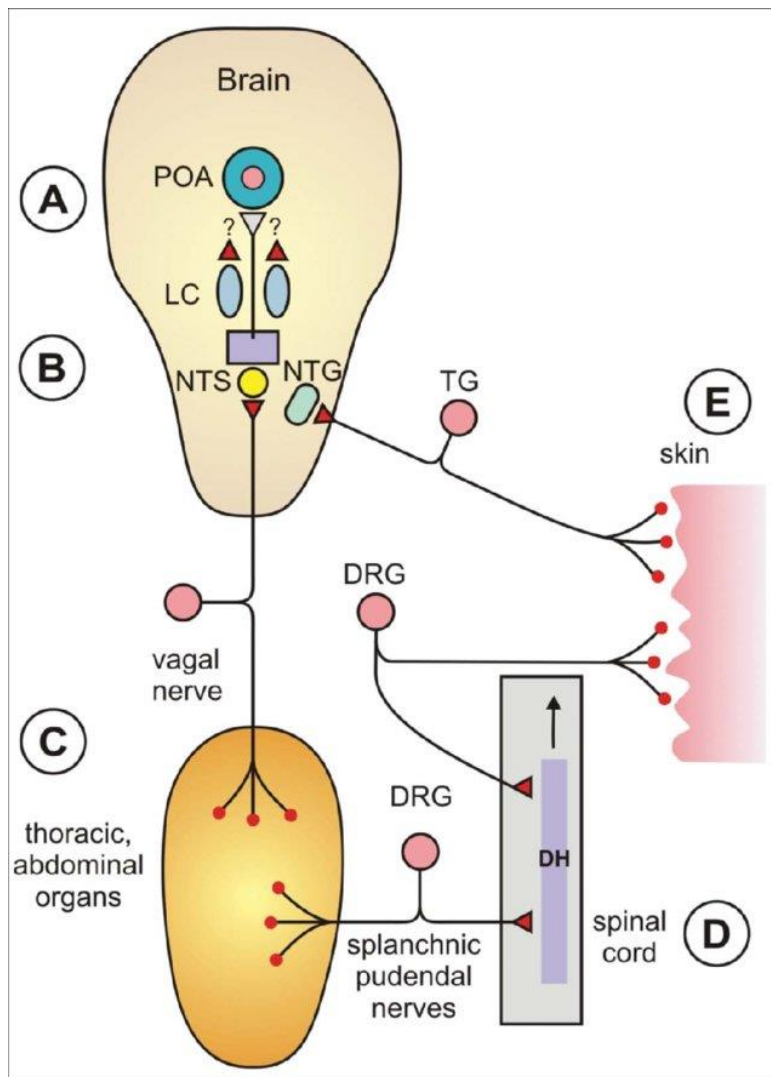


Figure 10 : Représentation schématique du contrôle de la thermorégulation par TRPV1 *via* des neurones sensibles à la chaleur.

Au-delà des thermorécepteurs situés dans le cerveau et en particulier dans la POA (A), les récepteurs viscéraux thoraciques et abdominaux et les terminaisons présynaptiques centrales des neurones sensoriels sensibles à la capsaïcine des nerfs vagues et splanchniques pourraient également jouer un rôle important dans le contrôle de la température corporelle centrale (B, C, D). Les changements de la température ambiante influencent les récepteurs cutanés sensibles à la chaleur (E), mais leurs terminaisons centrales dans la corne dorsale de la moëlle épinière (D) ou dans le noyau caudal du nerf trijumeau (NTG) (B) sont également des sites thermosensibles qui peuvent contribuer à influencer la température corporelle centrale. Parmi les noyaux cérébraux extra-hypothalamiques qui peuvent participer à la sensation de chaleur, on trouve le LC mais également la matière grise périaqueducule.

(A) Cerveau et tronc cérébral. POA : aire pré-optique médiane de l'hypothalamus, LC : locus coeruleus. (B) NTS: noyau du tractus solitaire; NTG noyau caudal du nerf trijumeau. (C) Thermorécepteurs des organes thoraciques et abdominaux. (D) Moëlle épinière, DH : corne dorsale ; (E) Peau avec récepteurs sensibles à la chaleur. TG : ganglion trijumeau, DRG : ganglion de la racine dorsale. En rose : neurones exprimant TRPV1. Cercles rouges : récepteurs sensoriels à la chaleur et sensibles à la CAP ; triangles rouges : terminaisons nerveuses centrales sensibles à la CAP et à la chaleur. D'après (Szolcsanyi, 2015)

des protéines kinases A et C, et la phosphorylation de TRPV1 par ces protéines kinases permet d'augmenter sa sensibilité durant l'inflammation (Bhave et al. 2003; Hung et Tan 2018). En parallèle, lors d'une inflammation, la sensibilisation de TRPV1 est provoquée par l'hydrolyse de PIP₂ par la phospholipase C (Hung et Tan 2018). D'autres mécanismes responsables de la régulation de l'activité de TRPV1 durant l'inflammation ont été identifiés. Par exemple, le NGF est un polypeptide qui active un récepteur à tyrosine kinase (trkA) afin d'augmenter l'expression de TRPV1 (Silos-Santiago et al. 1995; Lewin, Rueff, et Mendell 1994; Hung et Tan 2018). De plus, il a été montré que le NGF augmente l'adressage de TRPV1 à la membrane plasmique, augmentant ainsi son activité (Stein et al. 2006; X. Zhang, Huang, et McNaughton 2005).

En résumé, durant une inflammation, les médiateurs chimiques libérés augmentent l'activité de TRPV1 en augmentant son expression et son adressage à la membrane, et le sensibilisent en activant différents régulateurs comme des protéines kinases ou la phospholipase C. Cependant, en plus d'être la cible des médiateurs chimiques de l'inflammation, TRPV1 est aussi impliqué dans la libération Ca²⁺-dépendante de neuropeptides pro-inflammatoires, comme la substance P ou de la neurokinine A. Ces neuropeptides agissent sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les cellules immunitaires, et provoquent une cascade d'événements de l'inflammation neurogène tels que la vasodilatation, la libération de cytokines et l'hyperalgésie (Frias et Merighi 2016; Hung et Tan 2018).

b) Thermorégulation

Plusieurs éléments semblent indiquer que TRPV1 est impliqué dans la régulation de la température corporelle. Etant sensible à la température, TRPV1 est un candidat moléculaire idéal pour jouer le rôle de thermo-senseur. De plus, depuis plusieurs décennies il est connu que la CAP provoque des perturbations de la température corporelle. L'administration de CAP dans l'hypothalamus induit notamment une hypothermie par l'activation des neurones de l'aire pré-optique médiane (Jancsó-Gábor, Szolcsanyi, et Jancso 1970). De plus, l'administration de certains antagonistes de TRPV1 provoque une hyperthermie (Gavva 2008; Krarup et al. 2013). Les mécanismes responsables de l'hyperthermie induite par l'inhibition de TRPV1 ne sont pas connus mais certaines hypothèses ont été évoquées. Il a été observé que les antagonistes de TRPV1 induisant une hyperthermie ont la capacité d'inhiber l'activation de TRPV1 par les protons, alors que les antagonistes n'induisant pas d'hyperthermie n'inhibent pas l'activation de TRPV1 par les protons (Kort et Kym 2012; Reilly et al. 2012).

Cependant, le rôle de TRPV1 dans la thermorégulation est remis en question, car les souris TRPV1^{-/-} présentent une température corporelle normale (Tóth et al. 2011; Szelenyi et al. 2004). De plus, en raison de son seuil d'activation à une température bien supérieure à la température corporelle, l'implication de TRPV1 dans la thermorégulation a été mise de côté au profit d'autres thermo-TRP, comme TRPV3 et TRPV4 dont les seuils d'activation (>32°C et >27°C respectivement) correspondent plus à la température corporelle (S. M. Huang et al. 2011). Néanmoins, un nouveau concept de thermorégulation qui intègre TRPV1 a été proposé (Romanovsky et al. 2009; Szolcsányi 2015) (Figure 10). Selon cette hypothèse, TRPV1 est exprimé dans deux populations de neurones : les neurones sensoriels périphériques qui innervent les viscères, et les neurones sensoriels centraux de l'hypothalamus. Chacune de ces deux populations de neurones présente des connexions avec des voies efférentes qui contrôlent les acteurs de la thermorégulation, les thermo-effecteurs. D'un côté, TRPV1 présent dans l'hypothalamus est inactif en condition normale. D'un autre côté, TRPV1 présent dans les viscères est actif dans des conditions normales par l'action de nombreux agonistes endogènes et inhibe la thermogénèse dans

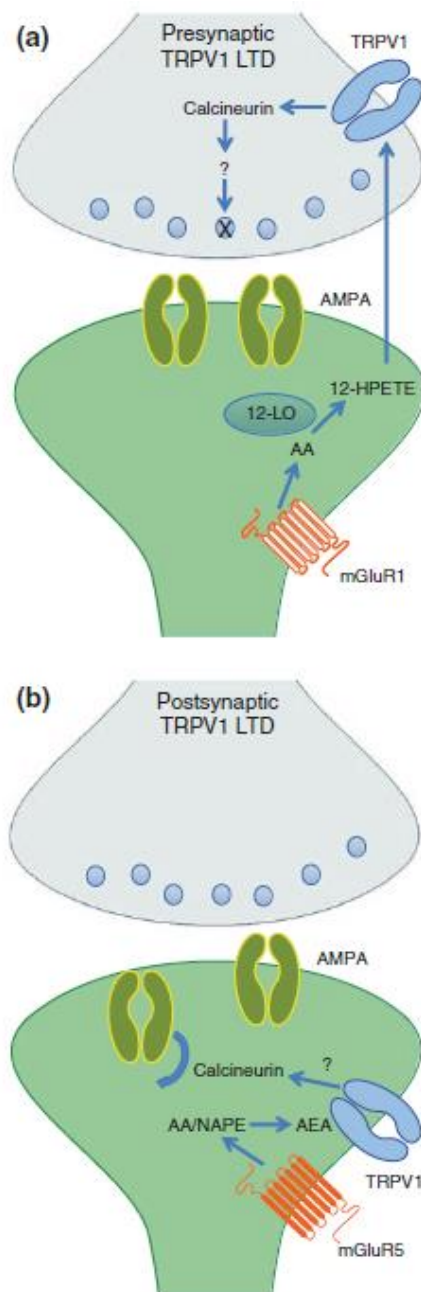


Figure 11 : Représentation schématique de l'implication de TRPV1 dans la dépression synaptique à long terme (LTD).

(a) Au niveau pré-synaptique, la LTD est médiée par une réduction de la libération de neurotransmetteurs (glutamate). Le 12-HPETE est formé au niveau post-synaptique par la 12-lipoxygénase à partir de l'acide arachidonique (AA) et active TRPV1 au niveau pré-synaptique. L'entrée de Ca^{2+} induit par l'activation de TRPV1 permet l'activation de la calcineurine, ce qui aboutit à une réduction de la libération du glutamate par un mécanisme encore inconnu.

(b) Au niveau post-synaptique, la LTD résulte de l'internalisation des récepteurs du glutamate de type AMPA. L'activation postsynaptique des mGluR5 provoque la formation d'anandamide (AEA) à partir du N-arachidonoyl phosphatidyléthanolamine (NAPE) qui active TRPV1. Ce qui permet l'activation de la calcineurine et aboutit à l'internalisation des récepteurs AMPA. D'après (Edwards 2014).

le tissu adipeux brun ainsi que la vasoconstriction. Ainsi, en condition normale, TRPV1 est actif dans les neurones sensoriels viscéraux et contribue à réduire la température corporelle *via* l'action d'agonistes chimiques endogènes. TRPV1 n'agirait donc pas comme un thermo-senseur mais plutôt comme un chimio-senseur. Cette hypothèse permet d'expliquer les effets contradictoires de l'administration d'agonistes et d'antagonistes de TRPV1 sur la température corporelle. En effet, les agonistes de TRPV1 activeraient uniquement TRPV1 dans l'hypothalamus et provoqueraient d'abord une hypothermie ponctuelle puis une hyperthermie chronique à de fortes doses en désensibilisant les neurones exprimant TRPV1 dans l'hypothalamus. Enfin, les antagonistes de TRPV1 pourraient uniquement inhiber TRPV1 dans les viscères et provoquer une hyperthermie en levant l'inhibition de la thermogénèse du tissu adipeux brun (Romanovsky et al. 2009). Cependant, face à cette hypothèse, de nombreuses questions subsistent et le rôle précis de TRPV1 dans la thermorégulation reste donc à éclaircir.

c) Transmission synaptique

TRPV1 est exprimé dans les neurones du SNC au niveau pré- et post-synaptique, mais plus faiblement que dans le SNP. Malgré cette faible expression, de nombreux résultats démontrent que TRPV1 est fonctionnel dans le SNC. Ainsi, TRPV1 serait impliqué dans la plasticité synaptique de l'hippocampe. Essentielle à l'apprentissage, cette fonction permet de favoriser ou de réprimer certaines connexions neuronales en adaptant le nombre de récepteurs présents au niveau post-synaptique ou en modifiant la quantité de neurotransmetteurs libérés au niveau pré-synaptique. Cette plasticité synaptique dépend majoritairement des récepteurs au N-méthyl-D-aspartate (NMDA) qui provoque la dépression à long terme (LTD) ou la potentialisation à long terme (LTP) des synapses (Edwards 2014). D'une part, il a été montré que l'inactivation génétique de TRPV1 réduit la LTP, alors que l'activation de TRPV1 par des agonistes facilite la LTP dans la région de la corne d'Ammon 1 (CA1) de l'hippocampe (Marsch et al. 2007; H.-B. Li et al. 2008). Par ailleurs, TRPV1 est directement impliqué dans la plasticité des interneurons inhibiteurs GABAergiques connectés aux cellules pyramidales de la région CA1 de l'hippocampe. L'activation des récepteurs glutamatergiques métabotropiques (mGluR1) post-synaptiques induit la production de 12-HPETE qui, une fois transporté au niveau pré-synaptique, active TRPV1 et inhibe la libération de neurotransmetteurs (Figure 11) (Gibson et al. 2008). Ainsi, la LTD induite par TRPV1 dans les interneurons inhibiteurs innervant les neurones pyramidaux CA1 permet de favoriser la LTP. De plus, il a été montré que l'administration de picrotoxine, un antagoniste des récepteurs GABA_A, chez des souris TRPV1^{-/-}, restaure la LTP dans les cellules pyramidales de la région CA1 (T. E. Brown et al. 2013). Ainsi, TRPV1 modulerait la LTP dans les cellules pyramidales de la région CA1 dans l'hippocampe, *via* la plasticité synaptique des interneurons. D'autre part, il a été montré que TRPV1 est également impliqué dans la LTD, notamment dans le gyrus denté. L'activation post-synaptique de mGluR5 provoque la production d'anandamide qui active TRPV1 puis aboutit à l'internalisation des récepteurs AMPA, *via* la voie de la calcineurine (Figure 11) (Chávez, Chiu, et Castillo 2010). De plus, TRPV1 est impliqué dans la plasticité synaptique dans d'autres régions du SNC comme la substance noire, le noyau accumbens et l'amygdale (Edwards 2014). Enfin, TRPV1 peut améliorer la neurotransmission glutamatergique *via* l'augmentation de Ca²⁺ au niveau pré-synaptique (Marinelli et al. 2007; Musella et al. 2009).

D'un point de vue comportemental, l'activation de TRPV1 dans le SNC a été associée à des comportements de stress et d'anxiété (Ho, Ward, et Calkins 2012), et dans ce sens son inactivation génétique ou l'injection

intrapéritonéale d'antagonistes de TRPV1 provoque une réduction de l'anxiété chez la souris (Marsch et al. 2007; Santos, Stern, et Bertoglio 2008).

3.5.2. Dans les tissus non neuronaux

TRPV1 est également exprimé dans les tissus non neuronaux et semble avoir des fonctions différentes de celles du système nerveux. Certains effets observés liés à TRPV1 dans des tissus non neuronaux peuvent être influencés par le système nerveux, ce qui rend complexe l'évaluation de la fonction de TRPV1 dans les tissus non neuronaux *in vivo* (Fernandes, Fernandes, et Keeble 2012). Néanmoins, plusieurs études suggèrent des implications très diverses de TRPV1 dans les tissus non neuronaux dont seulement certaines sont évoquées ci-après.

a) Vasculaire

TRPV1 joue un rôle important dans la régulation du système vasculaire. Il est en effet impliqué dans la régulation du tonus vasculaire, de la pression artérielle et dans les pathologies cardiovasculaires (Robbins, Koch, et Rubinstein 2013; Zholos et al. 2011). La fonction vasculaire de TRPV1 est en partie due à son activité stimulée par les nerfs périsvasculaires. Son activation dans les neurones sensoriels provoque une libération de CGRP, qui induit une vasodilatation et une chute de la pression artérielle (P. M. Zygmunt et al. 1999; M.-J. Zhang et al. 2015) et ceci par une entrée de Ca^{2+} , qui active la calcineurine et permet la déphosphorylation du co-facteur de transcription régulé par CREB1 (CRTCI) provoquant la transcription du CGRP (Riera et al. 2014).

TRPV1 est également exprimé dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses vasculaires pour réguler le tonus vasculaire. Par exemple, son activation dans les cellules musculaires lisses vasculaires provoque une vasoconstriction (Cavanaugh et al. 2011), alors que l'activation de TRPV1 dans les cellules endothéliales provoque une libération d'oxyde nitrique (NO) et contribue à la vasorelaxation (D. Yang et al. 2010). Par ailleurs, il a aussi été démontré que TRPV1 permet de réguler la différenciation cardiaque de cellules souches embryonnaires de souris (Qi et al. 2015).

b) Métabolisme énergétique

Plusieurs études suggèrent que TRPV1 joue également un rôle dans le métabolisme énergétique. Dans ce sens, TRPV1 est impliqué dans la sécrétion d'insuline et dans les diabètes de type I et II (Christie et al. 2018). Des données épidémiologiques montrent que la consommation chronique de CAP ou de capsiate, un analogue de la CAP, provoque une réduction de l'incidence de l'obésité chez l'Homme (Shi et al. 2017), et permet de réduire le gain de poids induit par un régime riche en graisse chez la souris (L. L. Zhang et al. 2007; Shen et al. 2017). D'une part, TRPV1 pourrait contribuer à réduire la prise alimentaire en régulant la sécrétion d'hormones de la satiété comme la leptine ou le GLP-1, car la consommation de CAP permet d'augmenter le taux plasmatique postprandial de GLP-1 (Smeets et Westerterp-Plantenga 2009). De plus, les souris TRPV1^{-/-} présentent un taux de leptine plus important que des souris sauvages (Lee et al. 2015). D'autre part, TRPV1 pourrait aussi contribuer à réduire la prise alimentaire *via* les fibres nerveuses afférentes gastro-intestinales. En effet, les neurones innervant l'estomac réagissent à la stimulation mécanique induite par une prise alimentaire et permettent de réguler l'appétit (Tan, Bornstein, et Anderson 2009). Chez les souris TRPV1^{-/-}, la réponse des fibres afférentes

gastro-intestinales induite par la stimulation mécanique est réduite, et aboutit à une prise alimentaire plus importante que pour les souris sauvages (Kentish et al. 2015).

Cependant, le rôle de TRPV1 dans le métabolisme énergétique semble être plus important dans la régulation de la dépense énergétique. D'une part, la consommation de CAP augmente l'activité postprandiale du système nerveux sympathique et aboutit à la libération de catécholamines par les glandes médullosurrénales (Matsumoto et al. 2000; Watanabe et al. 1988; Longhurst et al. 1984). Les catécholamines activent les récepteurs adrénergiques et induisent une augmentation du métabolisme et de la thermogénèse (Kawada et al. 1986). D'autre part, il semble que TRPV1 joue un rôle dans le métabolisme énergétique directement par le tissu adipeux. En effet, TRPV1 est exprimé dans le tissu adipeux blanc et brun (Bishnoi et al. 2013; W. Sun et al. 2017) : l'activation de TRPV1 par la CAP inhibe la différenciation des adipocytes *via* l'activation de l'AMPK et réduit la quantité de triglycérides intracellulaires en favorisant la lipolyse (L. L. Zhang et al. 2007; Hsu et Yen 2007). De plus, la CAP induit le brunissement des pré-adipocytes 3T3-L1 (Baboota et al. 2014). L'entrée de Ca^{2+} induit par l'activation de TRPV1 activerait les « récepteurs activés par les proliférateurs de peroxyssomes » (PPAR γ) et la voie PRDM16, responsable du brunissement des adipocytes, *via* l'activation de la CaMKII, de l'AMPK et de SIRT-1 (Padmamalini Baskaran et al. 2016; P. Baskaran et al. 2017). De plus, l'activation de SIRT-1 induit par TRPV1 activerait le récepteur PGC-1 α , responsable de l'expression de la protéine découplante mitochondriale UCP1 (P. Baskaran et al. 2017). TRPV1 semble donc jouer un rôle important dans le métabolisme énergétique notamment en favorisant la thermogénèse adipocytaire. D'autres études suggèrent que la régulation de la thermogénèse dans le tissu adipeux par l'activation de TRPV1 est indirecte et dépend du système nerveux. Par exemple, l'activation de TRPV1 dans le tractus gastro-intestinal augmente la thermogénèse et active UCP1 dans le tissu adipeux brun *via* le système nerveux (Kawabata et al. 2009). De plus, chez l'homme, la consommation de capsinoïdes augmente la thermogénèse par l'activation du tissu adipeux brun (Yoneshiro et al. 2012). Cette régulation neuronale de la thermogénèse est effectivement possible car les fibres nerveuses innervant le tractus gastro-intestinal ont des terminaisons dans le noyau du tractus solitaire dont les projections se trouvent dans le tissu adipeux brun (Bamshad, Song, et Bartness 1999; W.-H. Cao, Madden, et Morrison 2010).

3.5.3. Homéostasie calcique intracellulaire

L'homéostasie calcique est indispensable pour maintenir la fonction cellulaire. En effet, il a été montré que des altérations de la régulation du Ca^{2+} dans la cellule provoquent un stress du RE et mènent, à terme, à la mort cellulaire (Mekahli et al. 2011). De plus, une altération de l'homéostasie calcique mitochondriale est la cause de multiples situations pathologiques (Giorgi et al. 2012). La régulation du Ca^{2+} dans l'appareil de Golgi est également indispensable pour maintenir sa fonction (Micaroni 2012).

Depuis la découverte de la localisation intracellulaire de TRPV1, son rôle dans l'homéostasie calcique des différents organites cellulaires et de leurs fonctions a beaucoup été étudié. En se basant sur les concentrations différentes de Ca^{2+} entre le cytoplasme et les différents organites, ainsi que la perméabilité de TRPV1 au Ca^{2+} , il apparaît logique que TRPV1 joue un rôle dans l'homéostasie calcique intracellulaire. Ainsi, il a été montré que, même en absence de Ca^{2+} extracellulaire, la CAP provoque une augmentation de Ca^{2+} intracellulaire dans différents types cellulaires ou systèmes hétérologues surexprimant TRPV1 (Olah et al. 2001; M. Liu et al. 2003; Lotteau et al. 2013; Z. Sun et al. 2014). La découverte de l'expression de TRPV1 dans le RE a confirmé que son activation permet une libération de Ca^{2+} dans le cytoplasme depuis les stocks intracellulaires du RE (Figure 12)

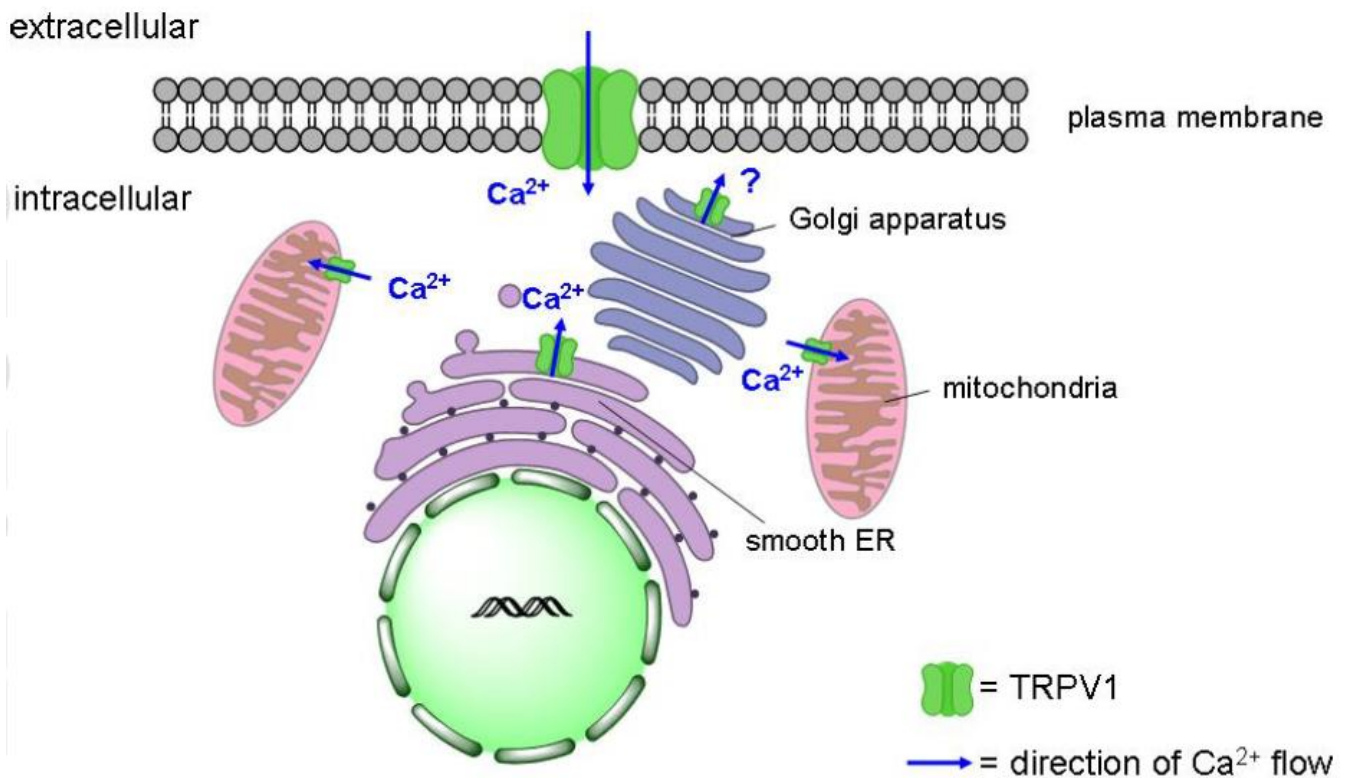


Figure 12 : Schéma de l'expression intracellulaire de TRPV1 et des flux calciques associés.
 En plus de son expression à la membrane plasmique, le canal TRPV1 a été retrouvé dans le RE, les mitochondries et l'appareil de Golgi, et des flux de Ca^{2+} y ont été associés D'après (R. Zhao et Tsang 2017)

(Gallego-Sandín et al. 2009; Z. Sun et al. 2014). De plus, TRPV1 semble impliqué dans le processus de libération de Ca^{2+} induit par le Ca^{2+} (CICR), durant lequel une petite entrée de Ca^{2+} extracellulaire provoque une mobilisation de Ca^{2+} du RE. Par exemple, dans les neurones de DRG, l'activation de TRPV1 par la CAP provoque une augmentation biphasique du Ca^{2+} intracellulaire. La première phase correspond à l'influx de Ca^{2+} *via* TRPV1 à la membrane plasmique, puis la deuxième phase représente la libération de Ca^{2+} des stocks intracellulaires. De plus, en absence de Ca^{2+} extracellulaire et en présence de rouge de ruthénium, un antagoniste non sélectif des canaux TRP non perméant, l'activation de TRPV1 dans le RE induit une libération de Ca^{2+} . La réintroduction de Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire induit une augmentation lente et progressive du Ca^{2+} intracellulaire (Zhao et Tsang 2017). Celle-ci est indépendante de TRPV1 localisé à la membrane plasmique, toujours bloqué par le rouge de ruthénium. TRPV1 dans le RE est alors impliqué à la fois dans le LCIC et dans le processus de « Store-Operated Calcium Entry (SOCE) », c'est-à-dire l'entrée de Ca^{2+} induite par une vidange du RE (Kárai et al. 2004). Cependant, ce résultat n'a pas été reproduit dans d'autres types cellulaires (Castro et al. 2009). Ainsi, dans les cellules musculaires squelettiques, le blocage de RyR1 réprime en partie la libération de Ca^{2+} induite par l'activation de TRPV1, suggérant un lien fonctionnel entre TRPV1 et RyR1 dans le SR (Lotteau et al. 2013) et l'existence d'un rôle de TRPV1 dans la régulation des fonctions cellulaires *via* l'homéostasie calcique intracellulaire. Dans ce sens, des agonistes de TRPV1 sont impliqués dans l'activation du stress du RE, en augmentant notamment l'expression de gènes en lien avec la réponse à ce stress comme GADD153 ou ATF4 (Thomas et al. 2007; Stock et al. 2012).

3.5.4. TRPV1 et mitochondrie

L'activation de TRPV1 au niveau intracellulaire a aussi montré des effets dans la mitochondrie (Figure 12). Dans les cellules cardiaques H9C2, l'apoptose induite par une l'hypoxie/réoxygénation est favorisée par la CAP qui augmente la production mitochondriale de ROS et inhibe la biogénèse mitochondriale (Z. Sun et al. 2014). Par ailleurs, TRPV1 est exprimée dans les mitochondries de cellules microgliales, et son activation provoque une accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie et une chute du potentiel de membrane mitochondrial, ce qui favorise la migration cellulaire par l'activation de la voie MAP kinase (MAPK) (Miyake et al. 2015). Dans des myotubes C2C12, la CAP augmente l'expression d'un facteur nucléaire qui régule le métabolisme du glucose et la biogénèse mitochondriale. Dans ce sens, des souris traitées à la CAP montrent une meilleure endurance à l'exercice, ainsi qu'un meilleur métabolisme énergétique *via* une augmentation de la phosphorylation oxydative (Luo et al. 2012). De plus, les souris TRPV1^{-/-} présentent une production de chaleur réduite simultanément à une diminution de la phosphorylation oxydative des cellules cardiaques. L'activation de TRPV1 dans les mitochondries augmente l'expression de la sirtuine 3, une enzyme mitochondriale qui stimule la phosphorylation oxydative (Lang et al. 2015), ainsi que l'activation de l'AMPK dans les podocytes, aboutissant à l'expression de Fundc1 et à la réduction des zones de contact entre le RE et les mitochondries (Wei et al. 2020). Enfin, TRPV1 est exprimé dans les mitochondries des cellules endothéliales et serait impliqué dans les dysfonctions endothéliales liées au diabète. En effet, l'hyperglycémie provoque une augmentation de l'activité de la 12LOX, une enzyme qui métabolise l'acide arachidonique en 12(S)-HpETE, dont l'accumulation dans le sang finit par activer TRPV1 et provoquer une accumulation de Ca^{2+} dans les mitochondries des cellules endothéliales. Cette perturbation de l'homéostasie calcique cellulaire mène ensuite à des dysfonctions endothéliales (Otto et al. 2020).

3.5.5. Implications pathologiques de TRPV1 dans la thermogénèse cellulaire

Récemment, plusieurs mutations de TRPV1 ont été identifiées comme étant impliquées dans des troubles de la régulation de la température corporelle. En effet, des variants de TRPV1 seraient impliqués dans le syndrome d'hyperthermie maligne (HM) per anesthésique et dans le syndrome de coup de chaleur d'exercice (CCE) (Abeelee et al. 2018; Bosson et al. 2020). Ces syndromes se caractérisent par une augmentation aiguë de la température corporelle, supérieure à 40°C, qui peut être fatale sans une prise en charge rapide. Cette augmentation est provoquée par une augmentation brutale de la thermogénèse qui dépasse la capacité des mécanismes d'élimination de chaleur de l'organisme, ou thermolyse. Dans le cas d'une HM, la crise est déclenchée par certains médicaments, notamment les anesthésiques halogénés. En revanche, dans le cas d'une CCE, la crise est déclenchée par un effort physique associé à des facteurs de risques comme l'environnement chaud et humide. Hormis l'origine de la crise, l'HM et le CCE présentent une physiopathologie très similaire (Hopkins 2007). Ces deux syndromes sont associés à une dérégulation de l'homéostasie calcique musculaire, qui conduit à une augmentation très importante du métabolisme et de la production de chaleur. Une origine génétique a été décrite pour l'HM, avec des mutations de plusieurs gènes, dont *RYR1* et *CACNA1S* qui codent pour des canaux calciques (Yeh et al. 2020). En revanche, très peu de données sur l'origine génétique du CCE sont disponibles. Les mutations T612M et N394del de TRPV1 semblent impliqués dans l'HM, en sensibilisant le canal TRPV1 aux anesthésiques halogénés, comme l'halothane et l'isoflurane (Abeelee et al. 2018), qui pourrait induire une libération incontrôlée de Ca²⁺ depuis le réticulum sarcoplasmique, soit en augmentant directement la concentration intracellulaire de Ca²⁺ au-dessus d'un seuil suffisant pour déclencher la crise d'HM, soit en déclenchant une libération de Ca²⁺ médiée par RYR1 (Abeelee et al. 2018). De plus, les mutations R772C et G684V de TRPV1 ont été identifiées chez des patients ayant présentés un épisode de CCE (Bosson et al. 2020). La mutation R772C modifie la cinétique de libération de Ca²⁺ lors de l'activation de TRPV1, alors que la mutation G684V supprime la fonction de TRPV1. Ainsi, ces deux dernières mutations R772C et G684V de TRPV1 pourraient participer au déclenchement multifactoriel d'une crise de CCE (Bosson et al. 2020). Ces données sont les premières qui associent TRPV1 à une canalopathie.

En conclusion, TRPV1 est un récepteur polymodal exprimé dans divers types cellulaires. Il est associé à une multitude de fonctions différentes en lien avec sa localisation à la fois dans la membrane plasmique et au niveau intracellulaire (Figure 12). Cependant, ses multiples localisations tissulaires et intracellulaires rendent très difficile la compréhension de ses fonctions cellulaires spécifiques. En effet, la présence possible de TRPV1 au niveau intracellulaire et dans la membrane plasmique d'une même cellule d'un modèle biologique est un paramètre de confusion important dans l'interprétation biologique des fonctions du canal. Ainsi, la détermination de facteurs impliqués dans sa localisation intracellulaire permettrait de mieux comprendre ses fonctions dans l'homéostasie calcique et la régulation de nombreuses voies métaboliques intracellulaires.

Objectifs

Le rôle clé de la mitochondrie dans la thermogénèse cellulaire a longtemps été délaissé au profit de ses autres fonctions, comme la production d'énergie. Mais avec les nouvelles avancées techniques de mesure de la température à l'échelle subcellulaire, plusieurs études ont mis évidence une forte hétérogénéité de la distribution thermique dans une cellule. Plus particulièrement, le gradient thermique observé entre le cytoplasme et la mitochondrie est étonnement élevée, et dépasse les estimations théoriques présumées. Notamment, la température mitochondriale pourrait atteindre la valeur extrême de 50°C (Chrétien et al. 2018). Cette découverte récente remet en question beaucoup de nos connaissances sur la régulation de la température corporelle et souligne le besoin de développer le champ de recherches lié à la caractérisation des processus de thermogénèse cellulaire. En effet, la température de 37°C de notre organisme n'est que le reflet de la température au cœur même de nos cellules. Ainsi, la compréhension des mécanismes de régulation de la température mitochondriale représente un intérêt majeur.

Comme de nombreux autres paramètres biologiques, la régulation d'un paramètre tel que la température nécessite la présence d'un senseur capable de détecter et de réagir, en fonction des variations de celle-ci. A partir de ce postulat, le canal TRPV1 pourrait constituer un candidat idéal comme thermostat mitochondrial. Effectivement, TRPV1 est un canal cationique sensible à des températures élevées (>43°C) et dont l'expression au sein de la mitochondrie a été mise en évidence dans plusieurs types cellulaires. De plus, TRPV1 est un canal qui dissipe des flux calciques, or le Ca^{2+} est connu pour être un acteur majeur dans la régulation de l'activité mitochondriale et dans d'autres processus en lien avec la thermogénèse cellulaire. Le canal TRPV1 pourrait donc agir comme un senseur de la température mitochondriale, dont l'activité pourrait permettre de contrôler la production de chaleur de la mitochondrie, par une voie Ca^{2+} -dépendante.

Ce projet vise à caractériser un variant de TRPV1 adressé spécifiquement à la mitochondrie (TRPV1mito) chez l'homme, qui a été identifié dans la banque de données GenBank. Puis, la caractérisation *in vitro* de ce variant de TRPV1 confirmera son adressage à la mitochondrie et amènera à étudier son implication dans la régulation des fonctions mitochondriales, notamment l'homéostasie calcique et sa régulation par la température mitochondriale. De plus, l'étude de la conservation de TRPV1mito au sein du règne animal livrera une information importante sur son rôle dans l'acquisition et le développement de la capacité de thermorégulation, ou homéothermie des mammifères au cours de l'évolution. Enfin, nous avons prévu d'étudier les implications pathologiques potentielles liées à TRPV1mito, du fait que des variants de TRPV1 sont associés aux syndromes d'hyperthermie maligne et de coup de chaleur d'exercice. Ces deux syndromes graves pouvant être reliés à une anomalie du contrôle de la température mitochondriale en lien à des altérations des flux calciques impliquant éventuellement une dysfonction spécifique de l'isoforme mitochondriale de TRPV1.

Tableau 1 : Liste des amorces TRPV1 ciblant les exons n°1 et n°3 de la souris.

Nom	Séquence (5'→3')
muScreenF	GAGACCCTAACTCCAAGCCG
muScreenR	GGTCTTCCCGTCTCTGGGT

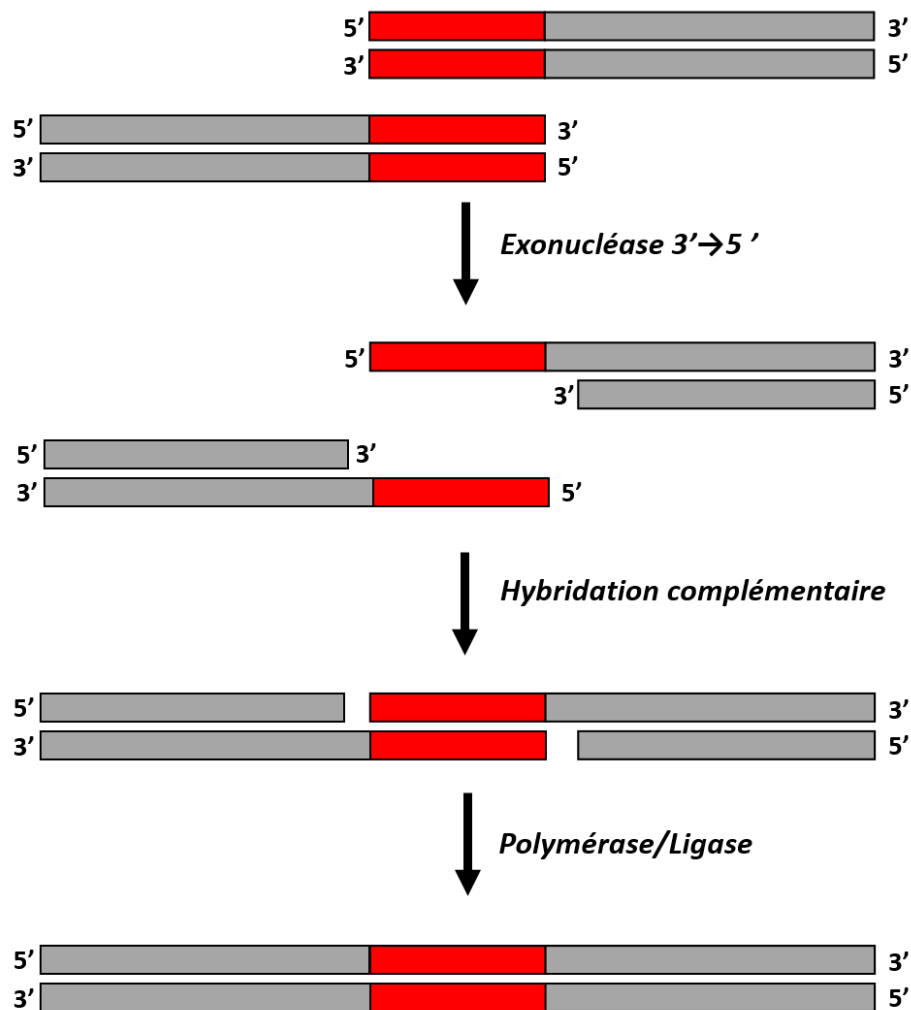


Figure 13 : Principe de clonage du système Infusion.

Matériels et Méthodes

1. Prédiction et Identification des variants mitochondriaux de TRPV1

1.1. Identification et expression du variant mitochondrial de TRPV1 humain

1.1.1. Identification *in silico* du variant humain TRPV1mito

Afin de rechercher une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain (hTRPV1), un criblage des variants de TRPV1 a été réalisé. Pour cela, toutes les séquences des variants (ADNc) de TRPV1 ont été récupérées des banques de données GenBank : NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et Ensembl (<https://www.ensembl.org>). Ensuite, l'ensemble des séquences a été analysée avec le logiciel Mitoprot II (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html> (Claros et Vincens 1996)) afin d'identifier une séquence d'adressage mitochondriale (MTS).

1.1.2. Expression tissulaire de TRPV1 chez l'homme

La base de données GTEx portal (<https://gtexportal.org/home/>) est une base de données regroupant des informations d'expression et de régulation des variants des gènes humains. Ainsi, les données d'expression tissulaire de différents variants de TRPV1 ont été extraites de cette banque de données.

1.2. Prédiction *in silico* de TRPV1mito chez les mammifères placentaires

Afin d'identifier *in silico* l'isoforme TRPV1mito chez d'autres organismes, les séquences des gènes codant pour TRPV1 d'environ 200 espèces parmi les mammifères, les poissons, les reptiles et les oiseaux ont été récupérées dans la banque de données GenBank : NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Un algorithme a ensuite été codé (par David Goudenège, bio-informaticien) afin de détecter la présence de séquence d'adressage mitochondriale à l'aide du logiciel Mitoprot II (<https://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>; Claros et Vincens 1996) dans les premiers exons codants et dans tous les cadres de lectures (ORF) possibles. Le fichier de sorti de l'algorithme renseigne l'espèce et la séquence protéique de la séquence d'adressage mitochondriale avec le score de prédiction le plus élevé (de 0 à 1).

1.3. Identification de TRPV1mito chez la souris

Afin de valider la prédiction de la présence de TRPV1mito chez la souris, la recherche du transcrit correspondant à TRPV1mito a été possible grâce à l'analyse d'échantillons d'ARNm de différents organes prélevés sur des souris C57BL/6. Ces ARNm ont été rétro-transcrits en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide du kit « Transcriptase inverse SuperScript™ II » (Thermo Fischer) en respectant le protocole indiqué par le fournisseur. Des réactions de PCR (cf 6.1.1.a) sont ensuite réalisées à l'aide de couples d'amorces ciblant les premiers exons codant pour TRPV1 (Tableau 1), afin d'identifier un variant d'épissage alternatif correspondant à la prédiction de TRPV1mito.

Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour le clonage de TRPV1mito dans le plasmide pcDNA5/FRT.

Nom	Séquence (5'→3')
A-For	ACCCTGAGACAGGGAAGACC
A-Rev	CTTTGAACTCGTTGTCTGTGAGG
B-For	caacgagttcaaagGTGGCCCCAGCGCTGGGCTCGGGGAGGGCCCCAGCCCTGGCCTGCCCTGACCCTCC CTTATGTCTTTTCAGaccctgagacagg
B-Rev	ccctgtctcagggtCTGAAAGACATAAGGGAGGGTCAGGGCAGGCCAGGGCTGGGGCCCTCCCCGAGCCCA GCGCTGGGGCCACctttgaactcgttg
C-For	ccgccaccATGGAGACCCTAACTCCAGGCC
C-Rev	tctccatGGTGGCGGTACCAAGCTTAAG

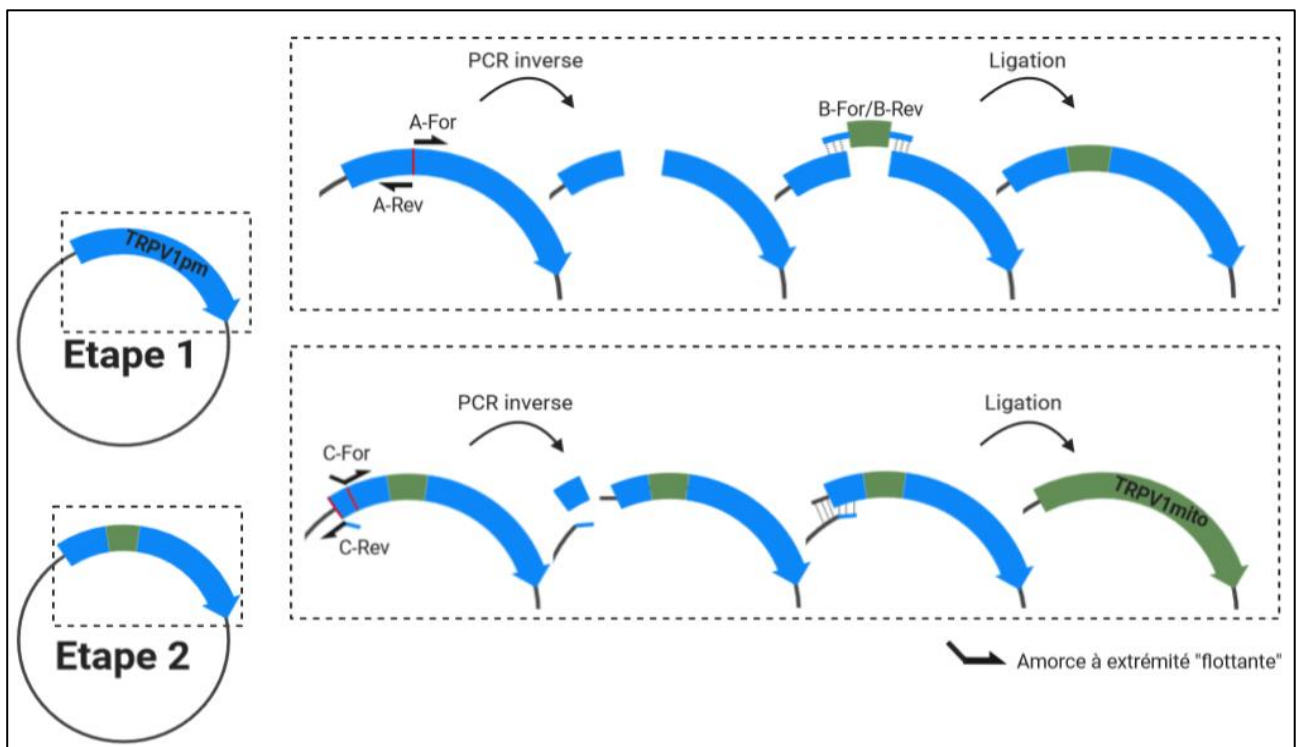


Figure 14 : Schéma de la stratégie de clonage du plasmide pcDNA5/FRT TRPV1mito à partir du plasmide pcDNA5/FRT TRPV1pm.

Les produits de PCR obtenus sont ensuite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose (0,8 %) (cf. 6.1.1.b). Après la révélation du gel, les fragments ADN d'intérêt sont alors isolés sur un banc à UV puis purifiés à l'aide du kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel), en respectant le protocole indiqué par le fournisseur. Les fragments ADN d'intérêt sont ensuite séquencés par séquençage Sanger (cf 6.1.3.e) en réutilisant les amorces ayant permis leur amplification.

1.4. Analyse et traitement des séquences ADN

Afin d'analyser et d'annoter les différentes séquences nucléotidiques, le logiciel « SnapGene software » a été utilisé. Les outils *BLAST* (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ont aussi été utilisés pour la comparaison de séquences.

2. Construction des modèles d'étude pour la caractérisation de TRPV1mito humain

2.1. Clonage et construction des plasmides

2.1.1. Technique de clonage *Infusion*

La technique de clonage *Infusion* permet de cloner des séquences ADN dans un vecteur, indépendamment des sites de restrictions. Elle permet un clonage unidirectionnel de n'importe quelle séquence d'intérêt dans n'importe quel locus d'un vecteur. Cette technique se base sur l'hybridation des extrémités complémentaires d'un insert et du vecteur de clonage linéarisé. En effet, le clonage *Infusion* nécessite un chevauchement de 15 paires de bases (bp) aux extrémités de l'insert et du vecteur de clonage, qui peuvent être générées par amplification PCR ou directement par la synthèse chimique de l'insert de clonage. Le mélange d'enzymes *Infusion* contient une exonucléase qui digère d'abord les brins 3' aux extrémités de l'insert et du vecteur, et rend possible l'hybridation complémentaire des brins 5'. Enfin, la polymérase et la ligase terminent la réaction en réparant le double brin d'ADN et en linéarisant le vecteur avec l'insert (Figure 13).

2.1.2. Méthodologie du clonage de TRPV1mito

Le clonage de l'isoforme mitochondriale de hTRPV1 (TRPV1mito) a été réalisé à partir de l'isoforme plasmique de hTRPV1 (TRPV1pm) dans le plasmide pcDNA5/FRT. Le plasmide pcDNA5/FRT hTRPV1pm a été obtenu d'Aubin Penna (Laboratoire STIM CNRS ERL 7003 - EA 7349, Poitiers).

La première étape de clonage de TRPV1mito consiste à insérer la séquence de 70pb correspondant à l'intron situé entre les exons codants 2 et 3. Pour cela, le plasmide pcDNA5/FRT TRPV1pm a été ouvert et linéarisé par PCR inverse au niveau du site d'insertion de l'intron grâce aux amorces A-For et A-Rev (Tableau 2 ; Figure 14). Deux oligonucléotides complémentaires simple brin, B-For et B-Rev, ont été conçus avec une séquence de 15 bp spécifiques du site d'insertion à chaque extrémité et ont été commandés chez Thermo Fischer (Tableau 2). L'insert double brin a ensuite été reconstitué grâce à l'appariement complémentaire des deux oligonucléotides simples brins. Grâce aux séquences de 15 bp situées aux extrémités de l'insert, le plasmide pcDNA5/FRT TRPV1pm a pu être circularisé par l'insertion de l'oligonucléotide de synthèse double brin (Figure 14).

La deuxième étape de clonage consiste à supprimer la séquence du plasmide pcDNA5/FRT TRPV1pm correspondant à la partie codante de TRPV1pm en amont du codon d'initiation alternatif de TRPV1mito. Pour cela,

Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour le clonage de TRPV1mitoGFP et TRPV1pmGFP dans le plasmide pcDNA5/FRT

Nom	Séquence (5'->3')
D-For	CCGCTCGAGTCTAGATCCAGC
D-Rev	CTTCTCCCCGGAAGCGGC
GFP-For	gcttccggggagaagATGGTGAGCAAGGGCGAG
GFP-Rev	tctagactcgagcggTACTTGTACAGCTCGTCCATGCC

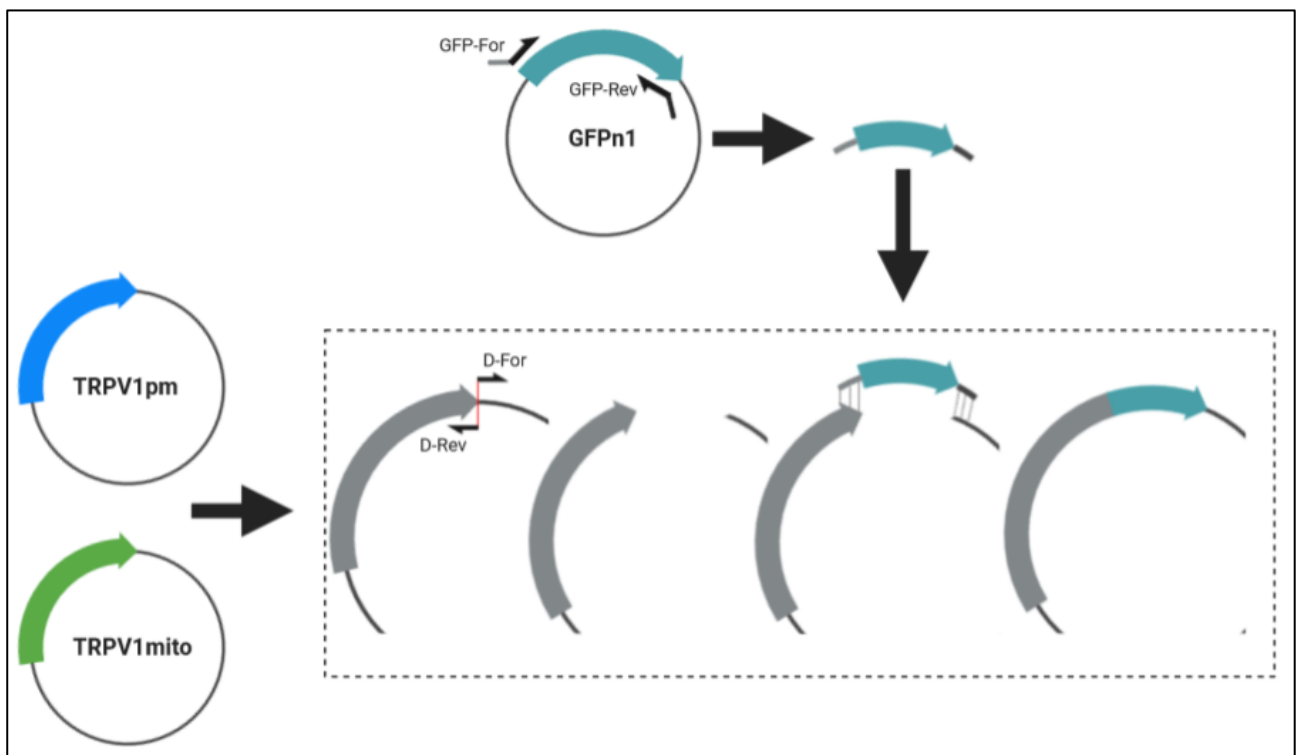


Figure 15 : Schéma de la stratégie de clonage des plasmides pcDNA5/FRT TRPV1mitoGFP et pcDNA5/FRT TRPV1pmGFP

des amorces à extrémités « flottantes » ont été conçues pour linéariser le plasmide en supprimant la région désirée tout y en insérant, aux extrémités, des séquences complémentaires entre elles (Figure 14). Ainsi, le plasmide linéaire a été ré-circularisé par la technique de clonage *Infusion* afin d'obtenir le plasmide pcDNA5/FRT TRPV1mito.

2.1.3. Méthodologie de clonage des versions fusion-GFP de TRPV1pm et TRPV1mito

Afin d'étudier l'isoforme TRPV1mito en comparaison avec l'isoforme TRPV1pm, un tag GFP a été ajouté à chacune de ces isoformes. Pour cela, les plasmides pcDNA5/FRT TRPV1pm et pcDNA5/FRT TRPV1mito ont été linéarisés à l'extrémité 3' de la séquence codante de TRPV1pm ou TRPV1mito par PCR inverse, à l'aide des amorces D-For et D-Rev (Tableau 3). En parallèle, la séquence codante de la GFP a été amplifiée par PCR, grâce aux amorces GFP-For et GFP-Rev (Tableau 3), à partir du plasmide pEGFPn1 en y intégrant les séquences complémentaires des sites d'insertion des plasmides linéarisés pcDNA5/FRT TRPV1pm et pcDNA5/FRT TRPV1mito. Cet insert comprenant la séquence codante de la GFP a ensuite été inséré dans les plasmides pcDNA5/FRT TRPV1pm et pcDNA5/FRT TRPV1mito grâce à la technique *Infusion* (Figure 15).

2.1.4. Protocole de clonage Infusion

a) Préparation du plasmide linéarisé

Afin de linéariser un plasmide par PCR inverse, un protocole d'amplification par PCR a été réalisé (cf 6.1.1.a). Après le programme de PCR, 4 µl de Cloning enhancer (Takara) pour 10 µl de mix réactionnel sont ajoutés. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 15 minutes puis à 80°C pendant 15 minutes. La migration des échantillons par électrophorèse sur gel d'agarose est ensuite réalisée (cf protocole page 6.1.1.b). La bande ADN d'intérêt correspondant au plasmide linéarisé est isolée et l'ADN est extrait (cf 6.1.1.c), purifié et dosé avec le spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fischer).

b) Préparation de l'insert de clonage

Différentes techniques ont été utilisées pour préparer l'insert de clonage. Pour insérer la séquence correspondant à la rétention d'intron lors du clonage de TRPV1mito, l'insert a été préparé par hybridation de deux oligonucléotides de synthèse complémentaires (B-For et B-Rev ; Tableau 2). Pour cela, les oligonucléotides B-For et B-Rev sont dilués ensemble à 10 µM dans le tampon NEBuffer 4 (New England Biolabs) et placés dans un thermocycleur pour suivre le programme suivant :

95°C	5 min
95°C → 25°C	5°C/min

Par ailleurs, pour cloner la séquence codante de la GFP dans les plasmides codant pour TRPV1pm ou TRPV1mito, l'insert a été préparé par PCR à partir du plasmide pEGFPn1. Pour cela, un protocole d'amplification par PCR a été réalisé (cf 6.1.1.a). Après la réaction de PCR, la migration des échantillons par électrophorèse sur gel d'agarose est réalisée (cf 6.1.1.b). La bande ADN d'intérêt correspondant à l'insert est ensuite isolée et l'ADN est extrait (cf 6.1.1.c), purifié et dosé avec le spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Fischer).

Tableau 4 : Liste des plasmides clonés

Nom du plasmide	Caractéristiques	Utilisation
TRPV1pm	Variants de TRPV1 adressé à la membrane plasmique	Caractérisation de TRPV1, flux calciques, respiration mitochondriale (cf Matériel et Méthodes: 4.4.1, 5.1 et 5.2)
TRPV1mito	Variants de TRPV1 adressé à la mitochondrie	Caractérisation de TRPV1, flux calciques, respiration mitochondriale (cf Matériel et Méthodes: 4.4.1, 5.1 et 5.2)
TRPV1mitoGFP	TRPV1mito en fusion avec la GFP (C-terminal)	Localisation de TRPV1 (cf Matériel et Méthodes: 3.)
TRPV1pmGFP	TRPV1pm en fusion avec la GFP (C-terminal)	Localisation de TRPV1 (cf Matériel et Méthodes: 3.1)
MTS-GFP	Séquence « MTS » de TRPV1mito en fusion avec la GFP	Localisation de TRPV1 (cf Matériel et Méthodes: 3.1)
TRPV1mitoGFPnoMTS	TRPV1mito délété de sa séquence « MTS » en fusion avec la GFP (C-terminal)	Localisation de TRPV1 (cf Matériel et Méthodes: 3.1)
TRPV1mitoGFP C-ter tronqué	TRPV1mito délété de partie C-terminale en fusion avec la GFP (post-TM6)	Localisation de TRPV1 (cf Matériel et Méthodes: 3.4)
TRPV1pmT612M	TRPV1pm présentant la mutation T612M	Non utilisé
TRPV1pmN394del	TRPV1pm présentant la mutation N394del	Non utilisé
TRPV1pmG684V	TRPV1pm présentant la mutation G684V	Non utilisé
TRPV1pmR772C	TRPV1pm présentant la mutation R772C	Non utilisé
TRPV1mitoT612M	TRPV1mito présentant la mutation T612M	Non utilisé
TRPV1mitoN394del	TRPV1mito présentant la mutation N394del	Non utilisé
TRPV1mitoG684V	TRPV1mito présentant la mutation G684V	Non utilisé
TRPV1mitoR772C	TRPV1mito présentant la mutation R772C	Non utilisé
TRPV1mitoCherry	TRPV1mito en fusion avec la mCherry (C-terminal)	Caractérisation de TRPV1, flux calciques (cf Matériel et Méthodes: 4.4.2)
TRPV1pmCherry	TRPV1pm en fusion avec la mCherry (C-terminal)	Caractérisation de TRPV1, flux calciques (cf Matériel et Méthodes: 3.4)

c) Clonage Infusion

Une fois la préparation de l'insert et du plasmide terminée, il faut déterminer le ratio insert/plasmide et les quantités de plasmide et d'insert à utiliser pour la réaction de clonage. En effet, plus la taille de l'insert est importante (en nombre de nucléotides) et plus le ratio insert/plasmide est petit, et inversement. Par exemple, pour un plasmide de 8000 nucléotides et un insert de 100 nucléotides, il est recommandé d'utiliser un ratio insert/plasmide de 10 à 15. A l'inverse, pour un plasmide de 5000 nucléotides et un insert de 2000 nucléotides, il est recommandé d'avoir un ratio insert/plasmide de 2 à 4. Ensuite, la quantité d'insert à utiliser dépend de la taille de l'insert et du plasmide, du ratio insert/plasmide et de la quantité de plasmide (en nanogramme).

$$\text{Quantité insert (ng)} = \frac{(\text{Quantité plasmide (ng)} \times \text{ratio} \frac{\text{insert}}{\text{plasmide}} \times \text{Taille insert (bp)})}{\text{Taille plasmide (bp)}}$$

Par la suite, on réalise le mix de clonage contenant les quantités de plasmide et d'insert désirées dans l'eau avec le prémix *InFusion 2X* (Takara Bio). On place ensuite le mix à 50°C pendant 20 minutes puis on incube le mix 30 minutes sur la glace.

Afin d'isoler un plasmide circularisé avec l'insert grâce à la réaction de clonage, on réalise une transformation bactérienne puis une sélection clonale grâce à un antibiotique. Pour cela, on ajoute 30 µL de bactéries compétentes Stellar™ (Takara Bio) au mix de clonage puis on incube 20 minutes sur la glace. On réalise ensuite un choc thermique en plaçant le tube à 43°C pendant 45 sec puis on l'incube à nouveau 10 minutes sur la glace. On ajoute 200 µL de SOC medium (Takara Bio) préalablement chauffé à 37°C avant de placer le tube dans un incubateur à 37°C pendant 1 heure. Après cela, l'ensemble de la pré-culture bactérienne est étalé dans une boîte de Pétri contenant une gélose à base d'agar (15 g/l), de luria broth medium (25 g/l) (Invitrogen) et l'antibiotique de sélection (50 µg/ml). La boîte de Pétri est incubée à 37°C pendant 16 à 18 heures. Le lendemain, plusieurs colonies bactériennes sont isolées puis mises en culture dans un milieu liquide de luria broth medium (25 g/l) et l'antibiotique de sélection (50 µg/ml) à 37°C sous agitation pendant 24 heures. Le lendemain, les plasmides de chaque clone bactérien sont isolés et purifiés à l'aide du kit « Plasmid Miniprep » (Monarch®) (cf 6.1.3.c). Pour chaque clone bactérien, la réussite du clonage est ensuite vérifiée par séquençage Sanger (cf 6.1.3.e) afin de sélectionner un clone viable.

2.1.5. Liste des plasmides de TRPV1 clonés

Pour caractériser TRPV1mito, d'autres plasmides ont été clonés. Mais la conception de ces plasmides ne sera pas détaillée ici car elle repose toujours sur le même principe que le clonage des plasmides décrit précédemment. Cependant, la liste complète des plasmides clonés et leur utilisation associée est fourni dans le tableau 4.

2.2. Mise au point des transfections transitoires

2.2.1. Culture cellulaire

Les lignées HEK293, SNB75 et MCF7 sont des lignées cellulaires issues de cellules embryonnaires humaines de rein immortalisées, de glioblastome et d'un cancer du sein, respectivement. Ces lignées cellulaires

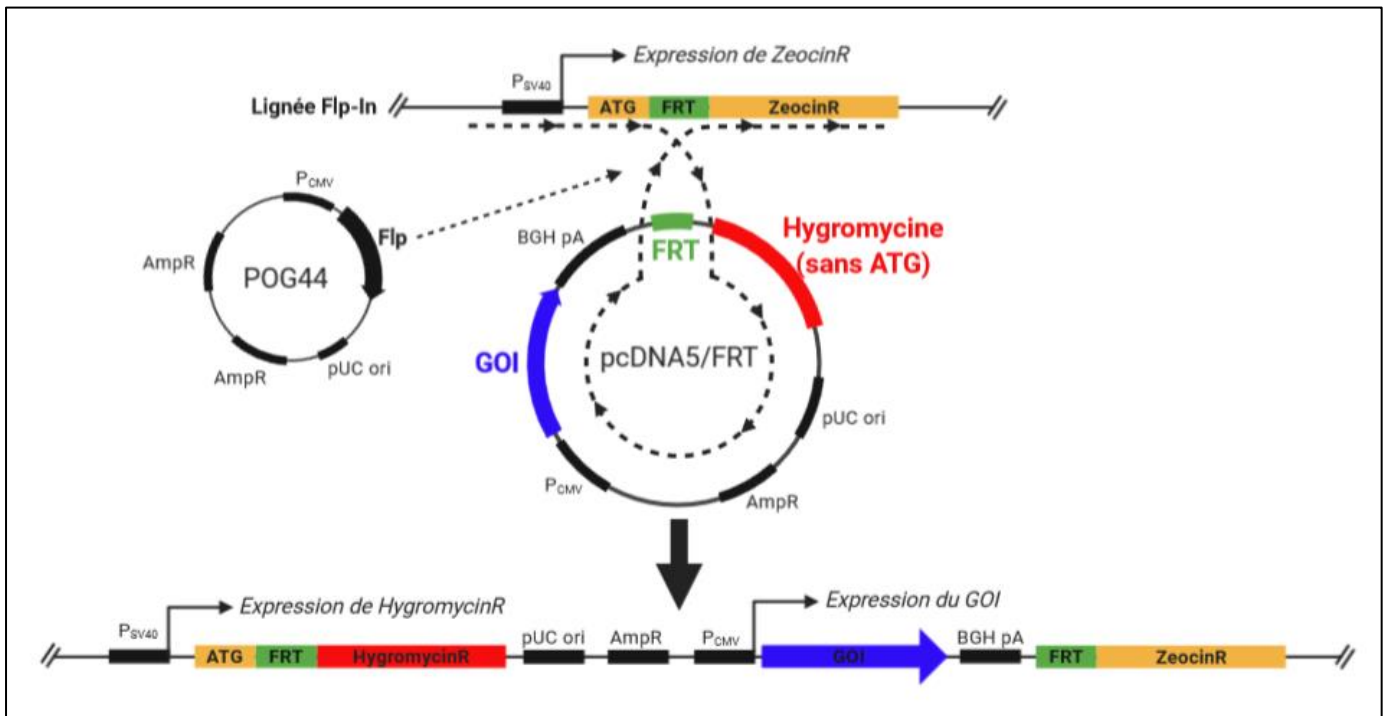


Figure 16 : Principe d'intégration d'une séquence d'intérêt dans une lignée cellulaire à l'aide du système Flp-In.

sont cultivées dans du milieu de culture contenant du DMEM (Pan Biotech P0403500) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Foetal (SVF) et 1 mM de L-Glutamine. Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C humidifié à 5% CO₂.

2.2.2. Transfection

Les cellules sont trypsinées de leur support de culture (Flask T25 ou T75) etensemencées en plaque 6 puits à 500 000 cellules par puit dans le milieu de culture. Après 24h à 37°C, lorsque les cellules sont à 60-70% de confluence, les cellules sont transfectées à l'aide de l'agent de transfection Avalanche®-Omni (EZ Biosystems) ou DharmaFECT (Horizon Discovery). Pour cela, 2 µg d'ADN et 2 µL d'agent transfectant sont ajoutés dans 200 µL de DMEM ou d'optiMEM. Pour une co-transfection de 2 plasmides, 1 µg de chaque plasmide est mis en contact avec 2 µL de l'agent transfectant. Après une homogénéisation, le mix transfectant-ADN est incubé 20 minutes à température ambiante avant d'être déposé sur les cellules qui sont ensuite replacées dans l'incubateur à 37°C.

2.2.3. Efficacité de transfection

Pour déterminer l'efficacité de transfection des plasmides codant pour TRPV1pm ou TRPV1mito, des cellules HEK293 ont été transfectées avec le plasmide pcDNA5/FRT TRPV1pmGFP ou le plasmide pcDNA5/FRT TRPV1mitoGFP dans une plaque 6 puits. La plaque de cellules a ensuite été placée dans l'appareil Incucyte S3 (Sartorius) afin d'acquérir les images des cellules en contraste de phase et en fluorescence (Ex : 488nm, Em : 510nm), 24h et 48h après la transfection. Grâce au logiciel « Incucyte software », le ratio de l'aire de fluorescence liée à l'expression de la GFP sur l'aire totale occupée par des cellules a été réalisé afin de déterminer l'efficacité de transfection à 24h et 48h.

2.3. Construction des lignées stables 293-TRPV1

2.3.1. Principe du système Flp-In

La construction de lignées qui surexpriment de manière stable une protéine d'intérêt présente plusieurs avantages non négligeables. En effet, cette approche permet d'exprimer une protéine d'intérêt de manière homogène et constante dans l'ensemble des cellules, en s'affranchissant de l'étape de transfection transitoire, qui provoque un stress cellulaire. Pour cela, différentes stratégies sont possibles afin d'intégrer un vecteur codant pour une protéine d'intérêt dans le génome d'une lignée cellulaire hôte. Parmi elles, le système Flp-In de Thermo Fischer permet d'intégrer et d'exprimer un gène d'intérêt dans le génome d'une lignée cellulaire grâce à un site cible de la recombinaison Flp (domaine FRT). Pour cela, on réalise la co-transfection des plasmides pcDNA5/FRT, contenant le gène d'intérêt GOI, et POG44, qui code pour la recombinase-flipase (Flp), dans une lignée cellulaire spécifique présentant un domaine FRT unique dans le génome. Lors de la co-transfection, la recombinase-flipase (Flp) exprimée à partir de pOG44 permet la recombinaison homologue entre les domaines FRT du génome et du vecteur pcDNA5/FRT de manière à intégrer la construction pcDNA5/FRT dans le génome (Figure 16). En parallèle, la recombinaison homologue entre les domaines FRT permet d'intégrer et d'activer le gène de résistance à l'hygromycine dans le génome. En effet, le gène de résistance à l'hygromycine sans codon d'initiation (ATG) présent dans le plasmide pcDNA5/FRT ne peut être traduit qu'une fois intégré dans le génome en profitant du codon d'initiation en amont du domaine FRT (Figure 16). Ainsi, ce système permet la sélection clonale par la perte de la résistance à la zéocine et l'acquisition de la résistance à l'hygromycine de la lignée cellulaire hôte.

Des lignées cellulaires qui surexpriment stablement TRPV1pm, TRPV1mito ou TRPV1mitoGFP ont été réalisées grâce au système Flp. La lignée cellulaire commerciale 293-Flp, issue de la lignée HEK293, a été fournie par Aubin Penna (Laboratoire STIM CNRS ERL 7003 - EA 7349, Poitiers) et a servi de lignée cellulaire hôte pour générer les lignées stables 293-TRPV1.

2.3.2. Protocole de construction d'une lignée stable avec le système 293-Flp

Les cellules de la lignée 293-Flp sontensemencées dans une plaque 6 puits à 500 000 cellules par puit dans le milieu de culture. Après 24h à 37°C, lorsque les cellules sont à 60-70% de confluence, elles sont transfectées à l'aide de l'agent de transfection, Avalanche®-Omni (EZ Biosystems). Pour chaque puit de cellules, 1 µg du plasmide POG44, 300 ng du plasmide pcDNA5/FRT TRPV1pm, pcDNA5/FRT TRPV1mito ou pcDNA5/FRT TRPV1mitoGFP et 2 µl d'Avalanche®-Omni sont ajoutés dans 200 µl de DMEM. Le mix est vortexé et incubé 20 minutes à température ambiante avant d'être déposé sur les cellules. Celles-ci sont ensuite replacées dans l'incubateur à 37°C. Après 24h de transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu de culture frais. A 48h, les cellules sont trypsinées etensemencées dans une flask T25 dans le milieu de culture contenant 50 µg/ml d'hygromycine B (Thermo Fischer) pour débiter la sélection clonale. Le milieu de culture contenant l'hygromycine B est remplacé tous les 3 jours pendant 15 jours environ, jusqu'à l'apparition des clones. L'ensemble des clones est ensuite amplifié jusqu'à pouvoir congeler les cellules et vérifier l'expression de TRPV1pm ou TRPV1mito par qPCR relative (cf 6.1.2).

3. Localisation du variant TRPV1mito humain

3.1. Imagerie live de colocalisation

Pour mettre en évidence la localisation d'une protéine d'intérêt, il est possible de l'exprimer, en fusion avec un marqueur fluorescent comme la GFP, dans des cellules en culture et comparer son profil de fluorescence avec un marqueur fluorescent dont la localisation est connue.

Ainsi, les plasmides pcDNA5/FRT TRPV1pmGFP ou pcDNA5/FRT TRPV1mitoGFP ont été transfectés dans différentes lignées cellulaires, SNB75 et MCF7 (cf 2.2.2) puis placées dans des chambres Ibidi 4 puits (Ibidi, 80426). Puis, 24h ou 48h après la transfection, les cellules sont incubées dans du milieu contenant 50 nM de MitoTracker™ Red CMXRos (Thermo Scientific™, M7513) pendant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont ensuite rincées et replacées dans du milieu de culture. Les acquisitions de fluorescence de la GFP (Ex : 488nm, Em : 510nm) et du MitoTracker Red (Ex : 578nm, Em : 599nm) sont ensuite réalisées sur un microscope inversé NIKON ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments Europe) à l'aide d'une caméra Andor NEO sCOMS. Les images sont ensuite analysées et traitées avec le logiciel MétaMorph 7.7 (Molecular devices).

3.2. Enrichissement des protéines mitochondriales

Afin d'isoler les mitochondries et étudier la fraction protéique mitochondriale, les cellules de trois flasks T75 sont rincées avec du tampon phosphate salin (PBS) puis récoltées par grattage à froid sur la glace dans du PBS. Les cellules sont ensuite centrifugées pendant 5 minutes à 800g à 4°C, puis le surnageant est retiré. Le culot cellulaire est repris dans 500µl de tampon isotonique (Mannitol 225mM, Sucrose 75mM, HEPES 10mM, EDTA 10mM, DTT1 mM). Après 10 minutes d'incubation dans la glace, les cellules sont broyées au Potter-Treflon-verre,

Tableau 5 : Composition des différents tampons utilisés pour le fractionnement cellulaire.

Tampon	Composition	Concentration
IB1	Mannitol	225mM
	Sucrose	75mM
	EGTA	0.1mM
	Tris-HCl	30mM
	H ₂ O	q.s.p 150ml
IB2	Mannitol	225mM
	Sucrose	75mM
	Tris-HCl	0mM
	H ₂ O	q.s.p 150ml
MRB	Mannitol	250mM
	HEPES	5mM
	EGTA	0.5mM
	H ₂ O	q.s.p 100ml
Percoll	Mannitol	225mM
	HEPES	25mM
	EGTA	1mM
	Percoll	30%
	H ₂ O	q.s.p 50ml
RIPA	RIPA 10X (Milipore,20-188)	10%
	Protease Inhibitor Cocktail 25X (Roche, 11697498001)	4%
	H ₂ O	q.s.p 1mL

avec 50 allers-retours afin d'éclater les cellules et libérer les mitochondries. La suspension est ensuite transférée dans un tube eppendorf de 1,5mL avant d'être centrifugée à 800g pendant 5 minutes à 4°C pour éliminer les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré afin de subir une 2^{ème} centrifugation à 6000g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant, contenant les protéines cytosoliques, est retiré et conservé dans un nouveau tube 1,5mL et le culot de mitochondries est repris dans 200 µl de tampon isotonique. La concentration en protéines est ensuite dosée à l'aide du kit « Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit » (cf 6.2.1).

3.3. Fractionnement cellulaire

Le protocole du fractionnement cellulaire visant à séparer les différents compartiments cellulaires tels que le RE, la mitochondrie et les MAMs est directement tiré de Wieckowski et al. 2009 et toutes les étapes sont réalisées sur la glace ou à 4°C (Figure 17). Les cellules en culture sont amplifiées dans 20 boîtes de Pétri (100mm) à 90% de confluence. Les cellules sont rincées avec du PBS puis récoltées grâce à l'action de la trypsine. La suspension cellulaire est ensuite centrifugée pendant 5 minutes à 800g puis repris dans le tampon IB1 (Tableau 5). Les cellules sont ensuite broyées au Potter-Treflon-verre (≈100 mouvements). Les cellules sont à nouveau centrifugées 5 minutes à 800g, le culot contenant les débris cellulaires est jeté et le surnageant est centrifugé à 7000g pendant 10 minutes. Le culot A est resuspendu dans le tampon IB2 (Tableau 5), centrifugé à 7000g pendant 10 minutes et le surnageant B est mis de côté.

Le nouveau culot A est de nouveau resuspendu dans le tampon IB2 et centrifugé à 10 000g pendant 10 minutes, le culot est resuspendu dans le tampon MRB (Tableau 5). Dans les tubes d'ultracentrifugeuse, 8 ml de tampon Percoll (Tableau 5) sont d'abord ajoutés avant de déposer la suspension de MRB. Le tube est ensuite centrifugé 30 minutes à 95 000g. Les mitochondries, présentes au fond du tube, et les MAMs, se situant au milieu du tube, sont récoltés séparément et dilués 10 fois dans le tampon MRB avant d'être centrifugés pendant 10 minutes à 6300g. Pour le tube contenant les mitochondries, le surnageant est jeté et les mitochondries sont reprises dans le tampon RIPA (Tableau 5) contenant des inhibiteurs de protéases. Pour le tube contenant les MAMs, le surnageant est récupéré et centrifugé à 100 000g pendant 1 heure. Le nouveau culot, correspondant aux MAMs, est alors repris dans le tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases.

Pour le surnageant B, il est centrifugé à 20 000g pendant 30 minutes. Le nouveau surnageant est récupéré et centrifugé pendant 1 heure à 100 000g. Le culot obtenu, qui correspond à la fraction du RE, est repris dans le tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases. Toutes les fractions sont ensuite conservées à -20°C.

3.4. Test de protection à la protéinase K

Afin de déterminer précisément, la localisation de TRPV1mito dans la mitochondrie, un test de protection à la protéinase K a été réalisé. Cette technique consiste à exposer des mitochondries isolées à des concentrations croissantes de digitonine, un détergent permettant de solubiliser progressivement les doubles membranes mitochondriales, et de protéinase K, une protéase. Grâce à différents marqueurs mitochondriaux, il est possible de visualiser la solubilisation progressive des membranes mitochondriales et de déduire la localisation de la protéine d'intérêt dans celles-ci.

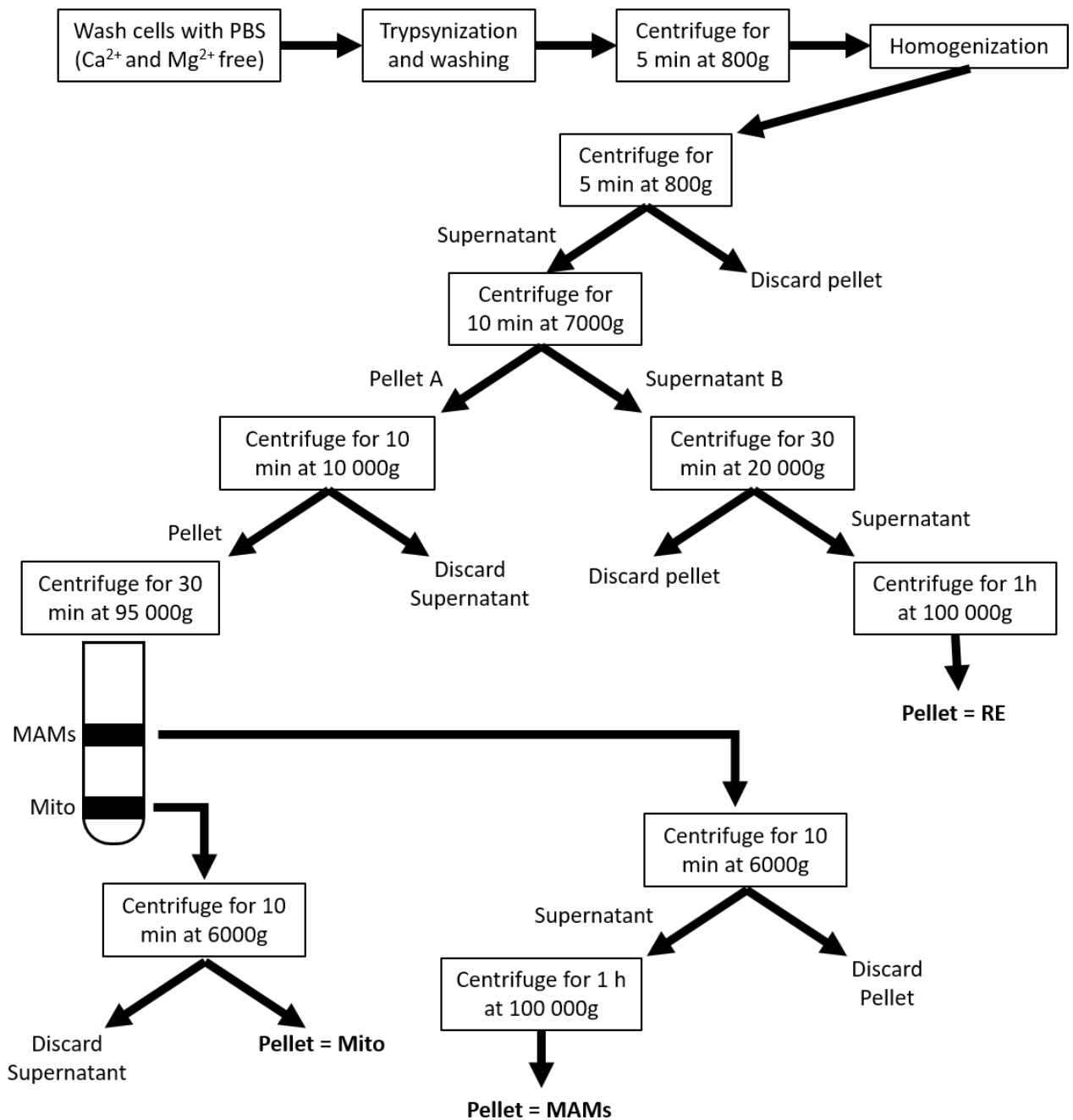


Figure 17 : Schéma des étapes réalisées pour le fractionnement cellulaire.
Adapté de (Wieckowski et al. 2009)

Ainsi, les mitochondries de cellules surexprimant de manière stable TRPV1mitoGFP (293-TRPV1mitoGFP) ou transitoirement TRPV1mitoGFP, dont la partie C-terminale a été supprimée, ont d'abord été isolées (cf 3.2). Une quantité fixe de mitochondries (50 µg) est ensuite traitée avec de la protéinase K (Thermo Scientific™ E00492) à 50 µg/ml et de la digitonine de 0,01 % à 0,15 % pendant 15 minutes à température ambiante. Le fluorure de phénylméthylsulfonyl (PMSF) à 100 µM est ajouté à la réaction afin d'inhiber la protéinase K puis 10% d'acide trichloracétique est ajouté à la réaction afin de précipiter les protéines. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 11 000g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot est repris dans le tampon Laemmli (65,8mM Tris-HCl, pH=6,8, 26,3% glycérol, 2,1% SDS, 0,01% bromophénol blue; Biorad) complété avec du dithiothréitol (DTT) à 100 mM. Les échantillons sont chauffés 10 minutes à 70°C avant d'être déposés sur gel de SDS-page pour le Western blot (cf 6.2.2).

3.5. Immunoprécipitation

Afin d'identifier les protéines partenaires de TRPV1mito, une immunoprécipitation de la GFP a été réalisée sur des cellules surexprimant de manière stable TRPV1mitoGFP, ou surexprimant de manière stable TRPV1mito et transfectées avec la GFP seule comme contrôle.

L'immunoprécipitation de la GFP a été réalisée à l'aide du kit GFP-trap MA (Chromotek). Les cellules d'une flask T75 sont rincées avec du PBS puis récoltées par grattage à froid sur la glace dans du PBS. Le culot de cellules est repris et incubé 10 minutes avec 200 µl de lysis buffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA, 0,5 % Nonidet™ P40 Substitute) supplémenté avec des inhibiteurs de protéases (cOmplete™ Protease Inhibitor Cocktail, ROCHE). Pendant ce temps, 25 µl de billes magnétiques présentant des sites de liaison spécifiques de la GFP sont équilibrées dans 500 µl de wash buffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,05 % Nonidet™ P40 Substitute, 0,5 mM EDTA). Un portoir magnétique permet d'isoler les billes magnétiques afin d'aspirer le surnageant. L'équilibration des billes est répétée 2 fois avant de reprendre les billes magnétiques dans 300 µl de dilution buffer (10 mM Tris/Cl pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5 mM EDTA). Le lysat cellulaire est ensuite centrifugé à 20 000g pendant 10 minutes à 4°C. Une partie du surnageant (20 µL) est récupérée et mise de côté pour l'électrophorèse (« Input »). Le reste du surnageant est ensuite incubé avec la suspension de billes magnétiques sous agitation à 4°C pendant toute une nuit. Le tube est ensuite placé sur le portoir magnétique afin de retirer le surnageant qui est conservé pour l'électrophorèse (« post-IP »). Les billes magnétiques sont incubées 3 fois avec 500 µl de wash buffer sous agitation pendant 10 minutes. Enfin, les billes magnétiques sont incubées avec 50 µL de tampon Laemmli (65,8mM Tris-HCl, pH=6,8, 26,3% glycérol, 2,1% SDS, 0,01% bromophenol blue; Biorad) et chauffé à 95°C pendant 10 minutes afin d'éluer les protéines fixées sur les billes magnétiques. La fraction protéique ainsi obtenue (« IP ») est ensuite conservée pour l'électrophorèse et l'analyse protéomique (plateforme 3P5 proteom'IC facility, Université de Paris, Institut Cochin, INSERM, CNRS, F-75014 PARIS, France).

Ensuite, pour déterminer les protéines partenaires de TRPV1mito parmi la liste des protéines identifiées lors de l'immunoprécipitation, les protéines présentes dans la condition contrôle, liées à l'immunoprécipitation de la GFP, ont été retirées. Puis, les protéines les moins représentées ont aussi été supprimées. Les protéines restantes ont ensuite été annotées avec leur localisation intracellulaire et leur fonction afin d'identifier un groupe de protéines ayant une fonction et une localisation commune.

Tableau 6 : Caractéristiques des différentes sondes calciques utilisées.

Nom	Nature	Type	Affinité (Kd)	Ex/Em	Compartiments cellulaires
Fura-2 AM	Chimique	ratiométrique	145nM	Ex : 340/380nm Em : 505nm	cytosol
4mtD3-CPV	Génétique	FRET	0.6µM	Ex : 433 nm Em : 475/528 nm	Matrice mitochondriale
erGAP1	Génétique	BRET	12µM	Ex : 403/470 nm Em : 510nm	RE
N33D3-CPV	Génétique	FRET	0.6µM	Ex : 433 nm Em : 475/528 nm	Hots spots mitochondriaux
Mito-GEM-GECO	Génétique	ratiométrique	340nM	Ex : 390 nm Em : 455/511 nm	Matrice mitochondriale

4. Rôle du variant humain TRPV1_{mito} dans l'homéostasie calcique

4.1. Principe des sondes calciques fluorescentes

Afin de suivre les variations de Ca^{2+} dans les différents compartiments cellulaires, des outils moléculaires fluorescents ont été développés. Ils constituent de véritables sondes cellulaires capables de se lier aux ions Ca^{2+} et dont les propriétés fluorescentes vont alors en être modifiées. Il existe plusieurs types de sondes calciques fluorescentes et on peut les classer en fonction de leur nature et de leurs caractéristiques.

Tout d'abord, on distingue les sondes chimiques et les sondes génétiques. Les sondes chimiques sont des molécules synthétiques et les sondes génétiques sont des protéines codées génétiquement par un vecteur d'expression. L'avantage majeur des sondes chimiques réside dans leur simplicité d'utilisation notamment depuis l'apparition des sondes chimiques possédant des groupements Acetoxymethyl ester (AM). En effet, les groupements AM permettent à la sonde de traverser la membrane cellulaire lors d'une incubation avec des cellules vivantes en la rendant liposoluble. Une fois dans le cytoplasme, ces groupements AM sont hydrolysés par les estérases cellulaires afin de piéger la sonde dans le cytoplasme. A l'inverse, les sondes génétiques nécessitent l'intégration du vecteur d'expression, par transfection ou infection, au moins 24h avant la mesure afin que les cellules expriment la sonde génétique utilisée. Ces sondes génétiques offrent plus de possibilités et de spécificités que les sondes chimiques, lorsqu'il s'agit de suivre des variations de Ca^{2+} dans des zones précises de la cellule. En effet, il est possible d'adresser les peptides vers un compartiment cellulaire spécifique en lui greffant une séquence d'adressage.

Ensuite, on peut classer les sondes en fonctions de leurs caractéristiques de fluorescence. Certaines sondes organiques, dites non-ratiométriques, ne présentent qu'un couple de longueur d'onde d'excitation/émission. Ainsi, seule l'intensité du signal fluorescent varie en fonction de la liaison de la sonde au Ca^{2+} . Ces sondes permettent de visualiser des cinétiques de variation rapide du Ca^{2+} intracellulaire, ainsi que sa distribution spatiale. D'autres sondes organiques, dites ratiométriques, présentent deux pics d'excitation ou deux pics d'émission. La mesure du rapport de fluorescences permet d'estimer la concentration en Ca^{2+} . Il existe également des sondes fluorescentes adressables (type caméléon) basées sur l'émission de lumière par FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) (Constantin et Deliot 2016). Lors de la liaison de la sonde au Ca^{2+} , l'intensité de fluorescence est transférée d'une longueur d'onde à une autre. Le transfert d'énergie s'effectue entre une protéine fluorescente et une autre, c'est-à-dire un donneur et un accepteur. La liaison au Ca^{2+} induit une modification de la conformation de la sonde, rapprochant ainsi le donneur et l'accepteur. Le donneur transfère son énergie à l'accepteur qui va émettre une fluorescence différente de celle émise lorsque la sonde n'est pas liée au Ca^{2+} .

4.2. Sondes calciques fluorescentes utilisées

Afin d'étudier les variations de Ca^{2+} dans différents compartiments cellulaires, plusieurs sondes calciques fluorescentes avec des caractéristiques différentes ont été utilisées (Tableau 6).

4.3. Protocole de marquage des cellules

4.3.1. Sonde chimique organique : Fura-2 AM

Les cellules sont rincées 2 fois avec le tampon HBSS (Hanks balanced salt solution : Gibco™ 14175095) complétées avec du CaCl₂ 2,5 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM et pH=7,3. Puis, les cellules sont incubées pendant 1 heure à température ambiante et à l'obscurité avec un mix de tampon HBSS contenant 0,02% d'acide pluronique®F127 (Sigma-Aldrich) et 4 μM de Fura-2 AM (Invitrogen™). Les cellules sont ensuite rincées et incubées dans le tampon HBSS pendant 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité avant l'acquisition.

4.3.2. Sondes génétiques

Les différents plasmides codant pour les sondes génétiques sont transfectés à l'aide du protocole de transfection décrit dans la partie 2.2.2. Le milieu des cellules est changé 24h après la transfection et les acquisitions sont réalisées 48h après la transfection.

4.4. Acquisition de la fluorescence des sondes calciques

4.4.1. Lecteur de plaque : Flexstation 3

La Flexstation 3 (Molecular Devices) est un lecteur de plaques qui permet de quantifier des signaux de fluorescence au cours du temps tout en réalisant différentes injections automatisées. Des cellules HEK293 sont d'abord transfectées avec les différents variants de TRPV1 (cf 2.2.2), ou co-transfectées avec les sondes génétiques, puis transférées dans une plaque 96 puits à 40 000 cellules par puit la veille de l'acquisition. Avant l'acquisition, les cellules sont marquées avec la sonde chimique Fura-2 AM ou simplement rincées puis incubées dans le tampon HBSS pour les cellules exprimant les sondes génétiques. Par ailleurs, les agents pharmacologiques sont dilués dans le tampon HBSS à une concentration 10X et transférés dans une plaque 96 puits. Les deux plaques sont ensuite placées dans la Flexstation 3 et la fluorescence est mesurée avec une acquisition toutes les 4,5 secondes. L'injection d'un agent pharmacologique (agoniste/antagoniste) est réalisée après 30 secondes d'acquisition à température ambiante.

Certaines acquisitions ont été réalisées dans un tampon dépourvu de Ca²⁺. Pour cela, les cellules sont rincées puis incubées dans le tampon HBSS 0Ca²⁺ (Hanks balanced salt solution : Gibco™ 14175095) complété avec EGTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, HEPES 10 mM et pH=7,3 avant l'acquisition.

4.4.2. Microscope à fluorescence

Pour les acquisitions au microscope à fluorescence, les cellules sont transfectées sur des lamelles de verres dans une plaque 6 puits (cf 2.2.2) avec les différents variants de TRPV1 en fusion avec la mCherry. Le milieu des cellules est changé 24h après la transfection et l'acquisition est réalisée 48h après celle-ci. Les acquisitions sont réalisées à température ambiante sur un microscope à champ large Leica DMI6000B équipé d'un objectif à huile 40X et d'une caméra ORCA-Flash 4.0 (HAMAMATSU). Le ratio de fluorescence est mesuré toutes les 5 secondes et analysé avec le logiciel Metafluor 6.3 (Universal Imaging) après avoir soustrait le bruit de fond.

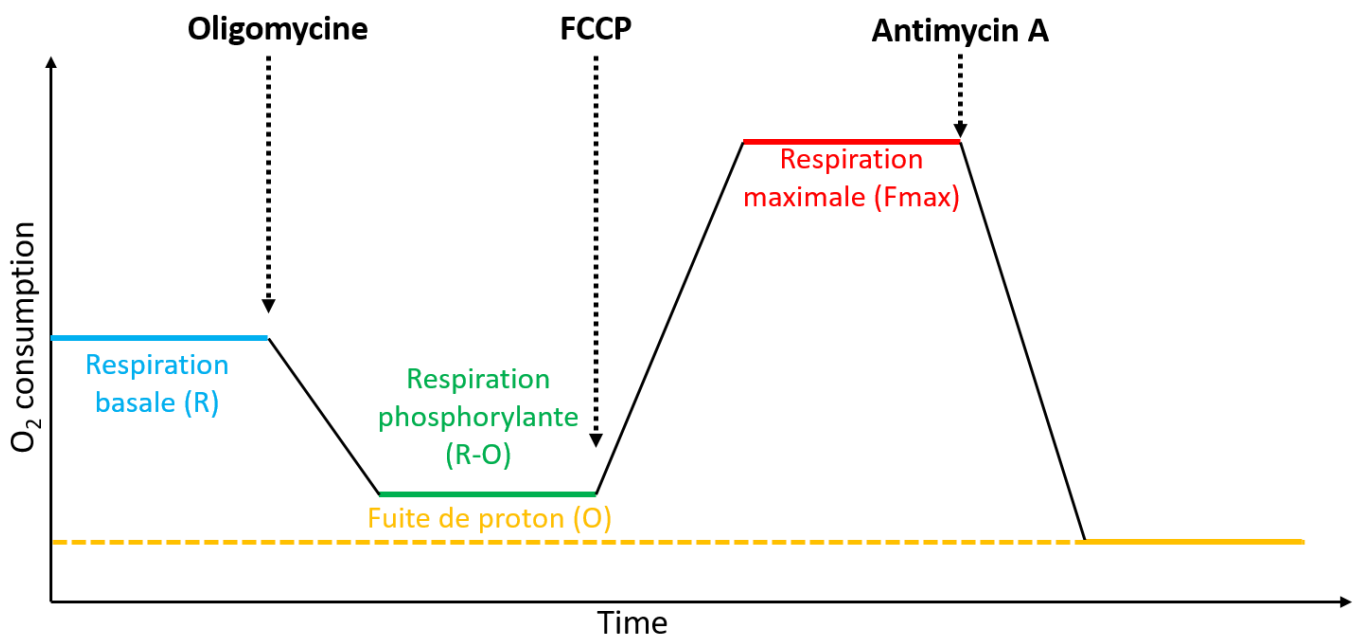


Figure 18 : Protocole utilisé pour la caractérisation de la respiration mitochondriale sur des cellules intactes avec le Seahorse XF96

4.5. Analyse des acquisitions des flux calciques

4.5.1. Taux de Ca²⁺ basal

Pour les sondes ratiométriques, le taux de Ca²⁺ est reflété par le ratio de fluorescence des deux couples de longueur d'onde pour une sonde donnée. Ainsi, le ratio de fluorescence des deux couples de longueur d'onde est comparé entre les différentes conditions en fonction du compartiment cellulaire observé et de la sonde utilisée.

4.5.2. Cinétique des flux calciques

Pour suivre l'évolution du taux de Ca²⁺ dans les différents compartiments cellulaires après l'injection d'agents pharmacologiques, le signal du ratio de fluorescence des deux couples de longueur d'onde au cours du temps est d'abord normalisé par rapport à la ligne de base obtenu avant l'injection. Deux types de normalisation ont été effectués.

La première normalisation consiste à définir la valeur moyenne de la ligne de base. Chaque valeur de la cinétique est ensuite rapportée à la valeur moyenne de la ligne de base afin d'obtenir un ratio dont la valeur de la ligne de base est à 1 (F/F_0). Une autre méthode de normalisation consiste à soustraire chaque valeur de la cinétique à la valeur moyenne de la ligne de base. Dans ce cas, la valeur de la ligne de base est fixée à 0 ($(F-F_0)/F_0$).

La réponse à la stimulation est ensuite quantifiée par l'aire sous la courbe (AUC) à l'aide du logiciel GraphPad Prism v8 ou quantifiée par l'analyse de l'amplitude maximale de la réponse.

5. Caractérisation de l'implication du variant humain TRPV1_{mito} sur la fonction mitochondriale

5.1. Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules intactes

5.1.1. Seahorse XF96 - Principe

Le Seahorse XF96 est un appareil commercialisé par la société Agilent. Celui-ci permet de mesurer la respiration mitochondriale en quantifiant la consommation d'O₂ sur des cellules intactes en plaque tout en injectant différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire (Figure 18). La première étape consiste à mesurer la consommation d'O₂ sans ajout d'inhibiteur afin d'évaluer la respiration basale (R). La deuxième étape consiste à inhiber l'ATP-synthase à l'aide d'oligomycine (2 µg/mL), pour évaluer la respiration phosphorylante (R-O) liée à la synthèse d'ATP. Ensuite, l'injection de FCCP à plusieurs concentrations (0,1 à 1 µM) va permettre de découpler les mitochondries afin d'évaluer la capacité respiratoire maximale des mitochondries (F_{max}). Enfin, l'injection d'Antimicyne A (2 µg/mL) va inhiber le complexe III de la chaîne respiratoire et entraîner l'arrêt total de son fonctionnement. Cette dernière étape permet de définir la valeur de la consommation d'O₂ liée aux mitochondries durant toute l'acquisition et d'évaluer la fuite de proton (O).

5.1.2. Seahorse XF96 - Protocole

Les cellules sont rincées avec du tampon phosphate salin (PBS) puis récoltées grâce à une incubation dans la trypsine. Les cellules sont ensuite comptées puis déposées à 30 000 cellules par puit dans une plaque 96 puits (Agilent). Après 4 heures, les cellules sont rincées 3 fois avec le tampon respiration (DMEM sans phénol red/bicarbonate de sodium, glucose 4,5 g/L, Glutamine 1 mM, pH=7,4) puis incubées 1 heure à 37°C dans un

Tableau 7 : Etape du protocole d'acquisition de la consommation d'O₂ avec le Seahorse XF96

	Mesure n°1	Mix 2 min	Mesure 3 min
	Mesure n°2	Mix 2 min	Mesure 3 min
	Mesure n°3	Mix 2 min	Mesure 3 min
Injection 1 (Oligomycine)	Mesure n°4	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°5	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°6	Mix 3 min	Mesure 3 min
Injection 2 (FCCP)	Mesure n°7	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°8	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°9	Mix 3 min	Mesure 3 min
Injection 3 (FCCP)	Mesure n°10	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°11	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°12	Mix 3 min	Mesure 3 min
Injection 4 (Antimicyne A)	Mesure n°13	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°14	Mix 3 min	Mesure 3 min
	Mesure n°15	Mix 3 min	Mesure 3 min

incubateur sans CO₂. Pendant ce temps, les différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont dilués à des concentrations 10X pour le port d'injection A, 11X pour le port d'injection B, 12X pour le port d'injection C et 13X pour le port d'injection D. Ces solutions d'inhibiteurs sont ensuite transférées dans les ports d'injections d'une cartouche Seahorse préalablement hydratée la veille avec une solution de calibrant (Agilent). La cartouche est ensuite placée sur la plaque de cellules avant de placer l'ensemble dans l'appareil Seahorse XF96. Le protocole d'acquisition utilisé est décrit dans le tableau 7.

5.1.3. Seahorse XF96 – Analyse

Pour obtenir les valeurs de respiration mitochondriale, chaque valeur brute de consommation d'O₂ est soustraite par la valeur de respiration après l'injection d'antimycine A. Pour calculer la capacité respiratoire maximale (Fmax), la courbe de tendance polynomiale de second degré :

$$Y = -ax^2 + bx + c$$

est calculée à l'aide des valeurs de respiration des différentes concentrations de FCCP. Les coordonnées du sommet de la parabole sont ensuite calculées à l'aide des formules :

$$x_{\max} = b / (1 * -a)$$
$$Y_{\max} = (a * x_{\max}) + (b * x_{\max}) + c$$

La valeur du Fmax est donnée par la valeur Y_{max}. Au final, à l'aide des valeurs de la respiration basale (R), de la fuite de proton (O), de la capacité respiratoire maximale (Fmax), on peut calculer :

- la respiration phosphorylante (R-O)
- le ratio de la respiration phosphorylante par rapport à la capacité respiratoire maximale (R-O/Fmax)
- le ratio de la respiration basale par rapport à la capacité respiratoire maximale (R/Fmax)
- le ratio de la fuite de proton par rapport à la capacité respiratoire maximale (O/F)
- le ratio de la respiration phosphorylante par rapport à la respiration basale (R-O/R).

5.2. Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules perméabilisées

5.2.1. Oroboros O2K - Principe

L'appareil Oroboros O2k, commercialisé par Oroboros Instruments, permet de quantifier la consommation d'O₂ de cellules en suspension dans une cuve fermée. Contrairement au Seahorse XF96 qui offre une quantification « haut débit » de la respiration mitochondriale, l'Oroboros O2K ne possède que deux cuves de mesures mais il permet de quantifier de manière plus sensible et précise la respiration mitochondriale. De plus, étant un système ouvert, le nombre d'injections dans la cuve n'est pas limité. Les cellules sont perméabilisées puis placées dans la cuve d'oxygraphie avant de la refermer. Les substrats et les inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont ensuite injectés séquentiellement. Contrairement à une oxygraphie sur cellules intactes, l'oxygraphie sur cellules perméabilisées permet de contrôler le métabolisme mitochondrial et de caractériser le fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Tableau 8 : Composition des tampons de respiration « Rustin » utilisés pour les oxygraphies sur cellules perméabilisées

Tampon Rustin	
KH ₂ PO ₄	10mM
Mannitol	300mM
KCl	10mM
MgCl ₂	5mM
EGTA	0.5mM
pH	7.4

Tampon Rustin + BSA	
BSA	1mg/ml
Tampon Rustin	Qsp X ml
pH	7.4

Tableau 9 : Préparation des substrats et des inhibiteurs de la chaîne respiratoire utilisées pour les oxygraphies sur cellules perméabilisées

Substrats/inhibiteurs	[C]	Méthode de préparation	Conservation
Malate	0.5 M	670.4 mg dans 10 ml d'H ₂ O	-20°C
Pyruvate	0.5M	550 mg dans 10 ml d'H ₂ O	-20°C
Succinate	0.5M	590.5 mg dans 10 ml d'H ₂ O, pH = 7	-20°C
Glutamate	0.5M	735.7 mg dans 10 ml d'H ₂ O, pH = 7	-20°C
Azide	1M	130 mg dans 2 ml d'H ₂ O	-20°C
KCN	0.5M	65.12 mg dans 2 ml d'H ₂ O	-20°C
ADP	0.15M	16.02 mg dans 250µl d'H ₂ O (le jour de l'utilisation)	-20°C
Ascorbate	0.4M	17.61 mg dans 250µl d'H ₂ O (5 minutes avant utilisation)	T° ambiante
TMPD	30mM	2.464 mg dans 500µl d'H ₂ O puis 37°C pendant 2 heures avant utilisation	T° ambiante
Cytochrome C	320µM	5.663 mg dans 20 ml d'H ₂ O	-20°C
Roténone	2.5mM	4.930 mg dans ½DMSO/½Ethanol	-20°C
Oligomycine	4mg/ml	20 mg/ml	-20°C
FCCP	1mM	2.542 mg dans 10 ml d' éthanol	-20°C
Antimicyne A	1mg/ml	1mg dans 1 ml d' éthanol	-20°C
Digitonine	5mg/ml	5 mg dans 1 ml d'H ₂ O puis 95°C pendant 2 minutes 30 (maximum 4 heures avant utilisation)	T° ambiante

5.2.2. Oroboros O2K – Protocole

a) Préparation du matériel

Pour réaliser l'oxygraphie, les cellules sont reprises dans un tampon de respiration, le tampon Rustin (Tableau 8). Les substrats et les inhibiteurs de la chaîne respiratoire utilisés sont préparés à l'avance à des concentrations élevées (Tableau 9).

b) Perméabilisation des cellules

Les cellules en culture ($\approx 80\%$ de confluence) sont rincées avec du PBS puis récoltées grâce à une incubation dans la trypsine. Les cellules sont ensuite reprises dans le tampon Rustin à 50 μl par million de cellules. La digitonine est ensuite ajoutée à 10 μg par million de cellules puis les cellules sont incubées pendant 2 min 30 sec sur un portoir agitant afin de perméabiliser les cellules. La perméabilisation est arrêtée grâce à l'ajout de 2 volumes de tampon Rustin + BSA. Les cellules sont centrifugées à 800g pendant 2 minutes 30 afin de retirer le surnageant avant d'être reprise dans 200 μl de tampon Rustin + BSA. Les cellules sont alors prêtes à être transférées dans la cuve d'oxygraphie.

c) Oxygraphie

Les cellules sont placées dans la cuve d'oxygraphie avant de refermer le bouchon. Par la suite, les substrats et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire sont injectés séquentiellement une fois que la consommation d' O_2 dans la cuve est stabilisée (Tableau 10). A la fin de l'oxygraphie, les cellules sont récupérées en triplicat par cuve et conservées à 4°C afin de réaliser le dosage des protéines (cf 6.2.1).

5.2.3. Oroboros O2K- Analyse

L'analyse des oxygraphies est réalisée à l'aide du logiciel OROBOROS Datlab (Oroboros Instruments). Les valeurs de consommation d' O_2 sont extraites pour chaque étape de l'oxygraphie et normalisées à l'aide du dosage en protéine (en mg/ml de protéine).

5.3. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

5.3.1. Principe

La mesure du potentiel de membrane mitochondrial (Ψ_m) est possible grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente, l'ester méthylique de tétraméthylrhodamine (TMRM). Le TMRM s'accumule dans les mitochondries actives et émet une fluorescence qui varie en fonction du Ψ_m avec un couple d'excitation/émission de 548nm/573nm.

5.3.2. Protocole

Les cellules HEK293 sont transfectées afin de surexprimer TRPV1mitoGFP ou la GFP seule. Puis, 48h après la transfection, les cellules sont incubées dans 300 nM de TMRM diluée dans le milieu de culture pendant 30 minutes à 37°C et placées sous un microscope inversé NIKON ECLIPSE Ti-E (Nikon Instruments Europe) muni d'une caméra Andor NEO sCOMS. La fluorescence du TMRM est ensuite mesurée toutes les 30 secondes pendant 3 minutes. Après ces 3 minutes, le carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone (CCCP), un agent découplant, est

Tableau 10 : Séquence d'injection et mode d'action des différents substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire utilisés pour les oxygraphies sur cellules perméabilisées

Substrats/Inhibiteurs	[C_{finale}]	Intérêt d'utilisation
Pyruvate	2.5mM	Substrat du cycle de KREBS (alimente le complexe I uniquement)
Malate	5mM	
ADP	1.5mM	Respiration phosphorylante (activation de l'ATP synthase)
Glutamate	5mM	Seconde entrée dans le cycle de KREBS (alimente le complexe I) et permet de vérifier si la Pyruvate Déshydrogénase est limitante
Succinate	10mM	Substrats du complexe II
Roténone	2.5µM	Inhibition du complexe I
Oligomycine	4µg/ml	Inhibition de l'ATP-synthase
FCCP	1µM	Contrôle de la perméabilisation
Cytochrome C	8µM	Contrôle intégrité membranaire
Antimicyne A	2µg/ml	Inhibition du complexe III
Ascorbate	4mM	Fournit des électrons et alimente le complexe IV
TMPD	0.3mM	
KCN	1mM	Inhibition du complexe IV
Azide	2mM	

injecté sur les cellules à 10 μ M. Le signal fluorescent du TMRM est ensuite mesuré pendant 10 minutes toutes les 30 secondes.

5.3.3. Analyse

Les images sont analysées avec le logiciel MétaMorph 7.7 (Molecular Devices). Grâce à la surexpression de TRPV1mitoGFP ou de la GFP seule, les cellules émettant une fluorescence correspondant à la GFP sont sélectionnées. Des zones d'intérêt sont alors placées au niveau des mitochondries de ces cellules, visibles grâce à la fluorescence du TMRM, et dans une zone de bruit de fond. Les valeurs d'intensité du signal fluorescent du TMRM sont récupérées. Les valeurs de fluorescence du bruit de fond sont alors soustraites à celle des cellules. Dans l'analyse finale, seules les cellules ayant montrées une diminution du signal fluorescent du TMRM après l'injection du CCCP ont été analysées.

6. Fiches techniques

6.1. Biologie Moléculaire

6.1.1. Amplification et isolement de fragment ADN

a) PCR

La technique de PCR (Polymerase Chain Reaction) est devenue une technique largement utilisée en biologie moléculaire pour amplifier des fragments d'ADN d'intérêt. Cette technique a été utilisée pour amplifier des fragments d'ADN d'intérêt à partir d'un plasmide ou d'ADNc. Le mix réactionnel est composé : d'une amorce sens (10 μ M), d'une amorce anti-sens (10 μ M), du prémix CloneAmp HiFi 2X (Takara) et 10-50 ng de matrice ADN et d'eau. Ce mix est ensuite placé dans un thermocycleur (Biorad) afin de suivre le programme de PCR :

	95°C	2 min	
X40	95°C	20s	(Etape de dénaturation de l'ADN)
	60°C	30s	(Etape d'hybridation des amorces)
	72°C	50s	(Etape d'élongation par la polymérase)
	72°C	2 min	

Après l'amplification, les produits de PCR sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose.

b) Electrophorèse

Une électrophorèse sur gel d'agarose permet de faire migrer des fragments d'ADN et de les séparer en fonction de leur taille. Cette technique est utilisée suite à une réaction de PCR ou suite à une digestion enzymatique d'un plasmide. Pour la préparation du gel, de la poudre d'agarose (ThermoFisher) est dissoute dans du tampon TBE (Tris-borate-EDTA) à un pourcentage compris entre 0,8 et 2%, en fonction de la taille des fragments d'ADN à faire migrer, puis portée à ébullition dans un micro-onde. La préparation est ensuite coulée dans un portoir adapté avec un peigne pour former les puits. Une fois que la polymérisation du gel est terminée par refroidissement, le peigne est retiré et le portoir contenant le gel est placé dans la cuve de migration remplie de tampon TBE. Le tampon de charge « DNA Gel Loading Dye 6X » (Thermo Fischer) est ajouté aux échantillons avant de les déposer dans les puits. Puis, la migration est réalisée à 150 Volts à l'aide d'un appareil d'électrophorèse « PowerPac™ Basic Power Supply » (Biorad). Le temps de migration dépend de la taille des

fragments d'ADN d'intérêt et varie de 30 min à 2 heures. Après la migration, le gel d'agarose est retiré de son portoir et plongé dans une solution de « GelRed Nucleic Acid Stain » (Thermo Fischer) à 0,01% dans le tampon TBE pendant 20 minutes. Le gel d'agarose est ensuite rincé puis révélé à l'aide de l'appareil « Odyssey Fc » (LI-COR) à une longueur d'onde de 600nm.

c) Isolement de fragment d'ADN à partir d'un gel d'agarose

Afin de purifier un fragment d'ADN amplifié par PCR puis séparé par électrophorèse sur gel d'agarose, la bande d'ADN d'intérêt est découpée et isolée à l'aide d'un scalpel et placée dans un tube eppendorf. L'extraction d'ADN du gel d'agarose est alors réalisée à l'aide du kit « NucleoSpin Gel and PCR Clean-up » (Macherey-Nagel). Le protocole consiste à dissoudre le gel d'agarose dans 200 µl de tampon NTI pour 100 mg de gel d'agarose grâce à une incubation à 50°C pendant 20 minutes sous agitation. La solution est ensuite transférée dans une colonne contenant une membrane de silice, elle-même placée dans un tube récupérateur. Le tube est alors centrifugé 1 minute à 11 000g et le tube de récupération est vidé. L'ADN est alors capté par la membrane de silice. La colonne est ensuite rincée deux fois avec l'ajout de 500 µl de tampon de lavage à l'éthanol et une centrifugation de 1 minute à 11000g. Puis, la membrane est séchée grâce à une centrifugation à sec pendant 2 minutes à 11 000g. L'ADN est ensuite élué dans 20 µl d'eau et une centrifugation de 1 minute à 11 000g. Après l'extraction, la concentration en ADN obtenue est mesurée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fischer).

6.1.2. Quantification de l'expression génique

a) Principe de la qPCR

La technique de PCR quantitative (qPCR) consiste à quantifier l'amplification des fragments d'ADN d'intérêt au cours d'une réaction de PCR. Cette quantification est possible grâce à une molécule fluorescente qui se lie aux brins d'ADN doubles brins, formés durant la réaction de PCR. La fluorescence de cette molécule reflète ainsi la quantité de fragments d'ADN d'intérêt double brin formée à chaque cycle de PCR. Grâce aux courbes d'amplifications, on peut ainsi retrouver la quantité initiale du fragment d'ADN d'intérêt qui reflète le nombre de copies d'ARNm et donc le niveau d'expression d'un gène, par exemple. Il est à noter que cette quantité initiale de fragments d'ADN d'intérêt peut être relative, par rapport à un autre fragment de référence, ou absolue, par rapport à une gamme étalon de quantité d'ADN connue.

b) Extraction d'ARNm

L'extraction d'ARN est réalisée à l'aide du kit RNeasy (QIAGEN). Pour cela, le culot cellulaire est repris avec 350 µl de tampon RLT et 350 µL d'éthanol 70%. La solution est ensuite transférée dans une colonne contenant une membrane de silice, elle-même placée dans un tube de collection, puis centrifugée à 8 000g pendant 15 secondes. 350 µl de tampon RW1 est ajouté dans la colonne avant de centrifuger à nouveau la colonne à 8 000g pendant 15 sec. Le tube de collection est vidé. Afin d'éliminer l'ADN génomique, un mix de 70 µl de tampon RDD et 10 µl de DNase 1 issu du kit « RNase-Free DnNase Set » (Qiagen, 79254) est ajouté sur la colonne puis incubé 15 min à température ambiante. La colonne est rincée deux fois avec 350 µl de tampon RW1 et une centrifugation à 8 000g pendant 15 sec. Le tube de collection est vidé. La colonne est rincée deux fois avec 500 µl de tampon RPE et une centrifugation 8 000g pendant 15 secondes. Le tube de collection est vidé. Puis, la membrane est séchée grâce à une centrifugation à sec pendant 2 minutes à 11 000g. La colonne est

Tableau 11 : Liste des amorces utilisées pour la détection des transcrits de TRPV1 par RT-qPCR chez l'homme

Nom	Séquence (5'->3')
hTRPV1pm-F	GGTGCCAGGCTGCTGTCC
hTRPV1pm-R	CCTGTCTCAGGGTCTTTGAACTCG
hTRPV1mito-F	CGAGTTCAAAGGTGGCCCCAG
hTRPV1mito-R	CGTCTCAGGGTCTGAAAGACATAAGG

placée dans un nouveau tube de collection afin de réaliser l'élution dans 30 µl d'eau RNase free grâce à une centrifugation 1 minute à 8 000g. Après l'extraction, la concentration en ARN obtenue est mesurée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fischer).

c) Reverse Transcription

La technique de Reverse Transcription (RT) permet d'obtenir les séquences d'ADN complémentaires (ADNc) à partir d'un pool d'ARN dont la stabilité est trop faible. Après l'extraction des ARNs, ceux-ci sont rétro transcrits à l'aide du kit « Transcriptase inverse SuperScript™ II » (Thermo Fischer). Pour cela, il faut réaliser le mix réactionnel :

500 ng d'ARNm	X µl
Oligo dT (500 µg/mL)	1 µl
dNTPs (10 mM chacun)	1 µl
H2O	qsp 12 µl

Le mix réactionnel est ensuite chauffé à 65°C pendant 5 minutes puis replacé dans la glace avant d'y ajouter 4 µl de 5X First-Strand Buffer, 2 µl de DTT (0,1M), 0,5 µl de SuperScript II et 0,5 µl d'eau. Le mix est incubé 50 minutes à 42°C puis 15 minutes à 70°C afin d'obtenir une solution de cDNAs à 25 ng/µl.

d) qPCR relative sur TRPV1

Pour quantifier l'expression des différentes isoformes de TRPV1, des amorces ont été conçues pour amplifier spécifiquement des fragments de TRPV1pm ou TRPV1mito. TRPV1mito étant un variant d'épissage alternatif de TRPV1pm, les séquences codantes de ces isoformes diffèrent uniquement au niveau de la rétention de l'intron entre les exons codants 2 et 3. Pour quantifier l'expression de TRPV1mito, les amorces ont été conçues pour amplifier un fragment d'ADN d'environ 100 bp correspondant à la rétention d'intron. En revanche, pour quantifier l'expression de TRPV1pm, les amorces ont été conçues pour amplifier un fragment d'ADN d'environ 100 bp correspondant à la jonction entre les exons codants 2 et 3 (Tableau 11). L'outil Primer Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) a été utilisé pour la conception des amorces. Puis l'outil Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>) a été utilisé pour vérifier la qualité des amorces comme l'absence de séquences répétées inversées ou l'absence de complémentarité des amorces pour éviter la formation de repliement intramoléculaire ou de dimère.

Pour réaliser la qPCR, un mix réactionnel est composé : SYBR Green (Biorad) 2X, des amorces sens et anti-sens du fragment d'intérêt (5 µM), d'ADNc (25 ng) et d'eau dans une plaque 96 puits. La plaque est ensuite placée dans un thermocycleur CFX96 (Biorad) afin de suivre le cycle suivant :

	95°C	3 min
X40	95°C	10s
	60°C	20s
	95°C	10s
	65°C->95°C	0.5°C/s

Chaque point est réalisé en triplicat et les résultats sont analysés grâce à la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ grâce à la quantification de l'expression de la GAPDH ou de la β -actine, utilisé comme contrôle interne pour normaliser l'expression de TRPV1.

6.1.3. Amplification des plasmides

Afin de constituer un stock important de tous les plasmides utilisés, ceux-ci sont amplifiés dans des bactéries compétentes et extraits à l'aide du kit « Monarch Plasmid Miniprep » (New England Biolabs) ou du kit « Plasmid Maxi » (Qiagen) en fonction de la quantité de plasmide désirée.

a) Transformation bactérienne

Dans un premier temps, on met en contact 20 μ L de bactéries compétentes StellarTM (Takara Bio) avec environ 10-20 ng du plasmide d'intérêt puis on incube 20 minutes sur la glace. On réalise ensuite un choc thermique en plaçant le tube à 43°C pendant 45 sec puis on l'incube à nouveau 10 minutes sur la glace. On ajoute 200 μ l de SOC medium (Takara Bio) préalablement chauffé à 37°C avant de placer le tube de bactéries dans un incubateur à 37°C pendant 1 heure. Après cela, un quart de la pré-culture bactérienne est étalé en gradient dans une boîte de pétri contenant une gélose à base d'agar (15 g/l), de luria broth medium (25 g/l) (Invitrogen) et de l'antibiotique de sélection (50 μ g/ml), notamment l'ampicilline (Sigma) ou la kanamycine (Sigma). La boîte de pétri est incubée à 37°C pendant une nuit.

b) Sélection des clones et amplification en milieu liquide

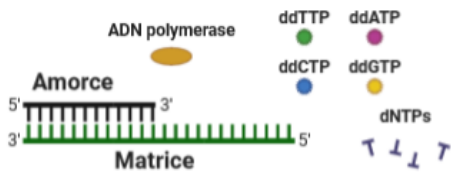
Le lendemain de la transformation bactérienne, plusieurs colonies bactériennes sont isolées à l'aide d'un inoculateur puis mises en culture dans un milieu liquide de luria broth (25 g/l) et de l'antibiotique de sélection (50 μ g/ml) à 37°C sous agitation pendant toute une nuit. Il est à noter que le volume de milieu liquide dépend de la quantité de plasmide désirée, 5 mL de milieu liquide pour une miniprep et 100 ml de milieu pour une maxiprep.

c) Extraction du plasmide

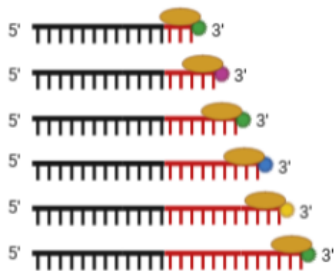
Le lendemain de la sélection clonale, les plasmides de chaque clone bactérien sont extraits et purifiés à l'aide du kit « Plasmid Miniprep » (Monarch[®]) ou du kit « Plasmid Maxi » (Qiagen). Les protocoles des kits de minipreps et maxipreps reposent sur le même principe, et seul le protocole du kit « Plasmid Miniprep » (Monarch[®]) est détaillé ici.

La culture bactérienne est centrifugée à 10 000g pendant 5 minutes et le surnageant est éliminé. Le culot bactérien est repris dans 300 μ l de tampon B1. Puis 300 μ l de tampon B2 sont ajoutés et le tube est incubé 2 à 3 min à température ambiante. 600 μ l de tampon B3 sont ajoutés et la solution est homogénéisée délicatement jusqu'à ce qu'elle devienne entièrement jaune. Le tube est centrifugé 5 minutes à 13 000g et le surnageant est transféré dans une colonne contenant une membrane de silice, elle-même placée dans un tube de collection. La colonne est centrifugée 1 minute à 13 000g et le tube de collection est vidé. 200 μ l de tampon de lavage 1 sont ajoutés et le tube centrifugé 1 minute à 13 000g. De la même manière, 400 μ l de tampon de lavage 2 sont ajoutés et le tube est centrifugé 1 minute à 13 000g. La membrane de silice est séchée grâce à une centrifugation à sec 2 minutes à 13 000g. La colonne est placée dans un nouveau tube de collection et le plasmide est élué en

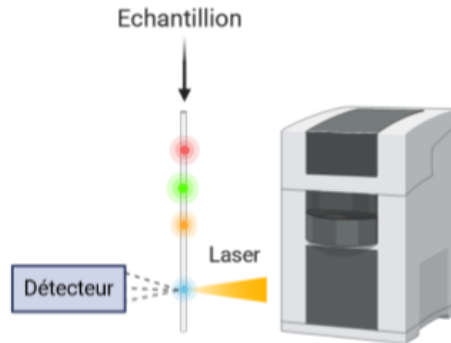
1 Mélange des réactifs



2 PCR de séquence



3 Electrophorèse et détection de fluorescence



4 Analyse des séquences

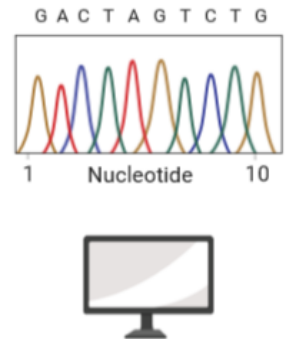


Figure 19 : Représentation schématique des étapes du séquençage Sanger

Tableau 12 : Composition des gels de migration utilisés pour le SDS-page

Type de gel	Composition	Concentration
Gel de migration	Tris 1.5M pH 8.8	0.375M
	Acrylamide 30%	6% à 12%
	SDS 10%	0.1%
	Temed	0.1%
	Ammonium persulfate (APS) 10%	0.075%
	H ₂ O	q.s.p 30ml
Gel de concentration	Tris 0.5M pH 6.8	0.125M
	Acrylamide 30%	5%
	SDS 10%	0.1%
	Ammonium persulfate (APS) 10%	0.075%
	Temed	0.1%
	H ₂ O	q.s.p 10ml

déposant 40 µl d'eau dans la colonne, suivi par une centrifugation 1 minute à 13 000g. La concentration de plasmides extraits est alors mesurée à l'aide du spectrophotomètre NanoDrop (Thermo Fischer).

Avant l'extraction, il est possible de conserver des bactéries transformées en les congelant dans une solution de glycérol 25% à 80°C. Ce stock dans le glycérol permet de ré-amplifier les bactéries contenant le plasmide d'intérêt sans refaire de transformation bactérienne.

d) Vérification de l'amplification

Pour chaque clone bactérien, la réussite de l'amplification est vérifiée par digestion enzymatique à l'aide d'enzyme de restriction spécifique ou par PCR, suivi d'une électrophorèse sur gel d'agarose. La méthode de vérification est définie par la séquence du plasmide d'intérêt notamment en fonction des amorces de PCR à disposition et des emplacements des sites de restriction dans le plasmide.

Séquençage Sanger

La première étape du séquençage consiste à réaliser une PCR de séquence à l'aide du kit « BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing » (Thermo Fischer). Pour cela, des amorces sont conçues préalablement pour s'hybrider de part et d'autre du site à séquencer lors de la PCR de séquence. Pour la PCR de séquence, un mix est réalisé avec une amorce (10 µM), la matrice ADN à séquencer (10 ng), le tampon de séquençage (5X) et le prémix Big dye Terminator (5X) qui contient les ddNTPs fluorescents et l'ADN polymérase. Il est important de noter que, contrairement à une PCR classique, on utilise une seule amorce par réaction pour amplifier en simple brin la zone d'intérêt. La réaction de PCR de séquence est alors réalisée dans un thermocycleur à l'aide du programme suivant :

	96°C	2 min
X25	96°C	10 s
	50°C	5 s
	60°C	4 min

Une fois la PCR de séquence terminée, l'ADN est précipité par l'ajout d'EDTA (125 mM), d'acétate de sodium (3 µM) et d'éthanol 100% (70% final) puis par centrifugation à 4 000t/min pendant 40 minutes. Le culot d'ADN est ensuite rincé avec de l'éthanol 70% puis centrifugé à 3 500t/min pendant 15 minutes. Le culot d'ADN est ensuite repris dans le « Formamide Hi-Di™ » (Thermo Fischer). L'analyse de la PCR de séquence est ensuite réalisée dans le séquenceur « 3130XL Series Genetic Analyzer » (Thermo Fischer) et les données sont traitées avec le logiciel « SeqScape™ Software v3.0 » (Thermo Fischer) (Figure 19).

6.2. Biochimie

6.2.1. Dosage de protéines

Le dosage de protéines est réalisé avec le kit « Thermo Scientific™ Pierce™ BCA Protein Assay Kit ». Une gamme étalon est préparée avec de la BSA (Bovine Sérum Albumine) avec les concentrations : 0,125 µg/µl, 0,25 µg/µl, 0,5 µg/µl et 1 µg/µl. Dans une plaque 96 puits, 10 µl de la gamme, ou des échantillons à doser, sont déposés avant d'y ajoutés 190 µl d'un mélange de solution B et de solution A (1/50). La plaque est incubée 30

Tableau 13 : Liste des anticorps primaires utilisés ou testés pour la détection de différentes protéines suite à une électrophorèse sur gel SDS-page

Cible de l'anticorps I ^{re}	Concentration	Hôte	Référence
TRPV1	1/200 - 1/500	Lapin	ACC-030 (Alomone Labs)
	1/200 - 1/500	Lapin	PA7-77317 (Thermo Scientific)
	1/200 - 1/500	Lapin	Bs-1931 (Bioss Antibodies)
	1/200 - 1/500	Lapin	PA5-34498 (Thermo Scientific)
	1/200 - 1/500	Lapin	A8564 (ABclonal)
	1/200 - 1/500	Lapin	CPA3024 (CliniSciences)
	1/200 - 1/500	Lapin	PAB0698 (Abnova)
GFP	1/2000	Souris	JL-8 (Takara Bio)
TFAM	1/2000	Lapin	ab176558 (abcam)
TIM44	1/2000	Lapin	ab201453 (abcam)
α -Tubuline	1/5000	Lapin	ab176560 (abcam)
TOM20	1/2000	Souris	ab562783 (abcam)
TIM23	1/2000	Lapin	ab116329 (abcam)
SERCA	1/2000	Souris	ab2861(abcam)
GRP75	1/2000	Souris	ab2799 (abcam)
VDAC	1/2000	Souris	ab14734 (abcam)

Tableau 14 : Liste des anticorps secondaires utilisés ou testés pour la détection de différentes protéines suite à une électrophorèse sur gel SDS-page

Anticorps II ^{re}	Concentration	Référence
α -souris IgG HRP linked	1/5000	MilliporeSigma-GENA931-1ML
α -lapin IgG HRP linked	1/5000	MilliporeSigma-GENA934-1ML

min à 37°C puis l'absorbance à 562 nm est mesurée à l'aide du CLARIOstarPlus (BMG Labtech). La concentration en protéines des échantillons est alors calculée en fonction de l'absorbance de la gamme étalon.

6.2.2. Western blot

La technique du Western Blot est utilisée pour la migration des protéines issues de cellules en culture ou de différentes fractions cellulaires. Les échantillons sont repris dans le tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases puis incubés 30 minutes sous agitation à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 13 000rpm pendant 5 minutes puis le surnageant est transféré dans un autre tube et le culot de débris cellulaire est jeté. Un dosage protéique est alors réalisé pour connaître la concentration en protéine des échantillons.

Pour chaque échantillon, l'équivalent de 20 µg à 40 µg de protéine est ensuite dilué dans le tampon Laemmli (65,8mM Tris-HCl, pH=6.8, 26,3% glycérol, 2,1%SDS, 0,01% bromophenol blue; Biorad) complété avec du dithiothréitol (DTT) à 100 mM avant d'être chauffé 10 minutes à 70°C. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits d'un gel SDS-page « fait maison » préparé et polymérisé au préalable dans un portoir adapté (Tableau 12), ou d'un gel commercial (Tris-Glycine precast gel 4-20%, NuSep, NB10-420) avec le marqueur de poids moléculaire (PageRuler 10-250 Kda, Thermo Scientific™ 26620). La migration des protéines est ensuite réalisée par électrophorèse à 100V pendant 20 minutes puis à 150V pendant 1h à 2h30 grâce à un générateur (PowerPac Universal Power Supply, BioRad). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Trans-Blot Turbo Mini 0.2 µm PVDF Transfer Packs #1704156) dans un appareil de transfert (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Biorad) pendant 10 min à 1,5A et 25V. Les membranes sont saturées pendant 1 heure dans le tampon de saturation TBS (NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM, pH=7,6) +Tween 0,1% + lait 5% à T° ambiante sous agitation. Puis, elles sont incubées avec l'anticorps primaire (Tableau 13) toute la nuit sous agitation à 4°C. Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois pendant 5 minutes avec le tampon TBS-Tween 0,1% puis incubées avec l'anticorps secondaire (Tableau 14) pendant 1 heure à T° ambiante sous agitation. La membrane est à nouveau lavée 3 fois pendant 5 minutes avant la révélation. Les membranes sont révélées avec la méthode de détection par chimiluminescence avec le kit de révélation « Pierce™ ECL Western Blotting Substrate » (Thermo Scientific™, 32109) grâce à l'imageur « Odyssey Fc » (LI-COR).

7. Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8. La normalité des données a été testée avec le test de Kolmogorov Smirnov. L'ensemble des données ne suivant pas une loi normale, les tests non paramétriques de Mann-Whitney, pour une comparaison de deux groupes, et Kruskal-Wallis, pour une comparaison de trois groupes ou plus, ont été utilisés. Les différences sont considérées comme significatives lorsque la p-value est inférieur à 0.05.

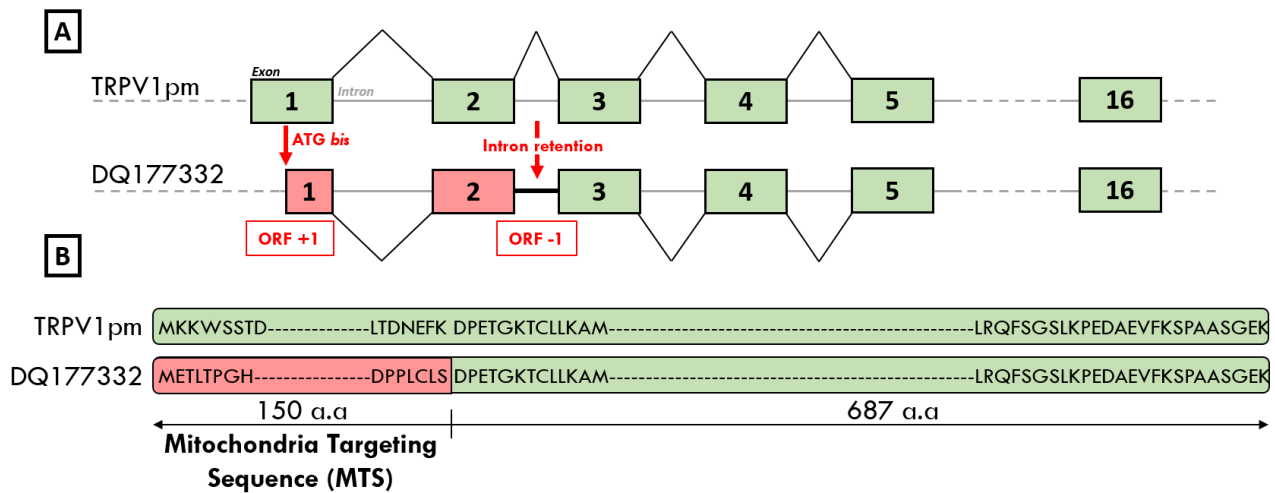


Figure 21: Comparaison des séquences codantes de TRPV1pm et du variant DQ177332 (TRPV1mito)
 (A) Séquences codantes de TRPV1pm et TRPV1mito sur la structure du gène de TRPV1. (B) Structure protéique de TRPV1mito par comparaison avec le variant TRPV1pm

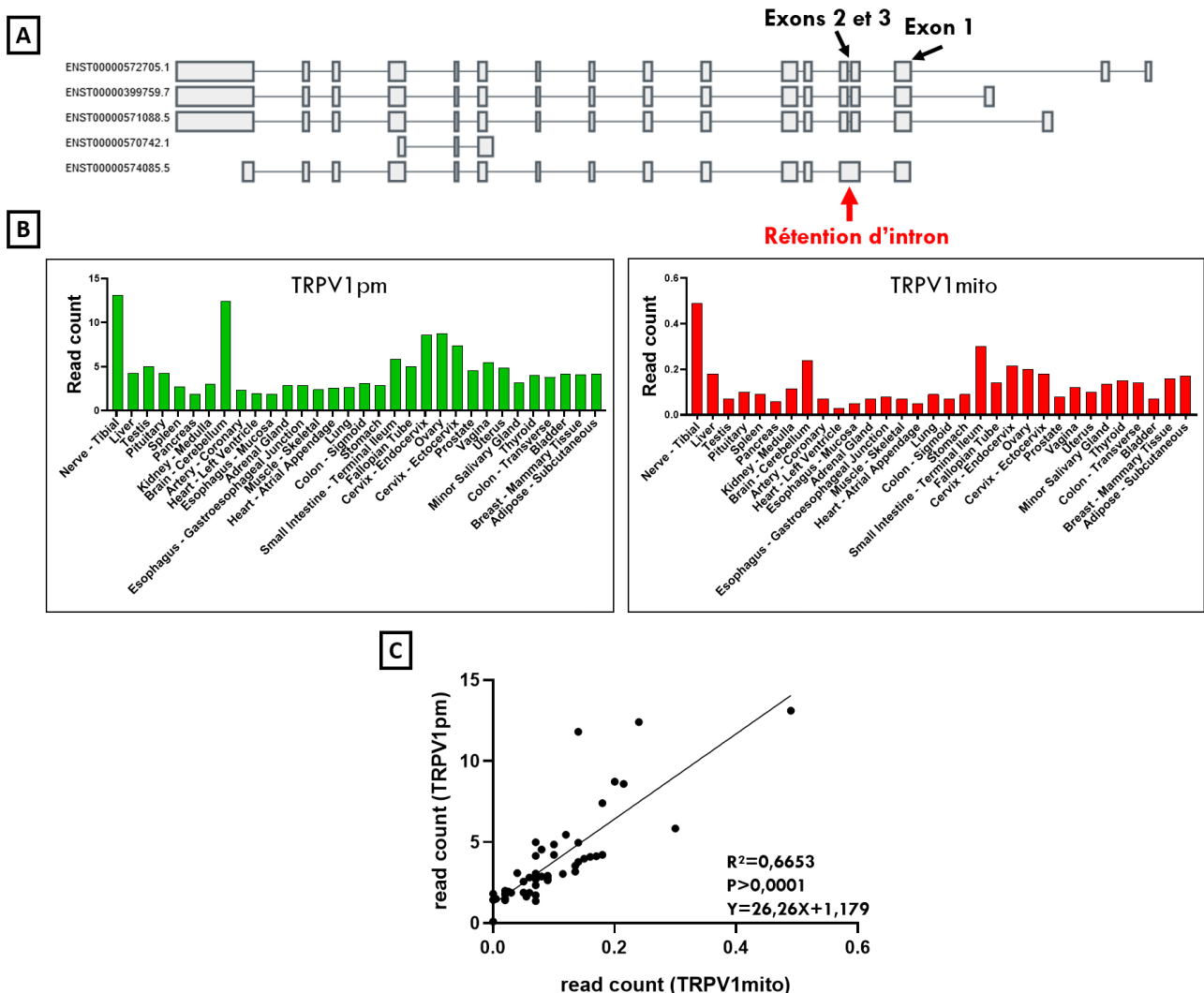


Figure 20 : Structure et expression du variant humain TRPV1mito
 (A) Structure des variants de TRPV1 présents dans la banque de données GTEx. (B) Expression tissulaire des variants TRPV1pm et TRPV1mito selon la banque de données GTEx. (C) Expression tissulaire du variant TRPV1pm en fonction de l'expression tissulaire du variant TRPV1mito selon la banque de données GTEx.

Résultats

1. Prédiction et Identification des variants mitochondriaux de TRPV1

1.1. Identification et expression du variant mitochondrial de TRPV1 humain

1.1.1. Identification *in silico* du variant humain TRPV1mito

Un variant d'épissage alternatif de TRPV1 présentant une séquence d'adressage mitochondriale a été identifié dans la banque de donnée NCBI (n° d'accèsion DQ177332). Par rapport au variant « standard » de TRPV1, ici nommé « TRPV1pm » (Michael J. Caterina et al. 1997), le variant DQ177332 présente deux particularités dans l'organisation de sa structure. Tout d'abord, le démarrage de la traduction est réalisé par un codon d'initiation alternatif (ATG) dans l'exon codant n°1. Ce codon d'initiation se situe dans un autre cadre de lecture, ce qui modifie la séquence nucléotidique des premiers exons codants (Figure 20A). Puis, l'intron situé entre l'exon codant n°2 et n°3 est retenu lors de l'épissage du pré-ARNm, ce qui entraîne un autre décalage de cadre de lecture au début de l'exon codant n°3, rétablissant le cadre de lecture normal de TRPV1pm (Figure 20A). Ainsi, après la traduction du variant DQ177332, ces modifications dans la séquence nucléotidique aboutissent à la formation d'une isoforme de TRPV1 présentant une séquence différente uniquement pour les 150 premiers acides aminés (Figure 20B). Cette séquence N-terminale correspond à une séquence d'adressage mitochondriale avec une probabilité de 98,27%, et un site de clivage prédit après le 138^{ème} acide aminé. Ce variant DQ17733 a été nommé TRPV1mito.

1.1.2. Expression tissulaire de TRPV1 chez l'Homme

La base de données « GTEX portal » permet de récupérer des informations d'expression des différents variants connus des gènes chez l'homme. Le variant TRPV1mito identifié n'est absolument pas décrit dans la littérature ni annoté comme tel dans les bases de données. Cependant, au sein de la base de données « GTEX portal », la structure des variants présents est renseignée (Figure 21A). Ainsi, le variant de TRPV1 annoté ENST00000574085.5 présente la rétention intronique spécifique du variant TRPV1mito. Les données d'expression tissulaire des variants TRPV1pm et TRPV1mito ont donc été extraites de cette base de données (Figure 21B). Ainsi les deux variants de TRPV1 sont exprimés de manière ubiquitaire dans l'organisme avec l'expression de TRPV1pm la plus importante dans le cerveau et de TRPV1mito dans le nerf tibial. Dans ce sens, la représentation de l'expression de TRPV1mito en fonction de l'expression de TRPV1pm, établit une corrélation linéaire entre leurs taux d'expression (Figure 21C), avec en moyenne une expression de TRPV1mito 25 fois plus faible que celle de TRPV1pm.

A

Espèces	Taux de prédiction (MTS)	Espèces	Taux de prédiction (MTS)	Espèces	Taux de prédiction (MTS)	Espèces	Taux de prédiction (MTS)	Espèces	Taux de prédiction (MTS)
Cynoglossus semialevis	0.322	Anser cygnoides domesticus	0.549	Struthio camelus australis	0.244	Macaca fascicularis	0.907	Lipotes vexillifer	0.997
Oryzias latipes	0.948	Numida meleagris	0.253	Tinamus guttatus	0.281	Mandrillus leucophaeus	0.531	Delphinapterus leucas	0.996
Fundulus heteroclitus	0.939	Meleagris gallopavo	0.208	Chelonia mydas	0.961	Papio anubis	0.936	Neophocaena asiaorientalis asiaorientalis	0.993
Poecilia reticulata	0.076	Coturnix japonica	0.157	Chrysemys picta	0.934	Theropithecus gelada	0.936	Physeter catodon	1.000
Austrofundulus limnaeus	0.043	Gallus gallus	0.193	Terrapene mexicana triunguis	0.802	Colobus angolensis palliatus	0.893	Pantholops hodgsonii	0.985
Acanthochromis polyacanthus	0.715	Gavia stellata	0.650	Pelodiscus sinensis	0.568	Ptilocolobus tephrosceles	0.914	Bison bison bison	0.998
Astyanax mexicanus	0.215	Eurypyga helias	0.735	Callorhynchus milii	0.971	Rhinopithecus bieti	0.849	Bos mutus	0.998
Carassius auratus	0.023	Balearica regulorum gibbericeps	0.191	Gekko japonicus	0.953	Rhinopithecus roxellana	0.849	Bos taurus	0.998
Danio rerio	0.184	Mesitornis unicolor	0.400	Pogona vitticeps	0.647	Gorilla gorilla	0.798	Bos indicus	0.998
Ictalurus punctatus	0.224	Chlamydotis macqueenii	0.676	Anolis carolinensis	0.098	Homo sapiens	0.983	Bubalus bubalis	0.998
Esox lucius	0.023	Tauraco erythrophlopus	0.136	Pseudonaja textilis	0.578	Pongo abelii	0.991	Capra hircus	0.985
Oncorhynchus mykiss	0.049	Opisthocomus hoazin	0.665	Chrysochloris asiatica	0.720	Nomascus leucogenys	0.989	Ovis aries	0.991
Salmo salar	0.162	Acanthisitta chloris	0.902	Elephantulus edwardii	1.000	Aotus nancymae	0.984	Odocoileus virginianus texanus	0.995
Nanorana parkeri	0.021	Corvus brachyrhynchos	0.441	Loxodonta africana	1.000	Callithrix jacchus	0.984	Samus scrofa	0.998
Xenopus tropicalis	0.457	Corvus cornix cornix	0.441	Echinops telfairi	0.992	Cebus capucinus imitator	1.000	Camelus dromedarius	1.000
Xenopus laevis	0.284	Ficedula albicollis	0.230	Orycteropus afer afer	1.000	Saimiri boliviensis	0.999	Camelus ferus	1.000
Alligator sinensis	0.588	Cyanistes caeruleus	0.624	Galeopterus variegatus	0.926	Carliro sylvatica	0.973	Camelus bactrianus	1.000
Alligator mississippiensis	0.524	Parus major	0.641	Oryctolagus cuniculus	0.466	Microcebus murinus	0.999	Vicugna pacos	1.000
Crocodylus porosus	0.619	Pseudopodoces humilis	0.641	Ochotona princeps	0.984	Propithecus coquereli	0.997	Pteropus alecto	1.000
Gavialis gangeticus	0.299	Lonchura striata domestica	0.795	Castor canadensis	0.944	Otolemur garnettii	0.985	Pteropus vampyrus	0.999
Chaetura pelagica	0.126	Taeniopygia guttata	0.775	Fukomya damarensis	0.971	Tupaia chinensis	0.961	Rousettus aegyptiacus	1.000
Calypte anna	0.690	Serinus canaria	0.600	Heterocephalus glaber	0.008	Canis lupus dingo	0.939	Hipposideros armiger	0.999
Buceros rhinoceros silvestris	0.701	Lepidothrix coronata	0.444	Gavia porcellus	0.894	Canis lupus familiaris	0.939	Desmodus rotundus	0.725
Antrostomus carolinensis	0.421	Sturnus vulgaris	0.540	Chinchilla lanigera	0.803	Vulpes vulpes	0.939	Rhinolophus sinicus	0.982
Cariama cristata	0.295	Geopiza fortis	0.506	Octodon degus	0.887	Mustela putorius furo	0.910	Epsteinus fuscus	0.973
Charadrius vociferus	0.389	Egretta garzetta	0.189	Jaculus jaculus	0.998	Odobenus rosmarus divergens	0.998	Miniopterus natalensis	0.999
Calidris pugnax	0.156	Pelecanus crispus	0.445	Microtus ochrogaster	0.967	Callorhinus ursinus	1.000	Myotis lucifugus	0.938
Pterocles gutturalis	0.432	Phaethon lepturus	0.449	Cricetulus griseus	0.903	Neomonachus schauinslandi	1.000	Myotis davidii	0.928
Colius striatus	0.265	Phalacrocorax carbo	0.710	Mesocricetus auratus	0.831	Alluoropoda melanoleuca	0.804	Myotis brandtii	0.890
Columba livia	0.118	Nipponia nippon	0.579	Peromyscus maniculatus bairdii	0.985	Ursus maritimus	0.815	Sorex araneus	0.994
Leptosomus discolor	0.251	Picoides pubescens	0.346	Meriones unguiculatus	0.004	Ursus arctos horribilis	0.815	Condylura cristata	0.951
Merops nubicus	0.162	Fulmarus glacialis	0.132	Mus pahari	0.962	Acinonyx jubatus	0.998	Equus przewalskii	0.989
Cuculus canorus	0.118	Nestor notabilis	0.224	Mus musculus	0.998	Felis catus	0.997	Equus caballus	0.989
Aquila chrysaetos canadensis	0.208	Melospittacus undulatus	0.112	Mus caroli	0.992	Puma concolor	0.997	Equus asinus	0.986
Haliaeetus leucocephalus	0.170	Aptenodytes forsteri	0.416	Rattus norvegicus	0.559	Panthera tigris altaica	0.996	Ceratotherium simum simum	0.990
Haliaeetus albicilla	0.170	Pygoscelis adeliae	0.416	Marmota marmota marmota	0.998	Panthera pardus	0.986	Manis javanica	1.000
Falco peregrinus	0.264	Tyto alba	0.302	Urocyon v. parryi	0.899	Balaenoptera acutorostrata scammoni	0.996	Dasyatis novemcinctus	0.998
Falco cherrug	0.264	Apaloderma vittatum	0.870	Cercocebus atys	0.936	Orcinus orca	0.997	Phascogaster cinereus	1.000
Anas platyrhynchos	0.156	Apteryx rowi	0.223	Chlorocebus sabaeus	0.996	Tursiops truncatus	0.997	Ornithorhynchus anatinus	0.903

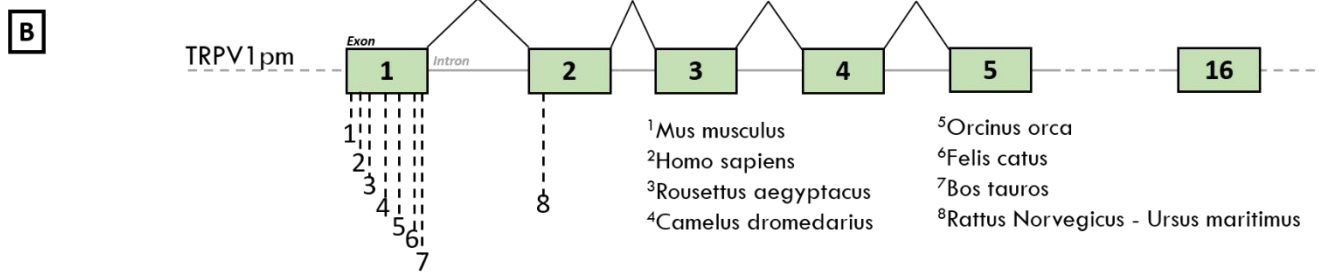


Figure 22 : Aspect phylogénique du variant TRPV1mito

(A) Taux de prédiction de la présence d'une séquence d'adressage mitochondriale (MTS) dans le gène de TRPV1 pour un ensemble d'espèces animales, selon l'algorithme MitoProt II. (B) Position des codons d'initiation alternatifs des séquences d'adressages mitochondriales prédites par le logiciel Mitoprot II sur le gène consensus de TRPV1 pour quelques mammifères.

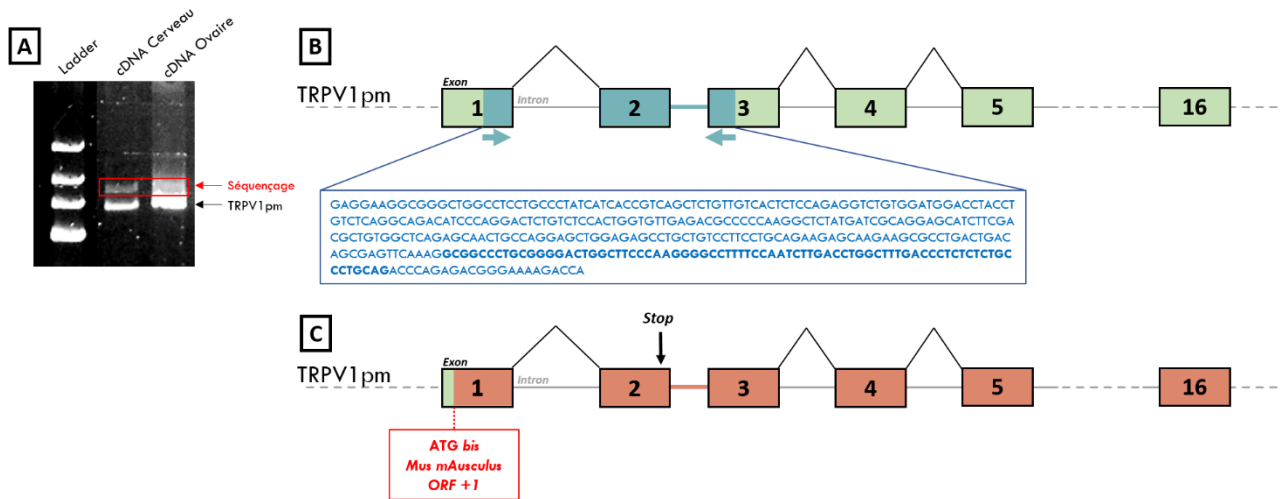


Figure 23 : Identification de TRPV1 chez la souris

(A) Image du gel d'électrophorèse de la réaction de RT-PCR ciblant les premiers exons de TRPV1 à partir d'ADNc de cerveau et d'ovaire de souris. (B) Portion du transcrit de TRPV1 isolé par RT-PCR et séquencé chez la souris sur la structure du gène. Le transcrit séquencé correspond au début de l'exon n°1, l'exon n°2, la rétention de l'intron entre les exons n°2 et n°3, puis le début de l'exon n°3. (C) Simulation de la formation du transcrit de TRPV1 généré par l'initiation de la traduction à partir du codon alternatif du MTS prédit et la rétention de l'intron entre les exons n°2 et n°3. Dans le cadre de lecture du MTS prédit, un codon STOP est présent à la fin de l'exon n°2, et la rétention de l'intron ne permet pas de rétablir le cadre de lecture standard de TRPV1 à partir de l'exon n°3.

1.2. Prédiction *in silico* de TRPV1mito chez les mammifères placentaires

Le résultat du criblage des séquences d'adressage mitochondriale (MTS) dans le gène de TRPV1 d'espèces animales est représenté dans la figure 22A. Ce tableau représente, pour chaque espèce indiquée, le taux de prédiction d'une séquence « MTS » débutant dans les exons codant n°1 ou n°2 dans le gène de TRPV1. Il apparaît clair que tous les mammifères présentent un taux de prédiction important pour une séquence MTS, allant de 0,5594 pour le rat (*Rattus norvegicus*) à 0,9998 pour le pangolin (*Manis javanica*). Cette observation comporte 3 exceptions, le rat taupe nu (*Heterocephalus glaber*), la gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) et l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) dont les taux de prédiction d'une MTS sont respectivement de 0,0079, 0,0037 et 0,303.

De plus, l'algorithme de criblage indique également la séquence en acides aminés correspondant au MTS (données non indiquées), ce qui permet de repositionner la séquence MTS prédite sur le gène de TRPV1 pour chaque espèce. Ainsi, sur la figure 22B, le codon d'initiation alternatif permettant la formation de la séquence MTS prédite chez certains mammifères est représenté sur la séquence conventionnelle codant l'isoforme TRPV1pm. Cette représentation montre que le codon d'initiation alternatif de différentes espèces est situé à différentes positions dans l'exon codant n°1 ou n°2. Malgré le trait commun des mammifères qui semblent tous présenter une séquence MTS dans l'exon codant n°1 ou n°2, celle-ci ne semble pas s'initier de la même manière en un site unique.

1.3. Identification de TRPV1mito chez la souris

Suite aux différentes analyses bio-informatiques de recherche de séquence « MTS » chez les mammifères, une stratégie d'identification *in vitro* a été mise en place chez la souris. En effet, le criblage des séquences MTS décrit précédemment indique un taux de prédiction d'adressage mitochondrial de 0,9976 chez la souris (*Mus musculus*) (Figure 22A) avec un codon d'initiation alternatif situé entre le codon d'initiation du variant standard et le codon d'initiation alternatif de TRPV1mito chez l'Homme (Figure 22B). Ainsi, à partir d'ADNc issus de différents organes de souris, une RT-PCR a été réalisée afin d'amplifier l'ADNc de TRPV1 en ciblant les exons codant n°1 à n°3 (Figure 23B). Grâce à cette technique, différents variants d'épissage alternatif dans cette région du gène TRPV1 ont été identifiés, correspondant à deux bandes de poids moléculaires différents après électrophorèse sur gel d'agarose (Figure 23A). Une première bande est abondante d'un poids moléculaire correspondant à la taille attendue pour l'amplification de l'ADNc du variant TRPV1pm. Une seconde bande moins intense et de poids moléculaire plus important est également identifiable (Figure 23A). Le séquençage de cette seconde bande a permis de mettre en évidence que celle-ci correspond à un variant d'épissage alternatif obtenu par la rétention de l'intron situé entre l'exon codant n°2 à n°3 (Figure 23B). Dans un premier temps, ce résultat suggérait qu'un variant de TRPV1 chez la souris présente le même mécanisme d'épissage que le variant TRPV1mito chez l'Homme. Une analyse visant à simuler la formation du variant TRPV1mito chez la souris a donc été réalisée. Ainsi, la figure 23C représente la structure du variant TRPV1mito hypothétique avec le démarrage de la traduction par le codon d'initiation alternatif prédit et la rétention intronique observée *in vitro*. Cette analyse met en évidence deux éléments majeurs. Le premier est la présence d'un codon stop dans l'exon codant n°2 dans le cadre de lecture du codon d'initiation alternatif. Le second élément est l'absence du rattrapage du cadre de

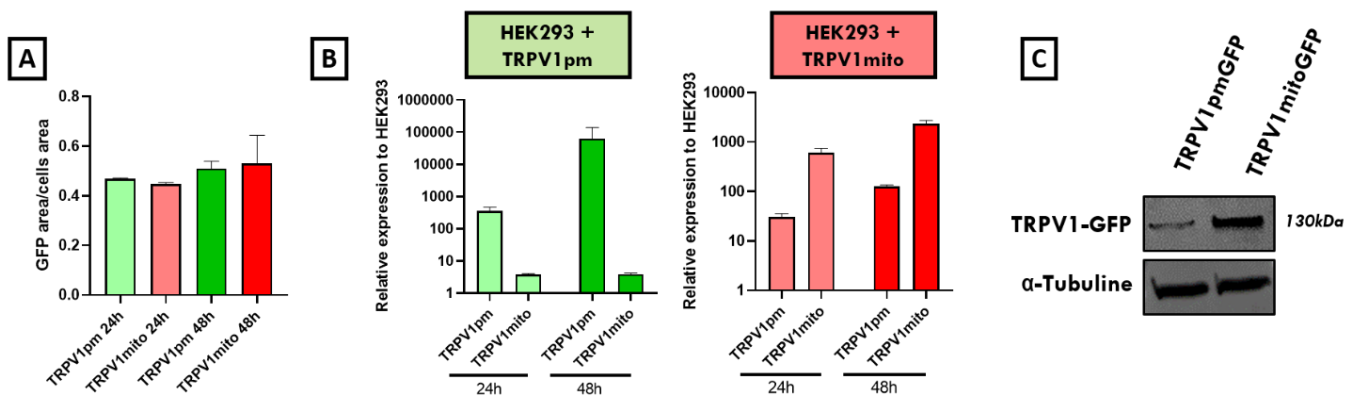


Figure 24 : Expression hétérologue transitoire de TRPV1pm et TRPV1mito

(A) Taux de transfection à 24h et 48h des cellules HEK293 transfectées avec TRPV1pmGFP ou TRPV1mitoGFP, mesurés par la surface de cellules fluorescentes sur la surface totale de cellules à l'aide de l'Incucyte S3 (N=3-4, moyenne +/- SD). (B) Expression relative des transcrits de TRPV1pm et TRPV1mito des cellules HEK293 transfectées avec TRPV1pm ou TRPV1mito à 24h et 48h, mesurée par qPCR relative, normalisée sur l'expression de la β -actine, et des cellules HEK293 WT (N=3-4, moyenne +/- SD). (C) Expression protéique de TRPV1 des cellules HEK 293 transfectées avec TRPV1pmGFP ou TRPV1mitoGFP à 48h, mesurée par Western blot à l'aide d'un anticorps anti-GFP.

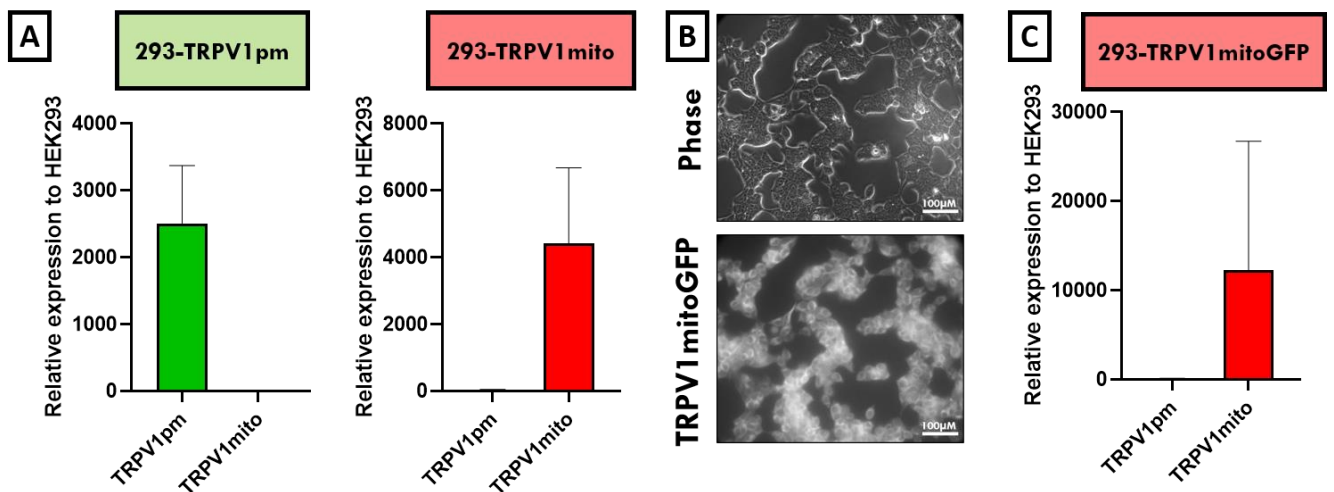


Figure 25 : Expression hétérologue stable de TRPV1pm et TRPV1mito

(A) Expression relative des transcrits de TRPV1pm et TRPV1mito dans les lignées surexprimant stablement TRPV1pm (293-TRPV1pm) ou TRPV1mito (293-TRPV1mito), mesurée par qPCR relative normalisée sur l'expression de la β -actine et des cellules HEK293 WT (N=3-4, moyenne +/- SD). (B) Image en contraste de phase et en fluorescence de la lignée surexprimant stablement TRPV1mitoGFP (293-TRPV1mitoGFP). (C) Expression relative des transcrits de TRPV1pm et TRPV1mito dans la lignée 293-TRPV1mitoGFP (N=3, moyenne +/- SD).

lecture du variant standard suite à la rétention intronique. Ce second élément s'explique par la différence de taille entre l'intron n°2 retenu qui est de 70 nucléotides chez l'Homme, et de 77 nucléotides chez la souris. Donc pour l'instant, et malgré la présence d'une séquence potentielle pouvant coder une MTS chez tous les mammifères, la structure du variant TRPV1mito chez la souris ne correspond pas à celle du variant TRPV1mito chez l'Homme. De fait, l'identification *in vitro*, suivie d'une confirmation *in vivo*, de TRPV1mito chez la souris et les autres mammifères restent à être approfondie et précisée.

2. Mise au point des modèles cellulaires

2.1. Expression transitoire

Les plasmides codant pour TRPV1pmGFP et TRPV1mitoGFP ont été transfectés dans la lignée cellulaire HEK293. Différentes approches ont été utilisées afin de valider la surexpression de TRPV1pmGFP et TRPV1mitoGFP.

Tout d'abord, la quantification de la surface de fluorescence de la GFP normalisée par rapport à la surface occupée par les cellules permet de quantifier le taux de transfection après 24 et 48h. Pour TRPV1pmGFP et TRPV1mitoGFP, le taux de transfection est donc identique et avoisine 50% à 24 et 48h (Figure 24A).

Ensuite, l'analyse de l'expression des ARNm de TRPV1pm et TRPV1mito a été réalisée par qPCR après 24 et 48h de transfection. Pour les cellules transfectées avec TRPV1pm, la quantité d'ARNm de TRPV1pm est 355 fois plus importante à 24h et 60 000 fois plus importante à 48h. Pour les cellules transfectées avec TRPV1mito, la quantité d'ARNm de TRPV1mito est 615 fois plus importante à 24h et 2350 fois plus importante à 48h (Figure 24B). Cependant, il est important de noter que suite à la transfection de TRPV1mito, on observe également une augmentation de la quantité d'ARNm de TRPV1pm (Figure 24B). En effet, du fait de l'infime différence de séquence entre les ADNc de TRPV1pm et TRPV1mito, la conception des amorces ciblant spécifiquement TRPV1pm est difficile. Les amorces ciblant TRPV1pm ne sont donc pas 100% spécifiques et amplifient également l'ADNc de TRPV1mito. L'efficacité de PCR des amorces ciblant TRPV1pm a été estimée à 103% sur l'ADNc de TRPV1pm et 184% sur l'ADNc de TRPV1mito. Malgré ce biais technique, on peut quand même valider la surexpression de TRPV1pm et TRPV1mito et observer une meilleure surexpression de TRPV1pm à 48h en termes de quantité d'ARNm.

Enfin, la visualisation des protéines TRPV1pmGFP et TRPV1mitoGFP après 48h de transfection a été réalisée par Western blot en utilisant un anticorps α -GFP. En effet, de nombreux anticorps ciblant TRPV1 ont été testés (Tableau 13) mais aucun d'eux n'a montré de détection spécifique de TRPV1 (données non montrées). Après 48h de transfection, une bande de 130 kDa montre la surexpression des protéines TRPV1pmGFP et TRPV1mitoGFP (Figure 24C). De plus, malgré un taux de transfection identique et une surexpression plus importante de TRPV1pm en quantité d'ARNm, il semblerait que ce soit la protéine TRPV1mitoGFP qui soit la mieux surexprimée.

2.2. Expression stable

La construction des lignées surexprimant stablement les différentes versions de TRPV1 a initialement été réalisée pour permettre une caractérisation de TRPV1mito plus simple et plus rapide. Ainsi, une lignée stable surexprimant TRPV1pm (293-TRPV1pm) et une autre, surexprimant TRPV1mito (293-TRPV1mito) a été réalisée.

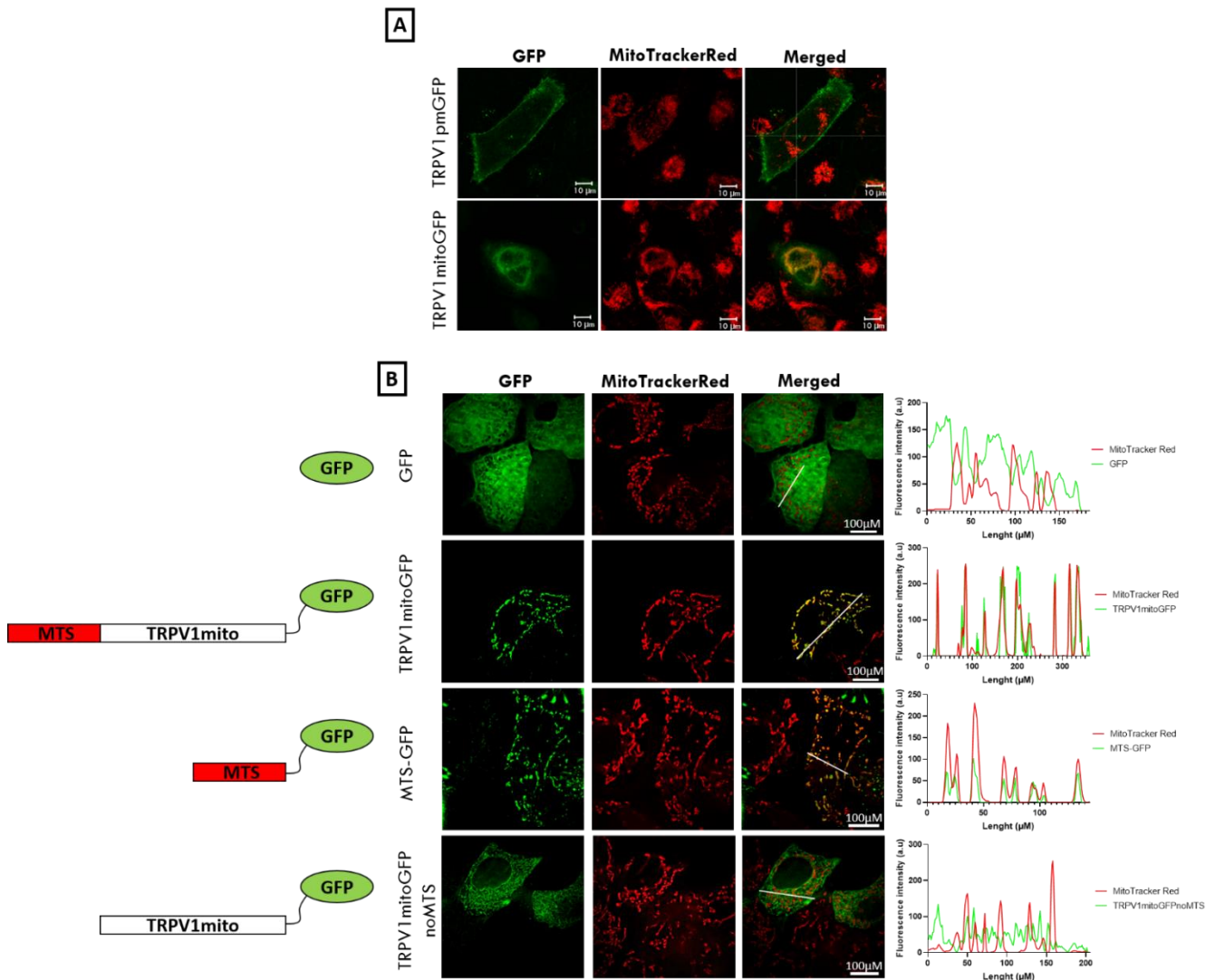


Figure 26 : Détermination de la localisation de TRPV1pm et TRPV1mito par microscopie à fluorescence (A) Images en microscopie à fluorescence de cellules SNB75 transfectées avec TRPV1pmGFP ou TRPV1mitoGFP, avec les mitochondries marquées par le MitoTracker red. (B) Images en microscopie à fluorescence de cellules MCF7 transfectées avec la GFP seule, TRPV1mitoGFP, la séquence MTS de TRPV1mito fusionnée avec la GFP (MTS-GFP) ou TRPV1mitoGFP sans séquence MTS en N-terminal (TRPV1mitoGFPnoMTS). Les mitochondries sont marquées avec le MitoTracker red et le profil de fluorescence de la GFP et du MitoTracker red est indiqué par un graphique dans chaque condition.

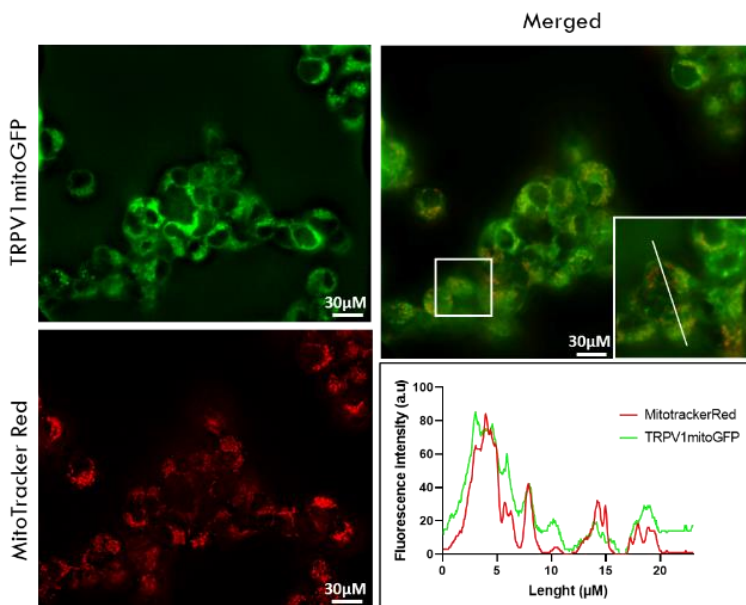


Figure 27 : Détermination de la localisation de TRPV1mito dans la lignée 293-TRPV1mitoGFP par microscopie à fluorescence

Images en microscopie à fluorescence de la lignée surexprimant stablement TRPV1mitoGFP (293-TRPV1mitoGFP) dont les mitochondries sont marquées avec le MitoTracker red. Le profil de fluorescence de la GFP et du MitoTracker red est indiqué par un graphique.

L'expression relative de l'ARNm de TRPV1pm et de TRPV1mito a été quantifiée par qPCR après 10 repiquages en culture cellulaire (Figure 25A). Ainsi, on peut observer que la lignée 293-TRPV1pm surexprime spécifiquement le variant TRPV1pm et que la lignée 293-TRPV1mito surexprime spécifiquement le variant TRPV1mito. Cependant, ces deux lignées n'ont pas été exploitées car elles n'ont présenté aucune réponse pharmacologique de TRPV1 (données non montrées).

Par ailleurs, une lignée stable surexprimant TRPV1mitoGFP (293-TRPV1mitoGFP) a été réalisée. L'observation en microscopie à fluorescence de cette lignée montre une expression de la GFP, qui est fusionnée avec TRPV1mito, dans toutes les cellules (Figure 25B). L'expression relative de l'ARNm de TRPV1pm et de TRPV1mito a été quantifiée par RT-qPCR après 10 repiquages, montrant que cette lignée surexprime bien spécifiquement TRPV1mito (Figure 25C). La construction d'une lignée surexprimant TRPV1pmGFP a également été initiée, mais sans succès, car aucun clone n'a montré une expression durable de la protéine de fusion.

3. Localisation du variant TRPV1mito humain

3.1. Microscopie à fluorescence

3.1.1. Transfection transitoire

Afin d'observer et de comparer la localisation intracellulaire de TRPV1mito et TRPV1pm, les plasmides codant pour TRPV1mitoGFP et TRPV1pmGFP ont été transfectés dans la lignée cellulaire SNB75 et le profil de fluorescence obtenu a été comparé avec celui du Mitotracker red, une sonde chimique fluorescente ciblant les mitochondries (Figure 26A). La fluorescence de TRPV1pmGFP se concentre au niveau de la membrane plasmique de la cellule et ne se superpose pas à celle du Mitotracker red. Ce résultat confirme la localisation de TRPV1pm à la membrane plasmique, comme décrit dans la littérature. A l'inverse, la fluorescence de TRPV1mitoGFP est cytoplasmique et se superpose avec la fluorescence du MitoTracker red. Le variant TRPV1mito semble donc être adressé à la mitochondrie.

Ensuite, différentes versions de TRPV1mitoGFP ont été clonées pour affiner la localisation en microscopie à fluorescence : une construction où seule la séquence MTS de TRPV1mito est clonée en fusion avec la GFP (MTS-GFP), et une autre de TRPV1mitoGFP dépourvue de sa séquence MTS (TRPV1mitoGFP noMTS). Ces différentes versions ont été transfectées dans la lignée cellulaire MCF7, qui présente un réseau mitochondrial bien déployé, autorisant une visualisation fine de leur localisation (Figure 26B), et comparé avec le profil de fluorescence du MitoTracker red. La fluorescence contrôle de la GFP seule montre une localisation diffuse dans le cytoplasme. La fluorescence de TRPV1mitoGFP complet correspond parfaitement au profil de fluorescence du MitoTracker red, comme l'indique le graphique montrant la superposition des profils de fluorescence le long du transect. Le profil de fluorescence de la version MTS-GFP montre également une superposition parfaite avec celui du MitoTracker red. Enfin, le profil de fluorescence de la version TRPV1mitoGFP noMTS est cytoplasmique mais ne co-localise pas avec celui du MitoTracker red. Ce résultat confirme l'adressage et l'expression de TRPV1mito au réseau mitochondrial et ce, grâce à la présence de sa séquence MTS en N-terminal.

3.1.2. Lignée stable 293-TRPV1mitoGFP

Pour vérifier l'adressage de TRPV1mito au sein de la lignée stable 293-TRPV1mitoGFP, le profil de fluorescence de TRPV1mitoGFP a été comparé à celui du MitoTracker red (Figure 27). Comme précédemment, les

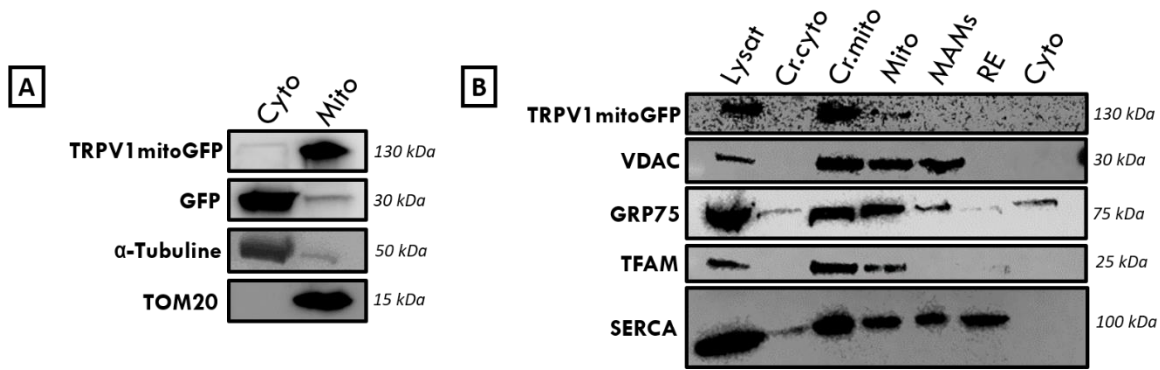


Figure 28 : Détermination de la localisation de TRPV1mito par fractionnement cellulaire (A) Western blot de la fraction des protéines cytoplasmiques (Cyto) et mitochondriales (Mito) issues de la lignée 293-TRPV1mitoGFP. TRPV1mitoGFP est détecté à l'aide d'un anticorps anti-GFP et les protéines α -Tubuline et TOMM20 sont utilisées comme marqueurs du cytoplasme et de la mitochondrie, respectivement. (B) Western blot du fractionnement cellulaire complet réalisé à partir de la lignée 293-TRPV1mitoGFP. Les fractions cellulaires sont composées du lysat cellulaire (Lysat), de la fraction crude cyto (Cr.cyto) qui comprend les fractions du cytoplasme (cyto) et du réticulum endoplasmique (RE), de la fraction crude mito (Cr.mito) qui comprend les fractions des mitochondries (Mito) et des MAMs. La protéine TRPV1mitoGFP est détectée à l'aide d'un anticorps anti-GFP. Les protéines VDAC et GRP75 sont utilisées comme marqueurs mitochondriaux des MAMs, la protéine TFAM est utilisée comme marqueur mitochondrial et la protéine SERCA est utilisée comme marqueur du RE.

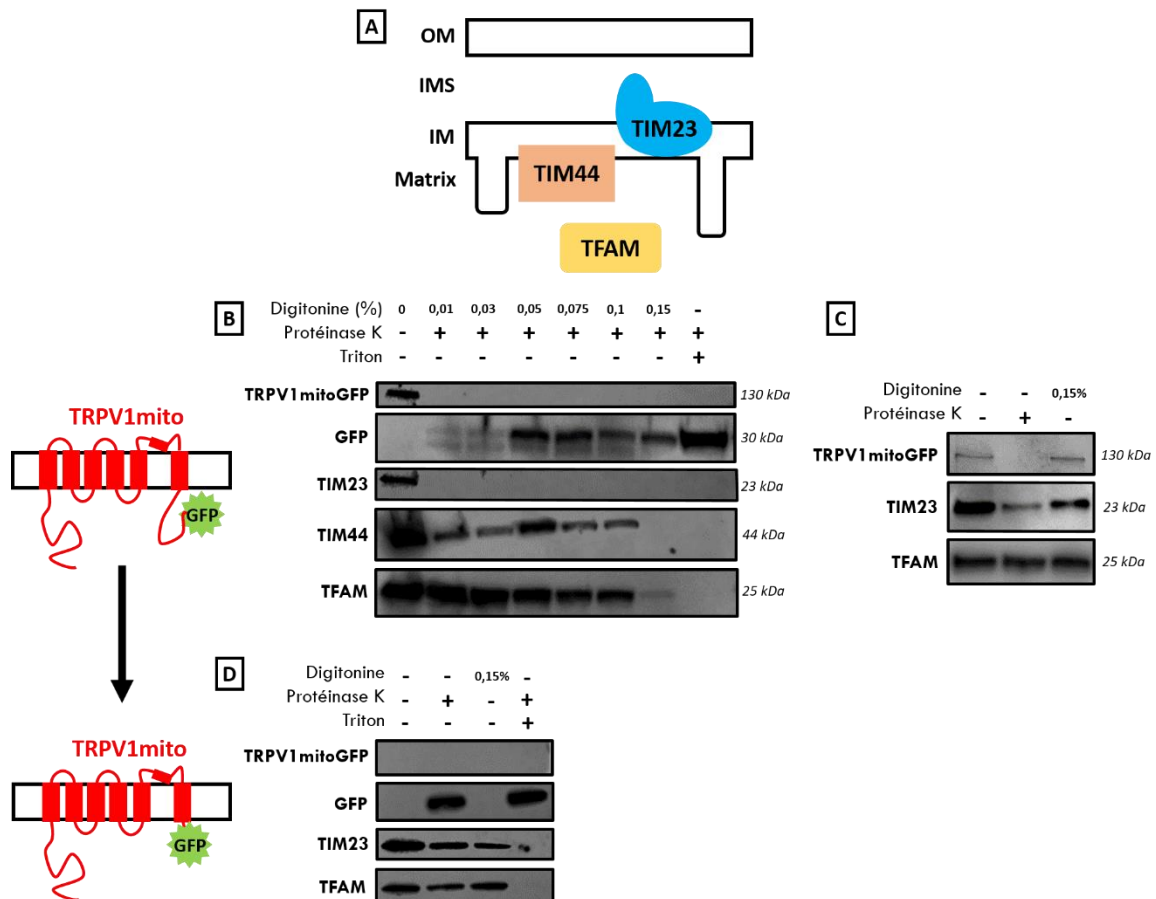


Figure 29 : Localisation intra-mitochondriale de TRPV1mito (A) Localisation mitochondriale des marqueurs TIM23, TIM44 et TFAM. TIM23 est utilisé comme marqueur de la membrane interne du côté de l'espace intermembranaire (IMS), TIM44 est utilisé comme marqueur de la membrane interne du côté matriciel, et TFAM est utilisé comme marqueur de la matrice mitochondriale. (B et C) Western blot du traitement des mitochondries isolées à partir de la lignée 293-TRPV1mitoGFP, traitées par de la digitonine (0,01% à 0,15%) et/ou de la protéinase K (50 μ g/ml). (D) Western blot du traitement des mitochondries isolées à partir de HEK 293 transfectées avec une version tronquée en C-terminal de TRPV1mitoGFP. Celles-ci sont traitées par de la digitonine (0,15%) ou de la protéinase K (50 μ g/ml).

profils de fluorescence se superposent au niveau cellulaire, comme l'indique le graphique montrant la superposition des profils de fluorescence le long du transect. Ainsi, l'adressage de TRPV1mito dans la mitochondrie lors d'une surexpression transitoire est conservé lors d'une surexpression stable.

3.2. Méthode biochimique

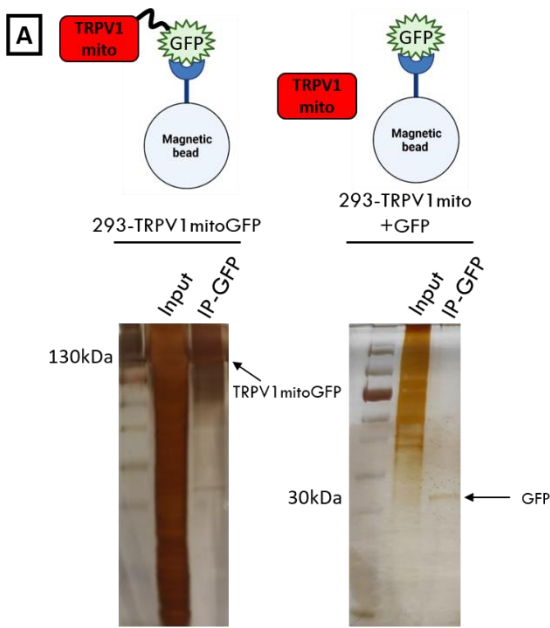
3.2.1. Fractionnement cellulaire

Une autre méthode basée sur le fractionnement cellulaire a été utilisée pour définir la localisation intracellulaire de TRPV1mito. Cette méthode permet de séparer les différents compartiments cellulaires puis d'y détecter les protéines présentes par Western blot. Dans un premier temps, un protocole de fractionnement simple visant à isoler et séparer les mitochondries a été appliqué sur la lignée 293-TRPV1mitoGFP (Figure 28A). Un anticorps anti-GFP a été utilisé pour détecter la présence de TRPV1mitoGFP au sein de la fraction des protéines mitochondriales ou celle des protéines du cytoplasme. L' α -tubuline, une protéine du cytosquelette, et TOM20, une protéine mitochondriale, sont utilisées comme marqueurs pour le fractionnement. La bande de 130 kDa correspondant à TRPV1mitoGFP est détectée uniquement dans la fraction des protéines mitochondriales. On retrouve également une bande à 30 kDa correspondant à la GFP seule présente dans la fraction des protéines du cytoplasme. Ce résultat confirme la localisation de TRPV1mito dans la mitochondrie et, dans la lignée stable 293-TRPV1mitoGFP, la GFP seule est aussi présente dans le cytoplasme.

Dans un deuxième temps, un protocole plus poussé de fractionnement cellulaire a été réalisée sur la lignée 293-TRPV1mitoGFP, permettant de séparer plusieurs compartiments cellulaires (Figure 28B). Sept fractions cellulaires sont obtenues : lysat, Cr.cyto, Cr.mito, Mito, MAMs, RE et Cyto. A partir des cellules entières (lysat), les fractions Cr.cyto et Cr.mito sont séparées. Puis à partir de Cr.mito, les fractions Mito et MAMs sont séparées et à partir de Cr.cyto, les fractions RE et Cyto sont séparées. Différentes protéines ont été utilisées comme marqueurs spécifiques de chaque compartiment : VDAC, une protéine de la membrane mitochondriale externe, et GRP75 pour les MAMs, TFAM, une protéine mitochondriale matricielle, pour la mitochondrie, SERCA pour le RE. Les Western blots confirment que VDAC et GRP75 sont présents dans les fractions mitochondriales et dans les MAMs, et que TFAM est présent uniquement dans la fraction mitochondriale. En revanche, le marqueur SERCA est présent dans la fraction du RE et également présent dans la fraction mitochondriale, indiquant une contamination de celles-ci par le RE. Enfin, TRPV1mitoGFP se retrouve très majoritairement dans la fraction Cr.mito et plus faiblement dans la fraction Mito. Malgré la contamination des fractions mitochondriales par le RE, on peut en conclure que TRPV1mito est présent uniquement dans la mitochondrie et probablement pas au niveau des MAMs ou du RE.

3.2.2. Localisation intra-mitochondriale

Un test de protection à la protéinase K a été réalisé sur des mitochondries isolées issues de cellules surexprimant TRPV1mitoGFP dans le but de déterminer la position précise de TRPV1mito dans les membranes mitochondriales (Figure 29). Différents marqueurs sont utilisés pour suivre la dégradation progressive des protéines mitochondriales : TIM23 comme marqueur des protéines de l'IMM situées du côté de l'espace intermembranaire, TIM44 comme marqueur des protéines de l'IMM situées du côté matriciel, et TFAM comme marqueur des protéines mitochondriales matricielles (Figure 29A).



B

Gène	Description de la protéine	Localisation	Fonction
AT2A2	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2	RE	Homeostasie du Ca ²⁺
ATD3A	ATPase family AAA domain-containing protein 3A	Mitochondrie	Homeostasie du Ca ²⁺ Morphologie mitochondriale Métabolisme mitochondrial
RCN1	Reticulocalbin-1	RE	Homeostasie du Ca ²⁺
ATD3B	ATPase family AAA domain-containing protein 3B	Mitochondrie	Homeostasie du Ca ²⁺ Morphologie mitochondriale Métabolisme mitochondrial
AT2A3	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3	RE	Homeostasie du Ca ²⁺
ECHA	Trifunctional enzyme s-u α	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
TRAP1	Heat shock protein 75	Mitochondrie	Homeostasie du Ca ²⁺ Métabolisme mitochondrial
SUCB1	Succinate-CoA ligase [ADP-forming] s-u β	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
MIRO2	Mitochondrial Rho GTPase 2	Mitochondrie	Homeostasie du Ca ²⁺ Morphologie mitochondriale
SDHA	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] flavoprotein	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
TIM44	Mitochondrial import inner membrane translocase (TIM44)	Mitochondrie	Import Mitochondrial
ATPG	ATP synthase subunit gamma	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
TOM70	Mitochondrial import receptor subunit (TOM70)	Mitochondrie	Import Mitochondrial
SUCA	Succinate-CoA ligase [ADP/GDP-forming] s-u α	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
MIC60	MICOS complex subunit MIC60	Mitochondrie	Formation des crêtes mitochondriale
CALX	Calnexin	RE	Homeostasie du Ca ²⁺
IDH3B	Isocitrate dehydrogenase [NAD] s-u β	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
ATPB	ATP synthase s-u β	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
ATPO	ATP synthase s-u O	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
VAPB	Vesicle-associated membrane protein-associated protein B/C	RE	Homeostasie du Ca ²⁺
TMX1	Thioredoxin-related transmembrane protein 1	RE	Homeostasie du Ca ²⁺
ECHB	Trifunctional enzyme s-u β	Mitochondrie/RE	Métabolisme mitochondrial
DHE3	Glutamate dehydrogenase 1	Mitochondrie/RE	Métabolisme mitochondrial
NDUS3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
TIM50	Mitochondrial import inner membrane translocase (TIM50)	Mitochondrie	Import Mitochondrial
QCR2	Cytochrome b-c1 complex s-u 2	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
IDHP	Isocitrate dehydrogenase [NAD] s-u β	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
HCD2	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial
HSPA9	Stress-70 protein (GRP75)	Mitochondrie	Homeostasie du Ca ²⁺
ATPA	ATP synthase s-u α	Mitochondrie	Métabolisme mitochondrial

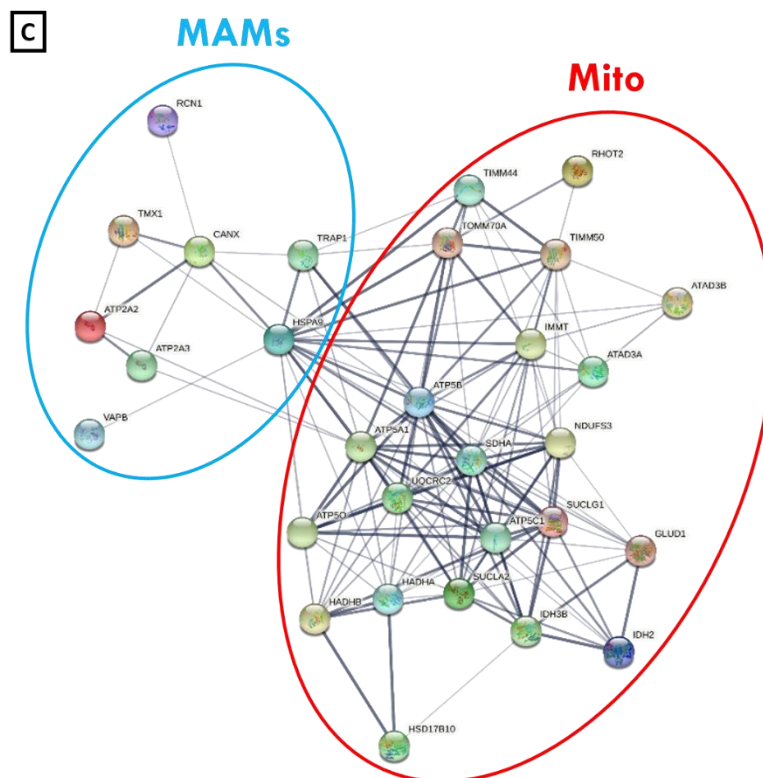


Figure 30 : Identification des partenaires possibles de TRPV1mito

(A) Images des gels d'électrophorèse colorés au nitrate d'argent résultant de l'immunoprécipitation de la GFP dans la lignée 293-TRPV1mitoGFP ou de HEK 293 co-transfectées avec la GFP seule et TRPV1mito. (B) Liste des protéines identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de la GFP dans la lignée 293-TRPV1mitoGFP. (C) Réseau d'association des protéines identifiées par spectrométrie de masse suite à l'immunoprécipitation de la GFP dans la lignée 293-TRPV1mitoGFP, réalisé avec l'outil en ligne « STRING ».

Dans un premier temps, à partir de la lignée 293-TRPV1mitoGFP, le test a été réalisé sur une fraction mitochondriale traitée à des concentrations croissantes de digitonine 0,01% à 0,15%, suivi d'une digestion protéolytique à la protéinase K (Figure 29B). Les Western blots montrent qu'à la concentration de 0,01% en digitonine, le marqueur TIM23 est dégradé, témoignant de la solubilisation de l'OMM, rendant accessibles les protéines de l'IMS à la dégradation par la protéinase K. Puis à partir de 0,15% de digitonine, le marqueur TIM44 est dégradé, révélant une atteinte de l'IMM. Enfin, le marqueur TFAM reste encore partiellement présent après un traitement à 0,15% de digitonine, grâce à sa localisation dans la matrice mitochondriale lui conférant une protection maximum à la dégradation par la protéinase K. En ce qui concerne TRPV1mito, dès le traitement à 0,01% de digitonine, l'incubation avec des anticorps contre la GFP montre que TRPV1mitoGFP est dégradé par la protéinase K, ou du moins que la GFP est clivée et séparée de TRPV1mito, car une bande correspondant la GFP seule apparaît. En effet, la GFP étant résistante à la dégradation par la protéinase K, comme cela a été déjà observé dans d'autres études (Ban et al. 2018).

De plus, pour compléter cette approche, la fraction mitochondriale issue de la lignée 293-TRPV1mitoGFP a été traitée par la protéinase K, mais sans digitonine (Figure 29C). Dans ce cas, le signal correspondant à TRPV1mitoGFP disparaît, ou comme précédemment, la GFP localisée dans la partie C-terminale est clivée de la protéine de fusion. Ces résultats suggèrent que la partie C-terminale de TRPV1mito est située en dehors de la mitochondrie, dans le cytoplasme, car la GFP est accessible au traitement par la protéinase K. En revanche, il n'est pas possible d'affirmer si les domaines transmembranaires de TRPV1mito sont localisés dans l'IMM ou l'OMM.

Pour répondre à cette question, une version de TRPV1mitoGFP avec une fusion de la GFP sitôt après le 6^{ème} domaine transmembranaire a été clonée, puis transfectée transitoirement dans des cellules HEK293. Selon le même protocole que précédemment, les mitochondries ont été isolées et traitées à la digitonine et la protéinase K (Figure 29D). Les marqueurs TIM23 et TFAM ne sont pas dégradés par le traitement, mais le sont suite à une perméabilisation complète des mitochondries par le triton X-100. En ce qui concerne TRPV1mito, aucune détection de la protéine de fusion n'a été observée, pour une raison encore inconnue. En revanche, suite au traitement à la protéinase K, on observe l'apparition de la GFP seule, indiquant un clivage de la GFP de la protéine de fusion TRPV1mitoGFP. Ce phénomène est également observable suite à un traitement au triton X-100 et à la protéinase K. Ce résultat préliminaire suggère donc que, même avec la GFP localisée à proximité du dernier domaine transmembranaire de TRPV1mito, celle-ci est clivée par un traitement à la protéinase K.

Au final, il est difficile de conclure sur une localisation dans l'IMM ou l'OMM de TRPV1mitoGFP, mais il est clair que sa partie C-terminale n'est pas située dans la matrice mitochondriale mais plus probablement du côté du cytoplasme.

3.2.3. Immunoprécipitation

Dans l'objectif de comprendre la localisation et les régulations précises de TRPV1mito dans la mitochondrie, une méthode d'immunoprécipitation de la GFP visant à identifier les protéines partenaires de TRPV1mito a été appliquée sur un lysat cellulaire de la lignée 293-TRPV1mitoGFP. Pour cela, deux conditions ont été utilisées. Une première a consisté à immunoprécipiter la GFP en fusion avec TRPV1mito grâce à la lignée stable 293-TRPV1mitoGFP, la deuxième condition, servant de contrôle, a consisté à immunoprécipiter la GFP à partir de cellules surexprimant transitoirement TRPV1mito et la GFP séparément. L'immunoprécipitation de la GFP

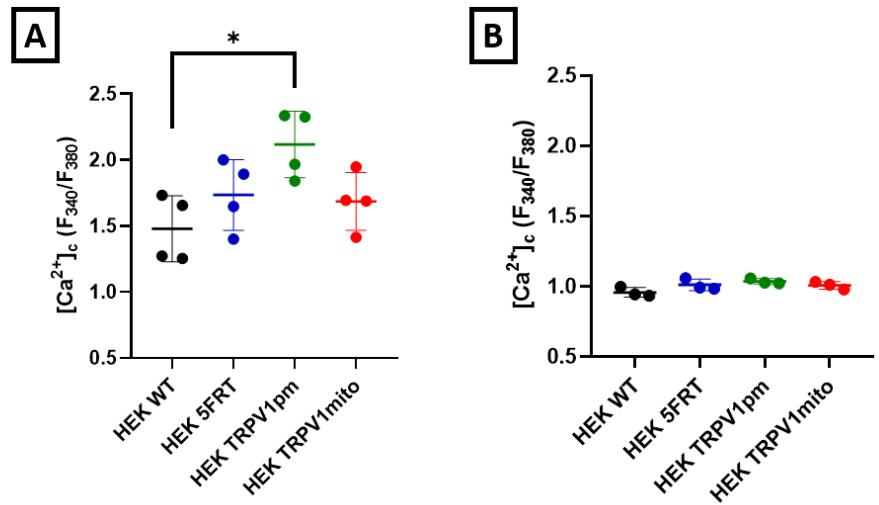
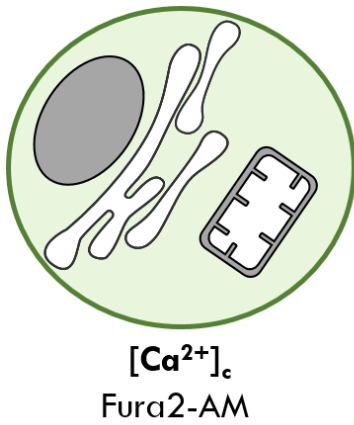


Figure 31 : Taux de Ca²⁺ dans le cytoplasme dans les cellules HEK 293 WT exprimant TRPV1pm, TRPV1mito ou le vecteur vide (HEK 5FRT) à l'état basal

Le [Ca²⁺]_m est mesuré sous la forme du rapport F₃₄₀/F₃₈₀, à l'aide de la sonde Fura2-AM avec la Flexstation 3 dans un tampon avec 2,5mM de CaCl₂ (A) ou 0mM de CaCl₂ (B). (N=3-4, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

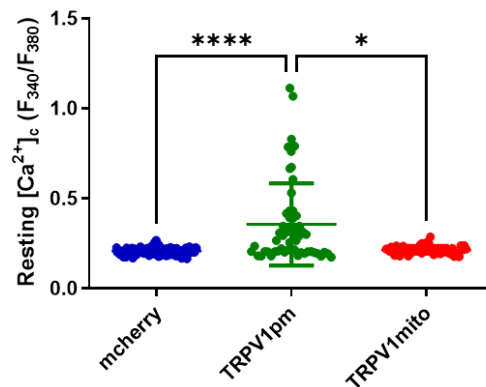
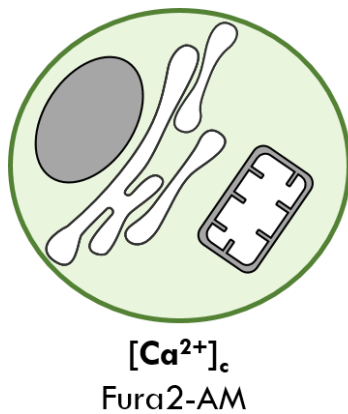


Figure 32 : Taux de Ca²⁺ dans le cytoplasme dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry à l'état basal

Le [Ca²⁺]_m est mesuré à l'aide de la sonde Fura2-AM en microscopie à fluorescence. (N=50-100, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Kruskal-Wallis)

en fusion avec TRPV1mito est visible en Western blot, avec une bande autour des 130 kDa (Figure 30A). Pour comparaison, l'immunoprécipitation de la GFP non fusionnée avec TRPV1mito est visible par Western blot avec une bande autour des 30 kDa, correspondant à la GFP (Figure 30A). Une analyse protéomique en spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines immunoprécipitées avec la GFP, ou la protéine de fusion TRPV1mitoGFP. L'analyse comparative des deux conditions a permis d'identifier de nombreuses protéines ayant une localisation mitochondriale ou au RE, et à leur interface dans les MAMs (Figure 30B et C), comme GRP75 et la SERCA. Ce résultat suggère une localisation de TRPV1mito à la mitochondrie à proximité des zones de contact entre le RE et les mitochondries, notamment en contact avec des protéines dont la fonction est de moduler les échanges de Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie. Ce résultat est néanmoins contradictoire avec les résultats du fractionnement cellulaire qui n'ont pas démontré la présence de TRPV1mito dans les MAMs. Ils demandent à être reconsidérés avec des anticorps spécifiques de TRPV1mito, qui font défaut actuellement, car aucun des 7 anticorps commerciaux testés ne permet actuellement de reconnaître cette isoforme.

4. Implication du variant humain TRPV1mito dans l'homéostasie calcique intracellulaire

La caractérisation fonctionnelle de TRPV1mito s'est naturellement orientée vers l'étude des flux calciques intracellulaires. En effet, la fonction connue et décrite de TRPV1pm suite à son activation repose sur la dissipation de flux d'ions Ca^{2+} à travers la membrane plasmique.

4.1. Ca^{2+} cytoplasmique

4.1.1. A l'état basal

a) Avec la Flexstation

Le taux de Ca^{2+} cytosolique $[\text{Ca}^{2+}]_c$ à l'état basal a été comparé dans les cellules surexprimant transitoirement TRPV1pm ou TRPV1mito grâce à la mesure du ratio de fluorescence de la sonde Fura2-AM (F_{340}/F_{380}). Cette mesure a été réalisée sur des cellules incubées dans un tampon contenant 2,5 mM de Ca^{2+} avec l'appareil Flexstation 3 (Figure 31A). Les cellules HEK293 (HEK WT) ou transfectées avec le vecteur vide (HEK 5FRT) sont utilisées comme contrôles négatifs. Les cellules qui surexpriment TRPV1pm présentent une augmentation significative du ratio F_{340}/F_{380} et donc du $[\text{Ca}^{2+}]_c$ à l'état basal, ce qui n'est pas le cas pour les cellules qui surexpriment TRPV1mito (Figure 31A).

Dans un second temps, la même quantification a été réalisée sur des cellules incubées dans un tampon dépourvu de Ca^{2+} (Figure 31B). Aucune différence significative de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ n'est retrouvée entre les cellules contrôles et les cellules surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito.

La surexpression de TRPV1pm au niveau de la membrane plasmique induit donc une augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_c$ à l'état basal dont l'origine est extracellulaire. En revanche la surexpression de TRPV1mito n'induit aucune modification du $[\text{Ca}^{2+}]_c$ à l'état basal.

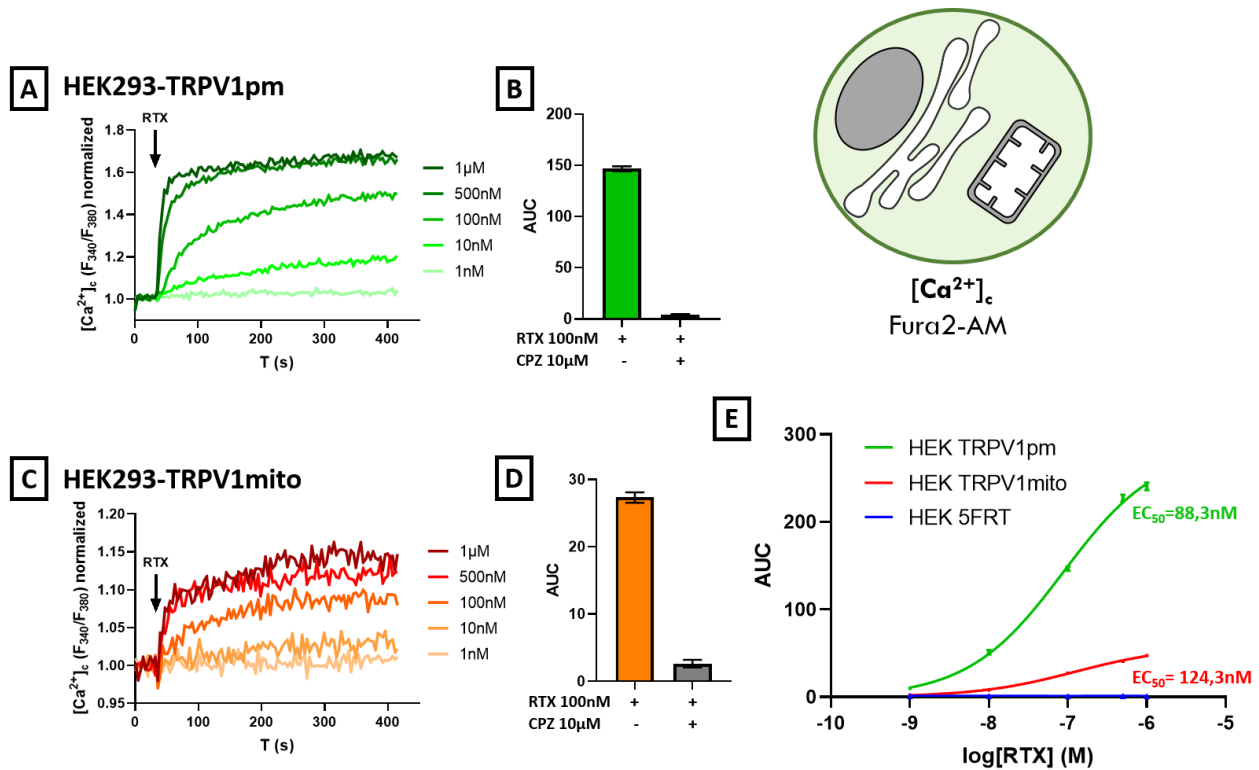


Figure 33: Taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dans les cellules HEK 293 WT, exprimant TRPV1pm, TRPV1mito ou le vecteur vide (HEK 5FRT) après un traitement avec la Résinifératoxine (RTX)
 Le $[\text{Ca}^{2+}]_c$ est mesuré à l'aide de la sonde Fura2-AM avec la Flexstation 3. (A) Cinétiques de variation de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ observées lors du traitement à la RTX des cellules exprimant TRPV1pm. (B) Quantification en aire sous la courbe (AUC) de la réponse à un traitement à la RTX (100 nM) et un pré-traitement à la capsazépine (10 μM) des cellules exprimant TRPV1pm. (C) Cinétiques de variation de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ observées lors du traitement à la RTX des cellules exprimant TRPV1mito. (D) Quantification en aire sous la courbe (AUC) de la réponse à un traitement à la RTX (100 nM) et un pré-traitement à la capsazépine (10 μM) des cellules exprimant TRPV1mito. (E) Superposition des courbes effet-log[RTX] en aire sous la courbe (AUC) des cellules exprimant TRPV1mito, TRPV1pm ou le vecteur vide 5FRT. (N=8, moyenne +/- SD).

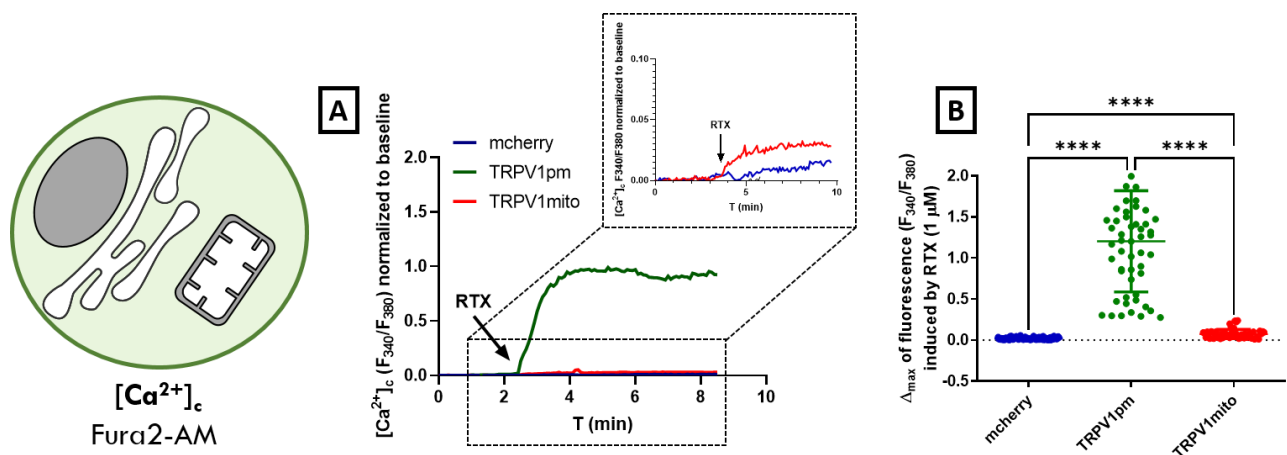


Figure 34: Taux de Ca^{2+} cytoplasmique $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry suite à un traitement avec la Résinifératoxine (RTX)
 Le $[\text{Ca}^{2+}]_c$ est mesuré à l'aide de la sonde Fura2-AM en microscopie à fluorescence. (A) Cinétiques de variation de $[\text{Ca}^{2+}]_c$ observées lors du traitement à la RTX à 1 μM . (B) Amplitude maximale de la réponse à la RTX observée. (N=50-100, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

b) Par microscopie à fluorescence

Afin de confirmer le résultat précédent, le $[Ca^{2+}]_c$ à l'état basal a été mesuré avec un microscope à fluorescence dans les cellules surexprimant transitoirement TRPV1pm ou TRPV1mito à l'aide de la sonde Fura2-AM dans un tampon contenant 2,5mM de Ca^{2+} . Les constructions TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry ont été utilisées afin de repérer les cellules transfectées, idem pour les cellules contrôles transfectées avec la mCherry seule (Figure 32). Seules les cellules qui surexpriment TRPV1pm présentent une augmentation significative du $[Ca^{2+}]_c$ à l'état basal (Figure 32). Ce résultat est en accord avec celui obtenu précédemment et confirme que contrairement à TRPV1pm, TRPV1mito n'induit aucune modification du $[Ca^{2+}]_c$ à l'état basal.

4.1.2. Activation pharmacologique de TRPV1

a) Avec la Flexstation

Afin de caractériser l'effet de l'activation aiguë de TRPV1mito sur le $[Ca^{2+}]_c$, le ratio de fluorescence de la sonde Fura2-AM (F_{340}/F_{380}) a été quantifié au cours du temps, après un traitement à la RTX (1 nM à 1 μ M), l'agoniste spécifique de TRPV1 le plus puissant (Figure 33).

Les mesures réalisées sur la FlexStation 3, pour les cellules surexprimant TRPV1pm, montrent que l'injection de la RTX provoque une augmentation rapide du $[Ca^{2+}]_c$ de manière dose dépendante (Figure 33A), et que cette réponse est inhibée par un prétraitement des cellules avec l'antagoniste compétitif de la RTX, la CPZ (Figure 33B). Ces résultats sont cohérents avec les données disponibles pour TRPV1pm.

Pour les cellules surexprimant TRPV1mito, on observe également une augmentation rapide du $[Ca^{2+}]_c$ de manière dose dépendante (Figure 33C), avec une réponse également inhibée par un prétraitement à la CPZ (Figure 33D).

En revanche, la comparaison des courbes effet-log[RTX] révèle une différence de l'intensité des réponses à la RTX des cellules surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito, cette dernière étant plus faible que celle des cellules surexprimant TRPV1pm (Figure 33E).

Ce résultat indique que TRPV1mito possède des propriétés pharmacologiques et fonctionnelles comparable à TRPV1pm : TRPV1mito est bien activé par la RTX et génère des flux calciques intracellulaires avec une CE_{50} proche de 100 nM, comme TRPV1pm, et ces réponses sont inhibées par un prétraitement à la CPZ. Cependant, la réduction de l'amplitude de l'augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ suite à l'activation à la RTX indique que l'activation de TRPV1mito dans la mitochondrie engendre des flux calciques différents et moindres.

b) Par microscopie à fluorescence

Afin de confirmer le résultat précédent, la même expérience a été réalisée avec un microscope à fluorescence toujours à l'aide de la sonde Fura2-AM. Les constructions TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry ou mCherry seule ont été utilisées afin de repérer les cellules transfectées (Figure 34). Un traitement avec 1 μ M de RTX provoque une augmentation du ratio F_{340}/F_{380} et donc du $[Ca^{2+}]_c$ pour les cellules surexprimant TRPV1pmCherry et TRPV1mitoCherry (Figure 34A). La quantification et la comparaison de l'amplitude maximum de la réponse à la RTX révèle que les cellules surexprimant TRPV1mito présente une réponse beaucoup plus faible que les cellules surexprimant TRPV1pm (Figure 34B). Ce résultat est en accord avec celui obtenu précédemment

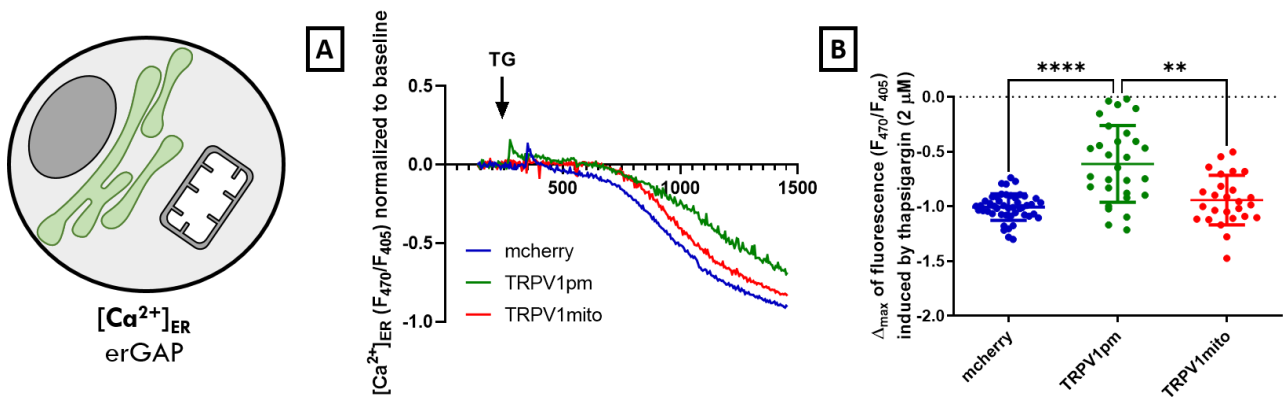


Figure 35: Taux de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique $[Ca^{2+}]_{ER}$ dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry suite à un traitement avec la thapsigargine (TG)
Le $[Ca^{2+}]_{ER}$ est mesuré à l'aide de la sonde erGAP en microscopie à fluorescence. (A) Cinétiques de variation de $[Ca^{2+}]_{ER}$ observées lors du traitement à la TG à $2 \mu M$. (B) Amplitude maximale de la réponse à la TG observée. (N=25-50, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

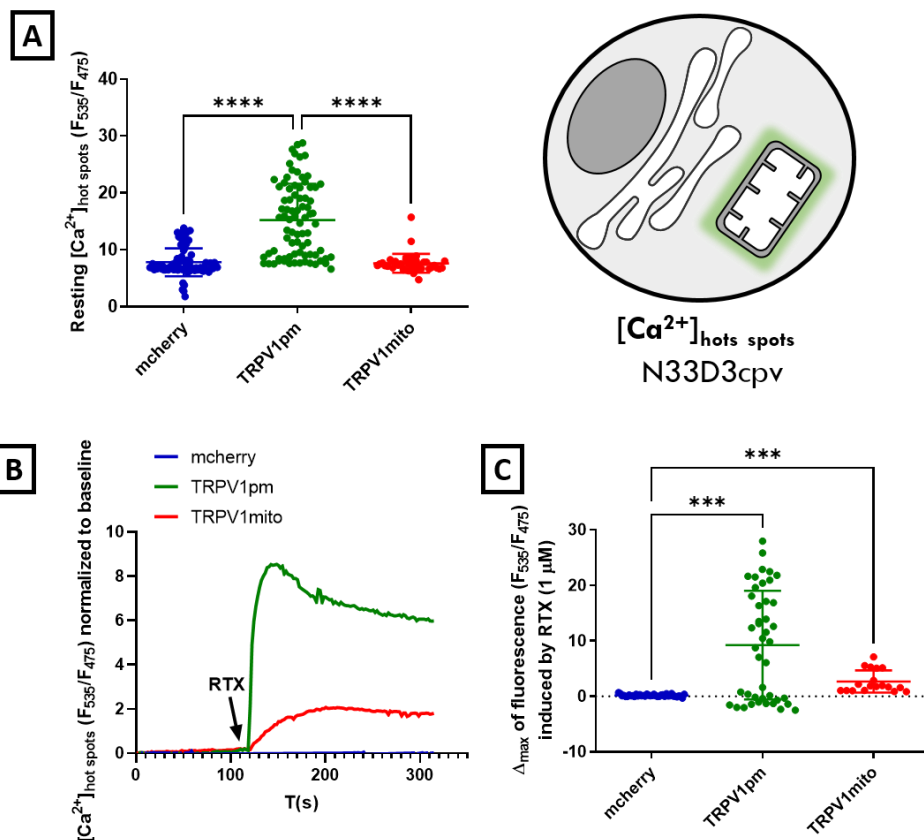


Figure 36: Taux de Ca^{2+} dans les « hot spots » mitochondriaux $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry suite à un traitement avec la Résinifératoxine (RTX)
Le $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ est mesuré à l'aide de la sonde N33D3cpv en microscopie à fluorescence. (A) $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ à l'état basal. (B) Cinétiques de variation de $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ observée lors du traitement à la RTX à $1 \mu M$. (C) Amplitude maximale de la réponse à la RTX observée (N=40-80, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

et confirme que l'activation de TRPV1mito par la RTX induit aucune augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ plus faible que les cellules surexprimant TRPV1pm.

4.2. Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique

L'influence de la surexpression de TRPV1mito et TRPV1pm sur les stocks intracellulaires de Ca^{2+} du RE a été mesurée à l'aide de la sonde BRET erGAP et d'un microscope à fluorescence. La quantité de Ca^{2+} présent dans le RE a été estimée par une vidange du Ca^{2+} réticulaire grâce à l'inhibition de la SERCA, suite à un traitement à la Thapsigargine (TG). En effet, l'inhibition de la SERCA empêche la recapture du Ca^{2+} par le RE, menant à la vidange complète des stocks réticulaires de Ca^{2+} .

Les cellules surexprimant TRPV1pm-mCherry, TRPV1mito-mCherry ou la mCherry seule ont été traitées avec la TG et le ratio de fluorescence F_{470}/F_{405} de la sonde erGAP a été quantifié pour évaluer le taux de Ca^{2+} dans le RE ($[Ca^{2+}]_{RE}$) (Figure 35). Le traitement des cellules à la TG induit une diminution lente et progressive du $[Ca^{2+}]_{RE}$ (Figure 35A). L'amplitude de la réponse à la TG est significativement plus faible pour les cellules surexprimant TRPV1pm (Figure 35B). En revanche, l'amplitude de la réponse à la TG est identique entre les cellules contrôles et les cellules surexprimant TRPV1mito (Figure 35).

Ce résultat indique que la surexpression de TRPV1pm induit une réduction du $[Ca^{2+}]_{RE}$ à l'état basal, indépendamment d'une activation extrinsèque. En revanche, la surexpression de TRPV1mito n'induit aucune modification du $[Ca^{2+}]_{RE}$.

4.3. Ca^{2+} au niveau des « hot spots » mitochondriaux

4.3.1. A l'état basal

Les « hot spots » mitochondriaux sont définis par la zone du cytosol au contact des mitochondries, à l'interface entre celles-ci et leur environnement cellulaire. La mesure du taux de Ca^{2+} dans ces hot spots ($[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$) a été réalisée grâce au ratio de fluorescence (F_{535}/F_{475}) de la sonde N33D3cpv, à l'aide d'un microscope à fluorescence. Le ratio de fluorescence (F_{535}/F_{475}) est quantifié dans les cellules surexprimant TRPV1pm-mCherry, TRPV1mito-mCherry ou la mCherry seule.

A l'état basal, les cellules qui surexpriment TRPV1pm-mCherry présentent une augmentation significative du $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ en comparaison avec les cellules contrôles qui surexpriment la mCherry seule (Figure 36A). En revanche, les cellules qui surexpriment TRPV1mito-mCherry ne présentent aucune modification du $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ en comparaison avec les cellules contrôles qui surexpriment la mCherry seule (Figure 36A).

L'augmentation du $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ des cellules surexprimant TRPV1pm-mCherry, à l'état basal, reflète l'augmentation globale du $[Ca^{2+}]_c$ observée précédemment (cf 4.1).

4.3.2. Activation pharmacologique de TRPV1

Afin d'observer un effet direct de l'activation aiguë de TRPV1mito sur le $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$, le ratio de fluorescence de la sonde N33depcv (F_{535}/F_{475}) a été quantifié au cours du temps, pendant un traitement des cellules à la RTX (1 μ M) (Figure 36B et C).

Le traitement à la RTX induit une augmentation du $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ dans les cellules qui surexpriment TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry (Figure 36B). L'amplitude maximum de cette augmentation du $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ est plus importante pour les cellules qui surexpriment TRPV1pm-mCherry que TRPV1mito-mCherry

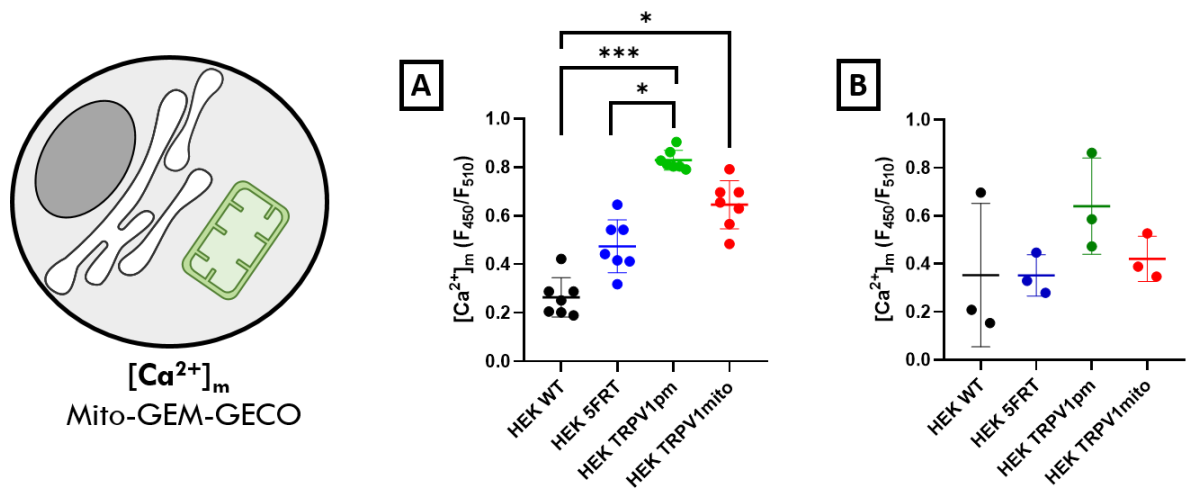


Figure 37: Taux de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale $[\text{Ca}^{2+}]_m$ dans les cellules HEK 293 WT, exprimant TRPV1pm, TRPV1mito ou le vecteur vide (HEK 5FRT) à l'état basal
 Le $[\text{Ca}^{2+}]_m$ est mesuré à l'aide de la sonde mito-GEM-GECO avec la Flexstation 3 dans un tampon avec 2,5mM de CaCl_2 (A) ou 0mM de CaCl_2 (B). (Mean +/- SD, test) (N=3-7, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

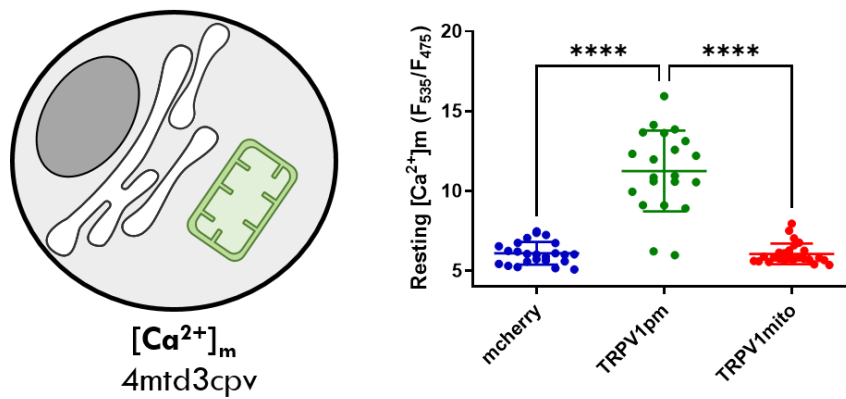


Figure 38: Taux de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale $[\text{Ca}^{2+}]_m$ dans les cellules HEK 293 surexprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry à l'état basal
 Le $[\text{Ca}^{2+}]_m$ est mesuré à l'aide de la sonde 4mtd3cpv en microscopie à fluorescence (N=20-23, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Kruskal-Wallis).

(Figure 36C). De plus, la réponse des cellules qui surexpriment TRPV1mito-mCherry montre une cinétique plus lente en comparaison avec les cellules qui surexpriment TRPV1pm-mCherry (Figure 36B).

Ainsi, l'activation de TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry après un traitement à la RTX induit une augmentation du $[Ca^{2+}]_{hot\ spots}$ différente en terme d'amplitude et en terme de cinétique.

4.4. Ca^{2+} mitochondrial

4.4.1. A l'état basal

a) Avec la Flexstation

Enfin, le taux de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale ($[Ca^{2+}]_m$) à l'état basal a été quantifié en mesurant les variations du ratio de fluorescence (F_{450}/F_{510}) de la sonde mito-GEM-GECO avec l'appareil Flexstation 3. La mesure du $[Ca^{2+}]_m$ à l'état basal a été réalisée sur des cellules HEK293 (HEK WT), transfectées avec le vecteur vide (HEK 5FRT), TRPV1pm ou TRPV1mito.

Même si la différence n'est pas statistiquement significative, le $[Ca^{2+}]_m$ des cellules HEK 5FRT apparaît légèrement augmenté par rapport aux HEK WT, suggérant un possible effet de la transfection (Figure 37A). Les cellules surexprimant TRPV1pm présentent une augmentation significative du $[Ca^{2+}]_m$ en comparaison avec les cellules HEK 5FRT et HEK WT (Figure 37A). Les cellules surexprimant TRPV1mito présentent également une augmentation significative du $[Ca^{2+}]_m$ en comparaison avec les cellules HEK WT (Figure 37A). Ces résultats suggèrent que la surexpression de TRPV1pm et de TRPV1mito, induit une augmentation du $[Ca^{2+}]_m$ à l'état basal.

Ensuite, la même expérience a été réalisée sur les cellules incubées dans un tampon dépourvu de Ca^{2+} extracellulaire, ne montrant aucune différence du $[Ca^{2+}]_m$ entre les cellules HEK WT, HEK 5FRT, ou surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito (Figure 37B). Cette observation indique que la présence de Ca^{2+} est indispensable à l'augmentation du $[Ca^{2+}]_m$ à l'état basal des cellules qui surexpriment TRPV1pm ou TRPV1mito.

b) Par microscopie à fluorescence

Afin de confirmer le résultat précédant, la même expérience a été réalisée sous un microscope à fluorescence en mesurant le $[Ca^{2+}]_m$ à l'aide du ratio de fluorescence (F_{535}/F_{475}) d'une autre sonde calcique mitochondriale, la sonde 4mtD3cpv. Le ratio de fluorescence (F_{535}/F_{475}) est quantifié dans les cellules surexprimant TRPV1pm-mCherry, TRPV1mito-mCherry ou la mCherry seule.

Comme déjà observée avec l'expérience précédente, les cellules qui surexpriment TRPV1pm-mCherry présente une augmentation du $[Ca^{2+}]_m$ à l'état basal (Figure 38). Inversement, les cellules qui surexpriment TRPV1mito-mCherry ne présente aucune augmentation significative du $[Ca^{2+}]_m$ (Figure 38).

La même expérience doit être réalisée en stimulant le canal TRPV1pm ou TRPV1mito à l'aide de la RTX.

5. Implication du variant humain TRPV1mito dans la respiration mitochondriale

5.1.1. Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules intactes

Afin de caractériser le rôle de TRPV1mito dans la respiration mitochondriale, la consommation d' O_2 des cellules surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito a été mesurée dans des cellules intactes. Ces mesures ont été

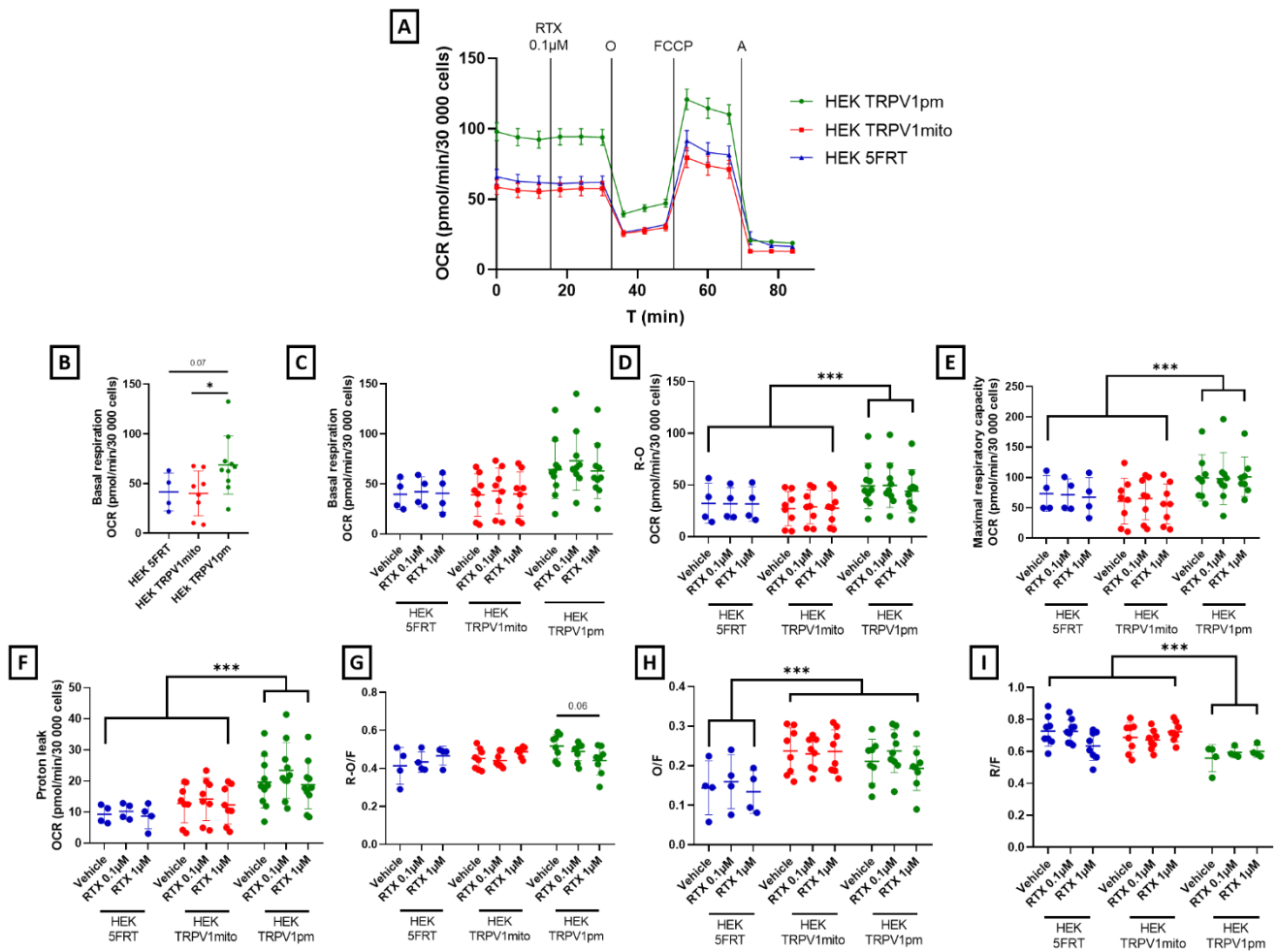


Figure 39: Influence de l'expression de TRPV1pm et TRPV1mito sur la respiration mitochondriale de cellules intactes

(A) Profils de consommation d'oxygène des cellules HEK293 transfectées avec TRPV1pm, TRPV1mito ou le vecteur vide 5FRT, mesurée avec le Seahorse XF96. La consommation d'oxygène est quantifiée pendant l'injection de RTX (0,1 µM), d'oligomycine (2 µg/ml), de FCCP (300 nM) et d'antimycine A (2 µg/ml). (B-I) Quantification de différents paramètres de la respiration mitochondriale (la respiration basale R, la respiration phosphorylante R-O, la capacité maximale de la chaîne respiratoire F, la fuite de proton O, le rapport R-O/F, le rapport O/F et le rapport R/F) des cellules intactes HEK293 transfectées avec TRPV1mito, TRPV1pm ou le vecteur vide 5FRT (N=4-9, moyenne +/- SD, test non paramétrique two-way ANOVA).

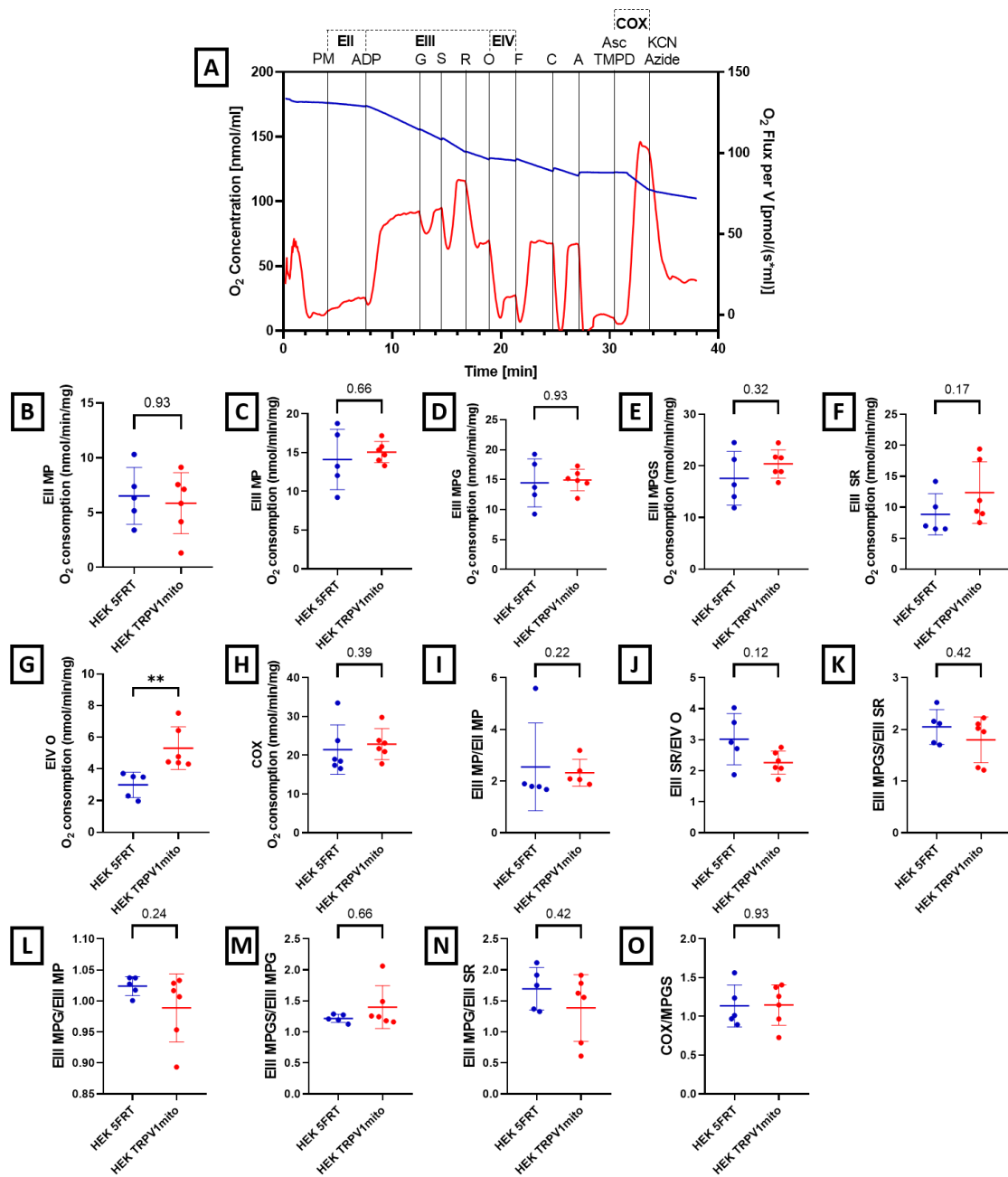
réalisées à l'état basal, lors un traitement avec la RTX à 0,1 μM ou 1 μM , suivi d'un traitement avec différents inhibiteurs de la chaîne respiratoire (Figure 39A). A partir des profils de consommation d' O_2 , différents paramètres de la respiration mitochondriale ont été calculés (Figure 39B-I). Les cellules surexprimant TRPV1pm présentent une augmentation significative de la respiration mitochondriale à l'état basal, en comparaison avec les cellules surexprimant le vecteur vide (Figure 39B). En revanche, les cellules surexprimant TRPV1mito ne montrent aucune modification de la respiration mitochondriale à l'état basal. De plus, aucune modification de la respiration mitochondriale basale n'est observée après l'addition de RTX à 0,1 μM ou 1 μM sur les cellules surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito (Figure 39C). L'augmentation de la respiration basale des cellules surexprimant TRPV1pm est accompagnée d'une augmentation significative de la respiration phosphorylante (R-O), de la fuite de proton (proton leak) et de la capacité maximale de la chaîne respiratoire (Figure 39D-E-F). Pour les cellules surexprimant TRPV1mito, aucun de ces paramètres n'est modifié. Le rapport de la respiration phosphorylante sur la capacité maximale de la chaîne respiratoire (R-O/F) n'est pas modifié pour les cellules surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito (Figure 39G). Et seul un traitement avec la RTX à 1 μM réduit de manière non significative la capacité de réserve des cellules surexprimant TRPV1pm. Par ailleurs, le rapport de la fuite de proton sur la capacité maximale de la chaîne respiratoire (O/F) est augmenté significativement dans les cellules surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito (Figure 39H). Enfin, la capacité respiratoire de réserve (R/F) n'est réduite significativement que chez les cellules surexprimant TRPV1pm (Figure 39I).

De manière générale, les cellules surexprimant TRPV1pm présentent une augmentation de la respiration phosphorylante mitochondriale accompagnée d'une augmentation de la fuite de proton. Les cellules surexprimant TRPV1mito ne montrent pas de modification majeure de la respiration mitochondriale, seulement une augmentation du rapport O/F. De plus, un traitement à la RTX 0,1 μM et 1 μM ne semble pas affecter la respiration mitochondriale des cellules surexprimant TRPV1pm ou TRPV1mito.

5.1.2. Mesure de la respiration mitochondriale sur cellules perméabilisées

Afin de caractériser le rôle de TRPV1mito dans la respiration mitochondriale, la consommation d' O_2 a été mesurée dans des cellules transfectées avec TRPV1mito ou le vecteur vide (HEK 5FRT) perméabilisées, après l'injection de différents substrats et d'inhibiteurs de la chaîne respiratoire (Figure 40A). A partir de ces profils de consommation d' O_2 , différents paramètres de la respiration mitochondriale sont calculés (Figure 40B-O). Les consommations d'oxygène des cellules surexprimant TRPV1mito à l'état 2 (EII MP), à l'état 3 (EIII MP, EIII MPG, EIII MPGS, EIII SR) ne sont pas significativement modifiées, en comparaison avec les cellules surexprimant le vecteur vide (Figure 40B-F). En revanche, la consommation d'oxygène à l'état 4 (EIV O) est augmentée de manière significative dans les cellules surexprimant TRPV1mito (Figure 40G), mais la surexpression de TRPV1mito n'affecte pas l'activité du complexe IV de la chaîne respiratoire (COX) (Figure 40H).

Les calculs de différents ratios ont aussi été réalisés pour caractériser la respiration mitochondriale des cellules surexprimant TRPV1mito. Les ratios EIII MP/EII MP et EIII SR/EIV O représentent les ratios de contrôle respiratoire (RCR) liés au complexe I et au complexe II, respectivement. Le ratio EIII MPG/EIII MP représente le contrôle de la respiration par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Le ratio EIII MPGS/EIII SR fait le rapport entre la respiration maximale liée aux complexes I et II, par rapport à celle liée au complexe II. Le ratio EIII MPGS/EIII MPG fait le rapport entre la respiration maximale liée aux complexes I et II, par rapport à celle liée au complexe I. Le ratio EIII MPG/EIII SR fait le rapport de la respiration maximale liée au complexe I par rapport à celle liée



au complexe II. Enfin, le ratio COX/MPGS fait le rapport entre l'activité maximale du complexe IV par rapport à la respiration maximale liée au complexe I et II. Globalement, la surexpression de TRPV1mito ne modifie pas significativement les ratios EIII MP/EII MP, EIII SR/EIV O, EIII MPGS/EIII SR, EIII MPG/EIII MP, EIII MPGS/EIII MPG, EIII MPG/EIII SR et COX/MPGS (Figure 40I-O).

5.1.3. Mesure du potentiel de membrane mitochondrial

La mesure du potentiel de membrane mitochondrial (Ψ_m) à l'aide de la sonde TMRM sur les cellules surexprimant TRPV1mitoGFP ou la GFP seule a été réalisée (Figure 41). L'intensité du signal fluorescent du TMRM est réduite pour les cellules surexprimant TRPV1mitoGFP en comparaison avec les cellules surexprimant la GFP seule (Figure 41A-B), suggérant que la surexpression de TRPV1mito affecte le Ψ_m et ce, sans activation extrinsèque.

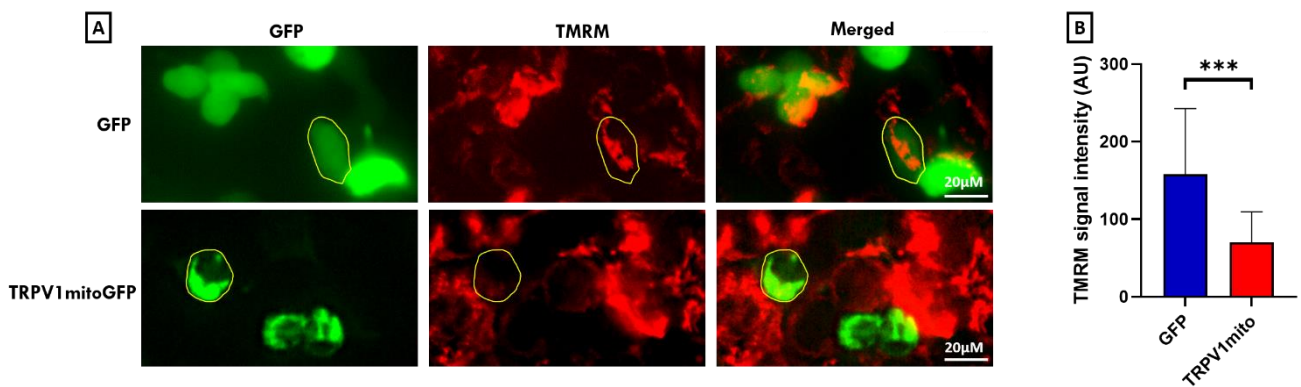


Figure 41: Influence de l'expression de TRPV1mito sur le potentiel de membrane mitochondrial
 (A) Image en microscopie à fluorescence de cellules HEK 293 transfectées avec la GFP seule ou TRPV1mitoGFP et incubées avec la sonde sensible au potentiel de membrane mitochondrial, le TMRM. (B) Quantification de l'intensité du signal fluorescent du TMRM (en unité arbitraire) des cellules HEK 293 transfectées avec la GFP seule ou TRPV1mitoGFP (N=50-100, moyenne +/- SD, test non paramétrique de Mann-Whitney).

Discussion

6. Rappel du contexte et hypothèse de travail

Ce projet de thèse a été initié suite aux récentes avancées des recherches sur la production de chaleur par la mitochondrie. En effet, la mitochondrie est un élément central du métabolisme énergétique cellulaire et, par conséquent, de la thermogénèse. D'un point de vue strictement énergétique, la chaleur produite lors de la respiration mitochondriale est plus importante que la production d'énergie sous forme d'ATP. Même si les estimations de la température mitochondriale varient en fonction des méthodes et des outils de mesure, il est vraisemblable que la forte production de chaleur de la mitochondrie induit une augmentation locale de la température de cet organite, largement supérieure à son environnement cellulaire. Ces observations amènent donc à reconsidérer la production de chaleur cellulaire et la température mitochondriale. Celle-ci est d'ailleurs susceptible de varier en fonction de nombreux paramètres, comme le type cellulaire ou l'état de la respiration mitochondriale notamment, et des variations de température ne seraient pas sans conséquence sur le fonctionnement des mitochondries. Par exemple, il a été démontré que l'activité enzymatique de certains complexes de la chaîne respiratoire serait optimale à une température avoisinant les 50°C (Chrétien et al., 2018). Par conséquent, comme pour tout autre processus biologique, la cellule et/ou la mitochondrie devraient être en mesure de réguler la production de chaleur mitochondriale, afin d'optimiser son fonctionnement dans différentes situations physiologiques, tout en limitant les potentiels effets négatifs, liées à une « surchauffe ».

Dans ce sens, le canal TRPV1 s'est révélé être un candidat très intéressant permettant de répondre au besoin de l'existence d'un thermostat mitochondrial. En effet, TRPV1 est originellement un canal ionique thermosensible, activable à une température supérieure à 43-44°C, dans la gamme de température à laquelle semble se situer la mitochondrie. De plus, l'activation de TRPV1 mito pourrait dissiper les flux d'ions Ca^{2+} , qui sont reconnus comme un mode de régulation majeur de la fonction mitochondriale. Enfin, de récentes études ont suggéré que TRPV1 pourrait être localisé au niveau de la mitochondrie. TRPV1 possède donc un ensemble de caractéristiques apte à jouer le rôle de thermostat mitochondrial, ce qui a motivé mon projet de thèse.

7. Synthèse et interprétation des résultats

7.1. Le variant TRPV1mito chez l'homme

7.1.1. Rappel des résultats

Ce travail a permis de mettre en évidence l'existence d'un variant d'épissage alternatif du canal TRPV1 à partir des banques de données GenBank. La particularité de ce variant repose sur le démarrage différé de la traduction grâce à un codon d'initiation alternatif dans l'exon n°1, et la rétention de l'intron situé entre les exons n° 2 et 3. Ces événements provoquent un décalage du cadre de lecture des exons codant n°1 et 2, qui est rattrapé à partir de l'exon n°3. Au final, ce variant de TRPV1 généré (TRPV1mito) présente des modifications de sa séquence protéique uniquement au niveau des 150 premiers acides aminés qui se trouvent être une séquence d'adressage mitochondriale (MTS) selon l'outil de prédiction Mitoprot II. Les MTS permettent l'adressage spécifique d'une protéine nouvellement traduite à la mitochondrie (Omura 1998).

7.1.2. Mécanisme de formation de TRPV1mito

La particularité de TRPV1mito réside dans le mécanisme de formation de la séquence MTS, basée sur un décalage du cadre de lecture des exons codants n° 1 et 2. Ce processus de décalage du cadre de lecture sur un même ARNm, connu sous le nom de « translational frameshifting » est largement décrit chez les virus (Atkins et al. 2016), car il leur confère une versatilité d'expression importante malgré la faible taille de leur génome. En revanche ce processus est très peu connu chez d'autres organismes, et ce n'est que récemment qu'il a été identifié chez les eucaryotes (Dinman 2012). Par exemple, au sein du gène Ma3 chez l'Homme, un décalage du cadre de lecture programmé sur l'ARNm permet la génération d'un ARNm alternatif fonctionnel (Wills et al. 2006).

Dans le cas de TRPV1mito, le cadre de lecture de la majorité de la protéine TRPV1 est rattrapé grâce à la rétention de l'intron entre les exons n°2 et 3. La modification de séquence engendrée par le décalage du cadre de lecture est donc compensée par un mécanisme d'épissage alternatif afin de conserver la majeure partie de la séquence protéique de TRPV1 tout en formant une préséquence d'adressage en N-terminal. L'identification de ce type de mécanisme est en plein essor dans la littérature scientifique. En effet, environ 7% des gènes présentent un mécanisme d'épissage alternatif, avec des régions codantes dans des cadres de lecture alternatifs, définissant le terme de « *dual-coding genes* » (Liang et Landweber 2006). Cependant, le mécanisme d'épissage alternatif le plus courant permettant un décalage du cadre de lecture de ces gènes est le saut d'exon (Ramalho et al. 2018). L'identification de TRPV1mito chez l'homme s'inscrit donc parfaitement dans ces récentes découvertes, associant une dimension inédite par l'utilisation de la rétention d'un intron codant de petite taille.

Beaucoup de questions émergent concernant la régulation de l'expression du variant TRPV1mito. Les mécanismes de contrôle connus pour le décalage de cadre de lecture grâce à des codons d'initiation alternatifs reposent sur la présence de séquences « glissantes » et/ou sur la formation de structures secondaires de l'ARNm (Atkins et al. 2016) qui permettent au ribosome de « sauter » un nucléotide pour forcer la traduction dans un autre cadre de lecture. Globalement, il devient intéressant de chercher à identifier ce genre de séquence ou de structure sur l'ARNm de TRPV1. De plus, pour comprendre la régulation de l'expression du variant TRPV1mito, il faudra également s'intéresser à la régulation de la rétention de l'intron lors de l'épissage du pré-ARNm de TRPV1, et des mécanismes attenants comme – notamment – la méthylation de l'ADN qui altère le recrutement des facteurs d'épissage de l'ARN ou des modifications post traductionnelles des histones qui déstabilisent le spliceosome (Monteuuis et al. 2019).

7.1.3. Présence d'une MTS dans TRPV1mito

L'organite semi-autonome qu'est la mitochondrie, contient environ 2000 protéines dont la grande majorité (>99%) est codée par des gènes nucléaires (Neupert et Herrmann 2007). La présence d'une séquence MTS ou « préséquence » en amont des zones fonctionnelles d'une protéine permet son import vers l'IMM, avant d'être éventuellement relocalisée dans la matrice, dans l'IMS ou internalisée dans l'IMM (Miernyk 2016). L'analyse bio-informatique des séquences de ces MTS a permis de proposer des algorithmes de prédiction de l'adressage mitochondrial, tels que MitoProt II ou Mitofate (Neupert et Herrmann 2007). Les séquences MTS sont décrites comme de courtes séquences protéiques de 10 à 80 acides aminés qui forment des hélices rapidement intégrées dans les membranes. Ces séquences MTS sont en général suivies d'un signal de clivage éliminant cette préséquence de la protéine définitive. Dans la séquence de TRPV1mito, le site de clivage est prédit au niveau du 135^{ème} acide aminé.

Une telle modification du domaine N-terminal de TRPV1 doit avoir des conséquences fonctionnelles non négligeables. Dans ce sens, un variant d'épissage alternatif de TRPV1 du rat, nommé VR.5'sv, présente une délétion des 368 premiers acides aminés en N-terminal. Cette modification provoque une insensibilité du variant VR.5'sv à la CAP, à la chaleur nociceptive et au pH acide (Sanchez, Krause, et Cortright 2001). De plus, il agit comme un dominant négatif lorsqu'il est co-exprimé avec le variant TRPV1 « standard » (Eilers et al. 2007). Chez la souris, un autre variant du canal TRPV1, TRPV1beta, est rendu instable et non fonctionnel à cause de la délétion de la séquence protéique de 10 acides aminés, correspondante à l'exon 7, dans son domaine N-terminal, à 25 résidus en amont du premier domaine transmembranaire (C. Wang et al. 2004). Chez l'homme, le variant d'épissage alternatif de TRPV1 nommé TRPV1b, résulte également de l'absence de l'exon 7 dans la phase codante, qui induit une perte de 60 acides aminés dans le domaine N-terminal. Contrairement aux autres variants VR.5'sv du rat et TRPV1beta de la souris, le variant TRPV1b de l'Homme est fonctionnel car il est activé par des températures >42°C, mais pas par la CAP ou le pH acide (G. Lu et al. 2005).

Dans le cas de TRPV1mito, la modification des 150 premiers acides aminés dans le domaine N-terminal induit une modification de la première séquence de répétition d'anhydrures normalement située entre le 111^{ème} et le 153^{ème} acide aminé. Les séquences de répétition d'anhydrures sont des configurations protéiques particulières très répandues, ayant de multiples rôles tels que la médiation des interactions protéine-protéine (Sedgwick et Smerdon 1999). Ainsi, l'interaction entre TRPV1mito avec des partenaires connus pour réguler l'activité de TRPV1pm, comme par exemple la Calmoduline (CaM), pourrait être modifiée, d'autant plus du fait de sa localisation différentielle (Zhao et Tsang 2017). Néanmoins, cet aspect reste à être étudié, car la modification du domaine N-terminal de TRPV1mito peut bouleverser le profil des partenaires et des régulations de cette isoforme, comme suggéré par nos résultats d'immunoprécipitation.

7.1.4. Expression de TRPV1mito

La base de données GTEx portal a permis d'extraire des données d'expression tissulaire de TRPV1mito qui traduisent une expression ubiquitaire de cette isoforme, bien que relativement faible par comparaison avec l'expression du variant classique de TRPV1, en moyenne 25 fois plus faible. Ces données ne concernent que l'expression du transcrite et non de la protéine qui en résulte. Même s'il est admis que, en général, l'expression des transcrits est corrélée avec l'expression protéique, ce n'est pas systématiquement le cas pour tous les gènes (Koussounadis et al. 2015). Il sera donc nécessaire de quantifier l'expression tissulaire de TRPV1mito tant au niveau transcriptionnel qu'au niveau protéique, ce qui renseignera sur sa fonction dans chaque tissu. Cette étape nécessite la création d'un anticorps spécifique de TRPV1mito, actuellement non disponible, afin de le discriminer du variant commun TRPV1pm.

7.2. Le variant TRPV1mito dans le règne animal

7.2.1. Rappel des résultats

Nos résultats suggèrent la présence d'une séquence MTS dans le gène TRPV1 chez les mammifères homéothermes et placentaires. En effet, seules 3 exceptions parmi les mammifères ne semblent pas contenir de séquence MTS dans le gène TRPV1 : le rat taupe nu (*Heterocephalus glaber*), la gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) et l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*). Par ailleurs, le mécanisme permettant la genèse de

cette MTS semble différent en fonction des groupes de mammifères, du fait de la divergence de la position du codon d'initiation alternatif.

De plus, la tentative d'identification *in vitro* du variant TRPV1mito chez la souris a mis en évidence un transcrit alternatif de TRPV1 présentant la rétention de l'intron caractéristique de la formation de TRPV1mito chez l'Homme. En revanche, la simulation *in silico* de l'épissage alternatif du variant TRPV1mito chez la souris a abouti à une séquence ne permettant pas la formation de TRPV1mito, selon la description classique d'une phase de lecture.

7.2.2. Intérêt évolutif lié à TRPV1mito

La prédiction de la présence d'une séquence MTS dans le gène de TRPV1 chez les mammifères suggère que la conservation d'un variant mitochondrial de TRPV1 chez les mammifères présente un avantage évolutif. Parmi les séquences de mammifères inclus dans notre étude, seules 3 ne présentent pas de séquence MTS potentielle dans le gène TRPV1. Parmi eux, le rat taupe nu (*Heterocephalus glaber*) est notamment connu pour sa longévité (Buffenstein 2005), sa résistance aux cancers et aussi pour sa capacité de thermorégulation extrêmement limitée (Johansen et al. 1976). De plus, cet animal n'éprouve aucune douleur lorsqu'il est exposé à la capsaïcine, pas plus qu'il n'est sensible à des agents pro-inflammatoires responsables d'hyperalgésie thermique (T. J. Park et al. 2008). Cet avantage évolutif est lié à différentes adaptations anatomiques et génétiques au niveau des nocicepteurs (Eigenbrod et al. 2019). Ensuite, la gerbille de Mongolie (*Meriones unguiculatus*) possède une forte tolérance à des stress thermiques à des températures élevées ou basses, avec une adaptation conséquente de sa fourrure (Y.-Y. Guo et al. 2020). Enfin, l'ornithorynque (*Ornithorhynchus anatinus*) est un mammifère non placentaire de l'ordre des monotrèmes qui est connu pour avoir une température corporelle inférieure aux autres mammifères (32°C) et pondre des œufs (Grant et Temple-Smith 1998). En considérant l'hypothèse d'un rôle de TRPV1mito dans la régulation de la température mitochondriale, la génération de l'isoforme mitochondriale TRPV1mito au cours de l'évolution pourrait être un élément clé dans le développement de l'endothermie-homéothermie chez les mammifères placentaires uniquement. Cette caractéristique de l'endothermie-homéothermie est également présente au sein de la classe des oiseaux, mais malgré l'existence de points de convergence entre mammifères et oiseaux, comme l'implication de l'hypothalamus dans le maintien de la température corporelle, les divergences entre leur endothermie-homéothermie sont importantes (Grigg, Beard, et Augee 2004). Par exemple la température corporelle des oiseaux (>40°C) est largement supérieure à celle des mammifères. Ceci confirme que l'endothermie-homéothermie est apparue indépendamment chez les oiseaux et les mammifères au cours de l'évolution (Grigg, Beard, et Augee 2004), et résulte de mécanismes évolutivement indépendants expliquant l'absence de séquence MTS dans le gène de TRPV1 des oiseaux.

7.2.3. Conservation du mécanisme d'épissage de TRPV1mito

Afin de confirmer les hypothèses précédentes, il est nécessaire d'identifier *in vitro* les transcrits complets de TRPV1 présentant une séquence MTS chez tous les mammifères placentaires. Cela comprend également d'identifier les mécanismes d'épissage alternatif permettant la création de la séquence MTS pour chacune des espèces. Dans un premier temps et pour des raisons pratiques, la recherche *in vitro* du variant chez la souris a été réalisée chez la souris. La rétention de l'intron entre l'exon codant n°2 et 3 permettant la formation de TRPV1

mito chez l'Homme a bien été identifiée chez la souris. Cependant, la simulation bio-informatique de la formation de TRPV1mito chez la souris à l'aide de cette rétention d'intron aboutit à la formation d'un transcrit non fonctionnel qui ne correspond pas à celui de TRPV1 car elle présente un codon STOP dans l'exon n°2. De plus, la rétention de l'intron entre l'exon n°2 et 3 ne permet pas de rattraper le cadre de lecture de TRPV1 à partir de l'exon codant n°3. De fait, il doit exister des mécanismes moléculaires supplémentaires à identifier pour restaurer un cadre de lecture permettant de générer l'isoforme TRPV1mito chez la souris, qu'il nous reste à mettre en évidence. Par ailleurs, les séquences MTS prédites pour l'ensemble des mammifères correspondent à des codons d'initiation alternatif situés à des positions différentes. Ainsi, le mécanisme d'épissage alternatif permettant la formation du variant TRPV1mito est très probablement différent entre les différentes espèces.

La fonction d'adressage des séquences MTS repose sur l'alternance de régions hydrophobes et d'acides aminés positivement chargés pour former une hélice amphiphile (von Heijne 1986). La pression de sélection des séquences MTS repose donc logiquement sur la structure secondaire du peptide d'adressage. On peut ainsi imaginer que la conservation de la séquence MTS dans le gène de TRPV1mito s'est produite malgré des modifications dans la séquence primaire de la séquence MTS de TRPV1.

7.3. Modèle cellulaire utilisé

7.3.1. Choix du modèle cellulaire

Afin de caractériser la localisation et la fonction de TRPV1mito, une stratégie basée sur la surexpression de TRPV1mito dans la lignée HEK293 a été mise en place, car c'est un modèle cellulaire prolifératif standard utilisé pour la caractérisation des canaux ioniques et qui supporte bien la transfection. De plus, cette lignée cellulaire est l'une des seules pour laquelle la fluorescence du MitoThermoYellow (MTY), la sonde chimique fluorescente sensible à la température mitochondriale, varie indépendamment des variations du potentiel de membrane mitochondrial. Cette lignée est par ailleurs décrite pour ne pas exprimer TRPV1 (Ouadid-Ahidouch et al. 2012), ce qui a permis de surexprimer les différents isoformes de TRPV1 afin de les caractériser sans interférence avec des canaux TRPV1 endogènes. Cette stratégie est la plus simple pour mettre en évidence les flux calciques uniquement liés à l'expression de chaque isoforme de TRPV1, notamment par leur activation et inhibition spécifiques par des agents pharmacologiques. Bien qu'étant un modèle d'étude non physiologique, la lignée HEK293 permet d'exacerber des effets liés aux fonction de TRPV1pm et TRPV1mito, afin de bien les caractériser en absence de bruit de fond.

7.3.2. Caractérisation des modèles cellulaires

Des lignées de HEK 293 ont donc été créées, qui surexpriment de manière stable les différentes constructions de TRPV1, dont la lignée stable TRPV1mitoGFP (293-TRPV1mitoGFP) pour caractériser la localisation de TRPV1mito.

Malgré l'obtention de lignées stables surexprimant TRPV1pm, aucune n'a montré des réponses fonctionnelles caractérisées par une augmentation du Ca^{2+} dans le cytoplasme suite aux traitements à la CAP et la RTX. De fait, nous avons choisi une seconde stratégie, basée sur la surexpression transitoire des différentes constructions de TRPV1pm et TRPV1mito. La surexpression de TRPV1pm, dont la fonction est décrite depuis longtemps dans la littérature, a été utilisée comme contrôle positif dans la caractérisation fonctionnelle de TRPV1mito. La quantification du taux de transfection, de l'expression des transcrits et protéines de TRPV1 a

permis de bien définir les caractéristiques de cette approche de transfection transitoire. Ainsi, malgré un taux de transfection identique entre TRPV1pm et TRPV1mito, les cellules exprimant TRPV1pm présentent une surexpression transcriptionnelle plus importante que les cellules exprimant TRPV1mito. En revanche, les cellules exprimant TRPV1pm présentent une surexpression protéique moins importante que les cellules exprimant TRPV1mito. Ces différences d'expression sont à considérer lors de l'interprétation des résultats quantitatifs de la caractérisation fonctionnelle des isoformes de TRPV1.

7.4. Localisation de TRPV1mito

7.4.1. Rappel des résultats

L'observation par microscopie à fluorescence de cellules SNB75, MCF7 et HEK 293 exprimant TRPV1mitoGFP ont mis en évidence la localisation mitochondriale de TRPV1mito, dépendante de la présence de sa séquence MTS en N-terminal. Le fractionnement cellulaire de la lignée 293-TRPV1mitoGFP a permis de restreindre cette localisation à la fraction mitochondriale, et de l'exclure probablement des MAMs ou du RE. Un test de protection à la protéinase K a suggéré que le domaine C-terminal de TRPV1mito-GFP serait dans le cytoplasme et non pas dans la matrice mitochondriale. Enfin, l'immunoprécipitation de TRPV1mitoGFP a identifiée des partenaires de TRPV1mito localisés dans la mitochondrie et aussi des protéines du RE comme la SERCA.

7.4.2. Localisation intracellulaire

La localisation de TRPV1mito dans la mitochondrie implique de reconsidérer beaucoup de processus décrits dans l'adressage de TRPV1 au niveau de la membrane plasmique. En effet, bien que ces mécanismes ne soient pas parfaitement connus, l'adressage de TRPV1 à la membrane plasmique repose principalement sur des modifications post-traductionnelles, notamment la phosphorylation, ou le processus d'exocytose SNARE-dépendant (Ferrandiz-Huertas et al. 2014). Ces processus d'adressage de TRPV1 contribuent même à sa régulation car, par exemple, une activation prolongée et répétée de TRPV1 provoque sa désensibilisation grâce à son internalisation et sa dégradation, suite à sa phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) (Sanz-Salvador et al. 2012). De plus, TRPV1 a été retrouvé dans d'autres organites intracellulaires, comme le RE, bien qu'aucune donnée ne permet de préciser ces mécanismes spécifiques d'adressage dans ces organites. Donc, la présence de la séquence MTS en N-terminal du variant TRPV1mito est un déterminant clé de son adressage à la mitochondrie, qui demande à ce que d'autres acteurs de cet adressage soient identifiés, ce qui améliorera la compréhension des fonctions intracellulaires de TRPV1 dans chaque compartiment cellulaire.

7.4.3. Localisation intra-mitochondriale

Nos résultats n'ont pas permis pour l'instant de déterminer avec précision la localisation de TRPV1mito dans la mitochondrie. D'après la littérature, les protéines codées par le noyau et adressées à la mitochondrie sont transportées une fois la traduction terminée. Le repliement des protéines reste bloqué par des chaperonnes cytosoliques de la famille Hsp70 ou Hsp90, pour permettre leur import sous une forme dépliée (Kunze et Berger 2015). Ensuite, les protéines sont prises en charge à la surface de l'OMM par le complexe TOM (Chacinska et al. 2009). Et en fonction de la nature du précurseur protéique, chaque compartiment intra-mitochondrial comporte une voie d'import différente. Dans le cas d'un adressage à la membrane mitochondriale externe, les précurseurs protéiques présentent majoritairement une conformation en tonneau β ou en hélice α et ils sont insérés dans la

membrane interne par le complexe SAM (Chacinska et al. 2009). Par ailleurs, dans le cas d'un adressage dans l'espace intermembranaire, les précurseurs protéiques possèdent majoritairement un motif MISS et sont pris en charge par les protéines Mia40 et Erv1 afin de les piéger dans l'espace intermembranaire (Mossmann, Meisinger, et Vögtle 2012). Dans le cas d'un adressage à la membrane mitochondriale externe, les précurseurs protéiques sont enchâssés puis libérés dans celle-ci par le complexe TIM22 ou TIM23. Enfin, dans le cas d'un adressage dans la matrice, les précurseurs protéiques passent à travers la membrane interne grâce à une prise en charge par le complexe TIM23.

Les canaux potassiques dépendant du potentiel (Kv) présentent une structure très proche de TRPV1 et sont également dans l'IMM. Cependant, contrairement à TRPV1mito, l'import des canaux Kv ne dépend pas d'une préséquence d'adressage mitochondriale (Capera et al. 2022). Les protéines mitochondriales qui se rapprochent le plus de TRPV1mito d'un point de vue structurel, dont le mécanisme d'adressage est connu, sont les transporteurs qui s'insèrent dans l'IMM comme la Translocase ATP/ADP (ANT) ou la Phosphate Carrier, les deux sont composées de 6 domaines transmembranaires en hélice α , à l'instar de TRPV1, et s'assemblent en multimères (Mossmann, Meisinger, et Vögtle 2012). Remarquablement, l'adressage de ces transporteurs à l'IMM est possible grâce à la présence de multiples signaux d'adressage distribués sur toute la longueur du précurseur protéique, ce qui n'est pas le cas de TRPV1mito, qui possède une séquence MTS en N-terminal formant une hélice amphiphile chargée positivement, ce qui est généralement associé à un adressage vers l'IMM et la matrice mitochondriale. De fait, la conjonction entre nos résultats et nos connaissances actuelles sur les mécanismes d'import des protéines mitochondriales, ne permettent pas de trancher sur la localisation précise de TRPV1mito, bien que nous anticipions, à l'instar de la localisation d'autres transporteurs de Ca^{2+} , comme le MCU, qu'il soit dans l'IMM. En effet, étant un canal ionique transmembranaire qui dissipe majoritairement des flux d'ions Ca^{2+} , sa présence dans l'IMM ou dans l'OMM ne provoquera pas les mêmes flux d'ions. Si TRPV1mito se trouve dans l'IMM, il constituera une voie d'entrée ou de sortie directe d'ions de la matrice mitochondriale, et pourra constituer une voie d'entrée de Ca^{2+} alternative à celle du MCU. A l'inverse, si TRPV1mito se trouve dans l'OMM, son activation et son ouverture ne constituerait pas une voie d'entrée directe d'ions dans la matrice mitochondriale qui dépendrait de ce fait des transporteurs de Ca^{2+} de la membrane interne mitochondriale. De plus, en lien avec nos résultats montrant que TRPV1mito est impliqué dans l'homéostasie calcique de la mitochondrie, sa localisation à proximité des MAMs y serait favorable. Mais nos résultats de fractionnement cellulaire suggèrent que TRPV1mito ne se trouve pas dans la fraction des MAMs, néanmoins, son immunoprécipitation a mis en évidence une interaction avec la SERCA, une protéine localisée dans le RE et les MAMs, responsable du repompage des ions Ca^{2+} vers le lumen du RE (Perrone et al. 2020). La piste d'une interaction de TRPV1mito avec les constituants des MAMs doit donc être approfondie. De fait, même si TRPV1mito ne se localise pas dans les MAMs ou le RE, il est probable que cette isoforme interagisse d'une manière directe ou au travers de complexes protéiques, avec des partenaires impliqués dans les flux calciques au sein des MAMs.

Définir la localisation de TRPV1mito permettra également de comprendre les mécanismes de régulation de son activité. Par exemple, TRPV1 présente des sites de liaison aux protons H^+ aux niveau du pore qui sont impliqués dans la régulation de son activité (K. Zhang, Julius, et Cheng 2021). L'enchâssement de TRPV1mito dans l'IMM avec ses domaines N- et C-terminal dans la matrice mitochondriale positionnerait la boucle du pore dans l'IMS, où la quantité de protons est importante et le pH est plus acide grâce à l'extrusion de protons par la chaîne respiratoire. Inversement, l'orientation des domaines N- et C-terminal dans l'IMS, permettrait d'une part

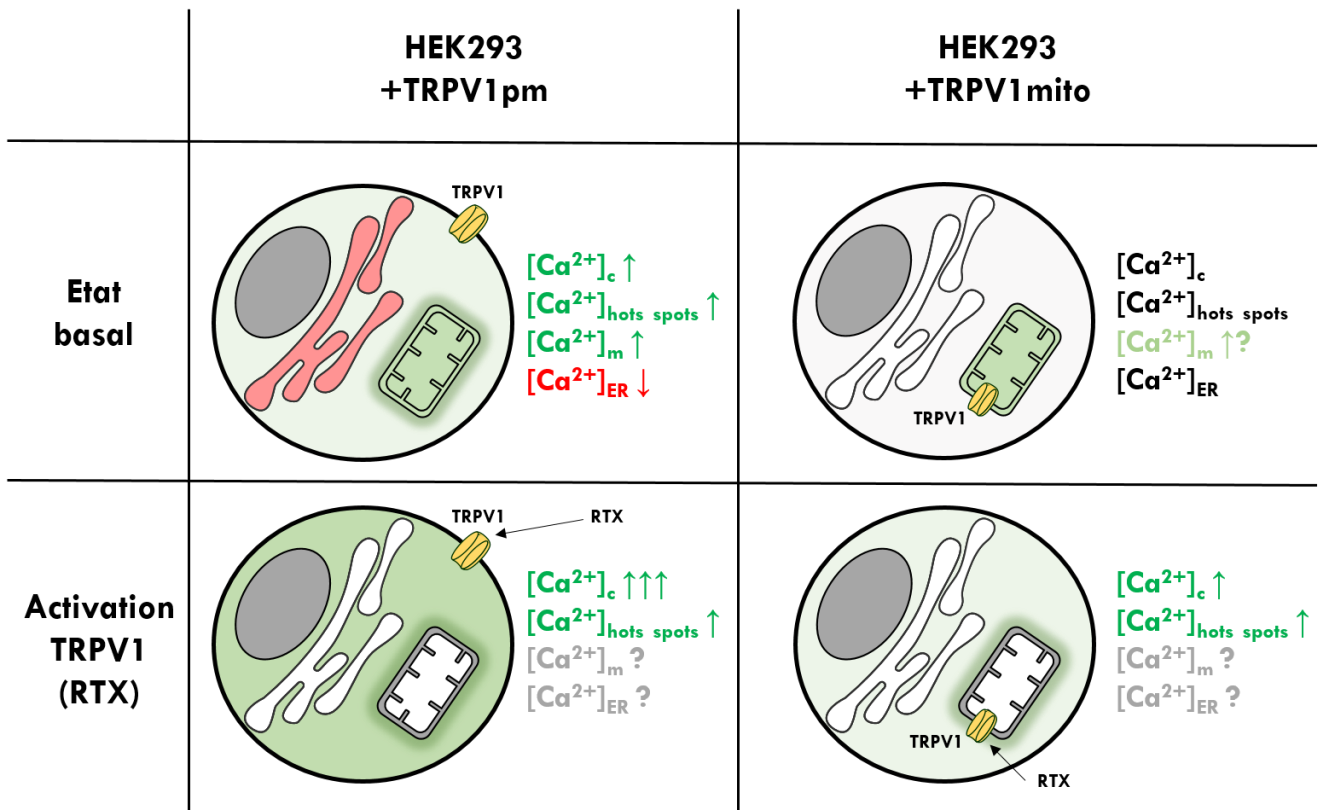


Figure 42: Récapitulatif des résultats de mesure des variations de $[Ca^{2+}]$ dans les différents compartiments cellulaires des cellules HEK293 transfectées avec TRPV1pm ou TRPV1mito à l'état basal ou lors d'une activation par la RTX

de restreindre l'ouverture du pore en lien avec le pH plus basique de la matrice, éventuellement en augmentant la température seuil pour son ouverture, et d'autre part de localiser l'extrémité C-terminale de TRPV1mito vers les MAMs.

7.5. Fonction de TRPV1mito dans l'homéostasie calcique

7.5.1. Rappel des résultats

Pour comprendre le rôle de TRPV1mito dans l'homéostasie calcique cellulaire, les variations de $[Ca^{2+}]$ dans différents compartiments cellulaires ont été mesurées dans différentes conditions expérimentales, à l'aide de sondes calciques fluorescentes au sein de cellules HEK293 transfectées avec TRPV1pm ou TRPV1mito (Figure 42). Les variations de $[Ca^{2+}]$ induites par la surexpression et/ou l'activation de TRPV1mito sont comparées à celles induites par TRPV1pm. A l'état basal, la surexpression de TRPV1pm induit une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme, au niveau des hot spots mitochondriaux et dans la matrice mitochondriale, ainsi qu'une diminution du $[Ca^{2+}]$ dans le RE. Et l'activation de TRPV1pm par un traitement à la RTX induit une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme et dans les hot spots mitochondriaux.

Paradoxalement, nos résultats montrent qu'à l'état basal, la surexpression de TRPV1mito induit, ou non, une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans la matrice mitochondriale, en fonction de la sonde utilisée. En revanche, l'activation de TRPV1mito par la RTX induit une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme et dans les hot spots mitochondriaux. La mesure du $[Ca^{2+}]$ dans le reticulum endoplasmique et dans la matrice mitochondriale n'a pas encore été réalisée dans la condition d'activation de TRPV1pm ou TRPV1mito par un traitement à la RTX.

7.5.2. Effets de TRPV1pm sur l'homéostasie calcique cellulaire

A l'état basal, TRPV1pm induit une augmentation généralisée du $[Ca^{2+}]$ cellulaire, notable dans le cytoplasme, les hot spots mitochondriaux et la matrice mitochondriale. L'augmentation basale du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme de cellules HEK293 surexprimant TRPV1 a déjà été observée (Bosson et al. 2020). Ce résultat est lié à l'activité constitutive de TRPV1 qui génère des flux faibles d'ions Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire, sans nécessité d'activation extrinsèque. En effet, TRPV1 est régulé par de nombreux acteurs endogènes tel que le pH ou des lipides (Zhao et Tsang 2017). Ainsi, la surexpression de TRPV1pm pourrait induire une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme qui se répercuterait alors logiquement sur la mitochondrie, dont l'une des fonctions consiste à tamponner le Ca^{2+} . Par ailleurs, il a été proposé que TRPV1 pourrait aussi être localisé dans le RE des cellules HEK293 exprimant le variant TRPV1pm (Wisnoskey, Sinkins, et Schilling 2003), ce qui pourrait provoquer des flux d'ions Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires. Ceci expliquerait la diminution du $[Ca^{2+}]_{ER}$ dans les cellules HEK293 exprimant TRPV1pm. Globalement, la surexpression de TRPV1pm dans les cellules HEK293 induirait une entrée de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire et une sortie de Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires grâce à son activité constitutive, cet excès de Ca^{2+} dans le cytoplasme serait alors tamponné par la mitochondrie.

L'activation directe de TRPV1pm par la RTX induit une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme, comme décrit dans la littérature (Michael J. Caterina et al. 1997). Cette réponse serait donc la conséquence, d'une part, d'une entrée de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire par le canal TRPV1pm exprimé à la membrane plasmique et d'autre part, d'une sortie de Ca^{2+} depuis les stocks intracellulaires par le canal TRPV1 exprimé dans le RE. Représentant une partie du cytoplasme au contact des mitochondries, le $[Ca^{2+}]$ des hot spots mitochondriaux augmenterait donc logiquement suite à l'activation de TRPV1pm.

7.5.3. Effets de TRPV1mito sur l'homéostasie calcique cellulaire

A l'état basal, la surexpression de TRPV1mito n'induit pas de modification du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme, dans le RE ou au niveau des hots spots mitochondriaux. En revanche, la surexpression de TRPV1mito induit une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans la matrice mitochondriale, ou non, en fonction de la sonde utilisée. La sonde mito-GEM-GECO ($K_d = 340$ nM) possède une affinité pour le Ca^{2+} plus importante que la sonde 4mtD3cpv ($K_d = 600$ nM). L'absence d'augmentation du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale avec la sonde 4mtD3cpv, pourrait donc résulter d'une sensibilité trop faible de cette sonde pour le Ca^{2+} . L'augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans la matrice mitochondriale, suggère une entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale par le pore de TRPV1mito, une hypothèse qui reste encore à être démontrée.

En effet, si TRPV1mito présente une activité constitutive dans la mitochondrie, ce serait une voie d'entrée directe du Ca^{2+} dans la matrice, à condition d'être situé dans la membrane mitochondriale interne. L'activation de TRPV1mito par un traitement à la RTX induit une augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans le cytoplasme et au niveau des hots spots mitochondriaux, mais dans des proportions plus faibles que lors de l'activation de TRPV1pm. En effet, l'augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ induite par l'activation de TRPV1mito représente 5% de celle induite par l'activation de TRPV1pm (Figure 34). Et l'augmentation du $[Ca^{2+}]_{hots\ spots}$ induite par l'activation de TRPV1mito représente 30% de celle induite par l'activation de TRPV1pm (Figure 36). Ainsi, contrairement à l'activation de TRPV1pm qui induit une augmentation globale du $[Ca^{2+}]_c$ détectable dans les hots spots mitochondriaux, l'activation de TRPV1mito provoque une augmentation du $[Ca^{2+}]$ localisée spécifiquement au niveau des hots spots mitochondriaux, ce qui peut correspondre à une sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie. Cette hypothèse reste à prouver, notamment en mesurant les variations de $[Ca^{2+}]$ de la matrice mitochondriale et du RE lors de son activation.

7.5.4. TRPV1mito : un canal calcique mitochondrial supplémentaire ?

La surexpression et l'activation de TRPV1mito semble influencer l'homéostasie cellulaire spécifiquement au niveau de la mitochondrie. En effet, l'augmentation du $[Ca^{2+}]$ dans la matrice mitochondriale à l'état basal des cellules exprimant TRPV1mito illustre son rôle dans l'homéostasie calcique mitochondriale. Ce résultat suggère d'ailleurs une entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale grâce à l'activité constitutive de TRPV1mito. Cependant, l'activation de TRPV1mito avec un traitement à la RTX induit une augmentation de $[Ca^{2+}]$ au niveau des hots spots mitochondriaux, donc plutôt en faveur d'une sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie (Figure 43B). En considérant les mécanismes et les acteurs connus qui régulent l'homéostasie calcique mitochondriale et par ailleurs que TRPV1mito serait situé dans l'IMM, l'activation de TRPV1mito devrait, en théorie, provoquer une entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale. En effet, le canal TRPV1 est un canal ionique qui dissipe, passivement, des flux d'ions Ca^{2+} lors de son activation. Ces flux sont alors dépendants du gradient électrochimique qui prend en compte le potentiel de membrane et le potentiel d'équilibre de l'ion. Dans la mitochondrie, le gradient électrochimique est en faveur d'une entrée de Ca^{2+} . En effet, la voie d'entrée principale du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale par le MCU dépend du potentiel de membrane mitochondrial (Giorgi, Marchi, et Pinton 2018). De plus, les voies connues de sortie du Ca^{2+} de la matrice mitochondriale vers le cytoplasme sont constituées d'échangeurs H^+/Ca^{2+} et Na^+/Ca^{2+} et pas de canaux ioniques. D'autres canaux ioniques, dont le canal TRPC3 ou le récepteur mitochondrial à la ryanodine mRyR, ont aussi été impliqués dans l'accumulation de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale indépendamment du MCU (Feng et al. 2013; Ryu et al. 2010). La fonction de TRPV1mito devrait donc théoriquement se rapprocher de ces canaux et induire une entrée

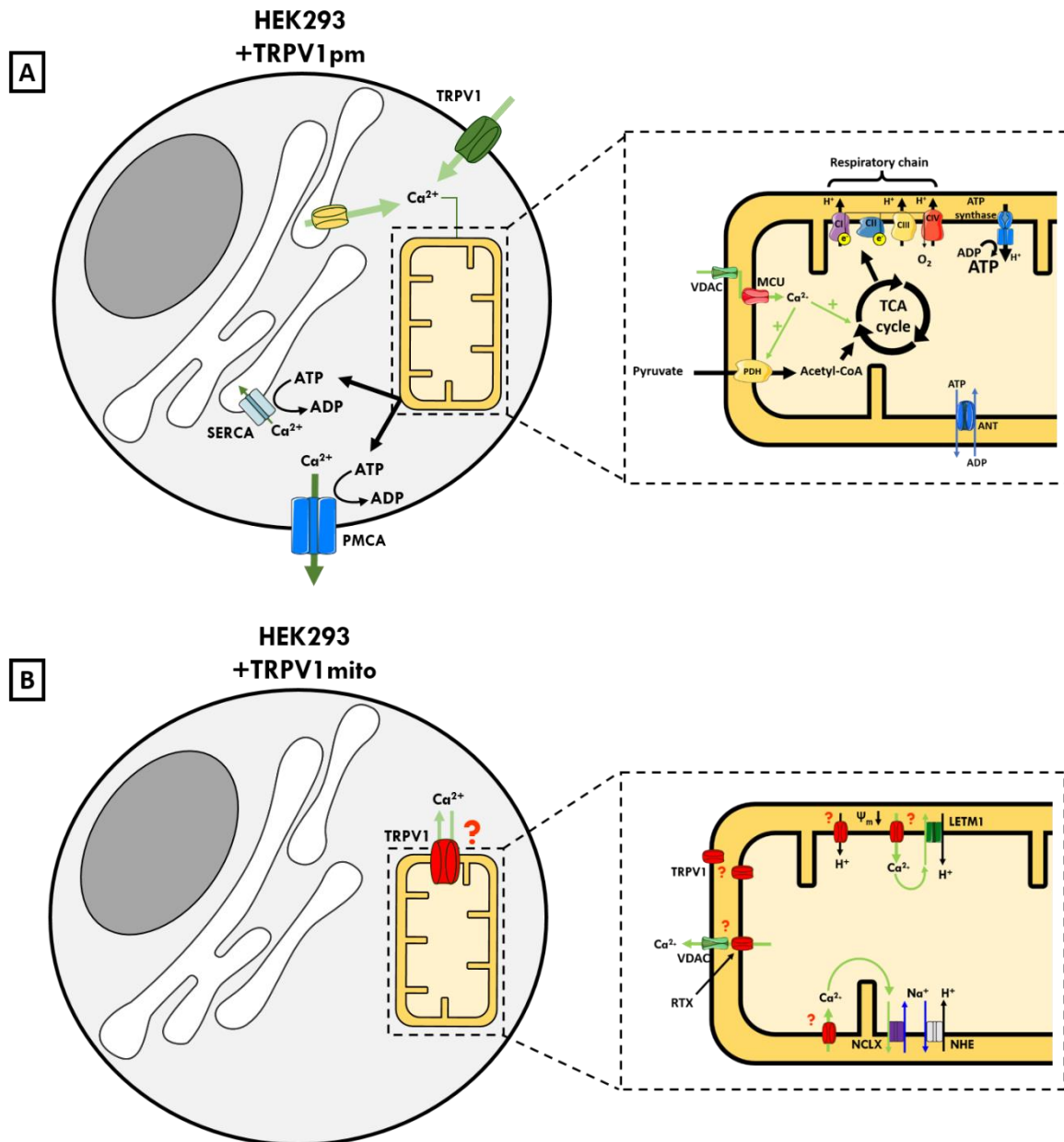


Figure 43: Schéma bilan des effets hypothétiques liés à la surexpression de TRPV1pm ou TRPV1mito

- (A) La surexpression de TRPV1pm induit une augmentation du $[Ca^{2+}]_c$ grâce à une entrée de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire et/ou une sortie des stocks intracellulaires, par activité constitutive ou son activation extrinsèque. Le Ca^{2+} est alors tamponné par la mitochondrie grâce aux canaux VDAC et MCU de la membrane mitochondriale externe et interne, respectivement. Dans la matrice mitochondriale, le Ca^{2+} augmente l'activité des enzymes du cycle de Krebs et de la pyruvate déshydrogénase (PDH) conduisant à l'augmentation de la respiration mitochondriale et de la production d'ATP. L'augmentation de la production d'ATP permet d'alimenter les pompes Ca^{2+} -ATPases comme la SERCA ou la PMCA afin d'éliminer le Ca^{2+} du cytoplasme.
- (B) TRPV1mito est adressé dans la mitochondrie mais sa localisation précise et notamment son enchâssement dans l'IMM ou l'OMM reste à déterminer. Cependant, en supposant que TRPV1mito est situé dans l'IMM, son expression induit plusieurs phénomènes. D'abord, une augmentation du $[Ca^{2+}]_m$ sans activation extrinsèque, suggérant une entrée de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale. Ensuite, son activation avec la RTX induit une augmentation du $[Ca^{2+}]_{hots\ spots}$ en lien avec une sortie de Ca^{2+} de la mitochondrie. Par ailleurs, l'expression de TRPV1mito induit une réduction du Ψ_m en lien avec l'augmentation de la fuite de protons. Celle-ci peut être induite directement par l'activité canal de TRPV1mito et sa perméabilité aux protons, ou indirectement grâce à des processus de régulation de l'homéostasie calcique mitochondriale comme l'échangeur LETM1 qui génère une sortie Ca^{2+} contre une entrée de H^+ ou l'échangeur NHE qui génère aussi une entrée de H^+ contre une sortie de Na^+ .

de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale suite à son activation. Toutefois, il est important de prendre en considération que le modèle cellulaire utilisé n'est pas physiologique. La surexpression et l'activation d'un canal ionique notamment dans la mitochondrie ne correspondent pas à une situation naturelle dans laquelle la fonction de TRPV1mito serait en lien avec des processus cellulaires spécifiques d'un type cellulaire. L'activation de TRPV1mito pourrait donc induire des réponses différentes entre un modèle d'étude de surexpression au sein d'une lignée cellulaire immortalisée et un modèle d'étude physiologique avec une expression endogène de TRPV1mito. L'interprétation de nos données nous conduit à penser – si l'on tient compte que les mitochondries d'une cellule fonctionnent avec un optimum de 50°C – que dans une situation où la cellule est sollicitée, l'augmentation de la température mitochondriale au-delà de 43°C active le canal TRPV1mito pour faciliter la sortie de Ca^{2+} et, d'une certaine manière, « refroidir » la mitochondrie. Cette hypothèse reste à vérifier, notamment dans un système physiologique cellulaire. La caractérisation précise des flux calciques induite par l'activation de TRPV1mito reste donc à préciser.

7.6. TRPV1mito et la fonction mitochondriale

7.6.1. Rappel des résultats

Pour comprendre l'influence de TRPV1mito sur la respiration mitochondriale, des mesures d'oxygraphies sur cellules intactes ont été réalisées sur des cellules HEK293 transfectées avec TRPV1pm ou TRPV1mito, en présence ou absence de RTX pour activer TRPV1. A l'état basal, seule la respiration phosphorylante des cellules HEK293 exprimant TRPV1pm est augmentée. De plus, l'activation de TRPV1pm ou TRPV1mito lors de l'injection de RTX à 0,1 μM ou 1 μM ne provoque aucune modification de la respiration mitochondriale. En revanche, les cellules transfectées avec TRPV1mito et TRPV1pm présentent une augmentation du ratio de la fuite de protons par rapport à la capacité maximum de la chaîne respiratoire (ratio O/F).

Ensuite, les oxygraphies sur cellules perméabilisées exprimant TRPV1mito ont montré qu'aucun paramètre de la chaîne respiratoire hormis la fuite de protons (O) n'est augmenté. Enfin, une expérience préliminaire de mesure du potentiel de membrane mitochondrial (Ψm) des cellules exprimant TRPV1mitoGFP présentent un Ψm plus faible que les cellules contrôlent.

7.6.2. Oxygraphie sur cellules intactes

Sur cellules intactes, l'expression de TRPV1pm induit une augmentation de la respiration phosphorylante à l'état basal. Au regard des résultats décrits précédemment, l'impact de l'expression de TRPV1pm sur l'homéostasie calcique cellulaire explique l'augmentation de la respiration mitochondriale des cellules transfectées avec TRPV1pm. En effet, l'expression de TRPV1pm perturbe l'homéostasie calcique cellulaire et entraîne une augmentation généralisée du Ca^{2+} dans le cytoplasme et dans la mitochondrie à l'état basal. Afin de rétablir son homéostasie calcique, l'activité des Ca^{2+} -ATPases, comme la « Plasma Membrane Calcium ATPase » (PMCA) ou la SERCA, permettent de compenser l'influx de Ca^{2+} dans le cytoplasme, et de générer une sortie de Ca^{2+} vers le milieu extracellulaire, ou une entrée de Ca^{2+} dans le RE grâce à l'hydrolyse de l'ATP (Brini et al. 2012). De fait, l'augmentation du Ca^{2+} dans le cytoplasme et la mitochondrie entraînerait une augmentation de la respiration phosphorylante mitochondriale par une activation Ca^{2+} -dépendante du métabolisme (Figure 43A), et une augmentation de la production d'ATP permettant de soutenir le fonctionnement des Ca^{2+} -ATPases (Figure 43A).

L'expression de TRPV1mito, en revanche, n'induit qu'une augmentation du ratio O/F, qui traduit une

augmentation de la fuite de protons (O) ou une diminution de la capacité de respiration maximale (F_{max}), malgré le fait qu'aucun de ces deux paramètres seuls n'est modifié par la surexpression de TRPV1mito. Étonnement, la surexpression et/ou l'activation de TRPV1mito n'induit donc pas de modification majeure de la respiration mitochondriale, ce qui pourrait s'expliquer par la technique utilisée. En effet, l'oxygraphie sur cellules intactes permet de quantifier la consommation d' O_2 par des cellules qui régulent leur métabolisme, mais ne permet donc pas de contrôler le métabolisme cellulaire pour forcer l'utilisation de la respiration mitochondriale. En conséquence, nous avons envisagé de travailler sur cellules perméabilisées.

7.6.3. Oxygraphie sur cellules perméabilisées

La technique d'oxygraphie sur cellules perméabilisées a été utilisée pour caractériser l'influence de TRPV1mito sur la respiration mitochondriale, car elle permet de contrôler l'apport en substrat des mitochondries. Cette technique n'a pas été réalisée sur les cellules transfectées avec TRPV1pm à cause de la perméabilisation de la membrane plasmique. L'expression de TRPV1mito entraîne une augmentation de la consommation d' O_2 après l'inhibition de l'ATP-synthase avec l'oligomycine (état IV O), suggérant une augmentation de la fuite de protons. Néanmoins, une augmentation de la fuite de protons liée à une augmentation de la respiration à l'état IV devrait réduire le ratio de contrôle respiratoire (EIII SR/EIV), qui reflète le couplage de la chaîne respiratoire. Or, la diminution du ratio EIII SR/EIV n'est pas significative. Donc, l'hypothèse de l'implication de TRPV1mito dans l'augmentation de la fuite de protons reste cohérente avec sa fonction. Si TRPV1mito est localisé au niveau de l'IMM, son activité pourrait constituer une voie d'entrée des protons H^+ vers la matrice mitochondriale et alimenter cette fuite (Figure 43B). En effet, TRPV1 est majoritairement perméable aux ions Ca^{2+} et dans une moindre mesure, aux protons H^+ (Hellwig et al. 2004). Alternativement, l'augmentation de la fuite de protons induit par la surexpression de TRPV1mito pourrait également provenir de processus indirects, liés à une dérégulation de l'homéostasie calcique mitochondriale, comme par exemple par l'échangeur mitochondrial H^+/Ca^{2+} (LETM1), qui dissipe le gradient de protons afin de générer une sortie de Ca^{2+} de la matrice mitochondriale (Figure 43B). L'augmentation de la fuite de protons pourrait aussi être induite par l'échangeur mitochondrial Na^+/H^+ (NHE) dont l'activité est couplée à l'échangeur NCLX qui importe du Na^+ dans la matrice mitochondriale afin d'extraire le Ca^{2+} de celle-ci.

Enfin, l'expression de TRPV1mito en absence d'activation extrinsèque ne semble pas affecter d'autres paramètres de la respiration mitochondriale, Cependant, ces résultats ont été obtenus dans un environnement dépourvu de Ca^{2+} , sans activation extrinsèque de TRPV1. Or la fonction de TRPV1mito repose sur l'action du Ca^{2+} . C'est pourquoi nous envisageons de reproduire ces expériences sur des cellules perméabilisées exprimant TRPV1mito dans un environnement contenant du Ca^{2+} , avec la RTX pour activer TRPV1mito, ou la 5' iodo-Résinifératoxine (5'-iRTX) pour l'inhiber.

7.6.4. Potentiel de membrane mitochondrial

Dans la continuité des résultats précédents, la surexpression de TRPV1mito induit une diminution du Ψ_m . Celle-ci pourrait effectivement être en lien avec l'augmentation de la fuite de protons observée dans les cellules exprimant TRPV1mito. Bien qu'il ne soit pas possible d'affirmer que cette diminution soit induite par l'activité canal de TRPV1, plutôt que par un effet indirect lié à la surexpression d'une protéine potentiellement localisée dans l'IMM. Ce résultat préliminaire a donc besoin d'être confirmé, notamment en inhibant TRPV1mito avec la 5'-

IRTX. Si cette inhibition maintient le Ψ_m , alors la diminution que nous avons observée par l'expression de TRPV1mito serait due à son activité de canal.

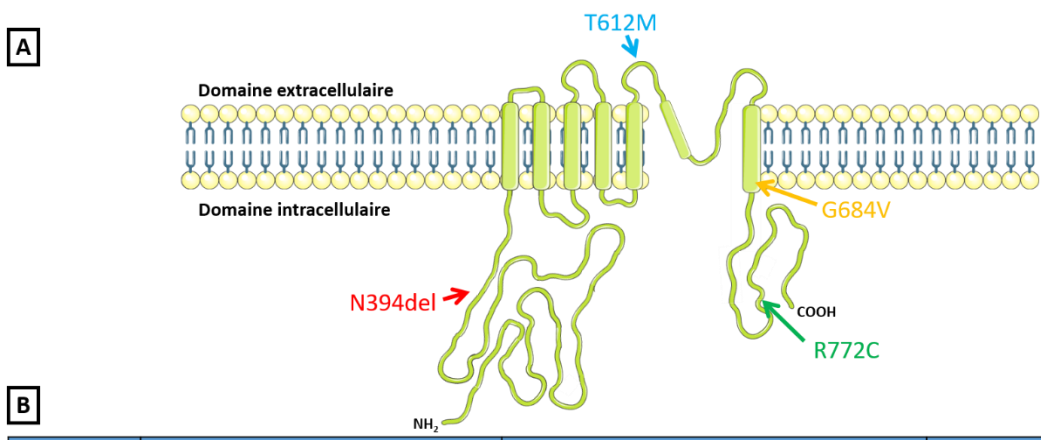
8. Questions liées à l'identification de TRPV1mito

8.1. Reconsidération de la fonction de TRPV1 au regard de sa localisation

L'identification d'une nouvelle isoforme de TRPV1 adressée spécifiquement à la mitochondrie représente une découverte importante dans le sens où elle impose de reconsidérer l'ensemble des fonctions connues du canal TRPV1 chez les mammifères. En effet, des milliers d'études ont mis en évidence l'implication de TRPV1 dans des processus physiologiques avec des interprétations mécanistiques basées sur l'expression de TRPV1 au niveau de la membrane plasmique. De fait, la localisation de TRPV1 dans des organites intracellulaires comme le RE ou la mitochondrie rend l'interprétation des fonctions de TRPV1 plus complexe. Par exemple, il a été montré que l'activation chronique de TRPV1 favoriserait la biogenèse mitochondriale *via* la voie de signalisation Ca^{2+} -CaMKII-p38 MAPK-PGC-1 α dans le muscle squelettique (Y. Xu, Zhao, et Gao 2022). Par ailleurs, une étude récente a mis en évidence que l'activation de TRPV1 prévient des lésions hépatiques associées au diabète en lien avec la fonction de la protéine OPA1 (T. Wang et al. 2022). Ces résultats suggèrent que l'activation de l'isoforme mitochondriale de TRPV1 serait requise pour la mise en œuvre de ces observations. Il devient donc nécessaire de prendre en compte les différentes localisations possibles de TRPV1, et en particulier dans les mitochondries des homéothermes, dans les futures recherches, afin de mieux comprendre les mécanismes cellulaires impliqués.

8.2. Régulation de l'activité de TRPV1mito

Pour l'instant, les régulations de l'activité de TRPV1mito ne peuvent se baser que sur les caractéristiques connues de TRPV1, lorsqu'il est exprimé à la membrane plasmique. Cependant, la mitochondrie offre un environnement cellulaire très différent de la membrane plasmique. En effet, la composition de l'IMM est très différente de la membrane plasmique, notamment par la présence d'une grande quantité de cardiolipine et autres phospholipides spécifiques. Il est donc probable que la composition de la membrane dans laquelle est enchâssé TRPV1 modifie ses propriétés thermosensibles et son activité. De plus, les processus de phosphorylation/déphosphorylation de TRPV1 ont un rôle clé dans la régulation de son activité. Par exemple, la déphosphorylation de TRPV1 par la calcineurine phosphatase dépendante du Ca^{2+} est impliquée dans la désensibilisation de TRPV1 (Bevan, Quallo, et Andersson 2014). Et inversement, la phosphorylation de TRPV1 par la protéine kinase Ca^{2+} /calmoduline-dépendante (CaMKII), la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase C (PKC) diminue sa désensibilisation (Vyklíček et al. 2008). Il devient donc légitime de questionner la régulation par phosphorylation de TRPV1mito dans la mitochondrie, en sachant que certaines de ces kinases comme la CaMKII et la Calmoduline kinases sont aussi présentes dans la matrice mitochondriale (Odagiri et al. 2009; Nguyen et al. 2018).



B

Mutations	Domaine protéique touché	Effets associés	Phénotype
N394del	N-terminal	Insensible à la capsaïcine Réponse transitoire rapide à l'isoflurane	Patient asymptomatique mais classé HMSH
T612M	Pore du canal	Insensible à la capsaïcine Réponse transitoire rapide à l'isoflurane	Hyperthermie Maligne per anesthésique
G684V	<u>Segment TM 6 (formation pore):</u> - Ouverture/fermeture canal - Sélectivité ionique	Insensible à la capsaïcine Perte de fonction ?	Coup de chaleur d'exercice
R772C	<u>C-ter (Liaison avec Calmoduline):</u> - Désensibilisation	Modification de la cinétique de flux de calcium	Coup de chaleur d'exercice

Figure 44 : Canalopathies liées à TRPV1
 (A) Schéma de l'emplacement des mutations de TRPV1 identifiées dans l'hyperthermie maligne (N394del et T612M) et le coup de chaleur d'exercice (R772C et G684V). (B) Tableau informatif à propos des mutants de TRPV1 identifiés dans l'hyperthermie maligne et le coup de chaleur d'exercice.

8.3. Implications physiopathologiques potentielles

Enfin, des mutations du gène de *TRPV1* ont été identifiées comme prédisposant à l'hyperthermie maligne per anesthésique et au coup de chaleur à l'exercice (Abeele et al. 2018; Bosson et al. 2020) (Figure 44). Ces mutations affectent différents domaines de TRPV1, présents dans TRPV1mito, et 3 d'entre elles semblent provoquer une perte de fonction de TRPV1. Ces observations cliniques et moléculaires sont cohérentes avec une implication de TRPV1mito dans la régulation de la température mitochondriale et une dérégulation de ce mécanisme potentiellement responsable du déclenchement des symptômes liés à une dérégulation de la thermogénèse et une hyperthermie. C'est pourquoi, dans la suite du projet, il est prévu d'étudier l'impact de ces mutants sur la fonction spécifique de TRPV1mito.

Conclusion et perspectives

Le travail de cette thèse a permis de mettre en évidence l'existence d'une isoforme mitochondriale de TRPV1 chez l'homme, nommée TRPV1mito. Les premières analyses bio-informatiques ont prédit l'existence d'une MTS dans TRPV1 chez tous les autres organismes homéothermes placentaires, mais il demeure nécessaire d'identifier les mécanismes moléculaires permettant d'exprimer TRPV1mito au sein de ce règne. L'existence de cette isoforme chez tous les mammifères placentaires représente un intérêt évolutif certain dans (i) la compréhension des mécanismes de thermorégulation ayant abouti à l'homéothermie et au développement embryonnaire, et (ii) pour identifier les avantages évolutifs correspondants. L'identification moléculaire de TRPV1mito chez tous les autres mammifères revêt de fait une importance capitale, pour générer des modèles animaux exprimant ou non les différentes isoformes de TRPV1, afin de pouvoir attribuer à chaque isoforme sa (ou ses) fonction(s) physiologique(s).

Ce travail a également permis une caractérisation initiale de TRPV1mito. Mais il sera indispensable de préciser la localisation et l'orientation de TRPV1 au sein des membranes mitochondriales, afin de mieux comprendre sa fonction dans l'homéostasie calcique et ses mécanismes de régulation au sein de la mitochondrie. Dans ce sens, il est indispensable de disposer d'anticorps spécifiques permettant de reconnaître l'isoforme TRPV1mito.

Nos résultats ont également permis de mettre en évidence l'implication de TRPV1mito dans des flux calciques notamment au niveau de la mitochondrie, mais nécessitent d'autres expériences afin de compléter nos connaissances sur l'origine et les types de flux calciques générés par l'activation de TRPV1mito. Ils devront aussi être corrélés avec des modifications de la respiration mitochondriale, qui est un paramètre clé pour adapter la thermogénèse mitochondriale. La suite consistera à compléter l'ensemble des paramètres précédents avec une mesure de la température mitochondriale dans des situations où TRPV1mito sera présent ou non, et ceci grâce à l'usage des sondes fluorescentes thermosensibles. L'ensemble de ces résultats présents et à venir confirmeront ou non notre hypothèse initiale considérant TRPV1mito comme le thermostat mitochondrial des mammifères.

Enfin dans une perspective clinique, il sera indispensable d'étudier l'impact des mutations de TRPV1 identifiées dans l'hyperthermie maligne et le coup de chaleur d'exercice sur les fonctions et régulations de l'isoforme TRPV1mito, afin d'ouvrir des perspectives de réponses thérapeutiques aiguës pour la prise en charge des patients présentant ces symptômes très sévères.

Bibliographie

- Abeele, Fabien Vanden, Sabine Lotteau, Sylvie Ducreux, Charlotte Dubois, Nicole Monnier, Amy Hanna, Dimitra Gkika, et al. 2018. « TRPV1 Variants Impair Intracellular Ca²⁺ Signaling and May Confer Susceptibility to Malignant Hyperthermia ». *Genetics in Medicine*, juin. <https://doi.org/10.1038/s41436-018-0066-9>.
- Adams, Volker, Waltraud Bosch, Jörg Schlegel, Theo Wallimann, et Dieter Brdiczka. 1989. « Further Characterization of Contact Sites from Mitochondria of Different Tissues: Topology of Peripheral Kinases ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 981 (2): 213-25. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(89\)90031-X](https://doi.org/10.1016/0005-2736(89)90031-X).
- Agarwala, M. K., R. George, R. Pramanik, et J. A. McGrath. 2016. « Olmsted Syndrome in an Indian Male with a New de Novo Mutation in TRPV3 ». *The British Journal of Dermatology* 174 (1): 209-11. <https://doi.org/10.1111/bjd.13910>.
- Aguettaz, Elizabeth, Patrick Bois, Christian Cognard, et Stéphane Sebillé. 2017. « Stretch-Activated TRPV2 Channels: Role in Mediating Cardiopathies ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology, Cardiac Mechanics and Electrics: it takes two to tango*, 130 (novembre): 273-80. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2017.05.007>.
- Ahern, Gerard P., Ian M. Brooks, Rosa Linda Miyares, et Xiang-bin Wang. 2005. « Extracellular Cations Sensitize and Gate Capsaicin Receptor TRPV1 Modulating Pain Signaling ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (21): 5109-16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0237-05.2005>.
- Ahern, Gerard P., et Louis S. Premkumar. 2002. « Voltage-Dependent Priming of Rat Vanilloid Receptor: Effects of Agonist and Protein Kinase C Activation ». *The Journal of Physiology* 545 (2): 441-51. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.029561>.
- Ahluwalia, J., Mohammed Yaqoob, Laszlo Urban, Stuart Bevan, et Istvan Nagy. 2003. « Activation of Capsaicin-Sensitive Primary Sensory Neurones Induces Anandamide Production and Release ». *Journal of Neurochemistry* 84 (3): 585-91. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.01550.x>.
- Ahn, Seyoung, Jungyun Park, Inkyung An, Sung Jun Jung, et Jungwook Hwang. 2014. « Transient Receptor Potential Cation Channel V1 (TRPV1) Is Degraded by Starvation- and Glucocorticoid-Mediated Autophagy ». *Molecules and Cells* 37 (3): 257-63. <https://doi.org/10.14348/molcells.2014.2384>.
- Andersson, David A., Mikael Adner, Edward D. Högestätt, et Peter M. Zygmunt. 2002. « Mechanisms Underlying Tissue Selectivity of Anandamide and Other Vanilloid Receptor Agonists ». *Molecular Pharmacology* 62 (3): 705-13. <https://doi.org/10.1124/mol.62.3.705>.
- Arrigoni, Cristina, et Daniel L. Minor. 2018. « Global versus Local Mechanisms of Temperature Sensing in Ion Channels ». *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 470 (5): 733-44. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2102-z>.
- Atkins, John F., Gary Loughran, Pramod R. Bhatt, Andrew E. Firth, et Pavel V. Baranov. 2016. « Ribosomal frameshifting and transcriptional slippage: from genetic steganography and cryptography to adventitious use ». *Nucleic acids research* 44 (15): 7007-7078.
- Baboota, Ritesh K., Dharendra P. Singh, Siddhartha M. Sarma, Jaspreet Kaur, Rajat Sandhir, Ravneet K. Boparai, Kanthi K. Kondepudi, et Mahendra Bishnoi. 2014. « Capsaicin Induces "Brite" Phenotype in Differentiating 3T3-L1 Preadipocytes ». *PLoS ONE* 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103093>.
- Baez-Nieto, David, Osvaldo Alvarez, Sebastian Brauchi, Carlos Gonzalez, et Ramón Latorre. 2013. « Voltage-Dependence in Thermo-Voltage Sensitive Channel TRPV1. A Delocalized Voltage Sensor? ». *Biophysical Journal* 104 (2): 456a. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.11.2525>.
- Ban, Akihiko, Mizuki Tanaka, Ryuya Fujii, Atsushi Minami, Hideaki Oikawa, Takahiro Shintani, et Katsuya Gomi. 2018. « Subcellular localization of aphidicolin biosynthetic enzymes heterologously expressed in *Aspergillus oryzae* ». *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 82 (1): 139-47. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1399789>.
- Bandell, Michael, Gina M. Story, Sun Wook Hwang, Veena Viswanath, Samer R. Eid, Matt J. Petrus, Taryn J. Earley, et Ardem Patapoutian. 2004. « Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin ». *Neuron* 41 (6): 849-57. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(04\)00150-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(04)00150-3).
- Baskaran, P., V. Krishnan, K. Fettel, P. Gao, Z. Zhu, J. Ren, et B. Thyagarajan. 2017. « TRPV1 Activation Counters Diet-Induced Obesity through Sirtuin-1 Activation and PRDM-16 Deacetylation in Brown Adipose Tissue ». *International Journal of Obesity* 41 (5): 739-49. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.16>.
- Baskaran, Padmamalini, Vivek Krishnan, Jun Ren, et Baskaran Thyagarajan. 2016. « Capsaicin Induces Browning of White Adipose Tissue and Counters Obesity by Activating TRPV1 Channel-Dependent Mechanisms ». *British Journal of Pharmacology* 173 (15): 2369-89. <https://doi.org/10.1111/bph.13514>.

- Bassi, M. T., M. Manzoni, E. Monti, M. T. Pizzo, A. Ballabio, et G. Borsani. 2000. « Cloning of the Gene Encoding a Novel Integral Membrane Protein, Mucopolipidin and Identification of the Two Major Founder Mutations Causing Mucopolipidosis Type IV ». *American Journal of Human Genetics* 67 (5): 1110-20. [https://doi.org/10.1016/S0002-9297\(07\)62941-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9297(07)62941-3).
- Bauer, Tyler M., et Elizabeth Murphy. 2020. « Role of Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition Pore in Regulating Cell Death ». *Circulation Research* 126 (2): 280-93. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.119.316306>.
- Bavassano, Carlo, Letizia Marvaldi, Michiel Langeslag, Bettina Sarg, Herbert Lindner, Lars Klimaschewski, Michaela Kress, Antonio Ferrer-Montiel, et Hans-Günther Knaus. 2013. « Identification of voltage-gated K⁺ channel beta 2 (Kvβ2) subunit as a novel interaction partner of the pain transducer transient receptor potential vanilloid 1 channel (TRPV1) ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research* 1833 (12): 3166-3175.
- Benz, R., M. Kottke, et D. Brdiczka. 1990. « The Cationically Selective State of the Mitochondrial Outer Membrane Pore: A Study with Intact Mitochondria and Reconstituted Mitochondrial Porin ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1022 (3): 311-18. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(90\)90279-w](https://doi.org/10.1016/0005-2736(90)90279-w).
- Bernardi, Paolo, et Michael Forte. 2007. « The Mitochondrial Permeability Transition Pore ». *Novartis Foundation Symposium* 287: 157-64; discussion 164-169.
- Berridge, M. J., P. Lipp, et M. D. Bootman. 2000. « The Versatility and Universality of Calcium Signalling ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 1 (1): 11-21. <https://doi.org/10.1038/35036035>.
- Bevan, Stuart, Talisia Quallo, et David A. Andersson. 2014. « TRPV1 ». *Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels*, 207-45. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_9.
- Bhave, Gautam, Hui-Juan Hu, Kathi S. Glauner, Weiguo Zhu, Haibin Wang, D. J. Brasier, Gerry S. Oxford, et Robert W. Gereau. 2003. « Protein Kinase C Phosphorylation Sensitizes but Does Not Activate the Capsaicin Receptor Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (21): 12480-85. <https://doi.org/10.1073/pnas.2032100100>.
- Bhave, Gautam, Weiguo Zhu, Haibin Wang, D. J. Brasier, Gerry S. Oxford, et Robert W. Gereau. 2002. « CAMP-Dependent Protein Kinase Regulates Desensitization of the Capsaicin Receptor (VR1) by Direct Phosphorylation ». *Neuron* 35 (4): 721-31. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(02\)00802-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(02)00802-4).
- Bishnoi, Mahendra, Kanthi Kiran Kondepudi, Aakriti Gupta, Aniket Karmase, et Ravneet K. Boparai. 2013. « Expression of Multiple Transient Receptor Potential Channel Genes in Murine 3T3-L1 Cell Lines and Adipose Tissue ». *Pharmacological Reports* 65 (3): 751-55. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(13\)71055-7](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(13)71055-7).
- Bölcskei, Kata, Zsuzsanna Helyes, Árpád Szabó, Katalin Sándor, Krisztián Elekes, József Németh, Róbert Almási, Erika Pintér, Gábor Pethő, et János Szolcsányi. 2005. « Investigation of the role of TRPV1 receptors in acute and chronic nociceptive processes using gene-deficient mice ». *Pain* 117 (3): 368-376.
- Bosson, Caroline, John Rendu, Laurent Pelletier, Amandine Abriat, Amandine Chatagnon, Julie Brocard, Jacques Brocard, et al. 2020. « Variations in the TRPV1 Gene Are Associated to Exertional Heat Stroke ». *Journal of Science and Medicine in Sport*, mai. <https://doi.org/10.1016/j.jsams.2020.04.018>.
- Bours, M. J. L., E. L. R. Swennen, F. Di Virgilio, B. N. Cronstein, et P. C. Dagnelie. 2006. « Adenosine 5'-Triphosphate and Adenosine as Endogenous Signaling Molecules in Immunity and Inflammation ». *Pharmacology & Therapeutics* 112 (2): 358-404. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2005.04.013>.
- Brauchi, Sebastian, Gerardo Orta, Carolina Mascayano, Marcelo Salazar, Natalia Raddatz, Hector Urbina, Eduardo Rosenmann, Fernando Gonzalez-Nilo, et Ramon Latorre. 2007. « Dissection of the Components for PIP2 Activation and Thermosensation in TRP Channels ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (24): 10246-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703420104>.
- Brauchi, Sebastian, Gerardo Orta, Marcelo Salazar, Eduardo Rosenmann, et Ramon Latorre. 2006. « A Hot-Sensing Cold Receptor: C-Terminal Domain Determines Thermosensation in Transient Receptor Potential Channels ». *Journal of Neuroscience* 26 (18): 4835-40. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5080-05.2006>.
- Brini, Marisa, Tito Cali, Denis Ottolini, et Ernesto Carafoli. 2012. « Calcium Pumps: Why so Many? » *Comprehensive Physiology* 2 (2): 1045-60. <https://doi.org/10.1002/cphy.c110034>.
- Brown, Dorothy Cimino. 2016. « Resiniferatoxin: The Evolution of the "Molecular Scalpel" for Chronic Pain Relief ». *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 9 (3). <https://doi.org/10.3390/ph9030047>.
- Brown, Travis E., Anda M. Chirila, Benjamin R. Schrank, et Julie A. Kauer. 2013. « Loss of Interneuron LTD and Attenuated Pyramidal Cell LTP in Trpv1 and Trpv3 KO Mice ». *Hippocampus* 23 (8): 662-71. <https://doi.org/10.1002/hipo.22125>.
- Brożyna, Anna A., Huazhang Guo, Sun-Eun Yang, Lynn Cornelius, Gerald Linette, Michael Murphy, Christine Sheehan, Jeffrey Ross, Andrzej Slominski, et J. Andrew Carlson. 2017. « TRPM1 (Melastatin) Expression

- Is an Independent Predictor of Overall Survival in Clinical AJCC Stage I and II Melanoma Patients ». *Journal of Cutaneous Pathology* 44 (4): 328-37. <https://doi.org/10.1111/cup.12872>.
- Buffenstein, Rochelle. 2005. « The Naked Mole-Rat: A New Long-Living Model for Human Aging Research ». *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medical Sciences* 60 (11): 1369-77. <https://doi.org/10.1093/gerona/60.11.1369>.
- Calcraft, Peter J., Abdelilah Arredouani, Margarida Ruas, Zui Pan, Xiaotong Cheng, Xuemei Hao, Jisen Tang, et al. 2009. « NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels ». *Nature* 459 (7246): 596-600. <https://doi.org/10.1038/nature08030>.
- Camprubí-Robles, M., R. Planells-Cases, et A. Ferrer-Montiel. 2009. « Differential contribution of SNARE-dependent exocytosis to inflammatory potentiation of TRPV1 in nociceptors ». *The FASEB Journal* 23 (11): 3722-33. <https://doi.org/10.1096/fj.09-134346>.
- Cao, Erhu, Julio F. Cordero-Morales, Beiyong Liu, Feng Qin, et David Julius. 2013. « TRPV1 Channels Are Intrinsically Heat Sensitive and Negatively Regulated by Phosphoinositide Lipids ». *Neuron* 77 (4): 667-79. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.12.016>.
- Cao, Erhu, Maofu Liao, Yifan Cheng, et David Julius. 2013. « TRPV1 Structures in Distinct Conformations Reveal Activation Mechanisms ». *Nature* 504 (7478): 113-18. <https://doi.org/10.1038/nature12823>.
- Capera, Jesusa, María Navarro-Pérez, Anne Stine Moen, Ildiko Szabó, et Antonio Felipe. 2022. « The Mitochondrial Routing of the Kv1.3 Channel ». *Frontiers in Oncology* 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2022.865686>.
- Castro, Joel, Edoardo C. Aromataris, Grigori Y. Rychkov, et Greg J. Barritt. 2009. « A Small Component of the Endoplasmic Reticulum Is Required for Store-Operated Ca²⁺ Channel Activation in Liver Cells: Evidence from Studies Using TRPV1 and Taurodeoxycholic Acid ». *Biochemical Journal* 418 (3): 553-66. <https://doi.org/10.1042/BJ20081052>.
- Caterina, M. J., T. A. Rosen, M. Tominaga, A. J. Brake, et D. Julius. 1999. « A Capsaicin-Receptor Homologue with a High Threshold for Noxious Heat ». *Nature* 398 (6726): 436-41. <https://doi.org/10.1038/18906>.
- Caterina, Michael J., A. Leffler, Annika B. Malmberg, W. J. Martin, J. Trafton, K. R. Petersen-Zeitz, M. Koltzenburg, A. I. Basbaum, et D. Julius. 2000. « Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor ». *science* 288 (5464): 306-313.
- Caterina, Michael J., Mark A. Schumacher, Makoto Tominaga, Tobias A. Rosen, Jon D. Levine, et David Julius. 1997. « The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway ». *Nature* 389 (6653): 816.
- Cavanaugh, Daniel J., Alexander T. Chesler, Alexander C. Jackson, Yaron M. Sigal, Hiroki Yamanaka, Rebecca Grant, Dajan O'Donnell, et al. 2011. « Trpv1 Reporter Mice Reveal Highly Restricted Brain Distribution and Functional Expression in Arteriolar Smooth Muscle Cells ». *Journal of Neuroscience* 31 (13): 5067-77. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6451-10.2011>.
- Cesare, Paolo, Lodewijk V. Dekker, Alessandro Sardini, Peter J. Parker, et Peter A. McNaughton. 1999. « Specific Involvement of PKC-ε in Sensitization of the Neuronal Response to Painful Heat ». *Neuron* 23 (3): 617-24. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80813-2](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80813-2).
- Chacinska, Agnieszka, Carla M. Koehler, Dusanka Milenkovic, Trevor Lithgow, et Nikolaus Pfanner. 2009. « Importing Mitochondrial Proteins: Machineries and Mechanisms ». *Cell* 138 (4): 628-44. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.08.005>.
- Chávez, Andrés E., Chiayu Q. Chiu, et Pablo E. Castillo. 2010. « TRPV1 activation by endogenous anandamide triggers postsynaptic LTD in dentate gyrus ». *Nature neuroscience* 13 (12): 1511-18. <https://doi.org/10.1038/nn.2684>.
- Cheng, Kwong Tai, Hwei Ling Ong, Xibao Liu, et Indu S. Ambudkar. 2013. « Chapter Seven - Contribution and Regulation of TRPC Channels in Store-Operated Ca²⁺ Entry ». In *Current Topics in Membranes*, édité par Murali Prakriya, 71:149-79. Store-Operated Calcium Channels. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407870-3.00007-X>.
- Cheng, Wei, Fan Yang, Christina L. Takanishi, et Jie Zheng. 2007. « Thermosensitive TRPV Channel Subunits Coassemble into Heteromeric Channels with Intermediate Conductance and Gating Properties ». *Journal of General Physiology* 129 (3): 191-207. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709731>.
- Chrétien, Dominique, Paule Benit, Hyung-Ho Ha, Susanne Keipert, Riyad El-Khoury, Young-Tae Chang, Martin Jastroch, Howard T. Jacobs, Pierre Rustin, et Malgorzata Rak. 2018. « Mitochondria are physiologically maintained at close to 50 C ». *PLoS biology* 16 (1): e2003992.
- Christie, Stewart, Gary A. Wittert, Hui Li, et Amanda J. Page. 2018. « Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis ». *Frontiers in Endocrinology* 9 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00420>.
- Chu, Constance J., Susan M. Huang, Luciano De Petrocellis, Tiziana Bisogno, Scott A. Ewing, Jeffrey D. Miller, Robert E. Zipkin, et al. 2003. « N-Oleoyldopamine, a Novel Endogenous Capsaicin-like Lipid That

- Produces Hyperalgesia ». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (16): 13633-39. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211231200>.
- Chuang, Huai-hu, Elizabeth D. Prescott, Haeyoung Kong, Shannon Shields, Sven-Eric Jordt, Allan I. Basbaum, Moses V. Chao, et David Julius. 2001. « Bradykinin and Nerve Growth Factor Release the Capsaicin Receptor from PtdIns(4,5)P₂-Mediated Inhibition ». *Nature* 411 (6840): 957-62. <https://doi.org/10.1038/35082088>.
- Chung, Man-Kyo, Ali D. Güler, et Michael J. Caterina. 2008. « TRPV1 Shows Dynamic Ionic Selectivity during Agonist Stimulation ». *Nature Neuroscience* 11 (5): 555-64. <https://doi.org/10.1038/nn.2102>.
- Clapham, David E. 2007. « Calcium Signaling ». *Cell* 131 (6): 1047-58. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.028>.
- Clapham, David E., David Julius, Craig Montell, et Günter Schultz. 2005. « International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Transient Receptor Potential Channels ». *Pharmacological Reviews* 57 (4): 427-50. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.6>.
- Claros, Manuel G., et Pierre Vincens. 1996. « Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences ». *The FEBS Journal* 241 (3): 779-786.
- Colletti, Grace A., et Kirill Kiselyov. 2011. « TRPML1 ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 704: 209-19. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_11.
- Colsoul, Barbara, Anica Schraenen, Katleen Lemaire, Roel Quintens, Leentje Van Lommel, Andrei Segal, Grzegorz Owsianik, et al. 2010. « Loss of High-Frequency Glucose-Induced Ca²⁺ Oscillations in Pancreatic Islets Correlates with Impaired Glucose Tolerance in Trpm5^{-/-} Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (11): 5208-13. <https://doi.org/10.1073/pnas.0913107107>.
- Constantin, Bruno, et Nadine Deliot. 2016. *Mesure des signaux calcique pendant la migration cellulaire. Apports de la microscopie de fluorescence confocale et de l'imagerie DIC*. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2121.0489>.
- Contreras, Laura, Paulino Gomez-Puertas, Mikio Iijima, Keiko Kobayashi, Takeyori Saheki, et Jorgina Satrustegui. 2007. « Ca²⁺ Activation Kinetics of the Two Aspartate-Glutamate Mitochondrial Carriers, Aralar and Citrin: Role in the Heart Malate-Aspartate NADH Shuttle ». *The Journal of Biological Chemistry* 282 (10): 7098-7106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610491200>.
- Cosens, D. J., et A. Manning. 1969. « Abnormal Electroretinogram from a Drosophila Mutant ». *Nature* 224 (5216): 285-87. <https://doi.org/10.1038/224285a0>.
- Cuajungco, Math P., Joshua Silva, Ania Habibi, et Jessica A. Valadez. 2016. « The Mucolipin-2 (TRPML2) Ion Channel: a tissue-specific protein crucial to normal cell function ». *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 468 (2): 177-92. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1732-2>.
- Curcic, Sanja, Romana Schober, Rainer Schindl, et Klaus Groschner. 2019. « TRPC-Mediated Ca²⁺ Signaling and Control of Cellular Functions ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*, SI: Calcium signalling, 94 (octobre): 28-39. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.02.001>.
- Danigo, Aurore, Laurent Magy, et Claire Demiot. 2013. « TRPV1 dans les neuropathies douloureuses - Des modèles animaux aux perspectives thérapeutiques ». *médecine/sciences* 29 (6-7): 597-606. <https://doi.org/10.1051/medsci/2013296012>.
- Dash, Ranjan K., et Daniel A. Beard. 2008. « Analysis of Cardiac Mitochondrial Na⁺-Ca²⁺ Exchanger Kinetics with a Biophysical Model of Mitochondrial Ca²⁺ Handling Suggests a 3:1 Stoichiometry ». *The Journal of Physiology* 586 (13): 3267-85. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.151977>.
- Davis, John B., Julie Gray, Martin J. Gunthorpe, Jonathan P. Hatcher, Phil T. Davey, Philip Overend, Mark H. Harries, Judi Latcham, Colin Clapham, et Kirsty Atkinson. 2000. « Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia ». *Nature* 405 (6783): 183.
- De Marchi, Elena, Massimo Bonora, Carlotta Giorgi, et Paolo Pinton. 2014. « The Mitochondrial Permeability Transition Pore Is a Dispensable Element for Mitochondrial Calcium Efflux ». *Cell Calcium* 56 (1): 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.03.004>.
- De Marchi, Umberto, Jaime Santo-Domingo, Cyril Castelbou, Israel Sekler, Andreas Wiederkehr, et Nicolas Demaurex. 2014. « NCLX Protein, but Not LETM1, Mediates Mitochondrial Ca²⁺ Extrusion, Thereby Limiting Ca²⁺-Induced NAD(P)H Production and Modulating Matrix Redox State ». *The Journal of Biological Chemistry* 289 (29): 20377-85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.540898>.
- De Petrocellis, Luciano, et Vincenzo Di Marzo. 2009. « Role of Endocannabinoids and Endovanilloids in Ca²⁺ Signalling ». *Cell Calcium, Lipids in Ca²⁺ Signalling*, 45 (6): 611-24. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.03.003>.
- De Stefani, Diego, Anna Raffaello, Enrico Teardo, Ildikò Szabò, et Rosario Rizzuto. 2011. « A Forty-Kilodalton Protein of the Inner Membrane Is the Mitochondrial Calcium Uniporter ». *Nature* 476 (7360): 336-40. <https://doi.org/10.1038/nature10230>.

- De Vos, Kurt J., Gábor M. Mórotz, Radu Stoica, Elizabeth L. Tudor, Kwok-Fai Lau, Steven Ackerley, Alice Warley, Christopher E. Shaw, et Christopher C. J. Miller. 2012. « VAPB Interacts with the Mitochondrial Protein PTPIP51 to Regulate Calcium Homeostasis ». *Human Molecular Genetics* 21 (6): 1299-1311. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr559>.
- Delettre, Cécile, Guy Lenaers, Jean-Michel Griffoin, Nadine Gigarel, Corinne Lorenzo, Pascale Belenguer, Laetitia Pelloquin, et al. 2000. « Nuclear Gene OPA1 , Encoding a Mitochondrial Dynamin-Related Protein, Is Mutated in Dominant Optic Atrophy ». *Nature Genetics* 26 (2): 207-10. <https://doi.org/10.1038/79936>.
- Denton, R M, P J Randle, et B R Martin. 1972. « Stimulation by calcium ions of pyruvate dehydrogenase phosphate phosphatase. » *Biochemical Journal* 128 (1): 161-63.
- Dietrich, Alexander, Meike Fahlbusch, et Thomas Gudermann. 2014. « Classical Transient Receptor Potential 1 (TRPC1): Channel or Channel Regulator? » *Cells* 3 (4): 939-62. <https://doi.org/10.3390/cells3040939>.
- Dimke, Henrik, Joost G. J. Hoenderop, et René J. M. Bindels. 2011. « Molecular Basis of Epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ Transport: Insights from the TRP Channel Family ». *The Journal of Physiology* 589 (Pt 7): 1535-42. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.199869>.
- Dinman, Jonathan D. 2012. « Mechanisms and Implications of Programmed Translational Frameshifting ». *WIREs RNA* 3 (5): 661-73. <https://doi.org/10.1002/wrna.1126>.
- Doonan, Patrick J., Harish C. Chandramoorthy, Nicholas E. Hoffman, Xueqian Zhang, César Cárdenas, Santhanam Shanmughapriya, Sudarsan Rajan, et al. 2014. « LETM1-Dependent Mitochondrial Ca²⁺ Flux Modulates Cellular Bioenergetics and Proliferation ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28 (11): 4936-49. <https://doi.org/10.1096/fj.14-256453>.
- Edwards, Jeffrey G. 2014. « TRPV1 in the central nervous system: synaptic plasticity, function, and pharmacological implications ». In *Capsaicin as a therapeutic molecule*, 77-104. Springer.
- Egan, Terrance M., et Baljit S. Khakh. 2004. « Contribution of Calcium Ions to P2X Channel Responses ». *Journal of Neuroscience* 24 (13): 3413-20. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5429-03.2004>.
- Eigenbrod, Ole, Karlien Y. Debus, Jane Reznick, Nigel C. Bennett, Oscar Sánchez-Carranza, Damir Omerbašić, Daniel W. Hart, et al. 2019. « Rapid Molecular Evolution of Pain Insensitivity in Multiple African Rodents ». *Science* 364 (6443): 852-59. <https://doi.org/10.1126/science.aau0236>.
- Eilers, Helge, Sook-Young Lee, Cathy W. Hau, Anna Logvinova, et Mark A. Schumacher. 2007. « The rat vanilloid receptor splice variant VR. 5' sv blocks TRPV1 activation ». *Neuroreport* 18 (10): 969-973.
- Elrod, John W., Renee Wong, Shikha Mishra, Ronald J. Vagnozzi, Bhuvana Sakthivel, Sanjeewa A. Goonasekera, Jason Karch, et al. 2010. « Cyclophilin D Controls Mitochondrial Pore-Dependent Ca(2+) Exchange, Metabolic Flexibility, and Propensity for Heart Failure in Mice ». *The Journal of Clinical Investigation* 120 (10): 3680-87. <https://doi.org/10.1172/JCI43171>.
- Erler, Isabell, Dalia MM Al-Ansary, Ulrich Wissenbach, Thomas FJ Wagner, Veit Flockerzi, et Barbara A. Niemeyer. 2006. « Trafficking and assembly of the cold-sensitive TRPM8 channel ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (50): 38396-38404.
- Everaerts, Wouter, Bernd Nilius, et Grzegorz Owsianik. 2010. « The Vanilloid Transient Receptor Potential Channel TRPV4: From Structure to Disease ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Ion channels: Growing evidence for the role in disease, 103 (1): 2-17. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2009.10.002>.
- Feng, Shengjie, Hongyu Li, Yilin Tai, Junbo Huang, Yujuan Su, Joel Abramowitz, Michael X. Zhu, Lutz Birnbaumer, et Yizheng Wang. 2013. « Canonical Transient Receptor Potential 3 Channels Regulate Mitochondrial Calcium Uptake ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (27): 11011-16. <https://doi.org/10.1073/pnas.1309531110>.
- Fernandes, Es, Ma Fernandes, et Je Keeble. 2012. « The Functions of TRPA1 and TRPV1: Moving Away from Sensory Nerves TRPA1 and TRPV1: Moving Away from Sensory Nerves ». *British Journal of Pharmacology* 166 (2): 510-21. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01851.x>.
- Ferrandiz-Huertas, Clotilde, Sakthikumar Mathivanan, Christoph Jakob Wolf, Isabel Devesa, et Antonio Ferrer-Montiel. 2014. « Trafficking of ThermoTRP Channels ». *Membranes* 4 (3): 525-64. <https://doi.org/10.3390/membranes4030525>.
- Flores, Emma N., et Jaime García-Añoveros. 2011. « TRPML2 and the Evolution of Mucopolipins ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 704: 221-28. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_12.
- Fonfria, Elena, Paul R. Murdock, Fiona S. Cusdin, Christopher D. Benham, Rosemary E. Kelsell, et Shaun McNulty. 2006. « Tissue Distribution Profiles of the Human TRPM Cation Channel Family ». *Journal of Receptor and Signal Transduction Research* 26 (3): 159-78. <https://doi.org/10.1080/10799890600637506>.
- Foskett, J. Kevin, et Benjamin Philipson. 2015. « The Mitochondrial Ca(2+) Uniporter Complex ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 78 (janvier): 3-8. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.11.015>.
- Frias, Bárbara, et Adalberto Merighi. 2016. « Capsaicin, nociception and pain ». *Molecules* 21 (6): 797.

- Fujiwara, Yuichiro, et Daniel L. Minor. 2008. « X-Ray Crystal Structure of a TRPM Assembly Domain Reveals an Antiparallel Four-Stranded Coiled-Coil ». *Journal of Molecular Biology* 383 (4): 854-70. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.08.059>.
- Gallego-Sandín, Sonia, Arancha Rodríguez-García, María Teresa Alonso, et Javier García-Sancho. 2009. « The endoplasmic reticulum of dorsal root ganglion neurons contains functional TRPV1 channels ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (47): 32591–32601.
- Garami, Andras, Eszter Pakai, Heath A. McDonald, Regina M. Reilly, Arthur Gomtsyan, Joshua J. Corrigan, Erika Pinter, Dawn XD Zhu, Sonya G. Lehto, et Narender R. Gavva. 2018. « TRPV1 antagonists that cause hypothermia, instead of hyperthermia, in rodents: compounds' pharmacological profiles, in-vivo targets, thermoeffectors recruited, and implications for drug development ». *Acta Physiologica*.
- Garcia-Elias, Anna, Sanela Mrkonjić, Carole Jung, Carlos Pardo-Pastor, Rubén Vicente, et Miguel A. Valverde. 2014. « The TRPV4 Channel ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 293-319. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_12.
- Gavva, Narender R. 2008. « Body-Temperature Maintenance as the Predominant Function of the Vanilloid Receptor TRPV1 ». *Trends in Pharmacological Sciences* 29 (11): 550-57. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2008.08.003>.
- Geron, Matan, Adina Hazan, et Avi Priel. 2017. « Animal Toxins Providing Insights into TRPV1 Activation Mechanism ». *Toxins* 9 (10). <https://doi.org/10.3390/toxins9100326>.
- Giacomello, Marta, Ilaria Drago, Mario Bortolozzi, Michele Scorzeto, Alessio Gianelle, Paola Pizzo, et Tullio Pozzan. 2010. « Ca²⁺ Hot Spots on the Mitochondrial Surface Are Generated by Ca²⁺ Mobilization from Stores, but Not by Activation of Store-Operated Ca²⁺ Channels ». *Molecular Cell* 38 (2): 280-90. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.04.003>.
- Giamarchi, Aurélie, Françoise Padilla, Bertrand Coste, Matthieu Raoux, Marcel Crest, Eric Honoré, et Patrick Delmas. 2006. « The Versatile Nature of the Calcium-Permeable Cation Channel TRPP2 ». *EMBO Reports* 7 (8): 787-93. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400745>.
- Gibson, Helen E., Jeffrey G. Edwards, Rachel S. Page, Matthew J. Van Hook, et Julie A. Kauer. 2008. « TRPV1 channels mediate long-term depression at synapses on hippocampal interneurons ». *Neuron* 57 (5): 746–759.
- Giorgi, Carlotta, Chiara Agnoletto, Angela Bononi, Massimo Bonora, Elena De Marchi, Saverio Marchi, Sonia Missiroli, Simone Patergnani, Federica Poletti, et Alessandro Rimessi. 2012. « Mitochondrial calcium homeostasis as potential target for mitochondrial medicine ». *Mitochondrion* 12 (1): 77–85.
- Giorgi, Carlotta, Saverio Marchi, et Paolo Pinton. 2018. « The Machineries, Regulation and Cellular Functions of Mitochondrial Calcium ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 19 (11): 713-30. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>.
- Glancy, Brian, et Robert S. Balaban. 2012. « Role of Mitochondrial Ca²⁺ in the Regulation of Cellular Energetics ». *Biochemistry* 51 (14): 2959-73. <https://doi.org/10.1021/bi2018909>.
- Gouin, Olivier, Killian L'Herondelle, Nicolas Lebonvallet, Christelle Le Gall-Ianotto, Mehdi Sakka, Virginie Buhé, Emmanuelle Plée-Gautier, et al. 2017. « TRPV1 and TRPA1 in cutaneous neurogenic and chronic inflammation: pro-inflammatory response induced by their activation and their sensitization ». *Protein & Cell* 8 (9): 644-61. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0395-5>.
- Grace, M. S., S. J. Bonvini, M. G. Belvisi, et P. McIntyre. 2017. « Modulation of the TRPV4 Ion Channel as a Therapeutic Target for Disease. » 22, février. <https://dx.doi.org/10.1016/j.pharmthera.2017.02.019>.
- Grandl, Jörg, Sung Eun Kim, Valerie Uzzell, Badry Bursulaya, Matt Petrus, Michael Bandell, et Ardem Patapoutian. 2010. « Temperature-Induced Opening of TRPV1 Ion Channel Is Stabilized by the Pore Domain ». *Nature Neuroscience* 13 (6): 708-14. <https://doi.org/10.1038/nn.2552>.
- Grant, T R, et P D Temple-Smith. 1998. « Field biology of the platypus (*Ornithorhynchus anatinus*): historical and current perspectives. » *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 353 (1372): 1081-91.
- Grevel, Alexander, et Thomas Becker. 2020. « Porins as Helpers in Mitochondrial Protein Translocation ». *Biological Chemistry* 401 (6-7): 699-708. <https://doi.org/10.1515/hsz-2019-0438>.
- Grigg, Gordon C., Lyn A. Beard, et Michael L. Augee. 2004. « The Evolution of Endothermy and Its Diversity in Mammals and Birds ». *Physiological and Biochemical Zoology: PBZ* 77 (6): 982-97. <https://doi.org/10.1086/425188>.
- Grimm, Christian, Maria Barthmes, et Christian Wahl-Schott. 2014. « TRPML3 ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 659-74. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_26.
- Güler, Ali Deniz, Hyosang Lee, Tohko Iida, Isao Shimizu, Makoto Tominaga, et Michael Caterina. 2002. « Heat-Evoked Activation of the Ion Channel, TRPV4 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 22 (15): 6408-14. <https://doi.org/20026679>.

- Gunter, K. K., M. J. Zuscik, et T. E. Gunter. 1991. « The Na(+)-Independent Ca²⁺ Efflux Mechanism of Liver Mitochondria Is Not a Passive Ca²⁺/2H⁺ Exchanger ». *The Journal of Biological Chemistry* 266 (32): 21640-48.
- Guo, A., L. Vulchanova, J. Wang, X. Li, et R. Elde. 1999. « Immunocytochemical Localization of the Vanilloid Receptor 1 (VR1): Relationship to Neuropeptides, the P2X3 Purinoceptor and IB4 Binding Sites ». *European Journal of Neuroscience* 11 (3): 946-58. <https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00503.x>.
- Guo, Yang-Yang, Shaoyan Hao, Meng Zhang, Xueying Zhang, et Dehua Wang. 2020. « Aquaporins, Evaporative Water Loss and Thermoregulation in Heat-Acclimated Mongolian Gerbils (*Meriones Unguiculatus*) ». *Journal of Thermal Biology* 91 (juillet): 102641. <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2020.102641>.
- Hardie, Roger C., et Baruch Minke. 1992. « The Trp Gene Is Essential for a Light-Activated Ca²⁺ Channel in *Drosophila* Photoreceptors ». *Neuron* 8 (4): 643-51. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90086-S](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90086-S).
- Harris, D. A., et A. M. Das. 1991. « Control of Mitochondrial ATP Synthesis in the Heart ». *The Biochemical Journal* 280 (Pt 3) (décembre): 561-73. <https://doi.org/10.1042/bj2800561>.
- Hashimoto, Ayako, et Taiho Kambe. 2015. « Mg, Zn and Cu Transport Proteins: A Brief Overview from Physiological and Molecular Perspectives ». *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 61 Suppl: S116-118. <https://doi.org/10.3177/jnsv.61.S116>.
- Heijne, G von. 1986. « Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. » *The EMBO Journal* 5 (6): 1335-42.
- Held, Katharina, Thomas Voets, et Joris Vriens. 2015. « TRPM3 in Temperature Sensing and Beyond ». *Temperature (Austin, Tex.)* 2 (2): 201-13. <https://doi.org/10.4161/23328940.2014.988524>.
- Helliwell, Rachel J. A, Linda M McLatchie, Melanie Clarke, Janet Winter, Stuart Bevan, et Peter McIntyre. 1998. « Capsaicin Sensitivity Is Associated with the Expression of the Vanilloid (Capsaicin) Receptor (VR1) mRNA in Adult Rat Sensory Ganglia ». *Neuroscience Letters* 250 (3): 177-80. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00475-3](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00475-3).
- Hellwig, Nicole, Nadine Albrecht, Christian Harteneck, Günter Schultz, et Michael Schaefer. 2005. « Homo- and Heteromeric Assembly of TRPV Channel Subunits ». *Journal of Cell Science* 118 (5): 917-28. <https://doi.org/10.1242/jcs.01675>.
- Hellwig, Nicole, Tim D. Plant, Wiebke Janson, Michael Schäfer, Günter Schultz, et Michael Schaefer. 2004. « TRPV1 Acts as Proton Channel to Induce Acidification in Nociceptive Neurons* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (33): 34553-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402966200>.
- Hirabayashi, Yusuke, Seok-Kyu Kwon, Hunki Paek, Wolfgang M. Pernice, Maëla A. Paul, Jinhoo Lee, Parsa Erfani, et al. 2017. « ER-Mitochondria Tethering by PDZD8 Regulates Ca²⁺ Dynamics in Mammalian Neurons ». *Science (New York, N.Y.)* 358 (6363): 623-30. <https://doi.org/10.1126/science.aan6009>.
- Ho, Karen W., Nicholas J. Ward, et David J. Calkins. 2012. « TRPV1: a stress response protein in the central nervous system ». *American journal of neurodegenerative disease* 1 (1): 1.
- Hofmann, Thomas, Vladimir Chubanov, Thomas Gudermann, et Craig Montell. 2003. « TRPM5 Is a Voltage-Modulated and Ca(2+)-Activated Monovalent Selective Cation Channel ». *Current Biology: CB* 13 (13): 1153-58. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00431-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00431-7).
- Holzer, P. 2011. « Acid Sensing by Visceral Afferent Neurons ». *Acta Physiologica (Oxford, England)* 201 (1): 63-75. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.2010.02143.x>.
- Hopkins, P M. 2007. « Is there a link between malignant hyperthermia and exertional heat illness? » *British Journal of Sports Medicine* 41 (5): 283-84. <https://doi.org/10.1136/bjism.2006.032516>.
- Hsu, Chin-Lin, et Gow-Chin Yen. 2007. « Effects of capsaicin on induction of apoptosis and inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 cells ». *Journal of agricultural and food chemistry* 55 (5): 1730-1736.
- Huang, Huiya, Xiangxin Hu, Colins O. Eno, Guoping Zhao, Chi Li, et Carl White. 2013. « An Interaction between Bcl-XL and the Voltage-Dependent Anion Channel (VDAC) Promotes Mitochondrial Ca²⁺ Uptake ». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (27): 19870-81. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.448290>.
- Huang, Susan M., Xiaoxin Li, YinYin Yu, Juan Wang, et Michael J. Caterina. 2011. « TRPV3 and TRPV4 Ion Channels Are Not Major Contributors to Mouse Heat Sensation ». *Molecular Pain* 7 (mai): 37. <https://doi.org/10.1186/1744-8069-7-37>.
- Hung, Chen-Yu, et Chun-Hsiang Tan. 2018. « TRP Channels in Nociception and Pathological Pain ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1099: 13-27. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1756-9_2.
- Hwang, S. W., H. Cho, J. Kwak, S. Y. Lee, C. J. Kang, J. Jung, S. Cho, et al. 2000. « Direct Activation of Capsaicin Receptors by Products of Lipoxygenases: Endogenous Capsaicin-like Substances ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (11): 6155-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.11.6155>.
- Inoue, Kaori, Schuichi Koizumi, Shigeyoshi Fuziwara, Sumiko Denda, Kazuhide Inoue, et Mitsuhiro Denda. 2002. « Functional vanilloid receptors in cultured normal human epidermal keratinocytes ». *Biochemical and biophysical research communications* 291 (1): 124-129.

- Jakobs, Stefan. 2006. « High Resolution Imaging of Live Mitochondria ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, Mitochondrial Dynamics in Cell Life and Death, 1763 (5): 561-75. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.04.004>.
- Jancsó-Gábor, Aurelia, J. Szolcsanyi, et N. Jancso. 1970. « Stimulation and desensitization of the hypothalamic heat-sensitive structures by capsaicin in rats ». *The Journal of physiology* 208 (2): 449-459.
- Jaquemar, D., T. Schenker, et B. Trueb. 1999. « An Ankyrin-like Protein with Transmembrane Domains Is Specifically Lost after Oncogenic Transformation of Human Fibroblasts ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (11): 7325-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.11.7325>.
- Jara-Oseguera, Andres, Chanhung Bae, et Kenton J Swartz. 2016. « An external sodium ion binding site controls allosteric gating in TRPV1 channels ». *eLife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.13356>.
- Jendryke, Thomas, Michaela Prochazkova, Bradford E. Hall, Grégory C. Nordmann, Moritz Schladt, Vladimir M. Milenkovic, Ashok B. Kulkarni, et Christian H. Wetzel. 2016. « TRPV1 Function Is Modulated by Cdk5-Mediated Phosphorylation: Insights into the Molecular Mechanism of Nociception ». *Scientific Reports* 6 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1038/srep22007>.
- Johansen, K., G. Lykkeboe, R. E. Weber, et G. M. Maloiy. 1976. « Blood Respiratory Properties in the Naked Mole Rat *Heterocephalus Glaber*, a Mammal of Low Body Temperature ». *Respiration Physiology* 28 (3): 303-14. [https://doi.org/10.1016/0034-5687\(76\)90025-6](https://doi.org/10.1016/0034-5687(76)90025-6).
- Joiner, Mei-Ling A., Olha M. Koval, Jingdong Li, B. Julie He, Chantal Allamargot, Zhan Gao, Elizabeth D. Luczak, et al. 2012. « CaMKII Determines Mitochondrial Stress Responses in Heart ». *Nature* 491 (7423): 269-73. <https://doi.org/10.1038/nature11444>.
- Jordt, Sven-Eric, Diana M. Bautista, Huai-Hu Chuang, David D. McKemy, Peter M. Zygmunt, Edward D. Högestätt, Ian D. Meng, et David Julius. 2004. « Mustard Oils and Cannabinoids Excite Sensory Nerve Fibres through the TRP Channel ANKTM1 ». *Nature* 427 (6971): 260-65. <https://doi.org/10.1038/nature02282>.
- Jordt, Sven-Eric, et David Julius. 2002. « Molecular Basis for Species-Specific Sensitivity to "Hot" Chili Peppers ». *Cell* 108 (3): 421-30. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00637-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00637-2).
- Jung, Jooyoung, Jae Soo Shin, Soon-Youl Lee, Sun Wook Hwang, Jaeyeon Koo, Hawon Cho, et Uhtaek Oh. 2004. « Phosphorylation of Vanilloid Receptor 1 by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Kinase II Regulates Its Vanilloid Binding ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (8): 7048-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311448200>.
- Kang, Yilin, Laura F. Fielden, et Diana Stojanovski. 2018. « Mitochondrial Protein Transport in Health and Disease ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 76: 142-53. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2017.07.028>.
- Kanzaki, M., Y. Q. Zhang, H. Mashima, L. Li, H. Shibata, et I. Kojima. 1999. « Translocation of a Calcium-Permeable Cation Channel Induced by Insulin-like Growth Factor-I ». *Nature Cell Biology* 1 (3): 165-70. <https://doi.org/10.1038/11086>.
- Kárai, László J., James T. Russell, Michael J. Iadarola, et Zoltan Oláh. 2004. « Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (16): 16377-16387.
- Kark, Tamás, Zsolt Bagi, Erzsébet Lizanecz, Enikő T. Pásztor, Nóra Erdei, Ágnes Czikora, Zoltán Papp, István Édes, Róbert Pórszász, et Attila Tóth. 2008. « Tissue-Specific Regulation of Microvascular Diameter: Opposite Functional Roles of Neuronal and Smooth Muscle Located Vanilloid Receptor-1 ». *Molecular Pharmacology* 73 (5): 1405-12. <https://doi.org/10.1124/mol.107.043323>.
- Kawabata, Fuminori, Naohiko Inoue, Yukiko Masamoto, Shigenobu Matsumura, Wakako Kimura, Makoto Kadowaki, Tomohiro Higashi, Makoto Tominaga, Kazuo Inoue, et Tohru Fushiki. 2009. « Non-pungent capsaicin analogs (capsinoids) increase metabolic rate and enhance thermogenesis via gastrointestinal TRPV1 in mice ». *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 73 (12): 2690-2697.
- Kawada, Teruo, Tatsuo Watanabe, Tomoko Takaishi, Takehiko Tanaka, et Kazuo Iwai. 1986. « Capsaicin-Induced β -Adrenergic Action on Energy Metabolism in Rats: Influence of Capsaicin on Oxygen Consumption, the Respiratory Quotient, and Substrate Utilization ». *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 183 (2): 250-56. <https://doi.org/10.3181/00379727-183-42414>.
- Kentish, Stephen J., Claudine L. Frisby, Stamatiki Kritas, Hui Li, George Hatzinikolas, Tracey A. O'Donnell, Gary A. Wittert, et Amanda J. Page. 2015. « TRPV1 Channels and Gastric Vagal Afferent Signalling in Lean and High Fat Diet Induced Obese Mice ». *PLoS ONE* 10 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135892>.
- Kim, Jae-Sung, Ting Qian, et John J. Lemasters. 2003. « Mitochondrial Permeability Transition in the Switch from Necrotic to Apoptotic Cell Death in Ischemic Rat Hepatocytes ». *Gastroenterology* 124 (2): 494-503. <https://doi.org/10.1053/gast.2003.50059>.
- Kimball, Corinna, Jialie Luo, Shijin Yin, Hongzhen Hu, et Ajay Dhaka. 2015. « The Pore Loop Domain of TRPV1 Is Required for Its Activation by the Volatile Anesthetics Chloroform and Isoflurane ». *Molecular Pharmacology* 88 (1): 131-38. <https://doi.org/10.1124/mol.115.098277>.

- Komiya, Yuko, et Loren W. Runnels. 2015. « TRPM Channels and Magnesium in Early Embryonic Development ». *The International Journal of Developmental Biology* 59 (7-9): 281-88. <https://doi.org/10.1387/ijdb.150196lr>.
- Kort, Michael E., et Philip R. Kym. 2012. « TRPV1 antagonists: clinical setbacks and prospects for future development ». In *Progress in medicinal chemistry*, 51:57–70. Elsevier.
- Kostic, Marko, Marthe H. R. Ludtmann, Hilmar Bading, Michal Hershinkel, Erin Steer, Charleen T. Chu, Andrey Y. Abramov, et Israel Sekler. 2015. « PKA Phosphorylation of NCLX Reverses Mitochondrial Calcium Overload and Depolarization, Promoting Survival of PINK1-Deficient Dopaminergic Neurons ». *Cell Reports* 13 (2): 376-86. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.079>.
- Koussounadis, Antonis, Simon P. Langdon, In Hwa Um, David J. Harrison, et V. Anne Smith. 2015. « Relationship between Differentially Expressed mRNA and mRNA-Protein Correlations in a Xenograft Model System ». *Scientific Reports* 5 (1): 10775. <https://doi.org/10.1038/srep10775>.
- Kraft, Robert, et Christian Harteneck. 2005. « The Mammalian Melastatin-Related Transient Receptor Potential Cation Channels: An Overview ». *Pflugers Archiv: European Journal of Physiology* 451 (1): 204-11. <https://doi.org/10.1007/s00424-005-1428-0>.
- Krørup, Anne Lund, Lars Ny, Jenny Gunnarsson, Frederik Hvid-Jensen, Sofia Zetterstrand, Magnus Simrén, Peter Funch-Jensen, Mark Berner Hansen, et Asbjørn Mohr Drewes. 2013. « Randomized clinical trial: inhibition of the TRPV1 system in patients with nonerosive gastroesophageal reflux disease and a partial response to PPI treatment is not associated with analgesia to esophageal experimental pain ». *Scandinavian journal of gastroenterology* 48 (3): 274–284.
- Kunze, Markus, et Johannes Berger. 2015. « The similarity between N-terminal targeting signals for protein import into different organelles and its evolutionary relevance ». *Frontiers in Physiology* 6. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2015.00259>.
- Lang, Hongmei, Qiang Li, Hao Yu, Peng Li, Zongshi Lu, Shiqiang Xiong, Tao Yang, Yu Zhao, Xiaohu Huang, et Peng Gao. 2015. « Activation of TRPV1 attenuates high salt-induced cardiac hypertrophy through improvement of mitochondrial function ». *British journal of pharmacology* 172 (23): 5548–5558.
- Lee, Eunjung, Dae Young Jung, Jong Hun Kim, Payal R. Patel, Xiaodi Hu, Yongjin Lee, Yoshihiro Azuma, et al. 2015. « Transient receptor potential vanilloid type-1 channel regulates diet-induced obesity, insulin resistance, and leptin resistance ». *The FASEB Journal* 29 (8): 3182-92. <https://doi.org/10.1096/fj.14-268300>.
- Lemasters, John J., Tom P. Theruvath, Zhi Zhong, et Anna-Liisa Nieminen. 2009. « Mitochondrial Calcium and the Permeability Transition in Cell Death ». *Biochimica et biophysica acta* 1787 (11): 1395-1401. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.06.009>.
- Levitan, Irena, Yun Fang, Avia Rosenhouse-Dantsker, et Victor Romanenko. 2010. « Cholesterol and Ion Channels ». *Sub-Cellular Biochemistry* 51: 509-49. https://doi.org/10.1007/978-90-481-8622-8_19.
- Lewin, Gary R., Alain Rueff, et Lorne M. Mendell. 1994. « Peripheral and Central Mechanisms of NGF-Induced Hyperalgesia ». *European Journal of Neuroscience* 6 (12): 1903-12. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1994.tb00581.x>.
- Li, Hong-Bin, Rong-Rong Mao, Ji-Chuan Zhang, Ya Yang, Jun Cao, et Lin Xu. 2008. « Antistress Effect of TRPV1 Channel on Synaptic Plasticity and Spatial Memory ». *Biological Psychiatry* 64 (4): 286-92. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2008.02.020>.
- Li, Mingjiang, Jianmin Jiang, et Lixia Yue. 2006. « Functional Characterization of Homo- and Heteromeric Channel Kinases TRPM6 and TRPM7 ». *The Journal of General Physiology* 127 (5): 525-37. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609502>.
- Liang, Han, et Laura F. Landweber. 2006. « A Genome-Wide Study of Dual Coding Regions in Human Alternatively Spliced Genes ». *Genome Research* 16 (2): 190-96. <https://doi.org/10.1101/gr.4246506>.
- Liao, Maofu, Erhu Cao, David Julius, et Yifan Cheng. 2013. « Structure of the TRPV1 Ion Channel Determined by Electron Cryo-Microscopy ». *Nature* 504 (7478): 107-12. <https://doi.org/10.1038/nature12822>.
- Liedtke, W., Y. Choe, M. A. Martí-Renom, A. M. Bell, C. S. Denis, A. Sali, A. J. Hudspeth, J. M. Friedman, et S. Heller. 2000. « Vanilloid Receptor-Related Osmotically Activated Channel (VR-OAC), a Candidate Vertebrate Osmoreceptor ». *Cell* 103 (3): 525-35. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00143-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00143-4).
- Liman, E. R. 2007. « TRPM5 and Taste Transduction ». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n° 179: 287-98. https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_17.
- Lishko, Polina V., Erik Procko, Xiangshu Jin, Christopher B. Phelps, et Rachelle Gaudet. 2007. « The Ankyrin Repeats of TRPV1 Bind Multiple Ligands and Modulate Channel Sensitivity ». *Neuron* 54 (6): 905-18. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.05.027>.
- Liu, Dan, et Emily R. Liman. 2003. « Intracellular Ca²⁺ and the Phospholipid PIP₂ Regulate the Taste Transduction Ion Channel TRPM5 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (25): 15160-65. <https://doi.org/10.1073/pnas.2334159100>.

- Liu, Jiao, Junxie Du, Yanrui Yang, et Yun Wang. 2015. « Phosphorylation of TRPV1 by Cyclin-Dependent Kinase 5 Promotes TRPV1 Surface Localization, Leading to Inflammatory Thermal Hyperalgesia ». *Experimental Neurology* 273 (novembre): 253-62. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.09.005>.
- Liu, Julia C., Jie Liu, Kira M. Holmström, Sara Menazza, Randi J. Parks, Maria M. Fergusson, Zu-Xi Yu, et al. 2016. « MICU1 Serves as a Molecular Gatekeeper to Prevent In Vivo Mitochondrial Calcium Overload ». *Cell Reports* 16 (6): 1561-73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.011>.
- Liu, Min, Wenlong Huang, Dongsheng Wu, et John V. Priestley. 2006. « TRPV1, but Not P2X, Requires Cholesterol for Its Function and Membrane Expression in Rat Nociceptors ». *The European Journal of Neuroscience* 24 (1): 1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2006.04889.x>.
- Liu, Min, Meng-Chuan Liu, Charalambos Magoulas, John V. Priestley, et Nick J. Willmott. 2003. « Versatile Regulation of Cytosolic Ca²⁺ by Vanilloid Receptor I in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 5462-72. <https://doi.org/10.1074/jbc.M20911200>.
- Liu, Zhaoguo, Hongyan Wu, Zhonghong Wei, Xu Wang, Peiliang Shen, Siliang Wang, Aiyun Wang, Wenxing Chen, et Yin Lu. 2016. « TRPM8: A Potential Target for Cancer Treatment ». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 142 (9): 1871-81. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2112-1>.
- Longhurst, J. C., M. P. Kaufman, G. A. Ordway, et T. I. Musch. 1984. « Effects of bradykinin and capsaicin on endings of afferent fibers from abdominal visceral organs ». *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 247 (3): R552-59. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1984.247.3.R552>.
- Lotteau, Sabine, Sylvie Ducreux, Caroline Romestaing, Claude Legrand, et Fabien Van Coppenolle. 2013. « Characterization of Functional TRPV1 Channels in the Sarcoplasmic Reticulum of Mouse Skeletal Muscle ». *PLoS ONE* 8 (3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058673>.
- Lu, Gang, Dorian Henderson, Lieju Liu, Peter H. Reinhart, et Sidney A. Simon. 2005. « TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant ». *Molecular pharmacology* 67 (4): 1119-1127.
- Lu, Xiyuan, Jennifer Q. Kwong, Jeffery D. Molkentin, et Donald M. Bers. 2016. « Individual Cardiac Mitochondria Undergo Rare Transient Permeability Transition Pore Openings ». *Circulation Research* 118 (5): 834-41. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.308093>.
- Luo, Zhidan, Liqun Ma, Zhigang Zhao, Hongbo He, Dachun Yang, Xiaoli Feng, Shuangtao Ma, et al. 2012. « TRPV1 Activation Improves Exercise Endurance and Energy Metabolism through PGC-1 α Upregulation in Mice ». *Cell Research* 22 (3): 551-64. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.205>.
- Mallilankaraman, Karthik, César Cárdenas, Patrick J. Doonan, Harish C. Chandramoorthy, Krishna M. Irrinki, Tünde Golenár, György Csordás, et al. 2012. « MCUR1 Is an Essential Component of Mitochondrial Ca²⁺ Uptake That Regulates Cellular Metabolism ». *Nature Cell Biology* 14 (12): 1336-43. <https://doi.org/10.1038/ncb2622>.
- Marinelli, Silvia, Vincenzo Di Marzo, Fulvio Florenzano, Filomena Fezza, Maria Teresa Viscomi, Mario van der Stelt, Giorgio Bernardi, Marco Molinari, Mauro Maccarrone, et Nicola B. Mercuri. 2007. « N -Arachidonoyl-Dopamine Tunes Synaptic Transmission onto Dopaminergic Neurons by Activating Both Cannabinoid and Vanilloid Receptors ». *Neuropsychopharmacology* 32 (2): 298-308. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301118>.
- Marsch, Rudolph, Elisabeth Foeller, Gerhard Rammes, Mirjam Bunck, Manfred Kössl, Florian Holsboer, Walter Zieglgänsberger, Rainer Landgraf, Beat Lutz, et Carsten T. Wotjak. 2007. « Reduced Anxiety, Conditioned Fear, and Hippocampal Long-Term Potentiation in Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptor-Deficient Mice ». *Journal of Neuroscience* 27 (4): 832-39. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3303-06.2007>.
- Martínez-Reyes, Inmaculada, et Navdeep S. Chandel. 2020. « Mitochondrial TCA Cycle Metabolites Control Physiology and Disease ». *Nature Communications* 11. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13668-3>.
- Matsumoto, Tamaki, Chiemi Miyawaki, Hidetoshi Ue, Toshiaki Yuasa, Aya Miyatsuji, et Toshio Moritani. 2000. « Effects of Capsaicin-containing Yellow Curry Sauce on Sympathetic Nervous System Activity and Diet-induced Thermogenesis in Lean and Obese Young Women ». *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 46 (6): 309-15. <https://doi.org/10.3177/jnsv.46.309>.
- McKemy, David D., Werner M. Neuhauser, et David Julius. 2002. « Identification of a Cold Receptor Reveals a General Role for TRP Channels in Thermosensation ». *Nature* 416 (6876): 52-58. <https://doi.org/10.1038/nature719>.
- Medina, Diego L., Simone Di Paola, Ivana Peluso, Andrea Armani, Diego De Stefani, Rossella Venditti, Sandro Montefusco, et al. 2015. « Lysosomal Calcium Signalling Regulates Autophagy through Calcineurin and TFEB ». *Nature Cell Biology* 17 (3): 288-99. <https://doi.org/10.1038/ncb3114>.
- Meents, Jannis E., Cosmin I. Ciotu, et Michael J. M. Fischer. 2018. « TRPA1: a molecular view ». *Journal of Neurophysiology* 121 (2): 427-43. <https://doi.org/10.1152/jn.00524.2018>.

- Meis, L. de. 2002. « Ca²⁺-ATPases (SERCA): Energy Transduction and Heat Production in Transport ATPases ». *The Journal of Membrane Biology* 188 (1): 1-9. <https://doi.org/10.1007/s00232-001-0171-5>.
- Mekahli, Djalila, Geert Bultynck, Jan B. Parys, Humbert De Smedt, et Ludwig Missiaen. 2011. « Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease ». *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (6): a004317.
- Messina, Angela, Simona Reina, Francesca Guarino, et Vito De Pinto. 2012. « VDAC Isoforms in Mammals ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1818 (6): 1466-76. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.10.005>.
- Micaroni, Massimo. 2012. « Calcium around the Golgi apparatus: implications for intracellular membrane trafficking ». In *Calcium Signaling*, 439-460. Springer.
- Miornyk, J. A. 2016. « Getting into Mitochondria ». *Biochemical Journal* 473 (21): 3755-58. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160667C>.
- Minke, B. 1982. « Light-Induced Reduction in Excitation Efficiency in the Trp Mutant of Drosophila ». *The Journal of General Physiology* 79 (3): 361-85. <https://doi.org/10.1085/jgp.79.3.361>.
- Minke, B., C. Wu, et W. L. Pak. 1975. « Induction of Photoreceptor Voltage Noise in the Dark in Drosophila Mutant ». *Nature* 258 (5530): 84-87. <https://doi.org/10.1038/258084a0>.
- Miyake, Takahito, Hisashi Shirakawa, Takayuki Nakagawa, et Shuji Kaneko. 2015. « Activation of mitochondrial transient receptor potential vanilloid 1 channel contributes to microglial migration ». *Glia* 63 (10): 1870-1882.
- Mohapatra, Durga Prasanna, et Carla Nau. 2005. « Regulation of Ca²⁺-Dependent Desensitization in the Vanilloid Receptor TRPV1 by Calcineurin and CAMP-Dependent Protein Kinase ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (14): 13424-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410917200>.
- Monet, Michaël, V'yacheslav Lehen'kyi, Florian Gackiere, Virginie Firlej, Matthieu Vandenberghe, Morad Roudbaraki, Dimitra Gkika, et al. 2010. « Role of Cationic Channel TRPV2 in Promoting Prostate Cancer Migration and Progression to Androgen Resistance ». *Cancer Research* 70 (3): 1225-35. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2205>.
- Montell, Craig. 2005. « The TRP Superfamily of Cation Channels ». *Science Signaling* 2005 (272): re3-re3. <https://doi.org/10.1126/stke.2722005re3>.
- Montell, Craig, Lutz Birnbaumer, Veit Flockerzi, René J. Bindels, Elspeth A. Bruford, Michael J. Caterina, David E. Clapham, et al. 2002. « A Unified Nomenclature for the Superfamily of TRP Cation Channels ». *Molecular Cell* 9 (2): 229-31. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00448-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00448-3).
- Montell, Craig, et Gerald M. Rubin. 1989. « Molecular Characterization of the Drosophila Trp Locus: A Putative Integral Membrane Protein Required for Phototransduction ». *Neuron* 2 (4): 1313-23. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(89\)90069-X](https://doi.org/10.1016/0896-6273(89)90069-X).
- Monteuuis, Geoffray, Justin J L Wong, Charles G Bailey, Ulf Schmitz, et John E J Rasko. 2019. « The changing paradigm of intron retention: regulation, ramifications and recipes ». *Nucleic Acids Research* 47 (22): 11497-513. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1068>.
- Moqrich, Aziz, Sun Wook Hwang, Taryn J. Earley, Matt J. Petrus, Amber N. Murray, Kathryn S. R. Spencer, Mary Andahazy, Gina M. Story, et Ardem Patapoutian. 2005. « Impaired Thermosensation in Mice Lacking TRPV3, a Heat and Camphor Sensor in the Skin ». *Science (New York, N.Y.)* 307 (5714): 1468-72. <https://doi.org/10.1126/science.1108609>.
- Morales-Lázaro, Sara L., et Tamara Rosenbaum. 2019. « Cholesterol as a Key Molecule That Regulates TRPV1 Channel Function ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 1135: 105-17. https://doi.org/10.1007/978-3-030-14265-0_6.
- Morales-Lázaro, Sara L, Sidney A Simon, et Tamara Rosenbaum. 2013. « The role of endogenous molecules in modulating pain through transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ». *The Journal of Physiology* 591 (Pt 13): 3109-21. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.251751>.
- Moreno-Sánchez, R. 1983. « Inhibition of Oxidative Phosphorylation by a Ca²⁺-Induced Diminution of the Adenine Nucleotide Translocator ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 724 (2): 278-85. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(83\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(83)90146-9).
- Mossmann, Dirk, Chris Meisinger, et F.-Nora Vögtle. 2012. « Processing of Mitochondrial Presequences ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1819 (9-10): 1098-1106. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.11.007>.
- Murphy, A. N., J. K. Kelleher, et G. Fiskum. 1990. « Submicromolar Ca²⁺ Regulates Phosphorylating Respiration by Normal Rat Liver and AS-30D Hepatoma Mitochondria by Different Mechanisms ». *The Journal of Biological Chemistry* 265 (18): 10527-34.
- Musella, Alessandra, Valentina De Chiara, Silvia Rossi, Chiara Prosperetti, Giorgio Bernardi, Mauro Maccarrone, et Diego Centonze. 2009. « TRPV1 channels facilitate glutamate transmission in the striatum ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 40 (1): 89-97.
- Nabissi, Massimo, et Giorgio Santoni. 2011. « TRPV1 (Transient Receptor Potential Cation Channel, Subfamily V, Member 1) », 8.

- Nagata, Keiichi, Anne Duggan, Gagan Kumar, et Jaime García-Añoveros. 2005. « Nociceptor and Hair Cell Transducer Properties of TRPA1, a Channel for Pain and Hearing ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25 (16): 4052-61. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0013-05.2005>.
- Neupert, Walter, et Johannes M. Herrmann. 2007. « Translocation of proteins into mitochondria ». *Annu. Rev. Biochem.* 76: 723-749.
- Nguyen, Emily K., Olha M. Koval, Paige Noble, Kim Broadhurst, Chantal Allamargot, Meng Wu, Stefan Strack, William H. Thiel, et Isabella M. Grumbach. 2018. « CaMKII (Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II) in mitochondria of smooth muscle cells controls mitochondrial mobility, migration and neointima formation ». *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 38 (6): 1333-45. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.118.310951>.
- Nieto-Posadas, Andrés, Giovanni Picazo-Juárez, Itzel Llorente, Andrés Jara-Oseguera, Sara Morales-Lázaro, Diana Escalante-Alcalde, León D. Islas, et Tamara Rosenbaum. 2011. « Lysophosphatidic Acid Directly Activates TRPV1 through a C-Terminal Binding Site ». *Nature Chemical Biology* 8 (1): 78-85. <https://doi.org/10.1038/nchembio.712>.
- Nilius, Bernd, Giovanni Appendino, et Grzegorz Owsianik. 2012. « The Transient Receptor Potential Channel TRPA1: From Gene to Pathophysiology ». *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology* 464 (5): 425-58. <https://doi.org/10.1007/s00424-012-1158-z>.
- Nilius, Bernd, et Grzegorz Owsianik. 2011. « The Transient Receptor Potential Family of Ion Channels ». *Genome Biology* 12 (3): 218. <https://doi.org/10.1186/gb-2011-12-3-218>.
- Noben-Trauth, Konrad. 2011. « The TRPML3 Channel: From Gene to Function ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 704: 229-37. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_13.
- Odagiri, Keiichi, Hideki Katoh, Hirotaka Kawashima, Takamitsu Tanaka, Hayato Ohtani, Masao Saotome, Tsuyoshi Urushida, Hiroshi Satoh, et Hideharu Hayashi. 2009. « Local Control of Mitochondrial Membrane Potential, Permeability Transition Pore and Reactive Oxygen Species by Calcium and Calmodulin in Rat Ventricular Myocytes ». *Journal of Molecular and Cellular Cardiology, Mitochondria Special Issue: From Basic Mitochondrial Biology to Cardiovascular Disease*, 46 (6): 989-97. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.022>.
- Olah, Zoltan, Tamas Szabo, Laszlo Karai, Chris Hough, R. Douglas Fields, Robert M. Caudle, Peter M. Blumberg, et Michael J. Iadarola. 2001. « Ligand-Induced Dynamic Membrane Changes and Cell Deletion Conferred by Vanilloid Receptor 1 ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (14): 11021-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008392200>.
- Omura, T. 1998. « Mitochondria-Targeting Sequence, a Multi-Role Sorting Sequence Recognized at All Steps of Protein Import into Mitochondria ». *Journal of Biochemistry* 123 (6): 1010-16. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022036>.
- Ong, Hwei Ling, Lorena Brito de Souza, et Indu S. Ambudkar. 2016. « Role of TRPC Channels in Store-Operated Calcium Entry ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 898: 87-109. https://doi.org/10.1007/978-3-319-26974-0_5.
- Otto, Mandy, Clarissa Bucher, Wantao Liu, Melanie Müller, Tobias Schmidt, Marina Kardell, Marvin Noel Driessen, Jan Rossaint, Eric R. Gross, et Nana-Maria Wagner. 2020. « 12(S)-HETE Mediates Diabetes Induced Endothelial Dysfunction by Activating Intracellular Endothelial Cell TRPV1 ». *The Journal of Clinical Investigation*, juin. <https://doi.org/10.1172/JCI136621>.
- Ouadid-Ahidouch, Halima, Isabelle Dhennin-Duthille, Mathieu Gautier, Henri Sevestre, et Ahmed Ahidouch. 2012. « [TRP calcium channel and breast cancer: expression, role and correlation with clinical parameters] ». *Bulletin du cancer* 99 (6): 655-64. <https://doi.org/10.1684/bdc.2012.1595>.
- Palty, Raz, William F. Silverman, Michal Hershinkel, Teresa Caporale, Stefano L. Sensi, Julia Parnis, Christiane Nolte, et al. 2010. « NCLX Is an Essential Component of Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ Exchange ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (1): 436-41. <https://doi.org/10.1073/pnas.0908099107>.
- Park, Chul-Kyu, Zhen-Zhong Xu, Tong Liu, Ning Lü, Charles N. Serhan, et Ru-Rong Ji. 2011. « Resolvin D2 Is a Potent Endogenous Inhibitor for Transient Receptor Potential Subtype V1/A1, Inflammatory Pain, and Spinal Cord Synaptic Plasticity in Mice: Distinct Roles of Resolvin D1, D2, and E1 ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 31 (50): 18433-38. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4192-11.2011>.
- Park, Thomas J., Ying Lu, René Jüttner, Ewan St J. Smith, Jing Hu, Antje Brand, Christiane Wetzel, et al. 2008. « Selective Inflammatory Pain Insensitivity in the African Naked Mole-Rat (*Heterocephalus Glaber*) ». *PLoS Biology* 6 (1): e13. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060013>.
- Park, Una, Nisha Vastani, Yun Guan, Srinivasa N. Raja, Martin Koltzenburg, et Michael J. Caterina. 2011. « TRP Vanilloid 2 Knock-Out Mice Are Susceptible to Perinatal Lethality But Display Normal Thermal and

- Mechanical Nociception ». *Journal of Neuroscience* 31 (32): 11425-36. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1384-09.2011>.
- Paulsen, Candice E., Jean-Paul Armache, Yuan Gao, Yifan Cheng, et David Julius. 2015. « Structure of the TRPA1 Ion Channel Suggests Regulatory Mechanisms ». *Nature* 525 (7570): 552. <https://doi.org/10.1038/nature14871>.
- Peier, Andrea M., Aziz Moqrich, Anne C. Hergarden, Alison J. Reeve, David A. Andersson, Gina M. Story, Taryn J. Earley, et al. 2002. « A TRP Channel That Senses Cold Stimuli and Menthol ». *Cell* 108 (5): 705-15. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00652-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00652-9).
- Pennington, Edward Ross, Katsuhiko Funai, David A. Brown, et Saame Raza Shaikh. 2019. « The Role of Cardiolipin Concentration and Acyl Chain Composition on Mitochondrial Inner Membrane Molecular Organization and Function ». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular and Cell Biology of Lipids* 1864 (7): 1039-52. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2019.03.012>.
- Perrone, Mariasole, Natascia Carocchia, Iliaria Genovese, Sonia Missiroli, Lorenzo Modesti, Gaia Pedriali, Bianca Vezzani, et al. 2020. « Chapter Four - The Role of Mitochondria-Associated Membranes in Cellular Homeostasis and Diseases ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Oliver Kepp et Lorenzo Galluzzi, 350:119-96. *Biology of the Endoplasmic Reticulum*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2019.11.002>.
- Peters, D. J., L. Spruit, J. J. Saris, D. Ravine, L. A. Sandkuijl, R. Fossdal, J. Boersma, R. van Eijk, S. Nørby, et C. D. Constantinou-Deltas. 1993. « Chromosome 4 Localization of a Second Gene for Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease ». *Nature Genetics* 5 (4): 359-62. <https://doi.org/10.1038/ng1293-359>.
- Petrocellis, Luciano De, Selena Harrison, Tiziana Bisogno, Michele Tognetto, Ines Brandi, Graham D. Smith, Christophe Creminon, John B. Davis, Pierangelo Geppetti, et Vincenzo Di Marzo. 2001. « The Vanilloid Receptor (VR1)-Mediated Effects of Anandamide Are Potently Enhanced by the CAMP-Dependent Protein Kinase ». *Journal of Neurochemistry* 77 (6): 1660-63. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00406.x>.
- Phillips, A. Marie, Ann Bull, et Leonard E. Kelly. 1992. « Identification of a Drosophila Gene Encoding a Calmodulin-Binding Protein with Homology to the Trp Phototransduction Gene ». *Neuron* 8 (4): 631-42. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(92\)90085-R](https://doi.org/10.1016/0896-6273(92)90085-R).
- Picazo-Juárez, Giovanni, Silvina Romero-Suárez, Andrés Nieto-Posadas, Itzel Llorente, Andrés Jara-Oseguera, Margaret Briggs, Thomas J. McIntosh, et al. 2011. « Identification of a Binding Motif in the S5 Helix That Confers Cholesterol Sensitivity to the TRPV1 Ion Channel ». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (28): 24966-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.237537>.
- Pinton, P., T. Pozzan, et R. Rizzuto. 1998. « The Golgi Apparatus Is an Inositol 1,4,5-Trisphosphate-Sensitive Ca²⁺ Store, with Functional Properties Distinct from Those of the Endoplasmic Reticulum ». *The EMBO Journal* 17 (18): 5298-5308. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.18.5298>.
- Prakriya, Murali, et Richard S. Lewis. 2015. « Store-Operated Calcium Channels ». *Physiological Reviews* 95 (4): 1383-1436. <https://doi.org/10.1152/physrev.00020.2014>.
- Premkumar, Louis S., Sanjay Agarwal, et Deborah Steffen. 2002. « Single-Channel Properties of Native and Cloned Rat Vanilloid Receptors ». *The Journal of Physiology* 545 (1): 107-17. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.016352>.
- Premkumar, Louis S., et Gerard P. Ahern. 2000. « Induction of Vanilloid Receptor Channel Activity by Protein Kinase C ». *Nature* 408 (6815): 985-90. <https://doi.org/10.1038/35050121>.
- Prescott, Elizabeth D., et David Julius. 2003. « A Modular PIP2 Binding Site as a Determinant of Capsaicin Receptor Sensitivity ». *Science (New York, N.Y.)* 300 (5623): 1284-88. <https://doi.org/10.1126/science.1083646>.
- Qi, Yan, Zenghua Qi, Zhichao Li, Chun-Kit Wong, Chun So, Iek-Chi Lo, Yu Huang, Xiaoqiang Yao, et Suk-Ying Tsang. 2015. « Role of TRPV1 in the differentiation of mouse embryonic stem cells into cardiomyocytes ». *PLoS One* 10 (7).
- R. Eid, Samer. 2011. « Therapeutic Targeting of TRP Channels - The TR(i)P to Pain Relief ». Text. 2011. <https://doi.org/info:doi/10.2174/156802611796904898>.
- Ramalho, Rodrigo F., Sujun Li, Predrag Radivojac, et Matthew W. Hahn. 2018. « Proteomic Evidence for In-Frame and Out-of-Frame Alternatively Spliced Isoforms in Human and Mouse ». *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 15 (4): 1284-89. <https://doi.org/10.1109/TCBB.2015.2480068>.
- Ramsey, I. Scott, Markus Delling, et David E. Clapham. 2006. « An Introduction to Trp Channels ». *Annual Review of Physiology* 68 (1): 619-47. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>.
- Reilly, Regina M., Heath A. McDonald, Pamela S. Puttfarcken, Shailen K. Joshi, LaGeisha Lewis, Madhavi Pai, Pamela H. Franklin, Jason A. Segreti, Torben R. Neelands, et Ping Han. 2012. « Pharmacology of modality-specific transient receptor potential vanilloid-1 antagonists that do not alter body temperature ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 342 (2): 416-428.

- Ren, Tingting, Jiaojiao Wang, Hui Zhang, Peng Yuan, Jianjun Zhu, Yousheng Wu, Qichao Huang, et al. 2018. « MCUR1-Mediated Mitochondrial Calcium Signaling Facilitates Cell Survival of Hepatocellular Carcinoma via Reactive Oxygen Species-Dependent P53 Degradation ». *Antioxidants & Redox Signaling* 28 (12): 1120-36. <https://doi.org/10.1089/ars.2017.6990>.
- Riera, Céline E., Mark O. Huising, Patricia Follett, Mathias Leblanc, Jonathan Halloran, Roger Van Andel, Carlos Daniel de Magalhaes Filho, Carsten Merkwirth, et Andrew Dillin. 2014. « TRPV1 pain receptors regulate longevity and metabolism by neuropeptide signaling ». *Cell* 157 (5): 1023-1036.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft, et T. Pozzan. 1998. « Close Contacts with the Endoplasmic Reticulum as Determinants of Mitochondrial Ca²⁺ Responses ». *Science (New York, N.Y.)* 280 (5370): 1763-66. <https://doi.org/10.1126/science.280.5370.1763>.
- Rizzuto, Rosario, Diego De Stefani, Anna Raffaello, et Cristina Mammucari. 2012. « Mitochondria as Sensors and Regulators of Calcium Signalling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 13 (9): 566-78. <https://doi.org/10.1038/nrm3412>.
- Robbins, Nathan, Sheryl E. Koch, et Jack Rubinstein. 2013. « Targeting TRPV1 and TRPV2 for Potential Therapeutic Interventions in Cardiovascular Disease ». *Translational Research* 161 (6): 469-76. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2013.02.003>.
- Rohács, Tibor, Coeli M. B. Lopes, Ioannis Michailidis, et Diomedes E. Logothetis. 2005. « PI(4,5)P₂ Regulates the Activation and Desensitization of TRPM8 Channels through the TRP Domain ». *Nature Neuroscience* 8 (5): 626-34. <https://doi.org/10.1038/nn1451>.
- Rolfe, D. F., et G. C. Brown. 1997. « Cellular Energy Utilization and Molecular Origin of Standard Metabolic Rate in Mammals ». *Physiological Reviews* 77 (3): 731-58. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.731>.
- Romanovsky, Andrej A., Maria C. Almeida, Andras Garami, Alexandre A. Steiner, Mark H. Norman, Shaun F. Morrison, Kazuhiro Nakamura, Jeffrey J. Burmeister, et Tatiane B. Nucci. 2009. « The transient receptor potential vanilloid-1 channel in thermoregulation: a thermosensor it is not ». *Pharmacological reviews* 61 (3): 228-261.
- Rosenbaum, Tamara, Ariela Gordon-Shaag, Mika Munari, et Sharona E. Gordon. 2004. « Ca²⁺/Calmodulin Modulates TRPV1 Activation by Capsaicin ». *The Journal of General Physiology* 123 (1): 53-62. <https://doi.org/10.1085/jgp.200308906>.
- Rostovtseva, Tatiana K., et Sergey M. Bezrukov. 2008. « VDAC Regulation: Role of Cytosolic Proteins and Mitochondrial Lipids ». *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 40 (3): 163-70. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9145-y>.
- Rowbotham, Michael C., Wolfram Nothaft, W. Rachel Duan, Yi Wang, Connie Faltynek, Steve McGaraughty, Katharine L. Chu, et Peter Svensson. 2011. « Oral and cutaneous thermosensory profile of selective TRPV1 inhibition by ABT-102 in a randomized healthy volunteer trial ». *Pain* 152 (5): 1192-1200.
- Runnels, Loren W., Lixia Yue, et David E. Clapham. 2002. « The TRPM7 Channel Is Inactivated by PIP₂ Hydrolysis ». *Nature Cell Biology* 4 (5): 329-36. <https://doi.org/10.1038/ncb781>.
- Ruparel, Nikita B., Amol M. Patwardhan, Armen N. Akopian, et Kenneth M. Hargreaves. 2008. « Homologous and Heterologous Desensitization of Capsaicin and Mustard Oil Responses Utilize Different Cellular Pathways in Nociceptors ». *PAIN* 135 (3): 271-79. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.06.005>.
- Rutter, G. A., et R. M. Denton. 1988. « Regulation of NAD⁺-Linked Isocitrate Dehydrogenase and 2-Oxoglutarate Dehydrogenase by Ca²⁺ Ions within Toluene-Permeabilized Rat Heart Mitochondria. Interactions with Regulation by Adenine Nucleotides and NADH/NAD⁺ Ratios ». *The Biochemical Journal* 252 (1): 181-89. <https://doi.org/10.1042/bj2520181>.
- Ryu, Shin-Young, Gisela Beutner, Robert T. Dirksen, Kathleen W. Kinnally, et Shey-Shing Sheu. 2010. « Mitochondrial Ryanodine Receptors and Other Mitochondrial Ca²⁺ Permeable Channels ». *FEBS Letters* 584 (10): 1948-55. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.01.032>.
- Samanta, Amrita, Taylor E. T. Hughes, et Vera Y. Moiseenkova-Bell. 2018. « Transient Receptor Potential (TRP) Channels ». *Sub-cellular biochemistry* 87: 141-65. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7757-9_6.
- Samanta, Krishna, Sophie Douglas, et Anant B. Parekh. 2014. « Mitochondrial Calcium Uniporter MCU Supports Cytoplasmic Ca²⁺ Oscillations, Store-Operated Ca²⁺ Entry and Ca²⁺-Dependent Gene Expression in Response to Receptor Stimulation ». *PLoS ONE* 9 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101188>.
- Sancak, Yasemin, Andrew L. Markhard, Toshimori Kitami, Erika Kovács-Bogdán, Kimberli J. Kamer, Namrata D. Udeshi, Steven A. Carr, et al. 2013. « EMRE Is an Essential Component of the Mitochondrial Calcium Uniporter Complex ». *Science (New York, N.Y.)* 342 (6164): 1379-82. <https://doi.org/10.1126/science.1242993>.
- Sanchez, J. F., J. E. Krause, et D. N. Cortright. 2001. « The distribution and regulation of vanilloid receptor VR1 and VR1 5' splice variant RNA expression in rat ». *Neuroscience* 107 (3): 373-381.

- Santos, Carolina JPA, Cristina AJ Stern, et Leandro J. Bertoglio. 2008. « Attenuation of anxiety-related behaviour after the antagonism of transient receptor potential vanilloid type 1 channels in the rat ventral hippocampus ». *Behavioural pharmacology* 19 (4): 357–360.
- Sanz-Salvador, Lucía, Amparo Andrés-Borderia, Antonio Ferrer-Montiel, et Rosa Planells-Cases. 2012. « Agonist- and Ca²⁺-Dependent Desensitization of TRPV1 Channel Targets the Receptor to Lysosomes for Degradation * ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (23): 19462-71. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.289751>.
- Sawada, Yosuke, Hiroshi Hosokawa, Aiko Hori, Kiyoshi Matsumura, et Shigeo Kobayashi. 2007. « Cold Sensitivity of Recombinant TRPA1 Channels ». *Brain Research* 1160 (juillet): 39-46. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.05.047>.
- Schumacher, Mark A., Irene Moff, Sharmila P. Sudanagunta, et Jon D. Levine. 2000. « Molecular Cloning of an N-Terminal Splice Variant of the Capsaicin Receptor LOSS OF N-TERMINAL DOMAIN SUGGESTS FUNCTIONAL DIVERGENCE AMONG CAPSAICIN RECEPTOR SUBTYPES ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (4): 2756-62. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2756>.
- Scorziello, Antonella, Claudia Savoia, Maria Josè Sisalli, Annagrazia Adornetto, Agnese Secondo, Francesca Boscia, Alba Esposito, et al. 2013. « NCX3 Regulates Mitochondrial Ca(2+) Handling through the AKAP121-Anchored Signaling Complex and Prevents Hypoxia-Induced Neuronal Death ». *Journal of Cell Science* 126 (Pt 24): 5566-77. <https://doi.org/10.1242/jcs.129668>.
- Sedgwick, Steven G., et Stephen J. Smerdon. 1999. « The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework ». *Trends in biochemical sciences* 24 (8): 311–316.
- Shadel, Gerald S., et David A. Clayton. 1997. « Mitochondrial Dna Maintenance in Vertebrates ». *Annual Review of Biochemistry* 66 (1): 409-35. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.66.1.409>.
- Shen, Wei, Mengyu Shen, Xia Zhao, Hongbin Zhu, Yuhui Yang, Shuguang Lu, Yinling Tan, et al. 2017. « Anti-Obesity Effect of Capsaicin in Mice Fed with High-Fat Diet Is Associated with an Increase in Population of the Gut Bacterium Akkermansia Muciniphila ». *Frontiers in Microbiology* 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00272>.
- Shi, Z., M. Riley, A. W. Taylor, et A. Page. 2017. « Chilli Consumption and the Incidence of Overweight and Obesity in a Chinese Adult Population ». *International Journal of Obesity* 41 (7): 1074-79. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.88>.
- Shin, Jieun, Hawon Cho, Sun Wook Hwang, Jooyoung Jung, Chan Young Shin, Soon-Youl Lee, So Hee Kim, et al. 2002. « Bradykinin-12-Lipoxygenase-VR1 Signaling Pathway for Inflammatory Hyperalgesia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (15): 10150-55. <https://doi.org/10.1073/pnas.152002699>.
- Shoshan-Barmatz, Varda, Yakov Krelin, et Anna Shteinifer-Kuzmine. 2018. « VDAC1 Functions in Ca²⁺ Homeostasis and Cell Life and Death in Health and Disease ». *Cell Calcium* 69 (janvier): 81-100. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2017.06.007>.
- Siemens, Jan, Sharlene Zhou, Rebecca Piskowski, Tetsuro Nikai, Ellen A. Lumpkin, Allan I. Basbaum, David King, et David Julius. 2006. « Spider Toxins Activate the Capsaicin Receptor to Produce Inflammatory Pain ». *Nature* 444 (7116): 208-12. <https://doi.org/10.1038/nature05285>.
- Silos-Santiago, I., D. C. Molliver, S. Ozaki, R. J. Smeyne, A. M. Fagan, M. Barbacid, et W. D. Snider. 1995. « Non-TrkA-expressing small DRG neurons are lost in TrkA deficient mice ». *Journal of Neuroscience* 15 (9): 5929–5942.
- Smeets, Astrid J., et Margriet S. Westerterp-Plantenga. 2009. « The Acute Effects of a Lunch Containing Capsaicin on Energy and Substrate Utilisation, Hormones, and Satiety ». *European Journal of Nutrition* 48 (4): 229-34. <https://doi.org/10.1007/s00394-009-0006-1>.
- Smirnova, Elena, Lorena Griparic, Dixie-Lee Shurland, et Alexander M. van der Bliek. 2001. « Dynamin-related Protein Drp1 Is Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells ». *Molecular Biology of the Cell* 12 (8): 2245-56. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.8.2245>.
- Smith, G. D., M. J. Gunthorpe, R. E. Kelsell, P. D. Hayes, P. Reilly, P. Facer, J. E. Wright, et al. 2002. « TRPV3 Is a Temperature-Sensitive Vanilloid Receptor-like Protein ». *Nature* 418 (6894): 186-90. <https://doi.org/10.1038/nature00894>.
- Southall, Michael D., Tao Li, Lera S. Gharibova, Yong Pei, Grant D. Nicol, et Jeffrey B. Travers. 2003. « Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 304 (1): 217–222.
- Stein, Alexander T., Carmen A. Ufret-Vincenty, Li Hua, Luis F. Santana, et Sharona E. Gordon. 2006. « Phosphoinositide 3-Kinase Binds to TRPV1 and Mediates NGF-Stimulated TRPV1 Trafficking to the Plasma Membrane ». *Journal of General Physiology* 128 (5): 509-22. <https://doi.org/10.1085/jgp.200609576>.

- Stelt, Mario van der, et Vincenzo Di Marzo. 2004. « Endovanilloids ». *European Journal of Biochemistry* 271 (10): 1827-34. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04081.x>.
- Stock, Kristin, Jitender Kumar, Michael Synowitz, Stefania Petrosino, Roberta Imperatore, Ewan St J. Smith, Peter Wend, Bettina Purfürst, Ulrike A. Nuber, et Ulf Gurok. 2012. « Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1 ». *Nature medicine* 18 (8): 1232.
- Story, Gina M., Andrea M. Peier, Alison J. Reeve, Samer R. Eid, Johannes Mosbacher, Todd R. Hricik, Taryn J. Earley, et al. 2003. « ANKTM1, a TRP-like Channel Expressed in Nociceptive Neurons, Is Activated by Cold Temperatures ». *Cell* 112 (6): 819-29. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(03\)00158-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)00158-2).
- Strotmann, R., C. Harteneck, K. Nunnenmacher, G. Schultz, et T. D. Plant. 2000. « OTRPC4, a Nonselective Cation Channel That Confers Sensitivity to Extracellular Osmolarity ». *Nature Cell Biology* 2 (10): 695-702. <https://doi.org/10.1038/35036318>.
- Sugiura, Takeshi, Makoto Tominaga, Hirotsada Katsuya, et Kazue Mizumura. 2002. « Bradykinin Lowers the Threshold Temperature for Heat Activation of Vanilloid Receptor 1 ». *Journal of Neurophysiology* 88 (1): 544-48. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.1.544>.
- Sun, Wuping, Chen Li, Yonghong Zhang, Changyu Jiang, Mingzhu Zhai, Qian Zhou, Lizu Xiao, et Qiwen Deng. 2017. « Gene Expression Changes of Thermo-Sensitive Transient Receptor Potential Channels in Obese Mice ». *Cell Biology International* 41 (8): 908-13. <https://doi.org/10.1002/cbin.10783>.
- Sun, Zewei, Jie Han, Wenting Zhao, Yuanyuan Zhang, Shuai Wang, Lifang Ye, Tingting Liu, et Liangrong Zheng. 2014. « TRPV1 activation exacerbates hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in H9C2 cells via calcium overload and mitochondrial dysfunction ». *International journal of molecular sciences* 15 (10): 18362–18380.
- Suzuki, Junji, Kazunori Kanemaru, et Masamitsu Iino. 2016. « Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Organellar Calcium Imaging ». *Biophysical Journal* 111 (6): 1119-31. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.04.054>.
- Szallasi, Arpad, Daniel N. Cortright, Charles A. Blum, et Samer R. Eid. 2007. « The Vanilloid Receptor TRPV1: 10 Years from Channel Cloning to Antagonist Proof-of-Concept ». *Nature Reviews Drug Discovery* 6 (5): 357-72. <https://doi.org/10.1038/nrd2280>.
- Szelenyi, Z., Z. Hummel, J. Szolcsanyi, et J. B. Davis. 2004. « Daily Body Temperature Rhythm and Heat Tolerance in TRPV1 Knockout and Capsaicin Pretreated Mice ». *European Journal of Neuroscience* 19 (5): 1421-24. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2004.03221.x>.
- Szolcsanyi, J. 1977. « A pharmacological approach to elucidation of the role of different nerve fibres and receptor endings in mediation of pain. » *Journal de physiologie* 73 (3): 251–259.
- Szolcsányi, János. 2015. « Effect of capsaicin on thermoregulation: an update with new aspects ». *Temperature* 2 (2): 277-96. <https://doi.org/10.1080/23328940.2015.1048928>.
- Tabrizi, Mojgan Aghazadeh, Pier Giovanni Baraldi, Stefania Baraldi, Stefania Gessi, Stefania Merighi, et Pier Andrea Borea. 2017. « Medicinal Chemistry, Pharmacology, and Clinical Implications of TRPV1 Receptor Antagonists ». *Medicinal Research Reviews* 37 (4): 936-83. <https://doi.org/10.1002/med.21427>.
- Tan, L. L., J. C. Bornstein, et C. R. Anderson. 2009. « Neurochemical and Morphological Phenotypes of Vagal Afferent Neurons Innervating the Adult Mouse Jejunum ». *Neurogastroenterology & Motility* 21 (9): 994-1001. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2009.01322.x>.
- Tang, Jia Xin, Kyle Thompson, Robert W. Taylor, et Monika Oláhová. 2020. « Mitochondrial OXPHOS Biogenesis: Co-Regulation of Protein Synthesis, Import, and Assembly Pathways ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (11): 3820. <https://doi.org/10.3390/ijms21113820>.
- Tang, Shihao, Xubu Wang, Qiang Shen, Xinyi Yang, Changhui Yu, Chunqing Cai, Guoshuai Cai, Xiaojing Meng, et Fei Zou. 2015. « Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Is Critical for Store-Operated Ca²⁺ Entry-Dependent Breast Cancer Cell Migration ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458 (1): 186-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.01.092>.
- Territo, P. R., V. K. Mootha, S. A. French, et R. S. Balaban. 2000. « Ca(2+) Activation of Heart Mitochondrial Oxidative Phosphorylation: Role of the F(0)/F(1)-ATPase ». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 278 (2): C423-435. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.2000.278.2.C423>.
- Thomas, Karen C., Manivannan Ethirajan, Kiumars Shahrokh, Hao Sun, Jeewoo Lee, Thomas E. Cheatham, Garold S. Yost, et Christopher A. Reilly. 2011. « Structure-Activity Relationship of Capsaicin Analogs and Transient Receptor Potential Vanilloid 1-Mediated Human Lung Epithelial Cell Toxicity ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 337 (2): 400-410. <https://doi.org/10.1124/jpet.110.178491>.
- Thomas, Karen C., Jessica K. Roberts, Cassandra E. Deering-Rice, Erin G. Romero, Randal O. Dull, Jeewoo Lee, Garold S. Yost, et Christopher A. Reilly. 2012. « Contributions of TRPV1, endovanilloids, and endoplasmic reticulum stress in lung cell death in vitro and lung injury ». *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* 302 (1): L111-19. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00231.2011>.

- Thomas, Karen C., Ashwini S. Sabnis, Mark E. Johansen, Diane L. Lanza, Philip J. Moos, Garold S. Yost, et Christopher A. Reilly. 2007. « Transient receptor potential vanilloid 1 agonists cause endoplasmic reticulum stress and cell death in human lung cells ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321 (3): 830–838.
- Tinel, H., J. M. Cancela, H. Mogami, J. V. Gerasimenko, O. V. Gerasimenko, A. V. Tepikin, et O. H. Petersen. 1999. « Active Mitochondria Surrounding the Pancreatic Acinar Granule Region Prevent Spreading of Inositol Trisphosphate-Evoked Local Cytosolic Ca(2+) Signals ». *The EMBO Journal* 18 (18): 4999-5008. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.18.4999>.
- Tomar, Dhanendra, Zhiwei Dong, Santhanam Shanmughapriya, Diana A. Koch, Toby Thomas, Nicholas E. Hoffman, Shrishiv A. Timbalia, et al. 2016. « MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics ». *Cell Reports* 15 (8): 1673-85. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.050>.
- Tominaga, M., M. J. Caterina, A. B. Malmberg, T. A. Rosen, H. Gilbert, K. Skinner, B. E. Raumann, A. I. Basbaum, et D. Julius. 1998. « The Cloned Capsaicin Receptor Integrates Multiple Pain-Producing Stimuli ». *Neuron* 21 (3): 531-43. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(00\)80564-4](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(00)80564-4).
- Tominaga, M., M. Wada, et M. Masu. 2001. « Potentiation of Capsaicin Receptor Activity by Metabotropic ATP Receptors as a Possible Mechanism for ATP-Evoked Pain and Hyperalgesia ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (12): 6951-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.111025298>.
- Tosatto, Anna, Roberta Sommaggio, Carsten Kummerow, Robert B. Bentham, Thomas S. Blacker, Tunde Berecz, Michael R. Duchon, et al. 2016. « The Mitochondrial Calcium Uniporter Regulates Breast Cancer Progression via HIF-1 α ». *EMBO Molecular Medicine* 8 (5): 569-85. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606255>.
- Tóth, Dániel Márton, Éva Szőke, Kata Bölcskei, Krisztián Kvell, Balázs Bender, Zsuzsanna Bősze, János Szolcsányi, et Zoltán Sándor. 2011. « Nociception, Neurogenic Inflammation and Thermoregulation in TRPV1 Knockdown Transgenic Mice ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 68 (15): 2589-2601. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0569-2>.
- Trenker, Michael, Roland Malli, Ismene Fertschai, Sanja Levak-Frank, et Wolfgang F. Graier. 2007. « Uncoupling Proteins 2 and 3 Are Fundamental for Mitochondrial Ca $^{2+}$ Uniport ». *Nature Cell Biology* 9 (4): 445-52. <https://doi.org/10.1038/ncb1556>.
- Urban, L., et A. Dray. 1991. « Capsazepine, a Novel Capsaicin Antagonist, Selectively Antagonises the Effects of Capsaicin in the Mouse Spinal Cord in Vitro ». *Neuroscience Letters* 134 (1): 9-11. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(91\)90496-g](https://doi.org/10.1016/0304-3940(91)90496-g).
- Valente, Pierluigi, Nuria García-Sanz, Ana Gomis, Asia Fernández-Carvajal, Gregorio Fernández-Ballester, Félix Viana, Carlos Belmonte, et Antonio Ferrer-Montiel. 2008. « Identification of molecular determinants of channel gating in the transient receptor potential box of vanilloid receptor I ». *The FASEB Journal* 22 (9): 3298-3309. <https://doi.org/10.1096/fj.08-107425>.
- Veldhuis, Nicholas A., Michael J. Lew, Fe C. Abogadie, Daniel P. Poole, Ernest A. Jennings, Jason J. Ivanusic, Helge Eilers, Nigel W. Bunnett, et Peter McIntyre. 2012. « N-glycosylation determines ionic permeability and desensitization of the TRPV1 capsaicin receptor ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (26): 21765–21772.
- Venkatachalam, Kartik, et Craig Montell. 2007. « TRP Channels ». *Annual review of biochemistry* 76: 387-417. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142819>.
- Venkatachalam, Kartik, Ching-On Wong, et Michael X. Zhu. 2015. « The Role of TRPMLs in Endolysosomal Trafficking and Function ». *Cell Calcium* 58 (1): 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.10.008>.
- Vlachová, Viktorie, Jan Teisinger, Klára Sušánková, Alla Lyfenko, Rüdiger Ettrich, et Ladislav Vyklický. 2003. « Functional role of C-terminal cytoplasmic tail of rat vanilloid receptor 1 ». *Journal of Neuroscience* 23 (4): 1340–1350.
- Voets, Thomas. 2012. « Quantifying and modeling the temperature-dependent gating of TRP channels ». In *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*, 91–119. Springer.
- Vriens, Joris, Giovanni Appendino, et Bernd Nilius. 2009. « Pharmacology of Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels ». *Molecular Pharmacology* 75 (6): 1262-79. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055624>.
- Wacquier, Benjamin, Laurent Combettes, Guy Tran Van Nhieu, et Geneviève Dupont. 2016. « Interplay Between Intracellular Ca(2+) Oscillations and Ca(2+)-Stimulated Mitochondrial Metabolism ». *Scientific Reports* 6 (janvier): 19316. <https://doi.org/10.1038/srep19316>.
- Wahl, P., C. Foged, S. Tullin, et C. Thomsen. 2001. « Iodo-Resiniferatoxin, a New Potent Vanilloid Receptor Antagonist ». *Molecular Pharmacology* 59 (1): 9-15. <https://doi.org/10.1124/mol.59.1.9>.

- Wang, Chunbo, Hong-Zhen Hu, Craig K. Colton, Jackie D. Wood, et Michael X. Zhu. 2004. « An alternative splicing product of the murine trpv1 gene dominant negatively modulates the activity of TRPV1 channels ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (36): 37423–37430.
- Wang, Ting, Yingmei Chen, Yong Li, Zhen Wang, Chenming Qiu, Dachun Yang, et Ken Chen. 2022. « TRPV1 Protect against Hyperglycemia and Hyperlipidemia Induced Liver Injury via OPA1 in Diabetes ». *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 256 (2): 131-39. <https://doi.org/10.1620/tjem.256.131>.
- Wang, Wuyang, Xiaoli Zhang, Qiong Gao, et Haoxing Xu. 2014. « TRPML1: An Ion Channel in the Lysosome ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 631-45. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_24.
- Watanabe, T., T. Kawada, M. Kurosawa, A. Sato, et K. Iwai. 1988. « Adrenal sympathetic efferent nerve and catecholamine secretion excitation caused by capsaicin in rats ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 255 (1): E23-27. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1988.255.1.E23>.
- Wegierski, Tomasz, Urs Lewandowski, Barbara Müller, Albert Sickmann, et Gerd Walz. 2009. « Tyrosine Phosphorylation Modulates the Activity of TRPV4 in Response to Defined Stimuli ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (5): 2923-33. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805357200>.
- Wei, Xiao, Xing Wei, Zongshi Lu, Li Li, Yingru Hu, Fang Sun, Yanli Jiang, et al. 2020. « Activation of TRPV1 Channel Antagonizes Diabetic Nephropathy through Inhibiting Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Contact in Podocytes ». *Metabolism: Clinical and Experimental* 105 (février): 154182. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2020.154182>.
- Wes, P. D., J. Chevesich, A. Jeromin, C. Rosenberg, G. Stetten, et C. Montell. 1995. « TRPC1, a Human Homolog of a Drosophila Store-Operated Channel ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (21): 9652-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.21.9652>.
- Weylandt, Karsten H., Cheng-Ying Chiu, Beate Gomolka, Simon F. Waechter, et Bertram Wiedenmann. 2012. « Omega-3 Fatty Acids and Their Lipid Mediators: Towards an Understanding of Resolvin and Protectin Formation ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 97 (3-4): 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.01.005>.
- Wieckowski, Mariusz R., Carlotta Giorgi, Magdalena Lebiezinska, Jerzy Duszynski, et Paolo Pinton. 2009. « Isolation of Mitochondria-Associated Membranes and Mitochondria from Animal Tissues and Cells ». *Nature Protocols* 4 (11): 1582-90. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.151>.
- Williams, George S. B., Liron Boyman, Aristide C. Chikando, Ramzi J. Khairallah, et W. J. Lederer. 2013. « Mitochondrial Calcium Uptake ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110 (26): 10479-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.1300410110>.
- Wills, Norma M., Barry Moore, Andrew Hammer, Raymond F. Gesteland, et John F. Atkins. 2006. « A Functional -1 Ribosomal Frameshift Signal in the Human Paraneoplastic Ma3 Gene * ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (11): 7082-88. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511629200>.
- Winter, Zoltán, Andrea Buhala, Ferenc Ötvös, Katalin Jósvay, Csaba Vizler, György Dombi, Gerda Szakonyi, et Zoltán Oláh. 2013. « Functionally important amino acid residues in the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) ion channel—an overview of the current mutational data ». *Molecular pain* 9 (1): 30.
- Wisnoskey, Brian J., William G. Sinkins, et William P. Schilling. 2003. « Activation of Vanilloid Receptor Type I in the Endoplasmic Reticulum Fails to Activate Store-Operated Ca²⁺ Entry ». *Biochemical Journal* 372 (2): 517-28. <https://doi.org/10.1042/bj20021574>.
- Woodbury, C. Jeffery, Melissa Zwick, Shuying Wang, Jeffrey J. Lawson, Michael J. Caterina, Martin Koltzenburg, Kathryn M. Albers, H. Richard Koerber, et Brian M. Davis. 2004. « Nociceptors lacking TRPV1 and TRPV2 have normal heat responses ». *Journal of Neuroscience* 24 (28): 6410–6415.
- Woolf, Clifford J., et Michael W. Salter. 2000. « Neuronal plasticity: increasing the gain in pain ». *science* 288 (5472): 1765–1768.
- Wu, Long-Jun, Tara-Beth Sweet, et David E. Clapham. 2010. « International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current Progress in the Mammalian TRP Ion Channel Family ». *Pharmacological Reviews* 62 (3): 381-404. <https://doi.org/10.1124/pr.110.002725>.
- Xin, Hong, Hideyuki Tanaka, Maki Yamaguchi, Shigeru Takemori, Akio Nakamura, et Kazuhiro Kohama. 2005. « Vanilloid Receptor Expressed in the Sarcoplasmic Reticulum of Rat Skeletal Muscle ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 332 (3): 756-62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.016>.
- Xing, Bao-Ming, Yan-Rui Yang, Jun-Xia Du, Hai-Jing Chen, Cai Qi, Zhi-Hua Huang, Ying Zhang, et Yun Wang. 2012. « Cyclin-Dependent Kinase 5 Controls TRPV1 Membrane Trafficking and the Heat Sensitivity of Nociceptors through KIF13B ». *Journal of Neuroscience* 32 (42): 14709-21. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1634-12.2012>.
- Xing, Hong, Meng Chen, Jennifer Ling, Weihong Tan, et Jianguo G. Gu. 2007. « TRPM8 Mechanism of Cold Allodynia after Chronic Nerve Injury ». *Journal of Neuroscience* 27 (50): 13680-90. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2203-07.2007>.

- Xu, Haoxing, I. Scott Ramsey, Suhas A. Kotecha, Magdalene M. Moran, Jayhong A. Chong, Deborah Lawson, Pei Ge, et al. 2002. « TRPV3 Is a Calcium-Permeable Temperature-Sensitive Cation Channel ». *Nature* 418 (6894): 181-86. <https://doi.org/10.1038/nature00882>.
- Xu, Hongshi, Yi Fu, Wei Tian, et David M. Cohen. 2006. « Glycosylation of the osmosensitive transient receptor potential channel TRPV4 on Asn-651 influences membrane trafficking ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 290 (5): F1103-9. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00245.2005>.
- Xu, Yixiao, Yongcai Zhao, et Binghong Gao. 2022. « Role of TRPV1 in High Temperature-Induced Mitochondrial Biogenesis in Skeletal Muscle: A Mini Review ». *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 10. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fcell.2022.882578>.
- Xu, Zhen-Zhong, Ling Zhang, Tong Liu, Jong Yeon Park, Temugin Berta, Rong Yang, Charles N. Serhan, et Ru-Rong Ji. 2010. « Resolvins RvE1 and RvD1 Attenuate Inflammatory Pain via Central and Peripheral Actions ». *Nature Medicine* 16 (5): 592-97, 1p following 597. <https://doi.org/10.1038/nm.2123>.
- Yang, Dachun, Zhidan Luo, Shuangtao Ma, Wing Tak Wong, Liqun Ma, Jian Zhong, Hongbo He, et al. 2010. « Activation of TRPV1 by Dietary Capsaicin Improves Endothelium-Dependent Vasorelaxation and Prevents Hypertension ». *Cell Metabolism* 12 (2): 130-41. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.05.015>.
- Yang, Fan, Yuanyuan Cui, KeWei Wang, et Jie Zheng. 2010. « Thermosensitive TRP Channel Pore Turret Is Part of the Temperature Activation Pathway ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (15): 7083-88. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000357107>.
- Yang, Fan, Xian Xiao, Wei Cheng, Wei Yang, Peilin Yu, Zhenzhen Song, Vladimir Yarov-Yarovoy, et Jie Zheng. 2015. « Structural Mechanism Underlying Capsaicin Binding and Activation of the TRPV1 Ion Channel ». *Nature Chemical Biology* 11 (7): 518-24. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1835>.
- Yang, Pu, et Michael X. Zhu. 2014. « TRPV3 ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 273-91. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_11.
- Yeh, Huei-Ming, Min-Hua Liao, Chun-Lin Chu, Yin-Hung Lin, Wei-Zen Sun, Ling-Ping Lai, et Pei-Lung Chen. 2020. « Next-Generation Sequencing and Bioinformatics to Identify Genetic Causes of Malignant Hyperthermia ». *Journal of the Formosan Medical Association*, septembre. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2020.08.028>.
- Yoneshiro, Takeshi, Sayuri Aita, Yuko Kawai, Toshihiko Iwanaga, et Masayuki Saito. 2012. « Nonpungent Capsaicin Analogs (Capsinoids) Increase Energy Expenditure through the Activation of Brown Adipose Tissue in Humans ». *The American Journal of Clinical Nutrition* 95 (4): 845-50. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.018606>.
- Yoshimoto, Tanihiro, et Yoshitaka Takahashi. 2002. « Arachidonate 12-Lipoxygenases ». *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 68-69 (août): 245-62. [https://doi.org/10.1016/s0090-6980\(02\)00034-5](https://doi.org/10.1016/s0090-6980(02)00034-5).
- Zeilhofer, Hanns Ulrich, Michaela Kress, et Dieter Swandulla. 1997. « Fractional Ca²⁺ Currents through Capsaicin- and Proton-Activated Ion Channels in Rat Dorsal Root Ganglion Neurons ». *The Journal of Physiology* 503 (1): 67-78. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.067bi.x>.
- Zhang, Feng, Andres Jara-Oseguera, Tsg-Hui Chang, Chanhyung Bae, Sonya M. Hanson, et Kenton J. Swartz. 2018. « Heat Activation Is Intrinsic to the Pore Domain of TRPV1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115 (2): E317-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717192115>.
- Zhang, Kaihua, David Julius, et Yifan Cheng. 2021. « Structural Snapshots of TRPV1 Reveal Mechanism of Polymodal Functionality ». *Cell* 184 (20): 5138-5150.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.012>.
- Zhang, Li Li, Dao Yan Liu, Li Qun Ma, Zhi Dan Luo, Ting Bing Cao, Jian Zhong, Zhen Cheng Yan, et al. 2007. « Activation of Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel Prevents Adipogenesis and Obesity ». *Circulation Research* 100 (7): 1063-70. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000262653.84850.8b>.
- Zhang, Ming-Jie, Yan-Wei Yin, Bing-Hu Li, Yun Liu, Shao-Qiong Liao, Chang-Yue Gao, Jing-Cheng Li, et Li-Li Zhang. 2015. « The Role of TRPV1 in Improving VSMC Function and Attenuating Hypertension ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 117 (2): 212-16. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.03.004>.
- Zhang, Xuming, Jiehong Huang, et Peter A McNaughton. 2005. « NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels ». *The EMBO Journal* 24 (24): 4211-23. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600893>.
- Zhang, Xuming, Lin Li, et Peter A. McNaughton. 2008. « Proinflammatory Mediators Modulate the Heat-Activated Ion Channel TRPV1 via the Scaffolding Protein AKAP79/150 ». *Neuron* 59 (3): 450-61. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.05.015>.
- Zhao, Rui, et Suk Ying Tsang. 2017. « Versatile Roles of Intracellularly Located TRPV1 Channel: ROLES OF INTRACELLULAR TRPV1 ». *Journal of Cellular Physiology* 232 (8): 1957-65. <https://doi.org/10.1002/jcp.25704>.

- Zholos, Alexander, Christopher Johnson, Theodor Burdyga, et Donal Melanaphy. 2011. « TRPM Channels in the Vasculature ». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 704: 707-29. https://doi.org/10.1007/978-94-007-0265-3_37.
- Zygmunt, P. M., J. Petersson, D. A. Andersson, H. Chuang, M. Sörgård, V. Di Marzo, D. Julius, et E. D. Högestätt. 1999. « Vanilloid Receptors on Sensory Nerves Mediate the Vasodilator Action of Anandamide ». *Nature* 400 (6743): 452-57. <https://doi.org/10.1038/22761>.
- Zygmunt, Peter M., et Edward D. Högestätt. 2014. « TRPA1 ». *Handbook of Experimental Pharmacology* 222: 583-630. https://doi.org/10.1007/978-3-642-54215-2_23.

Table des illustrations

Figure 1: Représentation schématique de la structure mitochondriale et de ses principaux constituants	7
Figure 2: Différents types de variations du $[Ca^{2+}]_c$ au sein d'une cellule	9
Figure 3 : Illustration de la répartition du Ca^{2+} dans la cellule avant et après stimulation.	11
Figure 4 : Flux calciques mitochondriaux	15
Figure 5: Dendrogramme montrant la parenté des protéines TRP	55
Figure 6 : Représentation schématique de la structure des sept sous-familles de TRP	57
Figure 7 : Aspects structuraux de TRPV1	65
Figure 8 : Structure chimique des principaux agonistes de TRPV1	71
Figure 9 : Structure chimique d'antagonistes de TRPV1	73
Figure 10 : Représentation schématique du contrôle de la thermorégulation par TRPV1 <i>via</i> des neurones sensibles à la chaleur.	83
Figure 11 : Représentation schématique de l'implication de TRPV1 dans la dépression synaptique à long terme (LTD).....	85
Figure 12 : Schéma de l'expression intracellulaire de TRPV1 et des flux calciques associés.	91
Figure 13 : Principe de clonage du système Infusion.	97
Figure 14 : Schéma de la stratégie de clonage du plasmide pcDNA5/FRT TRPV1mito à partir du plasmide pcDNA5/FRT TRPV1pm.	99
Figure 15 : Schéma de la stratégie de clonage des plasmides pcDNA5/FRT TRPV1mitoGFP et pcDNA5/FRT TRPV1pmGFP	101
Figure 16 : Principe d'intégration d'une séquence d'intérêt dans une lignée cellulaire à l'aide du système Flp-In.	105
Figure 17 : Schéma des étapes réalisées pour le fractionnement cellulaire.....	111
Figure 18 : Protocole utilisé pour la caractérisation de la respiration mitochondriale sur des cellules intactes avec le Seahorse XF96	117
Figure 19 : Représentation schématique des étapes du séquençage Sanger.....	131
Figure 20: Comparaison des séquences codantes de TRPV1pm et du variant DQ177332 (TRPV1mito).....	135
Figure 21 : Structure et expression du variant humain TRPV1mito	135
Figure 22 : Aspect phylogénique du variant TRPV1mito	137
Figure 23 : Identification de TRPV1 chez la souris	137
Figure 24 : Expression hétérologue transitoire de TRPV1pm et TRPV1mito.....	139
Figure 25 : Expression hétérologue stable de TRPV1pm et TRPV1mito	139
Figure 26 : Détermination de la localisation de TRPV1pm et TRPV1mito par microscopie à fluorescence.....	141
Figure 27 : Détermination de la localisation de TRPV1mito dans la lignée 293-TRPV1mitoGFP par microscopie à fluorescence.....	141
Figure 28 : Détermination de la localisation de TRPV1mito par fractionnement cellulaire	143
Figure 29 : Localisation intra-mitochondriale de TRPV1mito	143
Figure 30 : Identification des partenaires possibles de TRPV1mito	145

Figure 31 : Taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme dans les cellules HEK 293 WT exprimant TRPV1pm, TRPV1mito ou le vecteur vide (HEK 5FRT) à l'état basal'	147
Figure 32 : Taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry à l'état basal'	147
Figure 33: Taux de Ca^{2+} dans le cytoplasme $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dans les cellules HEK 293 WT, exprimant TRPV1pm, TRPV1mito ou le vecteur vide (HEK 5FRT) après un traitement avec la Résinifératoxine (RTX)	149
Figure 34: Taux de Ca^{2+} cytoplasmique $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry suite à un traitement avec la Résinifératoxine (RTX)	149
Figure 35: Taux de Ca^{2+} dans le réticulum endoplasmique $[\text{Ca}^{2+}]_{RE}$ dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry suite à un traitement avec la thapsigargine (TG)	151
Figure 36: Taux de Ca^{2+} dans les « hots spots » mitochondriaux $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{hots spots}}$ dans les cellules HEK 293 exprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry suite à un traitement avec la Résinifératoxine (RTX)	151
Figure 37: Taux de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale $[\text{Ca}^{2+}]_m$ dans les cellules HEK 293 WT, exprimant TRPV1pm, TRPV1mito ou le vecteur vide (HEK 5FRT) à l'état basal	153
Figure 38: Taux de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale $[\text{Ca}^{2+}]_m$ dans les cellules HEK 293 surexprimant la mCherry seule, TRPV1pm-mCherry ou TRPV1mito-mCherry à l'état basal	153
Figure 39: Influence de l'expression de TRPV1pm et TRPV1mito sur la respiration mitochondriale de cellules intactes.....	155
Figure 40: Influence de l'expression de TRPV1mito sur la respiration mitochondriale de cellules perméabilisées	157
Figure 41: Influence de l'expression de TRPV1mito sur le potentiel de membrane mitochondrial	159
Figure 42: Récapitulatif des résultats de mesure des variations de $[\text{Ca}^{2+}]$ dans les différents compartiments cellulaires des cellules HEK293 transfectées avec TRPV1pm ou TRPV1mito à l'état basal ou lors d'une activation par la RTX	173
Figure 43: Schéma bilan des effets hypothétiques liés à la surexpression de TRPV1pm ou TRPV1mito	177
Figure 44 : Canalopathies liées à TRPV1	183

Table des tableaux

Tableau 1 : Liste des amorces TRPV1 ciblant les exons n°1 et n°3 de la souris.....	97
Tableau 2 : Liste des amorces utilisées pour le clonage de TRPV1mito dans le plasmide pcDNA5/FRT.....	99
Tableau 3 : Liste des amorces utilisées pour le clonage de TRPV1mitoGFP et TRPV1pmGFP dans le plasmide pcDNA5/FRT.....	101
Tableau 4 : Liste des plasmides clonés.....	103
Tableau 5 : Composition des différents tampons utilisés pour le fractionnement cellulaire.	109
Tableau 6 : Caractéristiques des différentes sondes calciques utilisées.	113
Tableau 7 : Etape du protocole d'acquisition de la consommation d'O ₂ avec le Seahorse XF96.....	119
Tableau 8 : Composition des tampons de respiration « Rustin » utilisés pour les oxygraphies sur cellules perméabilisées	121
Tableau 9 : Préparation des substrats et des inhibiteurs de la chaîne respiratoire utilisées pour les oxygraphies sur cellules perméabilisées.....	121
Tableau 10 : Séquence d'injection et mode d'action des différents substrats et inhibiteurs de la chaîne respiratoire utilisés pour les oxygraphies sur cellules perméabilisées	123
Tableau 11 : Liste des amorces utilisées pour la détection des transcrits de TRPV1 par RT-qPCR chez l'homme	127
Tableau 12 : Composition des gels de migration utilisées pour le SDS-page.....	131
Tableau 13 : Liste des anticorps primaires utilisés ou testés pour la détection de différentes protéines suite à une électrophorèse sur gel SDS-page.....	133
Tableau 14 : Liste des anticorps secondaires utilisés ou testés pour la détection de différentes protéines suite à une électrophorèse sur gel SDS-page	133

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) **Beignon Florian**
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une
partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet,
constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées
pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **12 / 05 / 2022**

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex

Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00



Titre : Identification et caractérisation d'une isoforme mitochondriale du canal TRPV1 humain

Mots clés : TRPV1, Mitochondrie, Calcium, Thermogénèse

Résumé : Le rôle de la mitochondrie dans la production d'énergie cellulaire est universellement connu, mais son implication dans la thermogénèse cellulaire reste peu considérée et étudiée. Néanmoins, de récentes données indiquent que la température mitochondriale serait largement supérieure à celle de son environnement cellulaire et qu'elle pourrait atteindre 50°C. Dans l'optique de caractériser un thermostat mitochondrial, nous avons identifié un acteur moléculaire qui pourrait être impliqué dans la régulation de la thermogénèse mitochondriale: le canal TRPV1. En effet, TRPV1 est sensible à des températures élevées (>43°C) et son activité permet de générer des flux d'ions Ca²⁺, connu pour être un régulateur important de la fonction mitochondriale. Dans ce sens, nous avons identifié TRPV1mito, un variant du canal TRPV1 humain présentant une séquence d'adressage mitochondriale. Après avoir validé son adressage à la mitochondrie, nous avons

montré que TRPV1mito est impliqué dans la régulation de l'homéostasie calcique cellulaire et mitochondriale. Nos résultats suggèrent également que TRPV1mito est responsable d'une augmentation de la fuite de protons à travers la membrane interne mitochondriale et d'une diminution de son potentiel de membrane. De fait, l'identification et la caractérisation de TRPV1mito renforcent notre hypothèse d'un rôle dans la régulation de la thermogénèse mitochondriale, même si cela reste à démontrer. De plus, nos prédictions *in silico* indiquent que TRPV1mito serait présent uniquement chez les mammifères placentaires homéothermes, et constituerait un élément clé dans la compréhension des mécanismes évolutifs ayant abouti à l'homéothermie. Ces données permettent d'envisager une meilleure compréhension des mécanismes défailants du contrôle de la thermogénèse cellulaire, responsables de l'hyperthermie maligne et du coup de chaleur à l'exercice.

Title : Identification and characterization of a mitochondrial variant of the human TRPV1 channel

Keywords : TRPV1, Mitochondria, Calcium, Thermogenesis

Abstract: The role of mitochondria in cellular energy production is universally known, but its role in thermogenesis remains poorly considered. Nevertheless, recent data indicate that mitochondrial temperature would be much higher than the one of its cellular environment, and could reach 50°C. With the perspective to characterize a potential mitochondrial thermostat, we identified a molecular actor that could be involved in the regulation of mitochondrial thermogenesis, the TRPV1 channel. Indeed, TRPV1 is sensitive to high temperatures (>43°C) and its activation generates Ca²⁺ flux, an important regulator of mitochondrial function.

In this respect, we have identified a human TRPV1 variant with a mitochondrial targeting sequence, TRPV1mito. After validating its targeting to mitochondria, we demonstrated that TRPV1mito is regulating cellular and

mitochondrial calcium homeostasis. Our results also suggest that TRPV1mito expression leads to an increase in proton leak across the mitochondrial inner membrane and a decrease in its membrane potential. Thus, the identification and characterization of TRPV1mito support our hypothesis of its role in the regulation of mitochondrial thermogenesis, even if this latter point remains to be demonstrated. Moreover, our *in silico* predictions indicate that TRPV1mito is present only in homeothermic placental mammals, and would constitute a key element in understanding the evolutionary mechanisms that led to homeothermy.

Altogether, these data provide a fundamental basement for understanding the pathogenic mechanisms responsible for the excessive thermogenesis in exertional heat shock and malignant hyperthermia.