



HAL
open science

Rôle des interactions entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et de la stéatose hépatique

Agathe Beaulant

► **To cite this version:**

Agathe Beaulant. Rôle des interactions entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et de la stéatose hépatique. Réseaux moléculaires [q-bio.MN]. Université de Lyon, 2021. Français. NNT : 2021LYSE1133 . tel-03917550

HAL Id: tel-03917550

<https://theses.hal.science/tel-03917550v1>

Submitted on 2 Jan 2023

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.



N° d'ordre NNT :
2021LYSE1133

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

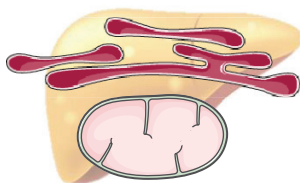
Opérée au sein de
L'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale N° ED 205
EDISS

Spécialité de doctorat : Biologie, Médecine et Santé
Discipline : Métabolisme

Soutenue publiquement le 12/07/2021, par :
Agathe BEAULANT

Rôle des interactions entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et de la stéatose hépatique



Devant le jury composé de :

Pr Christophe SOULAGE

Président

Dr Sophie GIORGETTI-PERALDI

Rapporteuse

Pr Steve LANCEL

Rapporteur

Dr Xavier PRIEUR

Rapporteur

Dr Jennifer RIEUSSET

Directrice de thèse

Dr Marie AVILLAC

Invitée

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Hubert**, pour son accueil au sein du laboratoire Carmen. Merci de m'avoir donné la chance de faire ma thèse entourée de la belle équipe 3. J'ai eu l'opportunité de finir ma thèse dans un magnifique laboratoire, avec tout le matériel possible et le confort pour finaliser au mieux ces 4 années ! Merci également pour tous vos bons conseils, vos encouragements et les nombreuses discussions portant sur l'avenir, notamment accompagnées d'Arthur.

Je tiens également à remercier mes rapporteurs **Dr Sophie Giorgetti-Peraldi**, **Pr Steve Lancel** et **Dr Xavier Prieur** d'avoir pris le temps de lire mon manuscrit et d'évaluer mon travail, ainsi que **Pr Christophe Soulage** qui me fait l'honneur de présider mon jury.

Un grand merci à ma directrice de thèse, **Jennifer** pour ces presque 5 années passées à vos côtés. Que le temps passe vite lorsqu'on est bien entouré ! Je me souviendrais toujours de nos premiers échanges de mail, au début de mon stage de master 2, lors desquels vous m'avez dit « J'espère réussir à te donner l'envie de faire une thèse ! ». Nous voilà 4 ans plus tard et 270 pages écrites... Je crois que c'est mission réussie ! Je n'aurais pu rêver d'une meilleure directrice de thèse pour m'accompagner au quotidien. Merci pour votre patience, votre ouverture d'esprit, votre mémoire infailible (qui compense la mienne complètement faillible !), votre motivation sans faille, votre dévouement sans limite, pour tous vos précieux conseils, et vos nombreux encouragements, et surtout merci pour la rigueur que vous m'avez apprise. Merci pour toutes ces heures de discussion au téléphone ou dans votre bureau... et malgré tout ça nous n'avons toujours pas trouvé un remède contre le diabète ??? Est-ce qu'on ne se ferait pas une dernière prolongation pour enfin guérir le DT2... ? Non en fait pas besoin vous y arriverez sans moi ! La recherche ce n'est pas juste votre profession, mais bien votre passion, vous dédiez votre vie à la recherche. J'en suis très admirative. C'est grâce à des personnes comme vous que la recherche continue et continuera à avancer. Alors merci au nom de l'humanité ! (tout simplement !). Et enfin merci au nom de tous les doctorants de CarMeN, toujours de bons conseils, vous êtes notre « maman » à tous, celle qui vole à la rescousse des étudiants, alors encore une fois merci.

Je suis ravie d'avoir pu faire un bout de chemin avec vous, ce fut extrêmement enrichissant d'évoluer à vos côtés, petit embryon de M2 est passé au stade de bébé docteur. Même si ces 4 années n'ont pas toujours été faciles, je ne garderai que les bons moments en souvenir de notre collaboration. Au plaisir de pouvoir collaborer à nouveau à vos côtés !

Marie, quelle aventure ces enseignements ! Aux côtés, de ce bon vieux Arthur Bassot, des promos incroyables, adorables et d'une très grande bienveillance, et d'autres plus compliquées... Ce fut une expérience géniale, digne des plus grandes montagnes russes ! Cela m'a permis de prendre confiance en moi et d'assurer devant des étudiants de tout âge. Merci de m'avoir permis de vivre tout cela. Merci

pour ta bienveillance, ton accessibilité, ta gentillesse et tous les bons petits restaurants que nous avons fait.

MAC, ma deuxième maman du labo, la légende de CarMeN...le moteur de CarMeN ! Quelle chance j'ai eu de travailler avec toi ! Merci pour tous les précieux conseils que tu m'as prodigué, merci pour les nombreuses fois à me rassurer, et me filer un coup de main dans l'isolation de MAMs (pour toutes les autres manip ahah) ! Je garderai un doux souvenir de toutes nos discussions en WB, merci pour ta bonne humeur, ton humour, ta gentillesse et ta bienveillance au quotidien. Et merci pour ces derniers mois de manip ! La thèse aurait été bien fade sans toi à mes côtés.

Jiji, ma troisième maman du labo, toujours disponible et présente pour moi. Tout comme MAC, merci pour tous tes bons conseils et le partage de ton expertise. Tu es la douceur et la gentillesse incarnée ! Ne change rien Jiji et merci pour tout !

Clémence, ma Clémi, comme je suis heureuse d'avoir croisé ton chemin. Merci pour ta gentillesse, ta bienveillance, tes milliers de bons conseils professionnels et dans la vie tout simplement (nutrition et sport ahah), mais pas que... merci pour tous ces moments de rigolade qu'on a pu avoir au labo ! J'ai hâte de passer vous voir à Clermont et de faire connaissance avec ton petit bouchon.

Bérangère, ou Serena pour les intimes, tu fus (trop) peu de temps ma collègue de bureau, mais suffisamment pour partager des tas de chose ! Merci pour toutes les conversations qu'on a pu avoir au bureau et pour les comptes rendus Gossip Girl. Ce fut un réel plaisir de te découvrir et de passer ces quelques mois à tes côtés. Et merci pour le plus beau sapin de Noël de porte jamais fait de tous les temps ! On attend toujours le premier prix, que l'on mérite amplement ! ahah. Et merci à ton acolyte **Audrey**, pour tous les débriefings « Mariés au premier regard » ainsi que les rapports « potin » du labo...

Un grand merci aux filles du plateau génomique, **Sandra, petite Manue et grande Manue**, pour tous vos bons conseils et vos gentils mots au quotidien ! Quel plaisir de venir dans ce petit îlot de sérénité dans le laboratoire, le jardin zen de CarMeN, net précis, toujours parfaitement rangé et organisé... que du bonheur ! Ce fut un plaisir de travailler à vos côtés.

Merci à **Stéphanie et Aurélie** pour votre aide tout au long de mon projet, pour tous les Oil Red O, les PLA et tout le reste... Merci aussi pour votre patience sans faille pour toutes les fois où je suis venue dans votre bureau : « Questions... ! ». Je suis fière d'avoir été votre 100^{ème} projet ahah. Et merci à votre fidèle acolyte Pascal, pour tes mots doux et ta gentillesse au quotidien, tu as su ensoleiller de nombreuses journées !

Merci à **Anne** pour toutes les discussions scientifiques et les bons conseils que vous avez pris le temps de me prodiguer tout au long de ma thèse. C'était à chaque fois un plaisir de discuter avec vous.

Nadia, Christine, et Bruno pour votre aide tout au long de mon projet. Tout ce travail n'aurait pas pu aboutir sans tous vos PLA, WB et hépatocytes isolés et j'en passe... Merci à vous pour ce travail d'équipe !

Merci à tout l'équipe du CRNH pour votre gentillesse et votre accueil chaleureux de nombreux midis !

Merci à mon équipe d'adoption, le B13, **Mélanie, Maya, Alexandre, Yves, Nolwenn** pour tous les bons conseils et pour l'accueil régulier dans cette salle noire et froide. D'ailleurs merci à toi, Yves, pour ces nombreuses pannes de clim, tu as su mettre du piment à toutes ces séances... aujourd'hui doudoune ou maillot de bain ?! Nolwenn merci pour toutes les offres de post-doc que tu as pris le temps de m'envoyer ! Merci pour ta gentillesse et ta bonne humeur ! Alex, l'étudiant modèle, l'Action Man de CarMeN, capable de tout mener de front et de tout réussir, ta soutenance était super et je te souhaite un aussi bel avenir dans la recherche ! Ce fut un plaisir de croiser le chemin de notre futur prix Nobel ! ;) Je n'en attends pas moins de toi... ! Maya et Mélanie merci pour toute votre aide sur mon projet, merci pour votre bonne humeur et votre énergie quotidienne !!!

Merci à Flo et Arthur mes mentors, l'équipe 3, MAMs forever <3, merci pour vos nombreux protocoles, conseils et pour la rigueur que vous m'avez appris. Merci aussi (et surtout) pour toutes ces soirées, pour mon éducation scientifique et festive, et surtout pour cette semaine de congrès mémorable à vos côtés, à Arosa, chez les Chuisse.

Mon Flo, que de chansons et de chorégraphies de Noël et de Lalaland à tes côtés... Jeune caneton est devenu un beau canard. Merci pour toutes les fois où tu m'as rassuré dans mes manip, où tu m'as nourri avec des tagada, où tu as râlé et pardon pour toutes les fois où j'ai pris grand plaisir à te faire râler ahah « Si je t'assure, tu es pessimiste Flo » ;p

Oh Bassot, que dire ! Merci pour tout, les soirées, les conseils, les blagues misogynes (non je déconne ça il va falloir te calmer !), et je ne parle pas des blagues envers les Roumains... ahah sacré Bassot ! Heureusement que tu as été le plus grand gentleman du laboratoire. Merci d'être toi, le passionné de recherche, qui peut parler des heures et des heures des MAMs à 3h du mat, très fonfon mais toujours passionné à refaire le monde. En revanche Bassot, changer le monde, changer le monde tu es bien sympathique mais déjà te lever le matin. Je ne sais pas si tu es au courant mais le monde il t'attend pas, il bouge, et il bouge vite ! Parce que là tu es en vacances très bien. Mais à la rentrée, tu y as pensé à l'année prochaine ? C'est le vrai monde dehors, et le vrai monde il va chez le coiffeur, déjà. Que de bons souvenirs de cette thèse aux côtés de toi et Flo.

Anne-Esther, Camille, Arthur, Flo, Anaïs, François, Pauline, Julien, Johan, Laura, Guillain, Edel, Alexandre, Rémy, Marie-Michèle, Chloé, je peux vous assurer, que je ne vais garder

que de beaux souvenirs de ma thèse et ça c'est grâce à vous tous. Merci pour cette bonne ambiance quotidienne, pour tous ces discussions et ces fous rires à vos côtés.

Je tiens également à remercier **Jean-Jacques Goldman** et **Céline Dion** qui m'ont accompagné pendant des heures et des heures durant mes manip, qui m'ont mis du baume au cœur tous les jours. C'est aussi grâce à vous que nous avons passé d'aussi bonnes soirées tous ensemble.

Ma Camille, merci d'être toi, toi et ton second degré, mais aussi toi et ta gentillesse quotidienne. Depuis mes débuts dans le laboratoire, nous avons toujours partagé le même bureau. Et je dois dire qu'on a passé de bons moments au bureau, de bons fous rires, et de bonne bouffe avec Clémence puis avec Laura à nos côtés ! Merci pour ta bienveillance et pour tous tes conseils nutrition « mais Agathe tu es encore en train de manger ?? » J'espère venir visiter votre nouveau chez vous à toi et Éric !

Merci **Laura**, notre Strasbourgeoise d'adoption Québéco-lyonnaise. Tu commences à en accumuler des nationalités... tu vas bientôt rattraper notre Camille ! ;p Merci pour ce partage de bureau, ces nombreuses, nombreuses, nombreuses discussions ahah et merci d'avoir accompagné ma gourmandise quotidienne envers et contre tous les conseils nutritionnels de notre diététicienne personnelle. Ahah

Pauline, Julien et Johan, les Totally Spies de CarMeN. Une Parisienne, un Normand et un Savoyard... le combo de choc ! Les petits nouveaux qui ont su amener un élan de jeunesse (et de folie) à nos soirées ! Johan l'infatigable jeune chiot, le casseur de verre, toujours de bonne humeur, c'est un plaisir de partager des moments avec toi ! Julien, le petit taquin toujours plus créatif dans les blagues (merci pour tous ces fous rires que j'ai pu avoir !), merci pour les danses endiablées sur Jean-Jacques et Céline, et merci d'avoir toujours répondu présent pour s'égosiller sur du Johnny. En revanche je ne te remercie pas pour toutes les fois où tu as oublié mon prénom, c'est uniquement pour ça que j'ai prolongé ma thèse. C'est bon maintenant c'est intégré ? AGATHE. Et Pauline, jeune maman de la petite Nala, toi qui fut la plus raisonnable, la sagesse incarnée, tu as su canaliser ces deux zigotos ! Si tu as su faire ça, la thèse c'est les doigts dans le nez ! ahah. Au plaisir de faire encore de nombreuses soirées à vos côtés.

Anaïs et François, vous êtes si mignons tous les deux... Deux amours, au grand cœur, généreux, bienveillants, vous étiez fait pour être ensemble ! En revanche, je dois l'avouer mon Francis, tu gagnes au niveau du râlage quotidien non justifié ahah. Merci pour votre soutien ces derniers mois, vous avez complètement participé à cette réussite ! Merci à toi Anaïs pour toutes ces conversations, ces rigolades et pour tous tes mots gentils. Merci Francis pour ton aide et tes petites attentions réconfortantes (tout en râlant évidemment). Un grand merci à vous deux.

Merci l'équipe des survivants Lyonnais, **Étienne, Valentin, Wass et Mathilde** d'avoir toujours répondu présents à tous ces petits restos. Même si nos rendez-vous étaient moins fréquents que nous

l'aurions aimé, ce fut à chaque fois un plaisir de partager ces moments à vos côtés ! J'espère à très très vite pour un nouveau resto !!!

Merci **Arthur et Anne-Esther** et petit Louis, pour les nombreux accueils, tous aussi chaleureux les uns que les autres, au 116 avenue Berthelot. Des soirées qui m'ont permis de faire la connaissance de personnes supers **Thib, Luce, Lardon, Gaëtan, François**, avec qui nous avons partagé de belles soirées Lyonnaises, Auboises, et même Drômoises...

Merci à **ma Cécile et mon Théo**, l'expérience du troupe fut incroyable à vos côtés (et elle est pas encore terminée !). Merci à vous pour tout le soutien que vous m'avez toujours apporté, pour toutes les fois où vous m'avez nourri avec les petits plats des HCL ou les petits plats fait par tes soins ma Cécile. Merci d'avoir emménagé en face de chez moi, grâce à vous le confinement parut plus doux à vos côtés. En revanche, je ne suis pas sûre de vous remercier pour la soirée tarte au citron qui a taché le mur de ma salle de bain ahah. Merci pour votre amour, votre gentillesse, votre générosité, et votre confiance. Merci ma Cécile de me faire l'honneur d'être ta témouine, je vais faire de mon mieux pour remplir ma mission. Merci mon Théo pour ton amour pour le sport, grâce à la fine collaboration que vous avez entrepris avec Anne-Esther je me suis mise au sport... entre le 10km de Lyon et les roulades à Since The Cavern que de calories perdues ! Merci pour les soirées qui commencent par « Je vous préviens je me couche pas à 8h du mat ! » et qui se terminent à 7h59. Pour nos nombreuses soirées mémorables, karaoké, danse du saumon, dégustation de pâté au Wallace, les petites bières au Pamp', les SDF propres, les lendemains de soirée Macdo, les 1 janviers devant des documentaires sur le Canada... et j'en oublie sûrement beaucoup d'autres ! Merci merci merci pour tout ce que vous avez fait, je vous love les copains.

Mon Moutmout, merci pour toutes ces bonnes soirées à Reims, aux côtés de notre internationale Valou. Que de bonne soirée avec vous tous durant nos années rémoises ! Et merci pour toutes ces Vacances sous le soleil d'Isle-sur-la-Sorgue, hâte de notre prochain week-end tous ensemble !

Ma Laurie, Loulou, à toutes nos soirées pyjamas, crêpes, fondue au chocolat avec Jean-Roch et Benjamin... Merci à toutes nos après-midis karaoké Lorie ! Premier concert de toute ma vie avec toi, et des jumelles pour observer Lorie sur la scène ahah. On se voit moins souvent qu'on ne le voudrait mais c'est toujours un plaisir de te retrouver Loulou !

Un petit cookie **mon Patrick** ? Ma déesse de la Cobalothérapie, la reine des gâteaux, de l'humour noir et malaisant ahah. Tellement de souvenirs avec toi, des soirées jeux vidéo, gaufrette, et Tracy Chapman à Troyes, une coloc à Reims avec Dridri et sa chambre verte, beaucoup de fous rires, de travail et de dépression... mais une amitié solide toujours bien présente ! Merci pour tout, et pour ta générosité sans limite mon Pat'. Tu es loin maintenant mais toujours aussi importante à mes yeux, j'ai hâte de venir découvrir ton chez toi au pays du Rhum ! :)

Cathy, ooooh ma copine, merci les parents... grâce à eux on a vécu notre meilleure enfance ! Les repas desserts, les journées bricolages tous ensemble, et soirées poteries !!! Merci aussi pour les dizaines et dizaines de restaurants que nous avons pu faire. Je tiens également à remercier tous les serveurs pour leur patience (ou pas) « c'est bon vous avez fait votre choix ? » « Ah non on n'a pas même pas ouvert la carte ». À toutes les fois où nous avons fait la fermeture des restaurants, à ces heures de discussion où on n'a pas eu le temps de tout se dire... Merci pour tes milliers de bons conseils, pour tout ce que tu m'apportes, pour la confiance que tu me fais, merci d'avoir fait de moi une témouine ! Merci à notre voyage en Angleterre avec Chloé, et à celui de Rome, là où notre amitié a commencé. Merci copine <3

Cyprien, mon Bibouche, mon petit chat, nous voilà 10 ans après le partage du panini Savoyard du moulin de Paul (Pierre ?!). Un lycée, un beau charpentier en commun (#papaBeaulant), une option art, un mirage nommé Hélène, des tartines de munster au petit déjeuner... il ne nous en fallait pas plus pour créer de toute pièce une amitié folle qui dure et durera malgré nos parcours différents ! On en parle de ce petit voyage improvisé à Tokyo ? Des beignets saucisses ? de cette soirée au Womb ? du thé chez l'empereur ? des bains tout nus ? Un voyage de folie à tes côtés mon chat. Merci pour tous ces appels remplis de mots doux et pour toutes les lettres débordantes d'amour que tu as pu m'écrire et que je garde précieusement. Merci pour tout ce que tu es, pour ton énergie, ta bonne humeur, ton amour, tout simplement. Love mon chat.

Merci à toute ma famille, mes oncles et tantes, mes cousins, cousines d'amour, à tous pour votre amour, votre soutien et vos mots doux à chaque fois que l'on s'est retrouvés.

Merci à vous, **les Claudes**, pour ces weekend parisiens et rémois, hauts en couleur. Sœur je crois qu'on a déconné avec les petites cousines... ahah. Tellement de fous rires, et de souvenirs avec vous. J'espère qu'on saura refaire des week-ends aussi fofous que ceux-là ! Je vous love.

Mon cœur, grâce à toi j'ai rencontré de très belles personnes, **Apo, Daniel, Kostas, Yuto**, merci pour toutes ces dégustations et ces weekends à Colmar ou à Morzine à vos côtés. Pardon pour ces derniers weekends annulés à cause de moi ! On va se rattraper promis.

Merci aussi à **Flo, Claire, et la petite Olivia** pour tous ces petits moments partagés avec vous, et merci Flo pour les précieux conseils de Docteur.

Merci également à **Lyndsay et Romain** pour toutes les soirées jeux de sociétés ou Just Dance ! Hâte de vous revoir autour d'un nouveau jeu !

Anne-Esther, mon acolyte, la plus bonne de mes copines, LA rencontre de cette thèse, ma personnel shopper, ma boxeuse pref (et la pref de Patou et d'Hervé aussi !), ta rencontre restera le

meilleur souvenir de cette aventure. Tu es une personne incroyable, pleine d'énergie, de bonnes idées, la personne la plus organisée que je connaisse, capable d'être sur tous les fronts, et d'exceller dans tout ce que tu entreprends. Tu donnes tout pour les gens que tu apprécies, je le savais déjà, mais ces derniers mois tu as su tout donner pour moi et je t'en suis tellement reconnaissante ! Tu as été mon socle, celle qui accourt à Mâcon dès que je faiblis, qui m'aide dans tout, qui m'a attendu tellement de fois (pardoooooon), qui adapte ses séances de sports pour moi, qui me rassure, qui m'habille, qui corrige mes nombreuses fautes d'orthographe, qui m'a fait un gâteau de malade mental pour mes 25 ans !!! Bref tous ces mots ne suffiront pas pour te dire à quel point je suis reconnaissante d'avoir passé ces années à tes côtés... Et encore je n'ai pas parlé, des nombreuses discussions en retour de soirée sur les vélov', des soirées top chef et le clou du spectacle, l'apogée de ces 4 années... ces vacances en Corse mémorables avec ma Cécile, 4 jours improvisés... des fous rires, des apéros, des chants Corses, des nausées dans la twintwin, mais aussi des chants dans la twintwin, des plages, une danse de la séduction pour avoir Céline et Jean-Jacques, des insectes (beaucoup trop), des coups de soleil, tellement de choses en si peu de temps. Ce n'est que le début, et au vu de ce qu'on a déjà vécu j'ai hâte que tout ça continue !!!
Merci mille fois pour tout ce que tu as fait, Love copine <3

Merci à **beau-papa et belle-maman** pour votre soutien et votre générosité. Cécile merci pour le temps que tu as accordé à la correction de mon manuscrit ! Est-ce que j'ai le droit à une carte de fidélité gommettes rouges pour toutes mes fautes d'orthographe ? Merci pour ta patience et tes encouragements. Et puis merci d'avoir fait de Tinou, un Homme attentionné et aimant !

Merci à **Lucas**, beau-frère toujours partant pour boire un coup et assez fou pour vouloir faire une thèse... ahah Je te souhaite de vivre une expérience aussi chouette, et même encore meilleure, que celle que j'ai vécu !

Merci à **Michel et Francine**, pour votre accueil pour le café, votre super barbecue, vos nombreuses petites attentions, et vos gentils mots de soutien. Grâce à vous j'ai découvert les vacances au ski, les joies de la montagne et la beauté de Morzine enneigé ! Alors merci pour tout cela.

À ma mamie Nenette et mon papi Jean. Très souvent, je ferme les yeux et je repense à tous ces bons moments passés avec vous. Ces goûters le dimanche avec vous, la canada dry de papi, les petits biscuits cœur et les gaufrettes framboises, les verveines oubliées sur la fenêtre, les tours de camionnette avec papi, les dimanches choucroute, les Noël's tous ensemble, la chaleur de la cheminée, les passages en coup de galop... J'aurais aimé que vous soyez là pour partager ce moment, vous me manquez. Vous restez et resterez à jamais dans mon cœur.

Ma petite mamie d'amour, c'est toi qui m'as appris à regarder le monde qui nous entoure avec un regard plein de curiosité. Toujours avide de savoir, de connaissances. Tu as su nous remplir la tête, ma sœur et moi, de souvenirs merveilleux avec ta culture incroyable, ton talent pour la cuisine, le savoir vivre, l'art de recevoir, ton amour pour le jardin (et surtout pour les tours de jardin !), pour nos vacances

en Bretagne, et nos nombreuses vacances avec Alice à l'autre bout du village... quelle aventure ! Le petit carré de chocolat devant la télé, le poulailler avec nos lapins qui se transformaient vite en pâté, à tous ces Noël, tous ensemble dans la joie, les rigolades, des Noël qui débordaient d'amour, de truffes au chocolat et de boules roses ! Merci de m'avoir apporté autant de bonheur et d'amour durant toutes ces années, ta Gatoune te remercie pour tout tout tout ma petite mamie, Love.

Mon cœur, mon huitre, mon putain de chat, déjà 7 ans à tes côtés, et maintenant un chez nous. Merci à toi pour toutes ces années d'amour, d'«humour» (c'est pas une erreur de frappe les guillemets hein), pour tous tes « C'est bon tu as fini ta thèse ? » quotidiens, pour avoir supporté tous mes « Je suis fatiguééééé » matin, midi et soir, pour tous les superbes voyages que nous avons fait ensemble et à tous nos prochains... Merci de m'avoir supporté ces derniers mois, merci de m'encourager, de me soutenir et de me pousser à trouver ma voie... Tu sais canaliser mes torrents d'émotion avec ta sérénité à toute épreuve. Parfois si différents mais en fait si complémentaires ! Le temps passe si vite à tes côtés, j'ai hâte de découvrir ce que l'avenir nous réserve. Mais je suis sûr que nous allons continuer à vivre de belles aventures ensemble. Je t'aime.

Ma sœur d'amour, ma meilleure amie, mon indispensable, mon âme-sœur, ma confidente. Que ce fut dur lorsque tu es partie vivre à l'autre bout du monde ! Mais on est solide, notre relation n'a fait que s'embellir d'années en années. Quel courage tu as eu de partir vivre cette aventure, j'ai tellement d'admiration pour ça ! Tu as toujours su suivre ton instinct sans te poser de questions, foncer, vivre ta vie à fond, comme maman, les artistes de la famille ! les électrons libres ^^ surtout ne pas essayer de vous contenir ahah. Merci d'être ce que tu es, grâce à toi nous nous sommes ouverts au monde qui nous entoure, à une nouvelle culture. Grâce à toi, j'ai vécu mes plus beaux voyages, j'ai une chance immense d'être ta sœur. J'ai hâte de rencontrer Shota San, et de vous serrer dans mes bras (choc des cultures assuré !). Tu as encore montré tout ton courage et ta persévérance quand tu as présenté le MOF... un projet parmi tant d'autres, 1 journée se passe et déjà tu planifies des milliers de projets tous aussi fous et incroyables les uns que les autres. Quelle fierté d'être ta sœur, tu m'inspires au quotidien. Je ne pourrais pas énumérer les nombreux souvenirs que j'ai à tes côtés tout aussi beaux les uns que les autres, impossible de choisir ! Même si j'ai été ton jouet en tant que petite sœur, moi la testeuse de potion magique, celle qui court devant la voiture pour vérifier qu'il n'y a pas de gendarmes, madame boncoeur comme tu dis ! Ton retour dans ton Montreuil natal, ne sera sans doute pas tous les jours facile, mais il est synonyme de pleins pleins de nouvelles aventures à tes côtés ! et ça, ça me réjouit tellement ! Bref, je t'aime sœur.

Mamounette et Papounet, je me souviens encore de vous avoir appelé en pleurs sur le parking de la fac après avoir été acceptée en thèse. Et je m'imagine déjà en pleurs sur ce même parking dans vos bras lorsque je serais Docteur. La boucle est bouclée. Cette réussite je la dois en très très grande partie à vous. 200 pages ne suffiraient pas pour vous dire à quel point je suis reconnaissante de tout ce que

vous avez pu faire pour ma sœur et moi. Vous êtes un exemple pour nous, vous nous avez et continuez à nous montrer ce que c'est que le courage, le goût des choses bien faites (Attention, Entreprise Beaulant gage de qualité depuis de nombreuses générations !), et le goût de l'effort. Tout cela, c'est grâce à vous et votre dévouement au quotidien pour tout ce que vous entreprenez. Ces derniers temps, vous m'avez dit « être courageuse de faire une thèse », je ne suis pas d'accord, si des personnes sont courageuses ici, c'est bien vous, des années de travail acharné pour l'entreprise et pour nous soutenir ma sœur et moi, alors mes petits parents c'est vous les courageux. Que je suis fière d'être votre fille. S'ajoute à cela, tout l'amour que vous nous avez donné depuis notre tendre enfance et qui nous a permis de nous épanouir pleinement ma sœur et moi (ça ne te gêne pas sœur si je parle pour toi ?). Merci pour tous ces pique-niques, pour toutes les balades en forêt, pour tous les voyages dans le Scenic (avec des tablettes pour goûter !!!), pour ces bons moments tous les 4. Merci de m'avoir suivi pendant ces longues études, merci pour votre soutien au quotidien, pour votre amour infini, merci pour les week-ends « campagne » à la maison où vous m'avez tant dorloté. Une fille à sa moman et à son popa, pourrie gâtée et dorlotée quotidiennement. Si j'ai pu réussir ces belles années d'études c'est grâce à vous et l'environnement douillet que vous avez su créer. Alors merci merci merci. Et vive nous 4 ! Je vous aime fort mes petits parents.

A vous tous, qui par un simple geste ou un sourire m'avez apporté toute l'énergie et le courage nécessaire durant ces dernières années. Merci.

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	1
TABLE DES MATIERES.....	3
RESUME.....	7
ABSTRACT.....	9
LISTE DES ABREVIATIONS.....	11
LISTE DES FIGURES.....	20
PUBLICATIONS, CONGRES, COMMUNICATIONS ET ACTIVITES COMPLEMENTAIRES A LA RECHERCHE.....	23
INTRODUCTION.....	28
I. PARTIE 1 : FOIE ET DIABETE.....	29
A. LE FOIE : UN ORGANE CENTRAL DANS LE CONTROLE DE L'HOMEOSTASIE ENERGETIQUE.....	29
(1) <i>Généralités</i> :.....	29
a) Anatomie et zonation métabolique.....	29
b) Fonctions hépatiques principales.....	32
(2) <i>Métabolisme hépatique</i>	34
a) Flexibilité métabolique.....	35
b) Contrôle hormonal de l'homéostasie glucidique.....	38
(3) <i>Deux organites clés du métabolisme : la mitochondrie et le RE</i>	41
a) La mitochondrie.....	42
b) Le RE.....	49
B. LE DIABETE DU TYPE 2.....	51
(1) <i>Vue d'ensemble des Diabètes</i>	51
a) Les différents types de diabètes.....	51
(1) Diabète de type 1 (DT1).....	51
(2) Diabète de type 2 (DT2).....	52
(3) Diabète gestationnel (DG).....	53
(4) Autres diabètes : les diabètes non classés.....	53
b) Un peu d'histoire.....	53
c) Epidémiologie du DT2.....	55
(1) Le DT2 dans le monde.....	55
(2) Le DT2 en France.....	57
(2) <i>Physiopathologie du DT2</i>	57
a) Les altérations.....	57

b)	Les complications.....	58
c)	Les facteurs de risques	59
d)	Les outils diagnostiques et traitements.....	61
(3)	<i>Atteintes hépatiques associées au DT2</i>	62
a)	Inflexibilité métabolique	62
b)	Insulino-résistance hépatique	65
(1)	Voie JNK/MAPK dans l'IR.....	67
(2)	Voie IKK/NFκB dans l'IR.....	68
c)	Stéatose hépatique ou NAFLD.....	68
II.	PARTIE 2 : LES MECANISMES MOLECULAIRES DE L'INSULINO-RESISTANCE ET DE LA STEATOSE HEPATIQUE.....	69
A.	MECANISMES DE L'INSULINO-RESISTANCE	69
(1)	<i>L'inflammation</i>	69
(2)	<i>Lipotoxicité</i>	71
(3)	<i>Stress du RE</i>	73
(4)	<i>Dysfonctions mitochondriales</i>	75
B.	MECANISME DE LA STEATOSE HEPATIQUE	81
(1)	<i>Altérations mitochondriales et métabolisme du pyruvate</i>	81
(2)	<i>Altération du métabolisme lipidique</i>	84
(3)	<i>Dysbiose intestinale</i>	89
III.	PARTIE 3 : LES MAMS (MITOCHONDRIA-ASSOCIATED MEMBRANES).....	93
A.	DE LEUR DECOUVERTE A LEURS ROLES PHYSIOPATHOLOGIQUES	93
(1)	<i>Une histoire de communication</i>	93
(2)	<i>Structure des MAMs</i>	95
(3)	<i>Fonctions des MAMs</i>	99
(4)	<i>Régulations des MAMs</i>	109
(5)	<i>Physiopathologie des MAMs</i>	113
a)	MAMs – maladies neurodégénératives	114
b)	MAMs – cancer.....	115
c)	MAMs – inflammation/immunité	117
B.	PRINCIPALES TECHNIQUES D'EXPLORATION DES MAMS.....	120
(1)	<i>Etude structurale</i>	122
(2)	<i>Etude fonctionnelle</i>	122
(3)	<i>Modulation des MAMs</i>	123
(a)	Linkers.....	125

(b) FATE1	125
C. MAMs ET DESORDRES METABOLIQUES HEPATIQUES	126
(1) MAMs – Inflexibilité métabolique	126
(2) MAMs – IR.....	129
(3) MAMs – stéatose hépatique.....	133
OBJECTIFS DE THESE ET RESULTATS.....	138
I. PARTIE 1 : LES ALTERATIONS STRUCTURALES ET FONCTIONNELLES DES MAMs SONT DES PHENOMENES PRECOCES ET CAUSALS DANS L’INSULINO-RESISTANCE ET LA STEATOSE HEPATIQUE.....	141
A. RESUME	141
B. SCHEMA BILAN	146
C. ARTICLE N°1: « ER-MITOCHONDRIA MISCOMMUNICATION IS AN EARLY AND CAUSAL TRIGGER OF HEPATIC INSULIN RESISTANCE AND STEATOSIS ».....	147
II. PARTIE 2 : L’ALTERATION STRUCTURALE DES MAMs DANS L’OBESITE ET L’INSULINO-RESISTANCE EST UN PHENOMENE RECURRENT ET INDEPENDANT DU FOND GENETIQUE.	192
A. RESULTATS NON PUBLIES :	192
B. SCHEMA BILAN	203
III. PARTIE 3 : PRESERVATION DES FONCTIONS INTRINSEQUES DU CA²⁺ INTRACELLULAIRE ET DU COUPLAGE EXCITATION-CONTRACTION DANS LA FIBRE MUSCULAIRE DE SOURIS OBESE.	204
A. RESUME	204
B. SCHEMA BILAN	205
C. ARTICLE N°2 EN COLLABORATION : « PRESERVED CA ²⁺ HANDLING AND EXCITATION–CONTRACTION COUPLING IN MUSCLE FIBRES FROM DIET-INDUCED OBESE MICE ».....	205
DISCUSSION.....	217
BIBLIOGRAPHIE.....	236

Résumé

Titre/ Résumé/ mots clefs

Titre : Rôle des interactions entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et de la stéatose hépatique.

Résumé :

L'obésité, le diabète de type 2 et la stéatose hépatique non-alcoolique, pathologies en pleine expansion depuis ces dernières années, sont intimement liées à l'insulino-résistance et à la stéatose hépatique ; pourtant les mécanismes moléculaires de ces atteintes métaboliques restent mal compris. Récemment, notre équipe a identifié un nouveau rôle des contacts entre la mitochondrie et le réticulum-endoplasmique (RE) (appelés MAMs : Mitochondria-Associated Membranes) et dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline et de l'homéostasie glucidique ; elle a démontré que les MAMs étaient altérées dans le foie de souris obèses et insulino-résistantes. Cependant, les controverses présentes dans la littérature dédiée à la dynamique des MAMs dans l'obésité chronique, freine les nouvelles investigations ciblant les MAMs pour améliorer le métabolisme hépatique. Dans ce contexte, il était crucial de redéfinir le rôle des MAMs dans l'insulino-résistance et la stéatose hépatique, et de caractériser plus finement la dynamique des MAMs au cours du développement de l'insulino-résistance associée à l'obésité.

L'objectif de la ma thèse a été d'étudier si les régulations structurales et fonctionnelles des MAMs évoluaient en fonction du temps lors d'une diète obésogène, et également de statuer sur le rôle causal des MAMs dans l'insulino-résistance et la stéatose hépatique, en modulant les MAMs via la surexpression adénovirale d'un spacer et d'un linker, non exprimé de manière endogène. Mes travaux ont démontré que l'altération structurale et fonctionnelle des MAMs dans le foie est un phénomène très précoce précédant l'insulino-résistance et la stéatose hépatique induites par un régime obésogène. De plus, cette altération des MAMs, en contexte d'obésité, a été retrouvée dans des modèles génétiques d'obésité et de fonds génétique différents, démontrant la robustesse de nos données. Le retour à un régime standard, des animaux obèses, améliore à la fois les MAMs, la sensibilité à l'insuline et la stéatose des souris, prouvant le caractère réversible de ces dysfonctions. Aussi, l'utilisation de protéines exogènes modulatrices des MAMs, spacer et linker, nous a permis de moduler les MAMs, indépendamment de toute autre fonction cellulaire. Ainsi, l'altération des MAMs médiée par la spacer FATE1 dans le foie de souris est suffisante pour altérer le métabolisme glucidique et lipidique des souris saines, tandis que l'induction de MAMs via le linker prévient l'altération du métabolisme glucidique induit par une diète obésogène. L'ensemble de ces données prouvent que l'altération des MAMs est un phénomène précoce, causal et réversible dans l'insulino-résistance et la stéatose hépatique, suggérant que les MAMs pourraient être une nouvelle cible pour améliorer l'homéostasie glucidique et lipidique dans les maladies métaboliques.

Mots clefs : Mitochondria-associated membranes (MAMs), insulino-résistance hépatique, stéatose hépatique, obésité, diabète de type 2, signalisation calcique, mitochondrie.

Abstract

Title / Abstract / keywords

Title: Role of the endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of hepatic insulin sensitivity and steatosis.

Abstract:

Obesity, type 2 diabetes, and non-alcoholic fatty liver diseases are pathologies that have been growing rapidly in recent years and are closely linked to hepatic insulin resistance and steatosis, yet the molecular mechanisms of these metabolic damages are poorly understood. Recently, our team identified a new role of endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria contacts sites (called MAMs for Mitochondria-Associated Membranes) in the control of insulin sensitivity and glucose homeostasis and demonstrated that MAMs were disrupted in the liver of obese and insulin-resistant mice. However, the presence of discrepancy in the literature regarding the dynamics of MAMs in chronic obesity prevents the development of new strategies targeting MAMs to improve hepatic metabolic diseases. In this context, it was crucial to reappraise the role of MAMs in insulin resistance and fatty liver diseases, and to finely characterize the dynamics of MAMs during the development of insulin resistance associated with obesity.

The purpose of my thesis was to study whether the structural and functional regulations of MAMs in mouse liver during diet-induced obesity and insulin resistance were time-dependant, and to define the causal role of MAMs in hepatic insulin resistance and steatosis, by modulating MAMs with non-endogenously expressed organelle spacer and linker using adenovirus. My work has shown that disrupted ER-mitochondria interactions and calcium exchange are early events that precede hepatic insulin resistance and steatosis in the liver of diet-induced obese mice. Furthermore, reduced ER-mitochondria contact sites were also present in the liver of genetic models of obesity and of different mice's strains, proving the robustness of our data. Interestingly, switching diet-induced obese mice to a healthy diet for 8 weeks reversed MAM alterations and improve hepatic insulin sensitivity and steatosis, proving that MAMs dysfunctions are reversible. Furthermore, the use of exogenous organelle spacer and linker allowed us to modulate MAMs, independently of other cellular functions. Disrupting ER-mitochondria interactions and calcium exchange in the healthy mouse liver by the spacer FATE1 was sufficient to alter glucose and lipid metabolism, while the reinforcement of MAMs using an artificial linker prevented diet-induced glucose intolerance. Altogether, our data prove that the ER-mitochondria miscommunication is an early, causal, and reversible trigger of hepatic insulin resistance and steatosis, suggesting that MAMs could be a new target for improving glucose and lipid homeostasis in hepatic metabolic diseases.

Keywords: Mitochondria-associated membranes (MAMs), hepatic insulin resistance, hepatic steatosis, obesity, type 2 diabetes, calcium signalling, mitochondria.

Liste des abréviations

$[Ca^{2+}]_C$	concentration calcique cytoplasmique
$[Ca^{2+}]_m$	concentration calcique mitochondriale
$[Ca^{2+}]_{RE}$	concentration calcique du réticulum endoplasmique
α -syn	α -synucléine

A

AA	acide aminé
ACC	acétyl-coA-carboxylase
ACS4	acyl coa synthase 4
AD	maladie d'Alzheimer
ADA	american diabetes association
ADN	acide désoxyribonucléique
ADN _{mt}	ADN mitochondrial
ADP	adénosine diphosphate
AGCC	acides gras à chaîne courte
AGJ	anomalie de la glycémie à jeun
AGL	acide gras libre
Akt	= PKB protéine kinase B
ALS	sclérose latérale amyotrophique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AMPK	AMP-activated Protein Kinase
ANT	adenine nucleotide translocase
APP	protéine précurseur amyloïde
ASP	apoptosis-associated speck like protein containing a CARD
ATAD3	protéine 3 contenant le domaine AAA
ATF6	activating transcription factor-6
Atg	autophagy related
ATP	adénosine triphosphate
ATP	adénosine triphosphate
A β	peptide β -amyloïde

B

Bak	Bcl-2 homologues killer
Bap31	B cell receptor associated protein

Bax	Bcl-2 associated X
Bcl-2	B-cell lymphoma 2

C

Ca ²⁺	calcium
CaMKII	Calcium/calmoduline dependent-protein kinase II
CAV1	cavéoline 1
CC	corps cétoniques
CEC	couplage excitation-contraction
CFP	cyan fluorescent protein
ChREBP	carbohydrate response element binding protein
CK	cycle de Krebs
CL	cardiolipine
CLR	C-type lectin receptor
CPT-1	carnitine palmityl-CoA transferase
CREB	cAMP-Response Element Binding Protein
CYP2E1	cytochrome P450 2E1
CypD	cyclophylin D

D

DAG	diacylglycérol
DAMP	damage-associated molecular patterns
DDP4	dipeptidyl peptidase 4
DG	diabète gestationnel
DGAT2	diacylglycérol transférase 2
LDN	lipogenesis de novo
Drp1	dynamain related protein-1
DT1	diabète de type 1
DT2	diabète de type 2
Dyn 2	dynamain 2

E

eNOS	NO synthase endothéliale
ERAD	ER-associated degradation

ERMES	ER-mitochondria encounter structures
Ero1- α	endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- α

F

FADH ₂	flavine adénine dinucléotide réduit
FAS	fatty acid synthase
FASN	fatty acid synthase gene
FATE1	Fœtal and Adult Testis Expressed 1
FCCP	p-[trifluorométhoxy]-phenyl-hydrazone
FGF21	fibroblast growth factor 21
FID	fédération international du Diabète
Fis1	fission 1
Foxo1	Forkhead box O 1
FRET	Förster resonance energy transfer
FUS	fused in sarcoma

G

G6P	glucose-6-phosphatase
GIP	glucose-dependent insulin releasing polypeptide
GK	glucokinase
GLP1	glucagon like peptide 1
GLUT	glucose transporter
grp75	glucose-regulated protein 75
grp78	glucose-regulated protein 78
GSK3 β	glycogen synthase kinase 3 beta
GTP	guanosine triphosphate
GTT	glucose tolerance test

H

H ₂ O ₂	peroxyde d'hydrogène
HbA1c	hémoglobine glyquée
HDL	high density lipoprotein
HFD	high fat diet
HFHSD	high fat high succrose diet
HK2	hexokinase 2

HMGCR	3-hydroxy-3-méthyl-glutaryl-coenzyme A réductase
HR2	hydrophobic heptad repeats
HSS	hepatic stimulator substance

I

IFN2	Inverted Formin-2
IG	intolérance au glucose
IKK	Inhibitor of IκB Kinase
IL-1β	interleukine 1-bêta
IL6	interleukine 6
IMM	inner mitochondrial membrane
IMS	inner membrane space
INSR	insulin receptor
IP3R	inositol-1,4,5-trisphosphate receptor
IR	insulino-résistance
IRE1	inositol-requiring enzyme-1
IRS1/2	Insulin Receptor Substrate 1/2
ITT	insulin tolerance test

J

JNK	c-Jun N-Terminal kinase
-----	-------------------------

K

KO	knock-out
----	-----------

L

LC3	microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LDL	low density lipoprotein

M

MAM	mitochondria-(ER)-associated-membranes
MAPK	mitogen activated protein kinase
MAVS	mitochondrial antiviral signaling protein

MCD	methionine, choline deficient diet
Mcl	myeloid cell leukemia
MCP-1	monocyte chemo-attractant
MCU	mitochondrial calcium uniporter
MCV	maladie cardiovasculaire
Mdm10/12/34	mitochondrial distribution and morphology protein 10
MERCs	mitochondria-ER contacts
MET	microscopie électronique à transmission
MFF	mitochondrial fission factor
Mfn1/2	mitofusine1/2
MICU1	mitochondrial Ca ²⁺ uptake 1 protein
MID49/MID51	mitochondria dynamics proteins de 49 ou 51kDa
mmm1	maintenance of mitochondria morphology protein 1
MPC	mitochondrial pyruvate carrier
mPTP	mitochondrial Permeability Transition Pore
mTORC2/1	mammalian target of rapamycin complex 2/1
mTOR	target of rapamycin

N

NAD	nicotinamide adénine dinucléotide oxydé
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADP	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate oxydé
NADPH	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NAFLD	non-alcoholic fatty liver disease
NASH	non-alcoholic steatohepatitis
NFκB	nuclear factor-kappa B
NLR	NOD-like receptor
nnt	nicotinamide nucleotide transhydrogenase
NO	monoxyde d'azote
Nrf2	nuclear factor E2-related factor 2

O

OAA	oxaloacétate
OMM	outer mitochondrial membrane
OMS	organisation mondiale de la santé

OPA1	optic atrophy 1
ORP5/8	oxysterol binding related proteins 5/8
OXPHOS	oxidative phosphorylation

P

p53	tumor protein 53
PA	acide phosphatidique
PACS2	phosphofurin acidic cluster sorting protein 2
PAMP	pathogen-associated molecular patterns
PC	phosphatidyl choline
PCR	polymerase chain protein
PD	maladie de Parkinson
PDH	complexe de la pyruvate déshydrogénase
PDK 2/4	pyruvate déshydrogénase kinase 2 / 4
PDPK1	phosphoinositide-dependant protéine Kinase 1
PE	phosphatidyl éthanolamine
PEMT	phosphatidyl éthanolamine N-methyl transferase
PEP	phosphoénolpyruvate
PEPCK	phosphoénolpyruvate carboxykinase
PERK	double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase
PFK	phospho-fructokinase
PHG	production hépatique de glucose
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PINK1	PTEN-induced putative kinase 1
PIP3	phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate
PKA/B/C	protein kinase A/B/C
PKC $\zeta/\epsilon/\delta$	protéine kinase C zêta/epsilon/delta
PL	phospholipide
PLA	proximity ligation assay
PLC	phospholipase C
PML	promyelocytic leukemia protein
PP	pentose phosphate
PP2A	protéine phosphatase 2A
PPAR	peroxysome proliferator activated receptor
pPKB	phospho PKB
protor	PRR5

PRR	pattern recognition receptors
PSD	phosphatidyl sérine décarboxylase
PSEN1/2	protéines preseniline 1/2
PSS1/2	phosphatidyl sérine synthase 1/2
PTEN	phosphatase and TENsin homolog
PTPases	phosphotyrosine phosphatase
PTPIP51	protein tyrosine phosphatase-interacting protein51

R

RD	reversal diet
RE	réticulum endoplasmique
REL	réticulum endoplasmique lisse
RER	réticulum endoplasmique rugueux
RFP	red fluorescent protein
riCTOR	rapamycin-insensitive companion of mTOR
RLR	RIG-1 like receptor
ROS	reactive oxygen species
RYR	ryanodine-sensitive channel

S

S1R	sigma 1 receptor
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase
sGC/cGMP/PKG	soluble guanylyl cyclase /cGMP-dependent protein kinase
SGLT2	co-transporteur glucose-sodium 2
SHH	syndrome hyperglycémique hyperosmolaire
Sin1	stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein
siARN	silencing ARN
SOAT1/ACAT1	acyl-Coenzyme A : cholesterol acyltransferase I
SPLICS	split-GFP-based contact site sensor
SREBP-1	sterol regulatory element binding protein
SR-FACT	super-resolution fluorescence-assisted diffraction
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
STED	stimulated-emission-depletion /déplétion par émission stimulée
Syn17	syntaxin 17
SOD	superoxyde dismutase

T

TA	tissu adipeux
TAV	tissu adipeux viscéral
TDP	TAR-DNA-binding protein 43
TG	triglycéride
TG2	transglutaminase type 2
TLR	toll like receptor
TM	transmembranaire
TNF- α	tumor necrosis factor-alpha
TOM 22/70	translocase of the outer membrane of mitochondria 22/70
TRX	thioredoxine
TXNIP	thioredoxine interacting protein

U

UPR	unfolded protein response
-----	---------------------------

V

VABP	vesicule-associated membrane protein associated protein B
VDAC	voltage-dependent anion channel
VLDL	very low density lipoprotein
VIH	virus de l'immunodéficience humain

W

WT	wild type
----	-----------

X

XBP-1	X-box binding protein-1
-------	-------------------------

Y

YFP	yellow fluorescent protein
-----	----------------------------

Liste des figures

Figure 1	Lobule Hépatique	p 29
Figure 2	Organisation structurelle et fonctionnelle du foie	p 31
Figure 3	Concept de zonation métabolique du foie	p 32
Figure 4	Schéma représentatif du concept de la flexibilité métabolique du foie	p 35
Figure 5	Schéma représentatif des voies métaboliques hépatiques mises en jeu lors de l'état nourri et à jeun	p 37
Figure 6	La voie de la signalisation cellulaire de l'insuline contrôlant les actions métaboliques de l'hormone.	p 40
Figure 7	Complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie responsable de la phosphorylation oxydative, OXPHOS	p 43
Figure 8	Schéma récapitulatif de la dynamique mitochondriale comprenant les principaux acteurs de la fission et de la fusion de la mitochondrie.	p 45
Figure 9	Canaux et transporteurs responsables de l'homéostasie calcique mitochondriale	p 48
Figure 10	Stress et homéostasie calcique du RE	p 50
Figure 11	Estimation du nombre total d'adultes (20 à 79 ans) vivant avec le diabète en 2019	p 56
Figure 12	Représentation schématique de la flexibilité métabolique chez un patient sain (à gauche) comparée aux patients IR, DT2, NAFLD et/ou obèse qui développent des inflexibilités métaboliques	p 63
Figure 13	Représentation schématique de l'altération de la signalisation à l'insuline hépatique.	p 65
Figure 14	Représentation schématique de l'insulino-résistance des patients DT2	p 66
Figure 15	Principaux composants de l'inflammation intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases	p 70
Figure 16	Principaux composants de la lipotoxicité, intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases	p 72
Figure 17	Principaux composants du Stress du RE, intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases	p 75
Figure 18	Les principales altérations mitochondriales et composées intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases	p 79
Figure 19	Bilan : Intégration des mécanismes de l'insulino-résistance hépatique	p 80

Figure 20	Les principales altérations mitochondriales retrouvées dans l'IR et la stéatose hépatique	p 82
Figure 21	Les principales altérations du métabolisme des lipides retrouvées dans l'IR et la stéatose hépatique	p 86
Figure 22	Les principales altérations du microbiote intestinal retrouvées dans la NAFLD et la NASH	p 90
Figure 23	Bilan : Mécanismes de l'insulino-résistance et de la stéatose	p 92
Figure 24	Représentation schématique des principaux complexes protéiques des MAMs	p 94
Figure 25	Schéma récapitulatif des principales fonctions des MAMs	p 108
Figure 26	Schéma récapitulatif des principales régulations des MAMs	p 110
Figure 27	Schéma récapitulatif des altérations des MAMs retrouvées dans les maladies neurodégénératives, le cancer et l'inflammation/immunité	p 118
Figure 28	Principales techniques d'exploration des MAMs	p 124
Figure 29	Représentation schématique des MAMs dans l'inflexibilité métabolique dans le contexte de désordres métaboliques	p 128
Figure 30	Schéma représentatif de la dynamique des MAMs dans le cœur, le muscle squelettique et le foie en situation d'insulino-résistance	p 130
Figure 31	Controverse des MAMs dans le foie et le muscle dans le contexte de l'insulino-résistance et de l'obésité	p 132
Figure 32	Schéma représentatif de la composition protéique du RE et de la mitochondrie durant le développement de la NASH	p 136
Figure 33	Schéma récapitulatif des atteintes métaboliques associées à l'altérations des fonctions et structures des MAMs dans le foie au cours d'une diète obésogène	p 220
Figure 34	Impact physiologique de la modulation des MAMs via un linker et un spacer, FATE1	p 221

**Publications, congrès,
communications et activités
complémentaires à la
recherche**

Publications

- **ER-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis**

Agathe Beaulant, Maya Dia, Bruno Pillot, Marie-Agnès Chauvin, Jingwei Ji-cao, Christine Durand, Nadia Bendridi, Stéphanie Chanon, Aurélie Vieille-Marchiset, Hubert Vidal, Ludovic Gomez, Mélanie Paillard, and Jennifer Rieusset.

Journal of Hepatology, mai 2021 (soumis).

- **Preserved Ca²⁺ handling and excitation–contraction coupling in muscle fibres from diet-induced obese mice**

Francisco Jaque-Fernandez, **Agathe Beaulant**, Christine Berthier, Mariana Casas, Laloé Monteiro, Bruno Allard, Jennifer Rieusset and Vincent Jacquemond.

Diabetologia, 2020 (publié).

Jaque-Fernandez F, **Beaulant A**, Berthier C, Monteiro L, Allard B, Casas M, Rieusset J, Jacquemond V. **Preserved Ca²⁺ handling and excitation-contraction coupling in muscle fibres from diet-induced obese mice.** *Diabetologia*. 2020 Nov;63(11):2471-2481. doi: 10.1007/s00125-020-05256-8. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32840676.

Congrès et communications

- Assises Régionales de Nutrition et Santé (21-22 novembre 2017, Saint Galmier, France).

Participation au congrès

- AFERO: Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité (23-24 janvier 2018, Lyon, France).

Participation au congrès

- EMBO Workshop: Membrane contact sites in health and disease (21-25 septembre 2018, Arosa, Suisse).

Participation au congrès

- Symposium on metabolism : (17-18 octobre 2018, Genève, Suisse).

Participation au congrès

- JEDISS: Journée de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science Santé (11 octobre 2018, Lyon, France).

Poster : « La diminution des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (RE) via la surexpression de la protéine FATE1 altère la sensibilité à l'insuline hépatique »

1er prix poster

- **Diabète Académie : (1^{er} et 2 février 2019, Lyon, France).**

Participation au congrès

- **SFD : Société Francophone du Diabète (26-29 mars 2019, Marseille, France)**

Communication orale : La modulation des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique via la surexpression de la protéine FATE1 impacte la sensibilité à l'insuline hépatique.

- **Assises Régionales de Nutrition et Santé (11-12 septembre 2019, Lyon, France)**

Communication orale : La modulation des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique via la surexpression de la protéine FATE1 (Foetal and Adult Testis Expressed 1) impacte la sensibilité à l'insuline hépatique.

- **JEDISS : Journée de l'Ecole Doctorale Interdisciplinaire Science Santé (9 octobre 2019, Lyon, France).**

Communication orale : La diminution des interactions entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique via la surexpression de la protéine FATE1 (Foetal and Adult Testis Expressed 1) altère la sensibilité à l'insuline hépatique.

1^{er} prix communication orale

- **EASD: European Association for the Study of Diabetes (21-25 septembre 2020, *virtual meeting*).**

Communication orale : The modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interactions via the overexpression of the protein FATE1 (Fetal and Adult Testis Expressed 1) impacts the sensitivity to hepatic insulin.

Activités complémentaires à la recherche

Enseignements :

- **Contrat ACE : Activité Complémentaires d'Enseignements : 192 heures (64h/an) d'enseignements (Octobre 2017 à juillet 2020)**
 - Travaux Dirigés « **Anatomie descriptive : Ostéologie et Arthrologie du tronc et des membres supérieur et inférieur** » pour les étudiants de 1^{ère} année en Ergothérapie et Masso-Kinésithérapie, à l'ISTR (Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation) Domaine Rockefeller, Université Claude Bernard Lyon 1. Reprise de supports TD précédemment créés et création de nouvelles séances de TD, supports à de nouveaux enseignements. Création et participation aux oraux de seconde session juillet 2019 et 2020.
 - Travaux Dirigés « **Projet Personnel et Professionnel** » (P.P.P.2, UE Transversale) pour les étudiants de 1^{ère} année de licence Sciences, Technologies et Santé, Domaine de La Doua, Université Claude Bernard Lyon 1.

Organisation d'évènements scientifiques :

- **AFERO (Association Française d'Etude et de Recherche sur l'Obésité) : Membre de l'organisation (23 et 24 janvier 2018, Lyon, France)**

Aide à l'organisation et à la mise en place des Journées Scientifiques. Responsable de l'organisation des buffets.

Formations :

- **Concepteur en recherche animale : modèles murins et génétiquement modifiés ; Niveau 1-Fonction B, Université Lyon 1- Claude Bernard – 66 heures**
- **Le Speakshow – Débloquez votre anglais, Université Lyon 1- Claude Bernard – 14 heures**

Introduction

I. Partie 1 : Foie et Diabète

A. Le foie : un organe central dans le contrôle de l'homéostasie énergétique

(1) Généralités :

a) Anatomie et zonation métabolique

Situé dans la partie supérieure droit de l'abdomen, le foie est un organe appartenant au système digestif. Après la peau, il constitue l'organe le plus gros de l'organisme avec un poids moyen, pour un adulte, de 1,5kg (J. Fontana, 2014). Il est divisé en deux : un lobe droit (2/3 du volume du foie) et un lobe gauche (1/3 du volume du foie), eux-mêmes subdivisés en sous-segments, au total le foie contient 8 segments différents. Le foie est l'un des organes les plus vascularisés avec en moyenne, pour un adulte, 1,4L de sang/min qui le traverse ¹. En effet, il est irrigué par 2 systèmes : l'artère hépatique riche en oxygène et des branches de la veine porte provenant de l'appareil digestif et chargées en nutriments divers.

L'unité anatomique de base du foie est le lobule, chaque lobule reçoit un schéma d'irrigation identique (**Figure 1**). Le lobule symbolisé par un hexagone comprend à chaque angle un espace porte (branche de la veine porte ou veine interlobulaire ; branche de l'artère hépatique ou artère interlobulaire ; ductule biliaire péri-portale), une veine centrale chargée de récupérer le sang filtré par les hépatocytes et des capillaires sinusoides reliant l'espace porte à la veine centrale.

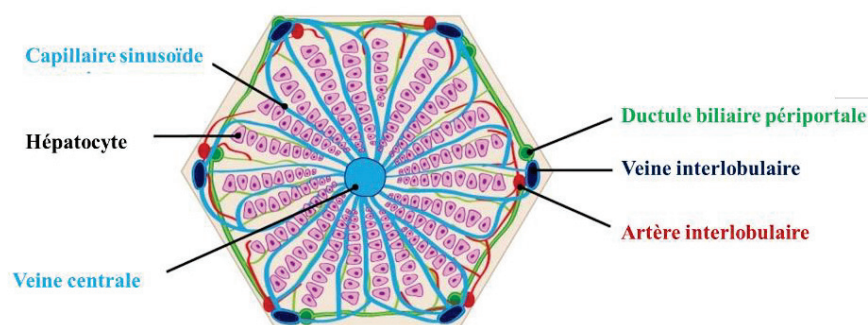


Figure 1 : Lobule hépatique, issu de ²

Chaque lobule est composé de plusieurs types de cellules (*Figure 3*)³:

- **Les hépatocytes** : les plus abondants, sont disposés en travée du centre du lobule à la périphérie et sont responsables de la plupart des activités métaboliques
- **Les cellules endothéliales** : délimitent les capillaires sinusoides entre chaque travée d'hépatocytes.
- **Les cellules de Küpffer** : se situent dans les capillaires sinusoides et sont des macrophages qui protègent le foie des substances néfastes provenant de la digestion.
- **Les cellules stellaires** ou de **Ito** : sont situées dans l'espace de Disse, localisé entre les cellules endothéliales et les hépatocytes. Elles participent à certains processus métaboliques (assimilation de vitamines) mais également au remodelage de la matrice cellulaire.
- **Les cellules des canaux biliaires** : collectent la bile sécrétée par les hépatocytes et la drainent jusqu'au système porte. C'est une substance essentielle dans le drainage de déchets endogènes et l'absorption des lipides.

A la fin des années 70, le concept d'une hétérogénéité métabolique est introduit par le fait que tous les hépatocytes d'un lobule ne présentent pas la même composition enzymatique⁴. Le concept s'affine jusqu'à obtenir la définition de plusieurs unités fonctionnelles du foie (*Figure 2*) :

- **Le lobule hépatique** : hexagone centré sur une veine centro-lobulaire, possédant à chaque angle un système porte. Celui-ci représente l'unité anatomique et fonctionnelle veineuse du foie.
- **Le lobule portal** : triangle centré sur un espace porte, les 3 extrémités étant des veines centro-lobulaires. Celui-ci représente l'unité fonctionnelle biliaire.
- **L'acinus hépatique** : losange délimité par deux veines centro-lobulaires et deux systèmes portes, il représente la plus petite unité fonctionnelle du foie. Celle-ci se divise en 3 zones théoriques (I, II, III), réparties selon l'exposition aux nutriments et à l'oxygène. La zone I se situe à proximité des triades et expose les hépatocytes à de fortes concentrations d'oxygène, tandis que la zone III constitue les hépatocytes périportaux exposés à de faibles taux d'oxygène. La zone II, est intermédiaire aux 2 précédentes.

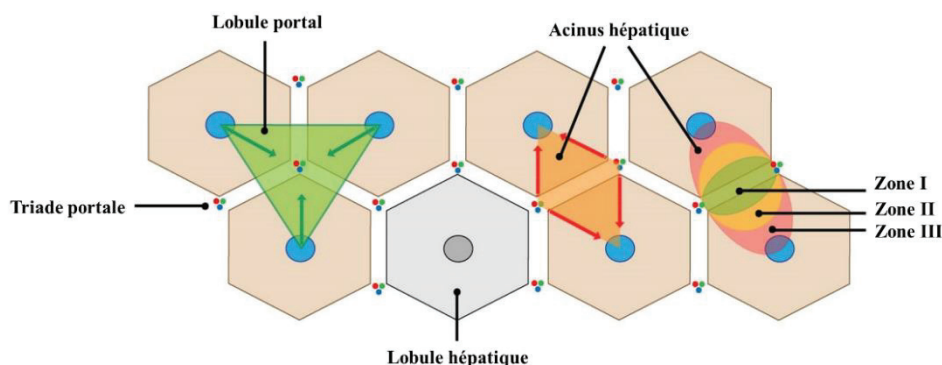


Figure 2 : Organisation structurale et fonctionnelle du foie, issu de ²

Il a été décrit que les acini étaient subdivisés en différentes zones, concept de zonation du foie, avec une répartition des enzymes selon des gradients d'hormones et d'oxygène conférant des rôles métaboliques différents à chacune ⁵⁻⁷. Cette zonation du foie est très intéressante puisqu'elle permet de regrouper des fonctions métaboliques similaires et à l'inverse, de séparer celles qui sont opposées comme par exemple la néoglucogénèse et la glycolyse (**Figure 3**) ^{8,9}. Ainsi, la néoglucogénèse et la β -oxydation se déroulent de préférence dans les hépatocytes périportaux tandis que la glycolyse, la cétogenèse, la lipogenèse et la synthèse des triglycérides (TG) se produisent plutôt dans les hépatocytes péricentraux. De récents travaux montrent que les gènes cibles de la voie de signalisation Wnt/ β -caténine, responsables de la régénération et de cette zonation du foie, se trouvent également exprimés, de façons différentes le long de l'axe porto-central ¹⁰. De manière intéressante, l'utilisation de séquençage d'ARN sur cellule unique, montre que cette zonation spatiale s'accompagne d'une zonation temporelle. Ainsi, le gène *Elovl3*, impliqué dans la lipogenèse est exprimé principalement pendant la prise alimentaire et dans les hépatocytes péricentraux tandis que le gène *Pck1*, impliqué dans la néoglucogénèse, est exprimé dans la zone périportale et vers la fin du cycle de jeun. Cette zonation spatio-temporelle régit également d'autres fonctions biologiques. En effet, l'espace péricentral expose les hépatocytes à un environnement hypoxique et riche en métabolites toxiques, favorisant un stress cellulaire élevé. Pour pallier, les hépatocytes péricentraux présentent des profils géniques favorisant le renouvellement protéique via l'expression de diverses chaperonnes mitochondriales ^{11,12}.

La complexité de cette organisation spatio-temporelle des hépatocytes, selon leurs fonctions, atteste de l'étendue des diverses fonctions que le foie doit accomplir.

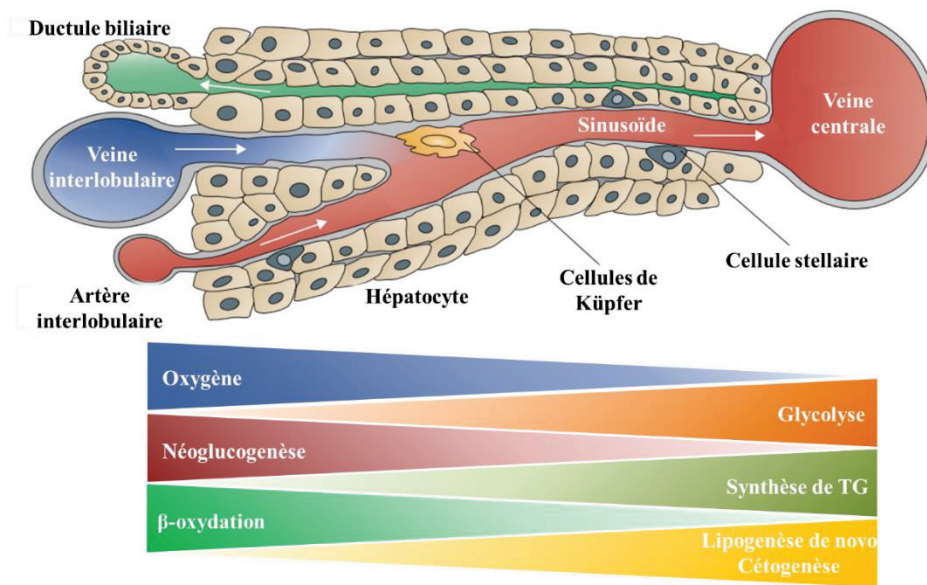


Figure 3 : Concept de zonation métabolique du foie, issu de ⁹

b) Fonctions hépatiques principales

- Détoxification

Le foie est un organe central dans l'organisme puisque celui-ci possède de nombreuses fonctions essentielles à son équilibre. Tout d'abord, grâce à sa forte vascularisation provenant directement du système digestif, le foie joue un rôle de détoxification. En effet, celui-ci va permettre d'éliminer des substances endogènes (produits du métabolisme cellulaire) ou exogènes (xénobiotiques) potentiellement toxiques pour l'organisme, comme la bilirubine (composé toxique provenant de la dégradation de l'hémoglobine), l'alcool et les médicaments. De même, le foie intervient dans l'élimination de l'ammoniaque, produit par la dégradation complète des protéines. C'est une fonction importante qui lui permet de garantir l'équilibre azotée de l'organisme, à l'origine de l'homéostasie acido-basique. En situation de jeûne, lorsque les concentrations d'ammoniaques sont faibles, les hépatocytes péricentraux se chargent d'intégrer l'ammoniaque lors de la glutaminogenèse, afin de produire de la glutamine, l'acide aminé le plus abondant de l'organisme. En revanche, en phase post-absorptive les concentrations en ammoniaque sont plus élevées et potentiellement toxiques. L'ammoniaque est alors dirigée vers la mitochondrie afin de produire de l'urée lors de l'uréogenèse. Cette substance hydrosoluble, après passage dans le sang, est filtrée par les reins et éliminée dans les urines ¹³. En ce qui concerne la détoxification des substances lipophiles, elle s'effectue en deux temps : la phase I d'inactivation des substances via des réactions d'hydrolyse, de réduction et/ou d'oxydation, puis la phase II de

conjugaison, permettant la modification de la solubilité des substances toxiques. La dernière étape est l'excrétion dans la bile, qui est ensuite drainée dans l'intestin et éliminée dans les selles ^{3,14}.

- Production de la bile

La bile est un suc digestif produit par les hépatocytes de manière continue. Celle-ci est stockée dans la vésicule biliaire et se compose principalement d'acides biliaires, de bilirubine, de cholestérol et de lécithines. La bile intervient à la fois dans le drainage des substances toxiques liposolubles du foie vers l'intestin et également dans la digestion et l'absorption des lipides et des micronutriments : les vitamines liposolubles (A, D, E et K) au niveau du duodénum ^{1,15}. Plus de 95% de la bile est réabsorbée par les entérocytes afin de réintégrer le cycle de production de la bile dans le foie, cette boucle est nommée cycle entérohépatique, les 5% restant sont éliminés dans les fèces ¹⁶.

- Synthèse et stockage

De par sa proximité avec l'intestin grêle, le foie reçoit un flux sanguin riche en protéines et acides aminés issues de la digestion, lui permettant, de produire la plupart des protéines composant le sang telles que l'albumine, les globines et les facteurs de coagulations ¹. Le foie est également le lieu de stockage de nombreux oligo-éléments (Fer, Zing, Manganèse, Cuivre...) essentiels pour la synthèse de co-enzymes, d'hormones, de vitamines et pour les fonctions de défenses de l'organisme. En effet, la protection contre le stress cellulaire, induit par la production de radicaux libres, implique des enzymes comme les superoxydes dismutases (SOD) et les glutathions peroxydases qui fonctionnent lorsqu'elles sont associées à des oligo-éléments comme le Cuivre, le Zinc, le Manganèse. Pourtant un stockage hépatique excessif de ces éléments peut-être délétère, c'est pourquoi la majorité des oligo-éléments possèdent un cycle entérohépatique permettant de réguler leur absorption et excrétion via la bile ¹⁷.

Le foie va également jouer un rôle important dans l'homéostasie lipidique notamment via la production des lipoprotéines (VLDL, HDL, LDL, IDL) responsables du transport sanguin du cholestérol, des TG, et des phospholipides (PL) mais également la production de cholestérol ¹⁸. En effet, le foie est responsable de la majorité de la production endogène de cholestérol, composé indispensable à la synthèse des acides biliaires, des hormones stéroïdiennes et de la vitamine D. Il est important de noter que la vitamine D nécessite une activation hépatique pour être fonctionnelle.

Le foie est également primordial dans l'homéostasie glucidique puisque celui-ci est capable de produire et d'utiliser le glucose selon les besoins énergétiques. Il est prouvé qu'une partie de ces fonctions subit un contrôle régi par les rythmes circadiens. Par exemple chez la souris, l'expression de transporteurs, de récepteurs et d'enzymes, impliqués dans le mécanisme du glucose, augmente préférentiellement durant les heures correspondant à la prise alimentaire. Ces régulations vont permettre une anticipation des flux énergétiques réguliers provenant de l'environnement ¹⁹. Le rôle du foie dans le

maintien de l'homéostasie énergétique sera détaillé dans le paragraphe suivant *I.A.(2)Métabolisme hépatique*.

(2) Métabolisme hépatique

La partie suivante est un rappel des différentes réactions qui opèrent dans le foie lors des phases de transitions nutritionnelles en se focalisant sur l'homéostasie glucido-lipidique en condition physiologique. Du fait de sa position anatomique, le foie est exposé à un flux sanguin de la veine porte riche en divers nutriment issus de la digestion et de l'absorption intestinale. Outre cette place stratégique, le foie tient une place clé dans l'homéostasie glucido-lipidique puisque celui-ci est capable de passer rapidement de la constitution de réserve, pendant les phases post-prandiale, à la mobilisation et la production d'énergie pendant les périodes de jeûne. Ce maintien de l'homéostasie énergétique est essentiel pour approvisionner constamment tous les organes et ceci indépendamment des variations de flux énergétique. Le glucose, comme les lipides, constitue les principaux substrats énergétiques, à la seule différence qu'il est essentiel à de nombreux organes gluco-dépendants comme le cerveau. L'organisme a mis en place un système ingénieux et complexes, comprenant de nombreux mécanismes cellulaires, et nécessitant l'intervention de différents organes : les muscles, le tissu adipeux (TA), le pancréas et le foie, afin de réguler le plus finement la concentration sanguine de glucose appelée la glycémie ²⁰. Chez un adulte sain, à jeun, la glycémie varie entre 0,8g/L et 1,2g/L ²¹. L'une des caractéristiques du foie est sa capacité à adapter le combustible, c'est-à-dire passer du métabolisme des glucides à celui des lipides rapidement pour produire de l'énergie. C'est ce que l'on nomme la flexibilité métabolique (**Figure 4**). Cet équilibre dynamique nécessite l'intervention d'hormones pancréatiques : l'insuline et le glucagon, avec des effets opposés et complémentaires assurant la balance entre les apports discontinus et les besoins continus.

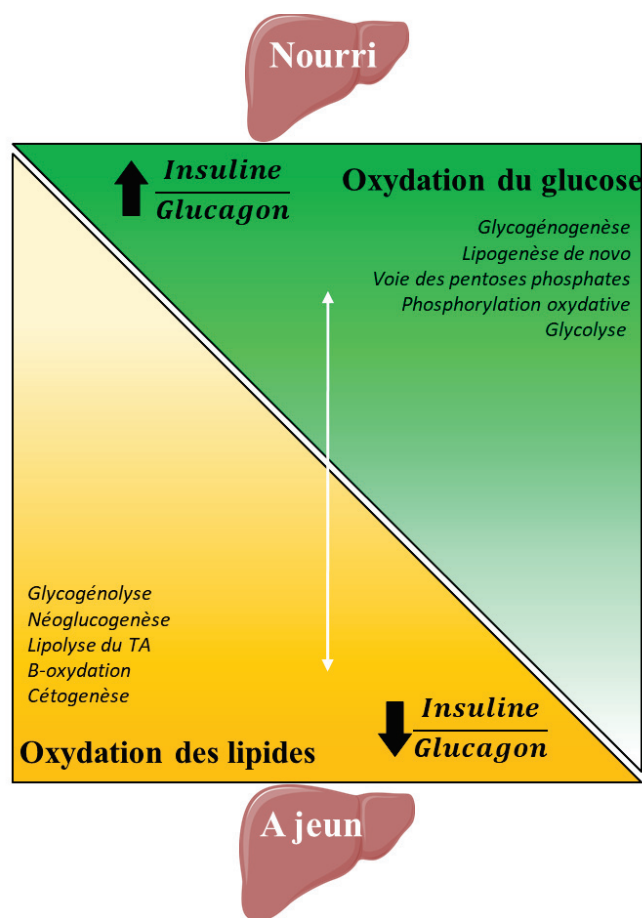


Figure 4 : Schéma représentatif du concept de flexibilité métabolique du foie

a) Flexibilité métabolique

- Etat nourri

En condition post-prandiale, le ratio insuline/glucagon est élevée car l'arrivée du glucose dans le sang stimule la sécrétion de l'insuline par les cellules β pancréatiques. Les glucides et lipides alimentaires, provenant de la digestion, passent par la circulation sanguine puis vont : soit être utilisés pour produire de l'énergie, soit être stockés pour une utilisation ultérieure (**Figure 5**).

- *Production d'énergie :*

La première étape est l'absorption du glucose par les transporteurs de glucose GLUT (GLUCose Transporter), dont l'isoforme majoritaire dans le foie est GLUT2. Ce transporteur, qui fonctionne par diffusion facilitée, présente une faible affinité pour le glucose et peut également être utilisé par d'autres sucres comme le mannose, le galactose et le fructose²². A noter que GLUT2 est indispensable à l'entrée

de glucose dans le foie mais n'est pas nécessaire à sa sortie lors de la néoglucogénèse ²². Après son entrée dans les hépatocytes, le glucose est dirigé vers la voie de la **glycolyse** pour être dégradé en pyruvate. Celui-ci passe ensuite dans la mitochondrie afin de donner l'acétyl-CoA qui va être oxydé dans le **Cycle de Krebs** (CK) permettant de libérer des équivalents réduits (NADH ; FADH₂) transmis ensuite à la chaîne respiratoire mitochondriale et permettant la production d'énergie sous forme d'ATP par la phosphorylation oxydative. En parallèle, le glucose-6-phosphate (G6P), produit lors de l'oxydation du glucose, peut intégrer la voie des **pentoses phosphates (PP)**, afin de fournir du ribose-5-phosphate précurseurs des acides nucléiques, des nucléotides et des co-enzymes. Cette réaction génère du NADPH essentiel notamment à la biosynthèse des acides gras (AG) ¹³.

- Mise en réserve :

Dans le foie, comme dans le muscle, la mise en réserve du glucose s'effectue sous forme de glycogène lors de la **glycogénogenèse**. Contrairement au muscle, qui va utiliser ce glycogène pour ses propres besoins énergétiques, le foie est capable de mobiliser ces stocks de glycogène afin de fournir en glucose les autres tissus. Lorsque l'afflux de glucides est trop important et sature le foie, celui-ci est alors capable de stocker l'excès de glucose sous forme de TG via l'acétyl-CoA ; cette réaction est nommée **lipogenèse de novo**.

Les lipides exogènes, issus de l'alimentation, vont circuler dans le compartiment sanguin grâce à des lipoprotéines liposolubles : les chylomicrons. Ces lipoprotéines libèrent des AG qui seront principalement absorbés et stockés dans le TA sous forme de TG mais également utilisés par d'autres tissus comme les muscles. Les chylomicrons, qui se retrouvent appauvris en AG, sont appelés remnants. C'est sous cette forme qu'ils sont absorbés par le foie et estérifiés pour former des TG. Le foie tient une place centrale dans le transport des lipides endogènes via la synthèse de VLDL (very-low-density-lipoprotéin). En effet, les TG hépatiques, après assemblage avec des PL, du cholestérol et l'apolipoprotéine B100 (ApoB100), seront ensuite exportés via des VLDL afin d'augmenter les réserves énergétiques dans le TA et d'approvisionner les organes en énergie ¹³.

- **Etat à jeun**

A l'état de jeun le ratio insuline/glucagon est faible. La sécrétion de glucagon dans la circulation sanguine va stimuler la mobilisation des réserves énergétiques faites à l'état post-prandial (**Figure 5**).

Dans ces conditions, le foie hydrolyse ces stocks de glycogène, lors de la **glycogénolyse**, afin de produire du glucose et de l'exporter dans la circulation sanguine pour approvisionner les organes gluco-dépendants. Après épuisement du glycogène hépatique, c'est la **néoglucogénèse** qui prend alors le relais pour produire du glucose, principalement à partir du lactate (issu du métabolisme anaérobique), de l'alanine (issu de la protéolyse musculaire) et du glycérol (issu de la lipolyse du TA) ¹³.

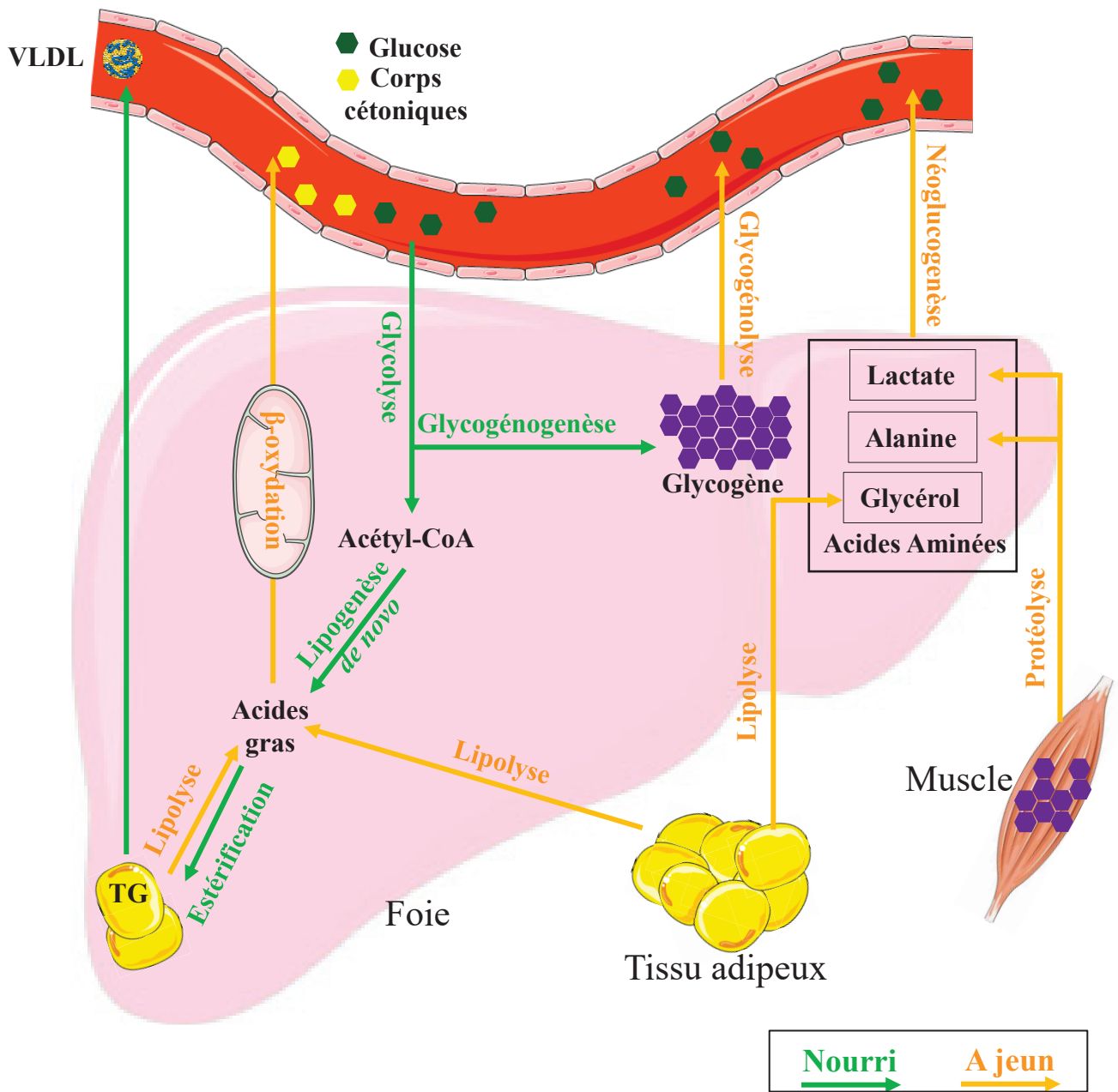


Figure 5: Schéma représentatif des voies métaboliques hépatiques mises en jeu lors de l'état nourri et à jeun, adapté d'après ²⁴.

Les réserves lipidiques sous forme de TG dans le TA et le foie constituent l'une des plus importantes réserves d'énergie de l'organisme. Les TG, dégradés lors de la **lipolyse** du TA, passent dans la circulation sanguine sous forme d'acides gras libres (AGL) et sont captés par le foie puis pris en charge dans la mitochondrie. Le passage des AG dans la mitochondrie se fait via la carnitine palmitoyl-CoA transférase 1 (CPT-1) : c'est une étape régulatrice. En effet, de fortes concentrations de malonyl-CoA, produit lors de la lipogenèse *de novo*, inhibent CPT-1. C'est pourquoi l'entrée des AG dans la mitochondrie nécessite une inhibition de la lipogenèse *de novo*. Ceux-ci vont alors être oxydés lors de la **β -oxydation** afin de donner de l'acétyl-CoA. Lui-même sera oxydé au cours du CK pour produire des substrats de la néoglucogénèse et des équivalents réduits FADH₂/NADH qui, via la phosphorylation d'oxydative de la chaîne respiratoire mitochondriale, fourniront de l'énergie.

Lors d'un jeûne prolongé, en support de la néoglucogénèse, les grandes quantités d'acétyl-CoA, produites par la **β -oxydation**, sont dirigées vers la **cétogenèse** dans le cytoplasme des hépatocytes. L'acétyl-CoA servira alors à la synthèse d'un nouveau type de substrat énergétique : les corps cétoniques (CC), des lipides hydrosolubles permettant de fournir en énergie tous les tissus périphériques. La production de CC est d'autant plus stimulée si de grosses quantités d'acétyl-CoA sont produites à la suite de la lipolyse du TA très élevée pendant le jeûne. A jeun, les 2/3 des AGL entrant dans le foie sont convertis en acétyl-CoA, via la β -oxydation, puis transformés en CC. L'autre tiers des AG, est utilisé par le CK pour générer de l'ATP afin de produire de l'énergie. Le fait que l'acétyl-CoA, produit par la β -oxydation, forme des CC ou entre dans le cycle CK est déterminé par l'afflux anaplérotique d'intermédiaires du CK ¹³. La conversion du pyruvate en oxaloacétate (OAA) par la pyruvate carboxylase est l'une des sources les plus importantes d'anaplérose hépatique. L'aiguillage du pyruvate va notamment se faire grâce au contrôle de la phosphorylation du complexe de la pyruvate déshydrogénase (PDH) par les pyruvates déshydrogénases kinases (PDKs). Ce système joue une place centrale dans l'orientation des flux métaboliques qui se trouvent être modifiés dans de nombreuses pathologies et notamment dans l'obésité et le diabète de type 2 (DT2), voir ***II. Partie 2.B. (2) Altération du métabolisme du pyruvate.***

b) Contrôle hormonal de l'homéostasie glucidique

- L'insuline

L'insuline est une hormone hypoglycémisante, sécrétée à la suite d'une augmentation de la glycémie par les cellules β des îlots de Langerhans du pancréas. En effet, le glucose circulant est absorbé par les cellules β et hydrolysé entraînant une production importante d'ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP inhibe les canaux membranaires potassiques, ce qui dépolarise la membrane plasmique et active les canaux calciques voltages dépendants. Ces canaux sont responsables d'une entrée massive de calcium essentielle à l'exocytose des granules contenant l'insuline ²³. A l'état nourri, l'insuline est donc

la principale hormone qui coordonne les réactions métaboliques des organes effecteurs : le TA, les muscles et le foie. Dans le foie, l'insuline inhibe la mobilisation d'énergie en réprimant la néoglucogénèse et la glycogénolyse, de même dans le TA en inhibant la lipolyse. A l'inverse, l'oxydation du glucose et sa mise en réserve sont favorisées par l'insuline, d'où une stimulation de l'entrée de glucose et de la glycolyse dans les tissus périphériques, parallèles à une augmentation de la glycogénogenèse hépatique et musculaire. La fixation de l'insuline sur son récepteur peut induire deux voies : soit la voie MAP kinase, responsable de la différenciation et prolifération cellulaire, soit la PI3K/PKB (phosphatidyl-inositol-3-kinase / protein kinase B) qui contrôle les réactions métaboliques ; c'est sur cette dernière que nous nous concentrerons, dans les hépatocytes (*Figure 6*²⁴).

Après liaison de l'insuline à son récepteur, les sous-unités α et β se rapprochent, entraînant une transphosphorylation de ses tyrosines. L'activation des tyrosines kinases permet la phosphorylation des effecteurs et de leurs ancrages. Les protéines IRS1/2 (insulin receptor substrate), les isoformes majoritaires dans le foie, vont alors s'ancrer aux résidus tyrosines phosphorylés du récepteur et transmettre le signal à la PI3K qui va ensuite phosphoryler PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3 (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). La propagation du signal se fait ensuite via le recrutement de PDK1 (phosphoinositide-Dependant protéine Kinase 1) par PIP3 qui phosphoryle PKB sur T308 tandis que mTORC2 (mammalian Target of Rapamycin Complex 2) se charge de la phosphorylation de PKB sur S473. Cette double phosphorylation est indispensable à l'activation de la PKB, l'élément nécessaire à la signalisation de l'insuline puisque celle-ci va contrôler différentes voies du métabolisme glucido-lipidique. Cette kinase contrôle donc la synthèse du glycogène grâce à l'inhibition de GSK3 β (glycogen synthase kinase 3), aboutissant à l'activation de la glycogénogenèse en parallèle de l'inhibition de la glycogénolyse. PKB est également responsable du stockage des lipides via l'inhibition de Tsc qui active mTORC1 qui à son tour active SREBP1c (sterol regulatory element binding protein) responsable de l'initiation de la lipogenèse. Aussi, PKB phosphoryle le facteur de transcription FoxO1 (forkhead box O), entraînant son exclusion nucléaire et sa séquestration dans le cytoplasme, ce qui le rend indisponible pour la synthèse des gènes de la néoglucogénèse ²⁵. Par cette voie, l'insuline inhibe la néoglucogénèse hépatique.

L'insuline favorise également la recapture du glucose par le muscle et inhibe la lipolyse du TA ²⁶. Lorsque les taux de glucose circulant diminuent, parallèlement à une hyperinsulinémie, la voie de rétrocontrôle du signal de l'insuline s'enclenche. Il s'ensuit une internalisation des récepteurs à l'insuline (INSR :insulin receptor) par endocytose, suivie d'une activation des phosphotyrosines phosphatases (PTPases), d'une régulation des Ser/Thr kinases et d'une activation des phosphoinositides phosphatases types PTEN (phosphatase and TENsin homolog) aboutissant à un freinage du signal insulinémique ²⁵.

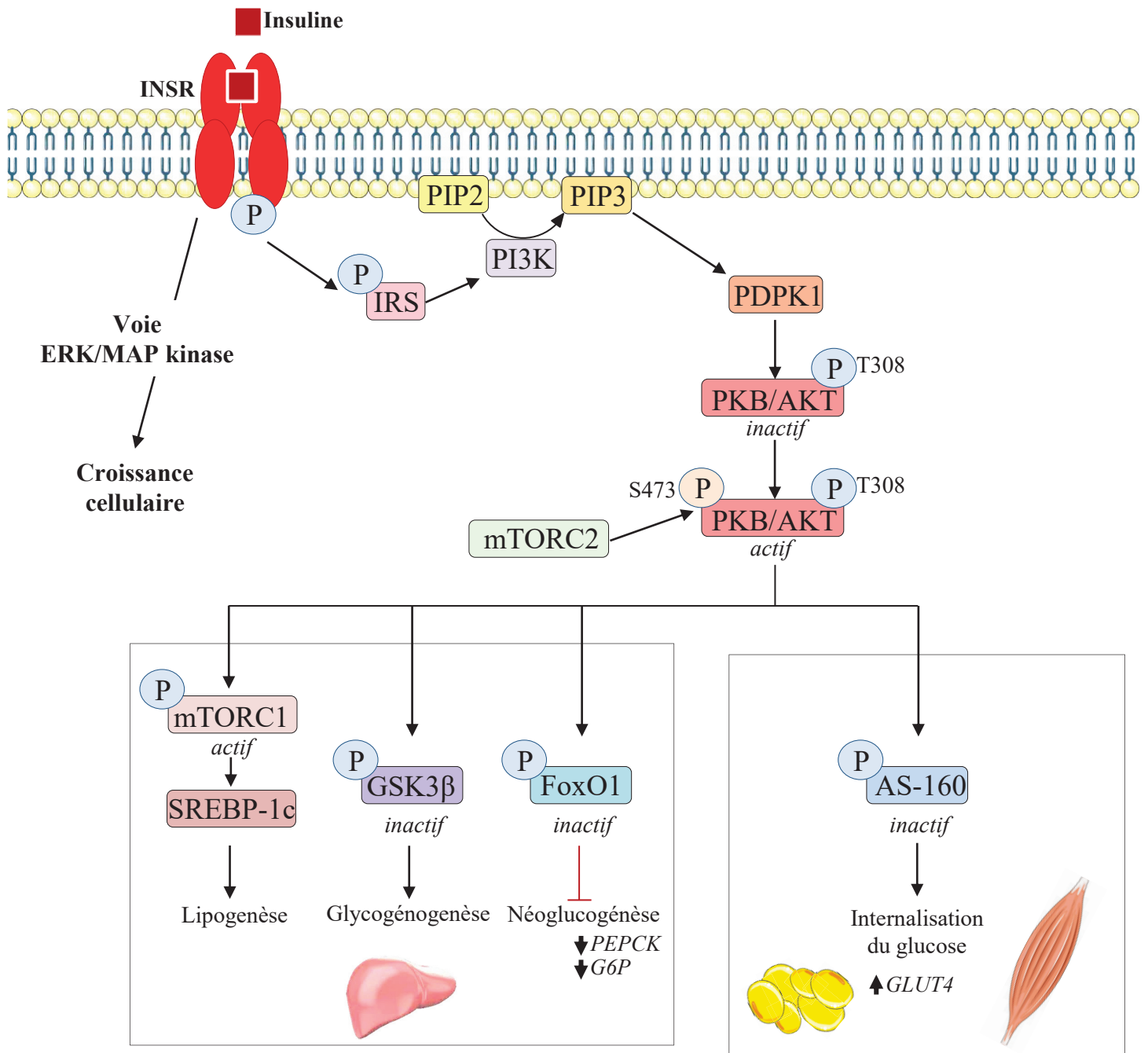


Figure 6: La voie de la signalisation cellulaire de l'insuline contrôlant les actions métaboliques de l'hormone.

- Les incrétines

De manière intéressante, Perley et Kipnis ont démontré que la sécrétion d'insuline était plus importante lors d'une ingestion orale de glucose plutôt que face à une infusion veineuse de la même quantité de glucose témoignant d'un mécanisme autre que l'augmentation de la glycémie dans la stimulation de la sécrétion de l'insuline²⁷. En effet, le passage du glucose dans le tractus gastro-intestinal stimule la sécrétion d'hormones : le GIP (glucose-dependent insulintropic polypeptide) et le GLP-1 (glucagon like peptide-1), respectivement sécrétés par les cellules K du duodénum et les cellules L du jéjunum et de l'iléon. Ce phénomène de potentialisation de l'effet du glucose sur la sécrétion d'insuline est nommé « effet incrétine ». Les incrétines, après liaison avec des récepteurs spécifiques sur les cellules β pancréatiques, augmentent la quantité d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), provoquant la stimulation de la sécrétion d'insuline. Ces hormones ont la particularité d'intervenir uniquement pour des concentrations de glucose égale ou supérieure à la normoglycémie, de ce fait celles-ci ne peuvent induire d'hypoglycémie.

- Le glucagon

Le glucagon est une hormone hyperglycémisante et sécrétée par les cellules α des îlots de Langerhans du pancréas. Durant les phases de jeûne alimentaire, le glucagon est l'hormone principale qui coordonne les réactions métaboliques en faveur de la mobilisation et de la production d'énergie. Son action s'effectue principalement sur le foie, en stimulant la glycogénolyse et la néoglucogénèse afin de fournir en énergie les tissus périphériques. Pour le TA, c'est la levée d'inhibition de l'insuline qui va stimuler la lipolyse du TA, permettant de fournir le foie en substrat pour la néoglucogénèse. De même, pour le contrôle de sa sécrétion, c'est l'augmentation d'insuline qui induit une diminution du taux de glucagon et inversement. Ainsi, l'insuline et le glucagon mènent des actions opposées mais coordonnées, c'est pourquoi, très souvent le ratio insuline/glucagon est étudié dans le contrôle de l'homéostasie glucidique.

Les catécholamines, comme l'adrénaline, sécrétées lors d'un stress physiologique, agissent comme le glucagon en favorisant la production d'énergie via la stimulation de la glycogénolyse, la néoglucogénèse hépatique et la lipolyse du TA, inhibant les voies de stockage.

(3) Deux organites clés du métabolisme : la mitochondrie et le RE

Le contrôle de l'homéostasie énergétique par le foie se fait notamment par l'encadrement précis de nombreuses réactions métaboliques au cours desquelles deux organites apparaissent indispensables : le réticulum endoplasmique (RE) et la mitochondrie.

a) *La mitochondrie*

La mitochondrie joue un rôle fondamental dans le catabolisme oxydatif permettant la production d'ATP grâce à des phosphorylations oxydative via la chaîne respiratoire (OXPHOS : phosphorylation oxydative) (transfert d'électron le long des 5 complexes de la chaîne respiratoire), mais intervient aussi dans d'autres fonctions cellulaires telles que l'apoptose, l'homéostasie calcique, l'autophagie et l'immunité^{28,29}. La mitochondrie se compose de deux membranes à la composition et aux propriétés complètement différentes : une membrane externe en contact avec le cytosol : l'OMM (outer mitochondrial membrane) et une membrane interne en contact avec la matrice mitochondriale : l'IMM (inner mitochondrial membrane). L'espace délimité par l'IMM et l'OMM est nommé espace intermembranaire (IMS : intermembrane space). L'OMM détient une composition proche de la membrane plasmique. Celle-ci, riche en PL, est perméable aux ions et aux petites molécules inférieures à 5kDa, grâce à la présence de la porine VDAC (Voltage Dependant Anion Channel)³⁰. A l'inverse, l'IMM, très imperméable aux ions, contient une grande quantité de protéines. Celle-ci forme des replis dans la matrice afin d'en augmenter la surface : ce sont les crêtes mitochondriales. L'IMM contient les 5 complexes OXPHOS qui permettent de générer de l'ATP, mais aussi différentes navettes permettant le transport des métabolites (*Figure 7*³¹). L'imperméabilité de l'IMM, nécessaire à l'établissement d'un gradient électrochimique de protons entre la matrice et l'IMS, permet la production d'ATP par l'ATP synthase. Du fait de la perméabilité de l'OMM, l'IMS a une composition proche du cytoplasme. En revanche la matrice mitochondriale se trouve isolée du cytoplasme. Celle-ci contient les enzymes nécessaires au CK ainsi que la plupart de celles utilisées dans la β -oxydation des AG mais également plusieurs copies de l'ADN mitochondriale (ADNmt). Dans la matrice mitochondriale, l'ADNmt est susceptible de subir des dommages importants dus à l'exposition fréquente aux radicaux libres. En effet, la mitochondrie représente le premier site de production des ROS (reactive oxygen species) car une faible proportion d'électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale réagit directement avec l'oxygène pour former le radical superoxyde. Les radicaux superoxydes représentent la principale source de ROS à l'intérieur de la mitochondrie. Leur durée de vie courte les convertit très rapidement en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces radicaux sont des particules très réactives, capables d'endommager les membranes, les protéines ou l'ADNmt entraînant des dysfonctions cellulaires et notamment à la surproduction de ROS et aboutissant à un cercle vicieux³². En condition physiologique, les ROS sont capables de contrôler des voies métaboliques via la modulation d'AMPK (AMP-activated protein kinase) et JNK (c-jun N-terminal kinase) ; mais en condition pathologique, ceux-ci peuvent être délétères en interférant avec des cascades de signalisation et en altérant des gènes mitochondriaux induisant des mitochondries dysfonctionnelles³³.

Cette exposition fréquente à des ROS, oblige un contrôle qualité régulier des mitochondries et un système d'élimination sélectif des mitochondries endommagées. Ce phénomène est nommé

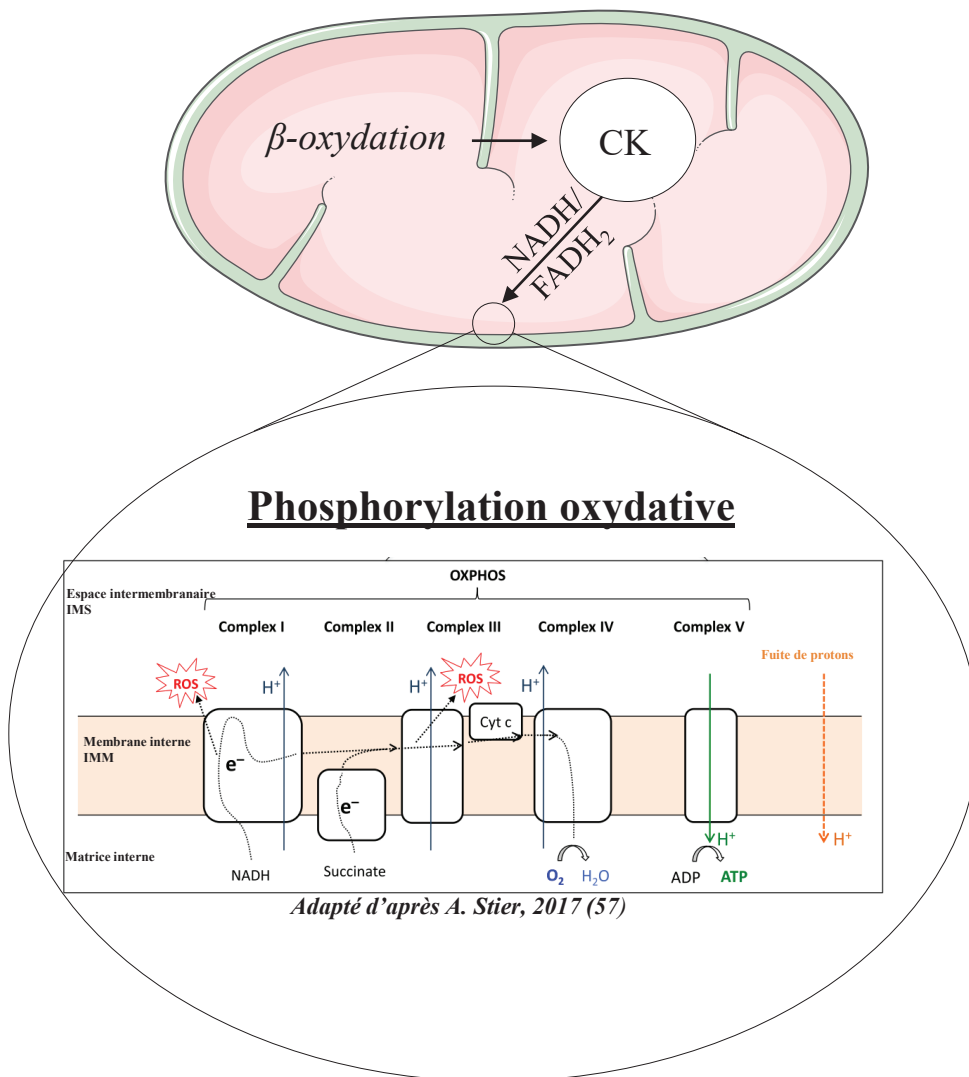


Figure 7: Complexes de la chaîne respiratoire de la mitochondrie responsable de la phosphorylation oxydative, OXPHOS

mitophagie sélective, par opposition à l'autophagie non sélective, et est activé par des niveaux faibles de ROS dans la cellule et lorsqu'une faible quantité de mitochondries est défectueuse³⁴. La mitophagie est une forme d'autophagie spécifiquement ciblée sur les mitochondries ayant pour but de garantir un pool de mitochondries fonctionnelles. Récemment, il a été montré que ces phénomènes d'élimination des mitochondries, qu'il s'agisse de la mitophagie sélective ou de l'autophagie non sélective, entretiennent un lien étroit avec la dynamique mitochondriale³⁴. En effet, la mitophagie sélective, induite par des faibles quantités de ROS, nécessite une fission mitochondriale de manière dépendante à Drp1 (dynamin-related protein 1) tandis que l'autophagie, induite par privation nutritionnelle, entraîne une hyperfusion des mitochondries³⁴. Cette réponse mitochondriale paradoxale peut s'expliquer par l'hyperfusion des mitochondries qui contrecarre l'élimination excessive des mitochondries par l'autophagie garantissant le maintien de la masse mitochondriale. En effet, en condition de jeûne, les niveaux de ROS sont élevés et induisant fortement les formes non sélectives d'autophagie. L'hyperfusion apparaît alors comme un moyen de connecter toutes les mitochondries fonctionnelles et d'écarter les mitochondries altérées afin que celles-ci soient éliminées.

Même si la dynamique mitochondriale ne constitue pas le seul mécanisme à l'origine du contrôle de la population mitochondriale, j'ai fait le choix de ne détailler que ce phénomène dans le paragraphe qui suit. La dynamique mitochondriale étant de nombreuses fois abordée dans *III. Partie 3*, sa description semble essentielle à la bonne compréhension de la partie 3.

- ***Dynamique mitochondriale***

Les mitochondries sont des structures très dynamiques qui s'adaptent à la demande énergétique via des cycles coordonnés de fusion et fission, c'est ce qu'on appelle la dynamique mitochondriale. La fission mitochondriale consiste à fractionner une mitochondrie mère afin de former deux mitochondries filles tandis que la fusion représente l'union de deux mitochondries afin d'en former une seule. La dynamique mitochondriale est notamment contrôlée par l'état métabolique des tissus et va directement impacter les fonctions mitochondriales et ses interactions avec les autres organites. Ainsi, pendant les périodes riches en nutriments les mitochondries sont maintenues dans un état fissionné alors que les périodes de jeûne alimentaire provoquent une fusion mitochondriale afin d'améliorer la production d'ATP via l'augmentation de l'activité OXPHOS^{35,36}.

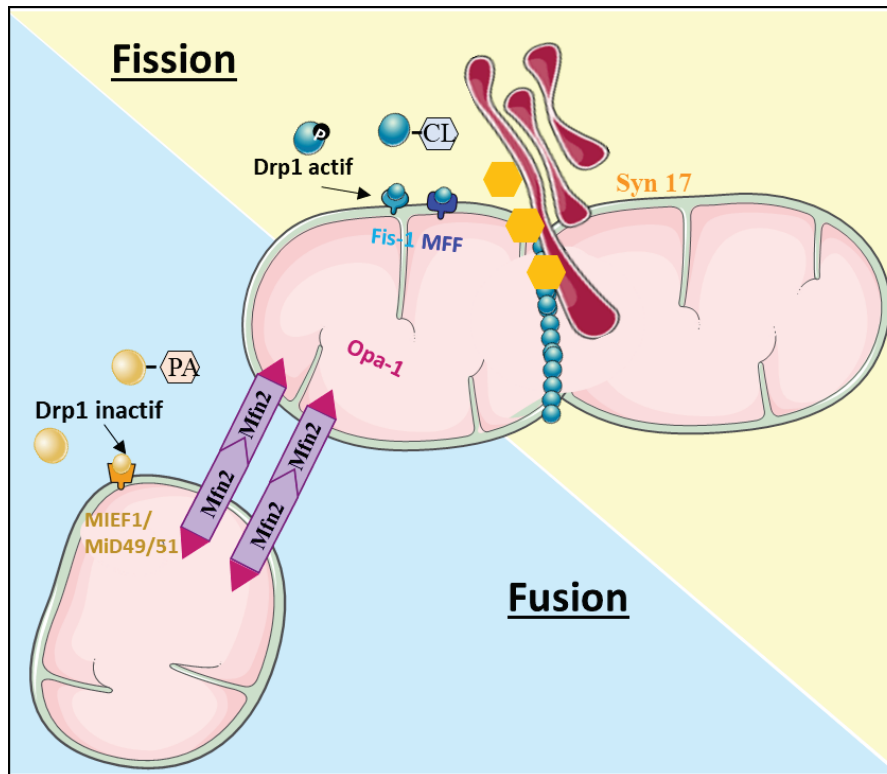


Figure 8 : Schéma récapitulatif de la dynamique mitochondriale comprenant les principaux acteurs de la fission et de la fusion de la mitochondrie. CL = cardiolipine, PA=acide phosphatidique

○ *La fission mitochondriale*

La fission est un processus qui se produit au niveau des sites de contact entre la mitochondrie et le RE. Des données récentes montrent la nécessité d'une pré-constriction par le RE autour de la mitochondrie ³⁷. L'implication des contacts RE-mitochondrie dans la dynamique mitochondriale sera plus amplement détaillée dans **III.A.(3) Fonctions des MAMs**. C'est au niveau de ce rétrécissement que la protéine réticulaire : la syntaxin 17 (Syn17) recrute Drp1, une GTPase cytoplasmique indispensable à la fission mitochondriale (**Figure 8**). Le rapprochement de Drp1 à la mitochondrie permet sa fixation sur ces récepteurs mitochondriaux : Fis1 (Fission 1) et Mff (mitochondrial fission factor), entraînant son oligomérisation en anneau autour de l'OMM. L'hydrolyse du GTP, par Drp1, induit son changement de conformation et par conséquent un étranglement de l'OMM ^{38,39}. Récemment, il a été montré que l'étape terminale de scission de la membrane était effectuée par la Dyn2 (Dynamine 2), une GTPase initialement connue pour son rôle de scission des vésicules d'endocytose ⁴⁰. Afin de réguler le recrutement de Drp1, différents récepteurs de celui-ci se trouvent ancrés à la membrane de la mitochondrie ⁴¹:

- *Mff* qui recrute Drp1 à l'OMM afin de promouvoir la fission mitochondriale ⁴²

- *MID49/MID51* (mitochondrial dynamics proteins de 49 ou 51kDa) sont également des récepteurs de Drp1 mais qui inhibent la fission en séquestrant Drp1^{43,44}

- *Fis1*, qui favorise la fission directement grâce à son rôle de récepteur de Drp1 et indirectement en séquestrant MID51, ce qui bloque l'inhibition de la fission⁴⁵. Cependant son rôle est encore discuté car une extinction de *Fis1* n'altère pas la fission mitochondriale⁴².

Au-delà du contrôle de la bioénergétique mitochondriale, la fission intervient également dans le contrôle de la qualité des mitochondries puisque celle-ci est nécessaire au phénomène de mitophagie.

○ *La fusion mitochondriale*

La fusion mitochondriale se décrit en deux étapes principales : la fusion de l'OMM médiée par les GTPases : Mfn1, 2 (Mitofusine 1,2) ; puis la fusion de l'IMM menée par une autre GTPase OPA1 (Optic Atrophy 1) (**Figure 8**). Les descriptions classiques de la fusion mitochondriale considèrent les Mfns avec deux domaines transmembranaires (TM) qui laissent apparaître les domaines HR2 et GTPase du côté cytosolique. Cette conformation permettrait d'initier la première étape de la fusion avec l'accrochage des mitochondries entre elles via ces domaines. Ensuite l'hydrolyse du GTP entraîne un changement de conformation et un rapprochement spatial des mitochondries conduisant à la fusion de l'OMM⁴⁶⁻⁴⁸. Il est important de noter qu'une nouvelle topologie alternative des Mfn 1 et 2 a été découverte, avec la présence d'un seul domaine TM, impliquant donc la présence du domaine HR2, non pas du côté cytosolique, mais dans l'IMS de la mitochondrie. Des études complémentaires sont nécessaires afin de préciser ces nouveaux mécanismes mais il semblerait que l'environnement oxydatif de l'IMS, dû à la production de ROS, entraîne l'accrochage des mitochondries et la fusion de l'OMM⁴⁹. Après la fusion de l'OMM, intervient : OPA1, une protéine ancrée à l'IMM, et la cardiolipine (CL), un PL spécifique de l'IMM. Il existe deux formes d'OPA1 : des formes longues L-OPA1, ancrées à l'IMM, et des formes courtes S-OPA1 qui se trouvent dans l'IMS. La balance entre ces deux formes permettrait de garder un équilibre fusion-fission. Aussi, les deux isoformes seraient nécessaires à la fusion puisque S-OPA1 amorcerait l'interaction de L-OPA1 et CL afin d'initier la fusion de l'IMM^{50,51}. De manière intéressante, comme pour la fission, les contacts mitochondrie-RE semblent également intervenir puisque la CL, indispensable à la fusion, est majoritairement produite à partir du PA (acide phosphatidique) qui provient du RE⁵². Aussi le PA et la CL, via leur liaison avec Drp1, vont jouer des rôles antagonistes dans la régulation de la dynamique mitochondriale. En effet, la liaison CL-Drp1 stimule l'activité GTPase de Drp1 favorisant la fission tandis que l'interaction PA-Drp1, à l'inverse, réprime son activité GTPase entraînant une hyperfusion mitochondriale⁵³.

Le calcium (Ca^{2+}) joue également un rôle très important dans la régulation de la dynamique fusion/fission notamment via Miro, une protéine de l'OMM impliquée dans la mobilité des mitochondries. En effet, lorsque Miro se trouve dans des micro-domaines riches en Ca^{2+} celui-ci stoppe

les mouvements de la mitochondrie, favorisant la fission. A l'inverse, des faibles concentrations de Ca^{2+} favorisent les interactions entre Miro et le cytosquelette, et ainsi la mobilité des mitochondries, plus en faveur de la fusion ^{54,55}.

- ***L'homéostasie calcique mitochondriale***

Outre le rôle du Ca^{2+} dans la mobilité des mitochondries, celui-ci est indispensable pour l'activité mitochondriale et notamment pour la production d'ATP et de NADH/FADH₂ via sa capacité à activer 3 déshydrogénases du CK : la PDH, l' α -cétoglutarate déshydrogénase et l'isocitrate déshydrogénase mais également l'ATP synthase et l'adénine nucléotide translocase (ANT) ^{56,57}. Dans le foie, le Ca^{2+} tient un rôle particulièrement important dans la néoglucogénèse via la modulation de l'activité de la pyruvate carboxylase responsable de la conversion du pyruvate en OAA, un substrat de la néoglucogénèse, mais aussi en jouant sur l'activité de la PEPCK (phosphoénolpyruvate carboxykinase) permettant la production de PEP (phosphoénolpyruvate) à partir d'OAA. De plus, le Ca^{2+} intervient sur la voie CaMK-FOXO (Calcium/calmoduline dependent-protein kinase-FOXO), régulant les gènes de la néoglucogénèse et de la glycolyse. Ainsi, le Ca^{2+} s'impose comme un régulateur commun à de nombreuses voies du métabolisme cellulaire et c'est pourquoi sa régulation requiert la plus grande attention.

L'accumulation du Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale nécessite le passage de la double membrane (**Figure 9**). L'OMM, par la présence d'un grand nombre de VDAC, permet un passage facile de Ca^{2+} dans l'IMS. En revanche, le passage à travers l'IMM se fait via un canal sélectif ayant une faible affinité pour le Ca^{2+} : MCU (Mitochondrial Calcium Uniporter). Les recherches ont montré que la mitochondrie se localisait à proximité du RE et notamment des canaux calciques sortants (IP3Rs : inositol-1,4,5-trisphosphate receptor ; RYRs : ryanodine-sensitive channels) les plaçant dans des micro-domaines riches en Ca^{2+} . Cet environnement permet l'entrée de Ca^{2+} dans la mitochondrie et ceci malgré la faible affinité de MCU pour le Ca^{2+} . Cette stratégie protège la mitochondrie d'une surcharge calcique délétère en réponse aux fréquentes fluctuations du Ca^{2+} cytosolique ⁵⁸. Récemment, l'étude structurale de MCU montre que celui-ci ne comporte aucun domaine régulateur permettant un contrôle de sa propre activité. En effet, il est maintenant clair que l'activité de MCU est régulée par une protéine de l'IMS : MICU1 (mitochondrial calcium uptake 1 protein). D'une part, MICU1 facilite l'absorption de Ca^{2+} en augmentant la conductivité de MCU mais limite également les entrées de Ca^{2+} puisque son extinction entraîne une surcharge calcique mitochondriale ^{59,60}. Aussi, la présence du gradient électrochimique, due à l'extrusion de H^+ dans l'IMS par OXPHOS, permet de fournir la force motrice nécessaire à l'entrée de Ca^{2+} . Dans ce sens, le traitement avec un découpleur : le FCCP (p-[trifluorométhoxy]-phényl-hydrazone) effondre le potentiel de membrane mitochondriale et abolit totalement l'absorption de Ca^{2+} par la mitochondrie ⁵⁶. Le maintien de l'homéostasie calcique mitochondriale nécessite également la présence de flux sortant de Ca^{2+} , pour se faire la mitochondrie possède des échangeurs ioniques :

Homéostasie calcique mitochondriale

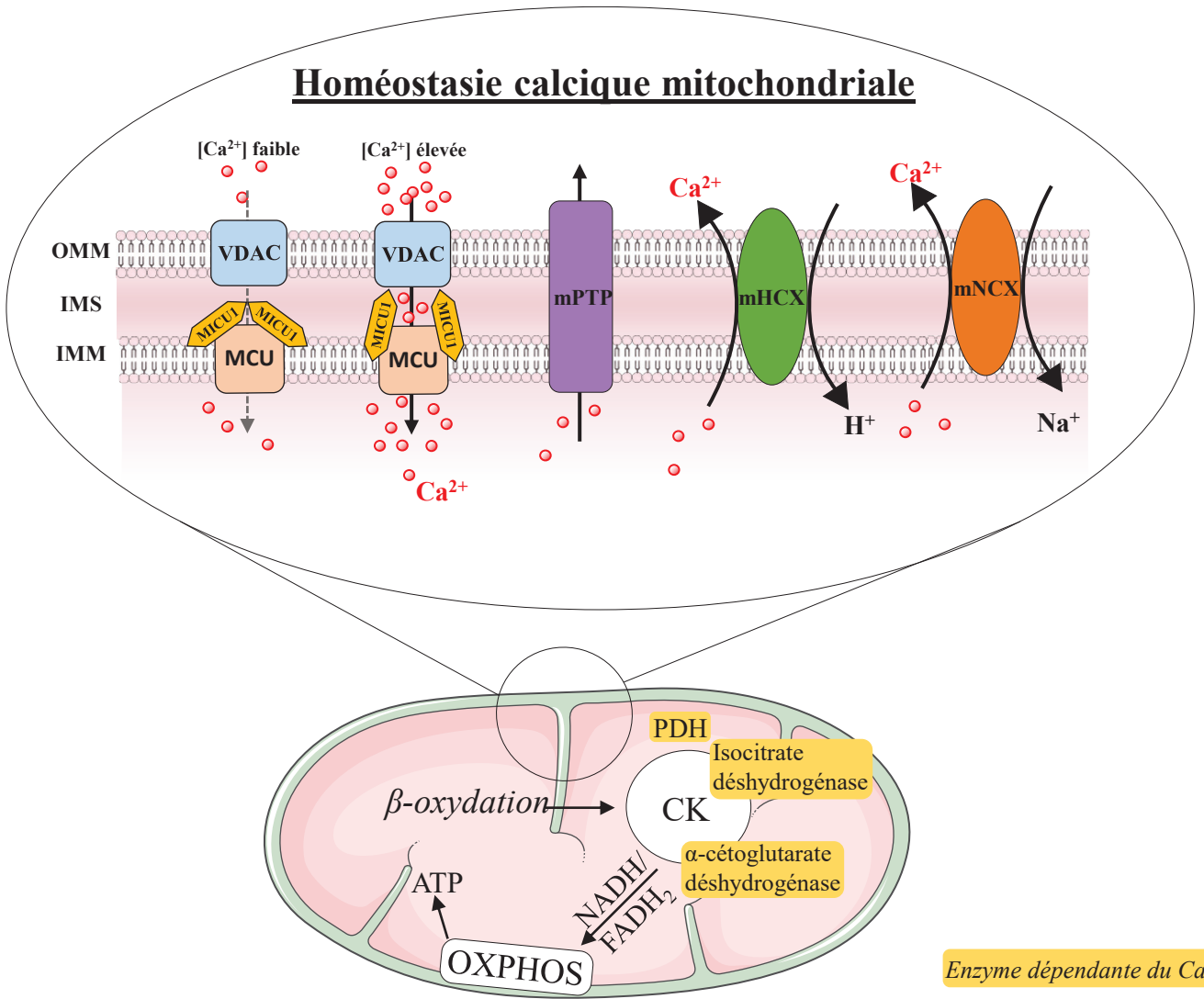


Figure 9: Canaux et transporteurs responsables de l'homéostasie calcique mitochondriale.

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mNCX) et $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ (mHCX). Cependant, le principal pore de sortie du Ca^{2+} mitochondrial reste le mPTP (mitochondrial Permeability Transition Pore). Le principal facteur entraînant l'ouverture du mPTP est la surcharge de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale induisant une perméabilité membranaire de la mitochondrie. Ceux-ci provoquent un effondrement du potentiel de membrane, augmentant la production de ROS par OXPHOS parallèlement à une diminution de la production d'ATP, et un relargage de cytochrome c dans le cytoplasme déclenchant les processus d'apoptose de la cellule⁶¹.

b) Le RE

Le RE est un organe spécifique des cellules eucaryotes appartenant au système endomembranaire. Son volume peut atteindre 10% du volume total de la cellule faisant de lui l'un des plus gros organites de la cellule. Le RE, composé d'une membrane séparant le cytosol de la lumière du RE, s'organise sous forme d'un grand réseau interconnecté de tubules et de saccules⁶². Il existe deux types de RE : le RER (réticulum endoplasmique rugueux) et le REL (réticulum endoplasmique lisse), qui se différencient par la présence de ribosomes à sa surface, côté cytosolique. Le RE tient un rôle central dans la biosynthèse des lipides et des protéines (transmembranaires et hydrosolubles) de la cellule. Dans les hépatocytes, le RE permet les réactions de détoxification, mais est également responsable de la synthèse des lipoprotéines nécessaires au transport des lipides dans le sang⁶². La grande majorité des protéines sécrétées, et présentes dans les cellules, passent dans le RE où celles-ci vont subir des maturations post-traductionnelles et des repliements. La cellule vérifie très régulièrement le fonctionnement correct du système, sans quoi le RE active une réponse au stress produit par l'accumulation de protéines mal repliées, appelée : « Unfolded Protein Response » (UPR) (**Figure 10A**). Cette réponse consiste en l'activation de 3 senseurs du stress : PERK (double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-like ER kinase), IRE1 (inositol-requiring enzyme-1), et ATF6 (activating transcription factor-6). Ces trois voies induisent différents processus dans le but de i) diminuer la synthèse protéique, ii) d'augmenter la dégradation des protéines mal conformées via la synthèse de protéines impliquées dans la machinerie de dégradation des protéines du RE : ERAD (ER-associated degradation), et iii) d'augmenter la présence de protéines chaperonnes nécessaires à la bonne conformation des protéines dans le but de retrouver une homéostasie. Si cette homéostasie n'est pas restaurée, l'induction de l'apoptose reste le dernier recours^{63,64}.

Une des autres fonctions du RE est celle de réservoir calcique. En effet, le Ca^{2+} ayant une fonction de messenger intracellulaire, celui-ci doit être stocké dans des réservoirs de manière à réguler très finement les concentrations cytoplasmiques. Ainsi le RE possède une concentration calcique d'environ $300\mu\text{M}$, tandis que celle du cytoplasme et de la mitochondrie est d'environ 100nM ⁶⁵. De plus, de nombreuses chaperonnes, intervenant dans la régulation des mécanismes de repliement des protéines

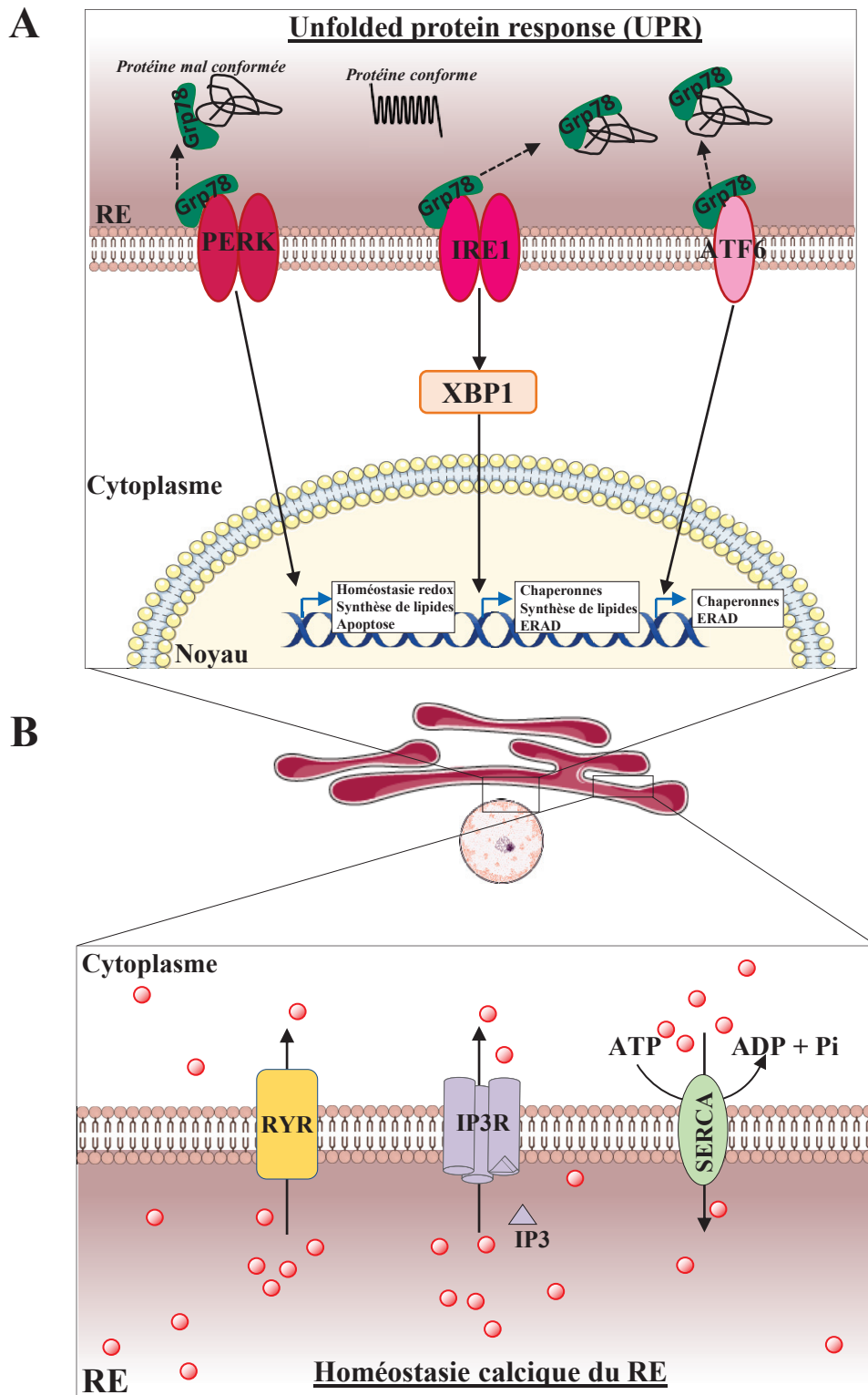


Figure 10: Stress et homéostasie calcique du RE. (A) Schéma représentatif des 3 voies activées lors de l'UPR en réponse à un stress du RE. (B) Schéma représentatif des canaux et transporteurs calciques responsables de l'homéostasie calcique du RE.

dans le RE, sont dépendantes du Ca^{2+} . L'homéostasie calcique du RE est assurée par des canaux à la surface du RE (**Figure 10B**). Les flux sortants de Ca^{2+} sont régulés par deux types de canaux, les IP3Rs et les RYRs, tandis que la recapture du Ca^{2+} dans la lumière du RE est réalisée par la pompe SERCA (sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase). De manière intéressante, le RE participe également à l'homéostasie calcique mitochondriale puisque des échanges calciques s'opèrent entre le RE et la mitochondrie via le complexe IP3R-grp75-VDAC⁶⁶. Les caractéristiques, fonctions et relations de ces points de contacts seront détaillées dans la **III. Partie3**. De ce fait, un stress du RE peut amener à une augmentation du transfert calcique à la mitochondrie conduisant à une accélération de la machinerie OXPHOS, à la surproduction de ROS augmentant la probabilité d'avoir des fuites d'électrons⁶⁷.

B. Le Diabète du type 2

(1) Vue d'ensemble des Diabètes

L'évolution des modes de vie a amené à une telle recrudescence de diabète ces dernières années, que certains l'appellent « le mal du siècle » et vont jusqu'à parler d'épidémie. Le diabète se définit comme une pathologie grave et chronique caractérisée par une hyperglycémie chronique associée à un défaut d'insuline, soit dans la sécrétion, soit dans son utilisation par l'organisme^{21,68}. Il existe globalement 3 types de diabète : le diabète de type 1 (DT1), le DT2, le diabète gestationnel (DG) (**voir I. B. (1) b**). Cependant, les écrits historiques et les données épidémiologiques ne peuvent distinguer les différents diabètes. C'est pourquoi dans la partie qui va suivre, il est important de garder à l'esprit que le DT2 dans le contexte de l'obésité représente 90% des cas de diabète dans le monde²¹. Ma thèse se rapportant au DT2, associée à une obésité, les parties qui suivent ont pour but de se concentrer principalement sur le DT2.

Le problème majeur du DT2 est son caractère insidieux et asymptomatique rendant son diagnostic compliqué. Les causes précises de l'apparition du DT2 sont actuellement méconnues mais certains facteurs comme le surpoids, la sédentarité, et la présence d'une stéatose hépatique, semblent jouer un rôle important dans l'expansion de cette pathologie. Ces dernières années, les recherches se multiplient pour comprendre les causes et les mécanismes du DT2 afin de proposer de nouvelles stratégies pour traiter le DT2.

a) Les différents types de diabètes

(1) Diabète de type 1 (DT1)

Le DT1 ou diabète insulino-dépendant est une maladie auto-immune se caractérisant par la déficience de sécrétion d'insuline. Le système immunitaire des patients DT1 est défectueux c'est à dire

que celui-ci reconnaît les cellules β des îlots de Langerhans, responsables de la sécrétion d'insuline, comme un corps étranger. Cette anomalie entraîne une destruction progressive des cellules β aboutissant à une production insuffisante, voire inexistante, d'insuline chez les patients. C'est le type de diabète le plus fréquent chez les enfants même si son apparition survient à tout âge. Le DT1 représente 10% des cas de diabète dans le monde ^{21,69}. Les origines du DT1 ne sont pas encore très claires, mais il semble qu'une association de gènes de prédispositions et de facteurs environnementaux favorisent son apparition. Le DT1, étant une maladie auto-immune, le diagnostic s'effectue par la recherche d'autoanticorps. Durant les premières phases de la maladie, la sécrétion d'insuline par les cellules β persistantes, maintient le patient dans un état asymptomatique. Les symptômes, notamment l'hyperglycémie, n'apparaissent que lorsque la quasi-totalité des cellules β du pancréas est éliminée. Les patients DT1 vont aussi présenter une polydipsie (soif excessive), polyurie (miction fréquente), et quelques fois une perte de poids ²¹.

Le traitement de référence chez les patients DT1 est l'insulinothérapie qui consiste en des injections régulières d'insuline sous cutanées afin de compenser la déficience en insuline. Cependant chez une minorité des patients, l'insulinothérapie ne parvient pas réguler leur diabète, obligeant le recours à la greffe du pancréas. Cette opération très lourde, consiste à implanter des îlots pancréatiques dans le foie des patients afin que celles-ci s'y nichent et sécrètent de l'insuline. Les pistes de recherche sur le DT1 s'orientent vers différentes stratégies : i) comprendre les origines environnementales afin de prévenir son apparition ; ii) rééduquer le système immunitaire des patients afin de tolérer les cellules β à l'aide d'immunothérapie ; iii) stimuler la régénération des cellules β dans le pancréas des patients avec des médicaments, iv) utiliser les cellules souches pluripotentes du patient pour générer des cellules β grâce à la thérapie génique ⁶⁹.

(2) Diabète de type 2 (DT2)

Le DT2 ou diabète non-insulino-dépendant est le diabète le plus répandu, il représente 90% des cas de diabète dans le monde. Même si le DT2 n'a pas d'origine génétique directe, il semblerait que certains profils génétiques favorisent le développement de la maladie, cependant le principal facteur de risque reste le mode de vie. En effet, une alimentation riche en glucides et en lipides, accompagnée d'un mode de vie sédentaire, aboutissent à une obésité et notamment au développement d'un « foie gras » appelé stéatose, favorisant considérablement la survenue du DT2. Le maintien d'un tel mode de vie induit une mobilisation importante et constante des organes impliqués dans l'homéostasie glucidique comme le foie, le TA, les muscles et le pancréas. Dans un premier temps, l'organisme arrive à compenser, ce qui explique le caractère asymptomatique du DT2 dans la plupart des cas et durant des années. Cependant les cellules des organes insulino-sensibles, exposées de manière excessive à l'insuline, au fur et à mesure des années deviennent insensibles à ce stimulus, on parle alors d'insulino-

résistance (IR). Cette anomalie touche les organes insulino-sensibles : principalement le foie, le TA et les muscles. L'IR cause un défaut de capture et d'utilisation du glucose dans les tissus et aboutit à une hyperglycémie des patients. Pour corriger cela, le pancréas va progressivement augmenter sa sécrétion d'insuline, mais en vain. Les cellules β s'affaiblissent et la sécrétion d'insuline diminue, potentialisant l'hyperglycémie ⁷⁰. Les formes sévères de DT2 peuvent présenter une destruction partielle des cellules β , s'apparentant alors un diabète insulino-dépendant. Il est presque impossible de connaître le moment exact où le patient devient DT2. Récemment, la Fédération International du Diabète (FID) dans son rapport de 2019, distingue une catégorie de pré-diabète qui consiste en une intolérance au glucose et une altération de la glycémie à jeun pouvant conduire, s'il n'est pas traité, à un DT2.

Le diagnostic du DT2 s'effectue tardivement, souvent une longue période après les premières défaillances de l'organisme, lors de l'apparition de complications ²¹ (*voir III.B.(2)Physiologie du DT2*).

(3) Diabète gestationnel (DG)

Le DG est une forme de diabète qui apparait chez les femmes enceintes quand les hormones placentaires empêchent les tissus de répondre à l'insuline ; si l'organisme est dans l'incapacité de contrer cet effet le diabète apparait alors ⁷¹. Le DG peut survenir à n'importe quel moment de la grossesse, même si c'est très souvent lors du second trimestre et il disparaît généralement après l'accouchement. La présence d'un flux sanguin commun entre la mère et le fœtus, expose l'enfant à l'hyperglycémie de la mère, induite par le DG. Cette exposition très précoce, à des teneurs élevées en glucose, favorise le risque de développement de DT2 à l'âge adulte via des mécanismes épigénétiques. Les femmes présentant une hyperglycémie avant grossesse, un surpoids, une obésité, un âge avancé, des antécédents de DG, une prise de poids excessive pendant la grossesse, des antécédents familiaux de diabète, un syndrome des ovaires polykystiques ou du tabagisme, sont exposées à un risque accru de développer un DG ²¹.

(4) Autres diabètes : les diabètes non classés

Il existe également des diabètes monogéniques qui se développent à la suite d'une mutation d'un seul gène. Plusieurs formes de diabètes monogéniques existent, cependant ils restent rares et représentent seulement 1,5 à 2% de tous les cas de diabète. La distinction avec les autres types de diabète est compliquée, c'est pourquoi ces patients sont souvent à tort diagnostiqués comme des DT1 ou DT2 ²¹.

b) Un peu d'histoire

Le diabète est une maladie qui existe depuis des milliers d'années. En effet, dans l'Antiquité, les grecs et égyptiens avaient mentionné « une maladie entraînant une soif intense, une miction excessive et une perte de poids », symptômes similaires au diabète ^{72,73}. A noter que le mot diabète est d'origine

grecque et signifie « qui traverse », « passer à travers », illustrant les symptômes des patients qui ingèrent de grandes quantités d'eau sans pouvoir les retenir ⁷⁴.

Plus tard, au Vème siècle en Inde, les docteurs Sushruta et Charaka, utilisaient des fourmis et l'urine des patients pour poser leur diagnostic. En effet, les fourmis étaient attirées par les urines des patients diabétiques qui contenaient du sucre ; ils parlaient « d'urine de miel ». C'est pourquoi, des années plus tard, le diabète fut qualifié de « mellitus » qui signifie « miel » en latin ⁷².

Au XVIIème siècle, en Angleterre, des médecins constatent le goût sucré d'urine de patients diabétiques, tandis que d'autres observent l'apparition de diabète chez des personnes ayant eu une lésion du pancréas. En suisse, en 1683, le médecin Johann Conrad Brunner, a observé suite à une ablation partielle du pancréas chez un chien, l'apparition d'une soif intense et l'augmentation des urines ⁷².

Matthew Dobson en 1776, puis John Rollo en 1797, mesurent le sucre dans les urines de patients diabétiques et démontrent la présence de sucre dans le sang. Ces découvertes ont été publiées dans la revue « Medical Observations and Inquiries ». Déjà, ils distinguent deux diabètes : un premier qui tue rapidement les patients (DT1) et un deuxième de type chronique (DT2), hélas le manque de traitement efficace n'assure pas une grande espérance de vie aux patients ^{72,73}.

Au XIXème siècle, en France, le médecin et physiologiste Claude Bernard, montre que les sujets sains régulent naturellement leur taux de sucre dans le sang, contrairement aux diabétiques qui gardent des taux sanguins de sucre élevés ⁷⁵.

Deux siècles après l'expérience de Johann Conrad Brunner, en 1889, Joseph Von Mering et Oskar Minkowski font le lien entre le diabète et le pancréas en effectuant une ablation complète du pancréas chez un chien et en observant, comme Brunner, une soif intense, des urines abondantes, ainsi qu'une élévation progressive du sucre dans le sang aboutissant à la mort du sujet après quelques jours. Ils démontrent l'existence d'une « substance chimique hypoglycémiant » ^{76,77}.

En 1921, à l'université de Toronto, Frederick Banting et Charles Best effectuent des expériences sur des extraits de pancréas de chien et isolent le « principe antidiabétique » dans l'extrait de pancréas : c'est l'insuline. Son nom a pour origine « insula » qui signifie île probablement car cette substance provient des îlots de Langerhans dans le pancréas ⁷⁸.

En 1922, un jeune homme de 14 ans, Leonard Thompson, est le premier patient recevant une injection d'extrait pancréatique qui lui permet de vivre plusieurs années. Ensuite les recherches des laboratoires Lilly ont mené à une meilleure purification et une production de grande ampleur ^{76,79}. Il s'ensuit de nombreuses années de recherche, qui ont permis de préciser les causes du diabète et de distinguer différents types.

c) *Epidémiologie du DT2*

Les données qui suivent sont tirées du rapport de la FID 2019, dans lequel les différents types de diabète ne sont pas nécessairement distingués. Lorsque le type de diabète n'est pas précisé, il faut donc garder à l'esprit que le DT2 représente 90% des cas de diabète.

(1) *Le DT2 dans le monde*

Parler d'épidémie mondiale de DT2 n'est actuellement pas excessif, puisque l'évolution du nombre de diabétiques dans le monde croît régulièrement ces dernières années. En effet le nombre de personnes adultes (20-79ans) vivant avec du diabète en 2000 était de 151 millions (4,6% de la population de l'époque), en 2019 nous sommes passés à 463 millions de diabétiques dans le monde (9,3% de la population de 2019) (*Figure 11*²¹). D'après les prévisions faites par la FID, ces chiffres sont en constante augmentation avec pour 2030 une prévision de 10,2% de la population touchée par le diabète soit 578 millions et pour 2045 10,9% de la population (700 millions de personnes).

Le diabète n'épargne aucun pays. Il a un impact fatal dans les pays à faibles ressources qui ne présentent pas de systèmes de santé efficaces pour palier cette épidémie. Actuellement les pays les plus impactés sont dans l'ordre : la Chine, l'Inde, les Etats-Unis, le Pakistan et le Brésil. Ces chiffres pourtant inquiétants sous-estiment le nombre de cas de diabète dans le monde car ils ne prennent pas en compte les milliers de personnes qui vivent avec un diabète mais n'ont jamais été diagnostiqués.

Ces chiffres rapportent la prévalence du diabète dans chaque pays, c'est-à-dire le nombre de cas rapporté sur l'effectif total de la population sans distinction des anciens et nouveaux cas. En effet, l'évolution de la médecine permet d'apporter des traitements aux patients DT2 et d'augmenter leur espérance de vie. La mesure de l'incidence, basée sur le nombre de nouveaux cas, donnerait de meilleures précisions de l'évolution. Il est actuellement impossible de mesurer l'incidence par pays, cependant la FID montre que chez l'adulte (55ans-79ans) de 2006 à 2014 27% des pays ont une incidence stable, pour 36% celle-ci est en baisse et pour 36% elle est en hausse.

Dans les précédents rapports de la FID, les experts prédisent une augmentation alarmante de la prévalence du diabète dans le monde de 51 % entre 2019 et 2045 (20-79ans), avec une estimation par région de :

- + 143% Afrique
- + 96% Moyen-Orient et Afrique du Nord
- + 74% Asie du Sud Est
- + 55% Amérique Centrale et du Sud
- + 33% Amérique du Nord et Caraïbes
- + 31% Pacifique Occidental

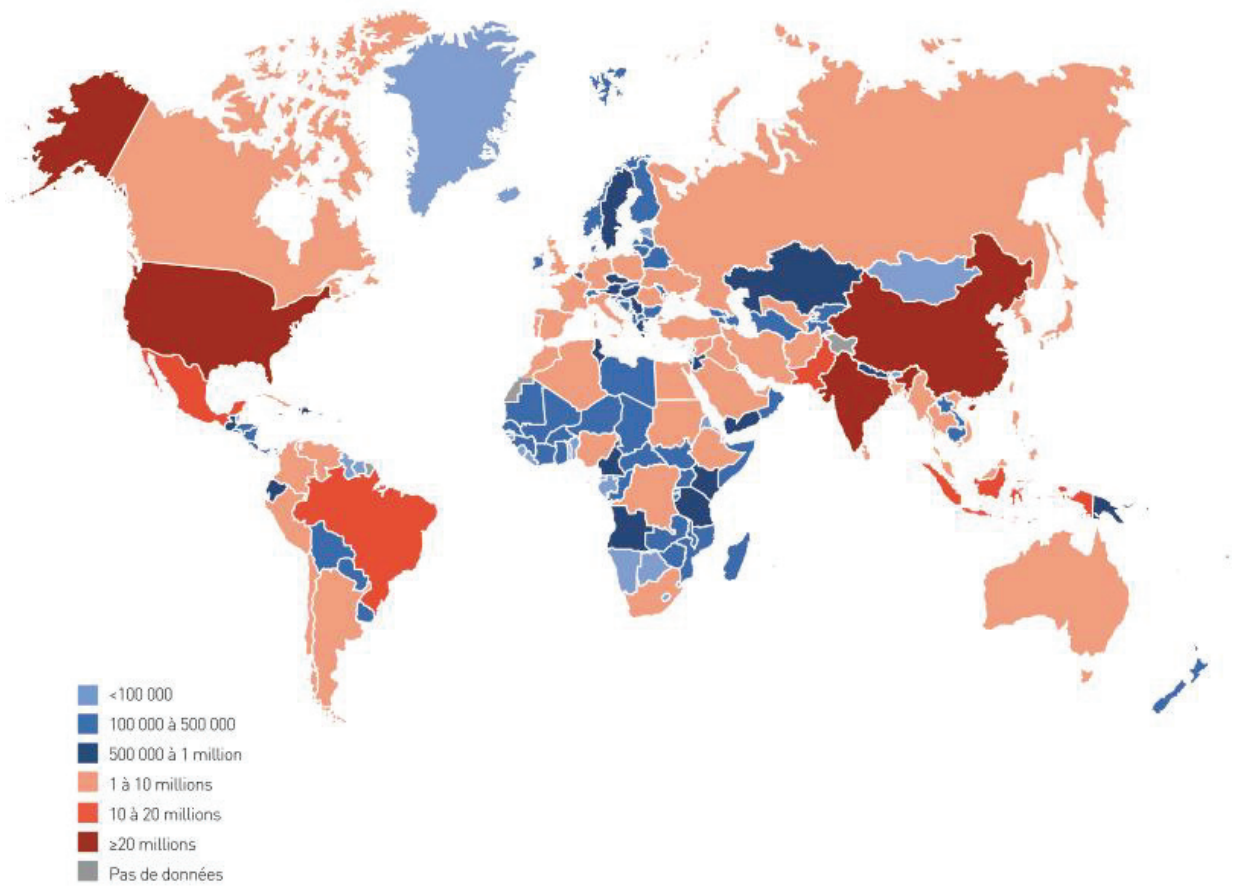


Figure 11: Estimation du nombre total d'adultes (20 à 79 ans) vivant avec le diabète en 2019, issu de la FID, 2019.

- + 15% en Europe

La mise en place de nouvelles stratégies de dépistages, de campagnes de prévention et de sensibilisation par l’OMS pourrait permettre de ralentir la propagation.

(2) Le DT2 en France

La France n’est pas épargnée par le diabète, en 2015, 5,4% de la population était traitée pour un diabète ⁸⁰. Le nombre de cas, en 4 ans, a dépassé la prévision des experts pour atteindre 7,6% en 2019. Même si la France se situe en dessous de la prévalence Européenne de 8,9%, celle-ci est sous-estimée car elle ne compte pas les patients ignorant leur diabète ²¹.

Les régions de France ne sont pas touchées de manière uniforme, avec une prévalence 2 fois supérieure en outre-mer. En métropole, ce sont les départements du Nord-Est qui sont les plus touchés par le diabète, à l’inverse la Bretagne présente la prévalence la plus faible de France ⁶⁸.

(2) Physiopathologie du DT2

a) *Les altérations*

Comme vu précédemment, pour les patients DT2-obèses atteints d’insulinorésistance (IR), le TA, les muscles et le foie ne sont plus sensibles à l’insuline ²⁵. L’IR est responsable de nombreuses modifications de flux métaboliques dans ces tissus, aboutissant à une perturbation de l’homéostasie glucidique et lipidique de l’organisme. L’étude des mécanismes moléculaires de l’IR de chacun de ces tissus est complexe, puisque ces organes interagissent entre eux ⁸¹. Ainsi, l’IR du TA se traduit notamment par une absence d’inhibition de la lipolyse par l’insuline entraînant une augmentation du flux d’AGL, et en conséquence une augmentation de dépôt graisseux ectopiques au niveau du muscle et du foie. Le muscle, qui constitue le principal site d’absorption du glucose, présente, en situation d’IR, une altération de l’utilisation de glucose due à une diminution du transporteur Glut4 à la membrane, participant à l’hyperglycémie des DT2. Cependant la raison principale de l’hyperglycémie à jeun des DT2 est l’IR hépatique, due à l’incapacité de l’insuline à inhiber la néoglucogenèse. En parallèle, ces patients présentent très souvent une stéatose hépatique qui se traduit par une augmentation de leurs TG circulants et une accumulation anormale de TG sous forme de gouttelettes lipidiques. Le lien de cause à effet entre la stéatose hépatique et l’IR hépatique n’est actuellement pas établie mais les recherches s’accordent à dire que ces deux phénomènes sont intimement liés. Ce contexte établit un état inflammatoire à bas bruit de l’organisme qui participe également à la mise en place de l’IR.

Dans les phases initiales du DT2, l’IR de chacun des tissus va provoquer une hyperglycémie modérée, c’est-à-dire supérieure à une normoglycémie, mais inférieure au seuil du diagnostic du diabète établi par la FID. On parle d’intolérance au glucose (IG). Pour faire face à cette demande accrue

d'insuline, le pancréas, dans un premier temps, augmente sa sécrétion d'insuline afin de maintenir une normo-glycémie malgré l'IR : c'est l'hyper-insulinémie. Au fur et à mesure des années, les cellules β du pancréas ne peuvent plus faire face à la demande croissante d'insuline pour compenser l'IR. Le pancréas s'épuise et progressivement s'altère jusqu'à ce que celui-ci ne puisse plus sécréter suffisamment d'insuline. On parle d'insulinopénie. L'altération du contrôle de la glycémie par le pancréas, se reflète par l'apparition d'une hyperglycémie à jeun des patients DT2. Plusieurs dizaines d'année peuvent séparer la mise en place de l'IR et l'insulino-déficience des patients DT2. Durant cette période, le diagnostic est très compliqué puisque les patients sont asymptomatiques, c'est pourquoi le DT2 est qualifié de maladie insidieuse.

b) Les complications

Un des problèmes majeurs des personnes atteintes de DT2 est l'augmentation significative de risques de développer des pathologies lourdes et parfois mortelles.

Les patients DT2 peuvent présenter, en réponse à l'hyperglycémie, une augmentation de leurs mictions entraînant des déshydratations sévères, une baisse de la pression sanguine pouvant aller jusqu'au coma : c'est le syndrome hyperglycémique hyperosmolaire (SHH) ⁸². Environ 20% des personnes présentant un SHH n'ont pas été diagnostiqués comme diabétiques, ce qui explique la complexité de la prise en charge des patients atteints. A l'inverse, les patients peuvent présenter des hypoglycémies s'ils n'arrivent pas à équilibrer leur balance énergétique et/ou leur traitement éventuel. L'état d'hypoglycémie sévère, tout aussi dangereux que le SHH, entraîne à une perte de connaissance qui peut aller jusqu'au coma s'il n'est pas traité. Le mauvais contrôle de la glycémie des patients affecte tout l'organisme, notamment la cavité buccale induisant des risques d'infection et de problèmes bucco-dentaires pouvant aller jusqu'à la perte des dents favorisant une malnutrition et donc une aggravation du mauvais contrôle de la glycémie ²¹.

S'ajoute à cela l'une des complications les plus sévères et les plus courantes chez les patients diabétiques : le développement de maladies cardiovasculaires (MCV), avec une prévalence de 32% pour les patients diabétiques. Aussi, les patients souffrant en plus du diabète, de l'hypertension vient augmenter de façon conséquente le risque de développer des maladies rénales chroniques comme la néphropathie diabétique mais également des maladies oculaires comme des rétinopathie diabétiques pouvant aboutir à la cécité. Enfin, le risque de neuropathie périphérique est accru chez les patients diabétiques. Dans la plupart des cas, celle-ci touche les membres inférieurs et notamment les pieds. On parle de « pied diabétique », qui sans traitement, amène à l'amputation. En effet, toutes les 30 sec un membre est amputé dans le monde en raison du diabète ²¹.

L'environnement socio-économique des patients influence beaucoup le développement de ces complications. En effet, celles-ci peuvent être évitées grâce au bon contrôle de la glycémie, ce qui est

faisable uniquement si le patient a été diagnostiqué diabétique et s'il est accompagné dans cette pathologie. En 2019, il y a eu 4,2 millions de décès (adultes de 20 à 79ans) des suites du diabète et de ses complications, ce qui représente 1 décès toutes les 8 sec dans le monde ²¹.

c) *Les facteurs de risques*

L'une des stratégies de l'OMS pour prévenir le développement du DT2 dans la population a été d'identifier les nombreux facteurs de risques de l'obésité et du DT2 afin d'informer et sensibiliser le grand public. L'un des plus importants est notre mode de vie.

En effet, de l'époque des Hommes « chasseurs-cueilleurs » à l'Homme moderne, de nombreux changements se sont opérés dans nos modes de vie, influençant notre santé. Durant ces dernières années, l'explosion de la technologie nous a poussé à augmenter notre temps (professionnel et personnel) devant les écrans, favorisant une grande sédentarité. S'ajoute à cela, l'omniprésence de la « malbouffe » basée sur des produits ultra-transformés et riches en graisse et /ou en sucre qui ont entraîné une prise de poids de plus en plus importante. Ce mode de vie, présent dans la majorité des pays développés, est délétère lorsqu'il est maintenu durant plusieurs années puisque favorisant l'apparition d'IG et d'anomalie de la glycémie à jeun (AGJ). Récemment, le monde scientifique et médical a défini un état favorisant l'apparition du DT2 : le « pré-diabète » ou « l'hyperglycémie non diabétique ou intermédiaire » correspondant au cumul d'une IG et d'une AGJ chez les patients ⁸³⁻⁸⁶. Les études montrent que 26 à 50% des diagnostiqués avec ces deux symptômes ont développé dans les 5 ans un DT2 ^{84,86}.

Un autre paramètre à prendre en compte dans l'épidémie du DT2, est la génétique. Ce terme vaste regroupe à la fois les origines ethniques et les prédispositions génétiques héréditaires. En effet, durant des milliers d'année, les populations n'ont cessé de parcourir le monde. Ces changements d'environnement ont augmenté le nombre de mutations du génome entraînant une adaptation génétique favorisant les traits bénéfiques à ce nouvel environnement. Ces modulations génétiques, permettant une meilleure adaptation à l'environnement, impactent également la vulnérabilité de la population à certaines maladies. Dans ce sens, il a été montré que les risques génétiques de développer un DT2 étaient régulièrement diminués au cours de la migration des populations de l'Afrique jusqu'en Amérique ⁸⁷. Une méta-analyse renforce ces résultats, en montrant que chaque population possède des spécificités particulières au niveau de sa sensibilité à l'insuline et de sa capacité de sécrétion de l'insuline. En effet, il apparait que la population africaine présente une IR très importante, compensée par une forte capacité de sécrétion de l'insuline. Tandis que les populations d'Asie ont tendance à avoir une bonne sensibilité à l'insuline mais associée à une faible capacité de sécrétion de l'insuline. Les Caucasiens, quant à eux, présentent un phénotype intermédiaire ⁸⁸. Toutes ces données nous montrent l'importance de la génétique dans le développement des maladies et notamment le DT2 puisque dans le cas de l'Asie, leur

incapacité à augmenter leur sécrétion d'insuline, et dans le cas de l'Afrique, la mobilisation abusive du pancréas, fait basculer ces populations dans la pathologie. En accord avec ces données, des études récentes montrent l'impact de la génétique au sein d'un même pays. Ainsi, aux Etats-Unis, de 2003 à 2012, les enfants hispaniques, noirs non hispaniques, asiatiques ou habitant les îles pacifiques/amérindiens subissent une augmentation importante de l'apparition du DT2 contrairement aux caucasiens démontrant bien l'implication de la génétique ⁸⁹. Cette étude met également en avant l'apparition d'un facteur sexe, puisque dans tous les groupes, les femmes étaient plus touchées par le DT2 ^{21,89}.

Et pourtant le rapport de 2019, de la FID, rapporte qu'au niveau mondial les femmes ont une prévalence pour le DT2 inférieure aux hommes ²¹. Ces différences de résultat s'expliquent par le fait que ces études prennent des populations qui ne sont pas situées dans les mêmes tranches d'âge. En effet, les derniers rapports montrent que la progression de la prévalence évolue avec la progression de l'âge de 1,4% entre 20-24ans à 19,9% 75-79ans. S'ajoute à cela, l'impact du milieu de vie, avec une augmentation de l'apparition de DT2 dans le monde urbain comparé au monde rural ²¹. Ces données s'expliquent assez facilement par le fait que le monde urbain conduit à un mode de vie plus sédentaire avec une facilité d'accès à la « malbouffe » contrairement au monde rural. De plus, l'environnement socio-économique influence également la prévalence du DT2 puisqu'un système de santé performant est nécessaire pour un dépistage précoce du DT2. Par la suite, des ressources solides sont indispensables pour maintenir une alimentation équilibrée, une activité physique et pour prendre en charge les traitements éventuels.

L'obésité reste l'un des facteurs de risques du DT2 les plus connus. En effet, une mauvaise hygiène de vie associée à une sédentarité aboutit bien souvent à une prise de poids allant parfois jusqu'à l'obésité. Selon la FID, l'obésité se définit comme l'affection d'une personne avec une masse grasse trop importante (IMC : indice de masse corporel > 30kg/m²). Cette abondance de TA favorise la présence d'AG circulant et promeut la mise en place de l'IR et par conséquent le développement d'un DT2. De plus, la répartition de cette masse grasse est tout aussi importante puisqu'une obésité de type androïde (TA viscéral important) sera bien plus inflammatoire qu'une obésité de type gynoïde (TA sous cutané abondant) ce qui favorise l'apparition d'IR des patients et le DT2. Parallèlement, la stéatose hépatique associée aux NAFLD (non alcoholic fatty liver disease), un autre facteur de risques du DT2, voit sa prévalence progressivement augmenter dans le monde ces dernières années. La stéatose hépatique se définit comme l'accumulation anormale de lipides dans le foie et se trouve très intimement liées avec le DT2. En effet, il semblerait que les patient DT2, présentant une IR, sont plus enclins à développer une NAFLD et réciproquement l'apparition de NAFLD favorise le développement de DT2 ⁹⁰. Ainsi selon les études, 25 à 75% des patients DT2 présentent une stéatose hépatique ⁹¹. Actuellement, les relations entre l'obésité, le DT2 et la NAFLD très complexes, ne sont pas encore complètement élucidées.

Ce grand nombre de facteurs de risques influençant l'apparition du DT2 rend cette maladie complexe et difficile à maîtriser.

d) *Les outils diagnostiques et traitements*

Selon la FID, le DT2 est diagnostiqué si le patient remplit un ou plusieurs des critères suivants : une glycémie plasmatique à jeun $\geq 126\text{mg/dL}$, une glycémie plasmatique 2h après une ingestion de glucose $\geq 200\text{mg/dL}$ ou une HbA1c (hémoglobine glyquée) $\geq 6,5\%$ (48mmol/mol). Cependant, ce dernier critère, est uniquement inclus par l'ADA (American Diabetes Association), et non pas dans les autres pays, même si celui-ci reste un bon indicateur de l'évolution du DT2. En effet, des études montrent que l'HbA1c était diminué lorsque l'état glycémique des patients s'améliore et que ce facteur était associé à une diminution du risque de développement de complications ⁹². Néanmoins la mesure de l'HbA1c a des limites puisque celle-ci reflète une dérégulation de la glycémie au long terme. Récemment, des études mettent en avant le critère de la variabilité glycémique qui renseigne sur le contrôle de la glycémie à court terme des DT2 et permet l'évaluation des risques d'apparition de complications ⁹³. Il consiste à mesurer les fluctuations journalières de la glycémie afin d'estimer les tendances des patients à faire des hypo ou hyperglycémies ⁹⁴.

A l'heure actuelle, les outils de diagnostic du DT2 sont restreints et consistent à mesurer les dérégulations de la glycémie des patients. Cependant, cela ne nous renseigne pas sur l'état d'avancement de la maladie qui est un facteur très important dans l'efficacité des traitements.

En effet, le traitement de première intention des patients DT2 est d'améliorer leur hygiène de vie avec une activité physique régulière et une alimentation saine accompagnée d'une perte de poids. Ce rééquilibrage peut suffire à améliorer le DT2 s'il a été diagnostiqué à temps et si les altérations cellulaires ne sont pas encore irréversibles. Dans le cas contraire, le patient doit passer à un traitement médicamenteux et notamment la metformine qui est le premier traitement de référence pour un patient DT2. Celle-ci est un biguanide ayant des effets anti-hyperglycémiant qui passent par 3 mécanismes : i) une inhibition de la néoglucogénèse et la glycogénolyse hépatique ; ii) une augmentation de la sensibilité à l'insuline musculaire, augmentant la recapture du glucose ; iii) un retard de l'absorption intestinale du glucose ⁹⁵. Ensuite, il est possible d'établir des stratégies thérapeutiques individuelles adaptées à chaque patient passant de la mono à la bi et trithérapie. Ainsi, les traitements médicamenteux anti-diabétiques sont classés selon leur mécanisme d'action :

- **Augmentation de la sensibilité à l'insuline** (biguanide)
 - ➔ *Mécanismes d'action* : Détaillé ci-dessus.
- **Stimulation de la production d'insuline** (sulfamides hypoglycémiant et glinides)

- ➔ *Mécanismes d'action* : blocage des canaux K^+ des cellules β pancréatiques induisant une dépolarisation membranaire et une augmentation de l'exocytose des granules d'insuline ⁹⁶.
- **Réduction de l'absorption du glucose** (inhibiteurs d'alpha-glucosidase)
 - ➔ *Mécanismes d'action* : inhibition compétitive de l'hydrolyse intestinale des glucides ⁹⁷.
- **Action par le biais des incrétines** (agonistes de GLP1, inhibiteurs de DDP4)
 - ➔ *Mécanismes d'action* : potentialisation des effets des incrétines soit avec un agoniste soit en inhibant l'enzyme responsable de la dégradation des incrétines : DDP4. D'une part la sécrétion d'insuline gluco-dépendante par le pancréas est stimulée et la sécrétion de glucagon est inhibée. D'autre part, les incrétines via le système nerveux abaissent la vidange gastrique et la prise alimentaire ⁹⁸.
- **Augmentation de l'élimination du glucose** (inhibiteurs de SGLT2).
 - ➔ *Mécanismes d'action* : inhibition de SGLT2, un co-transporteur glucose/ Na^+ présent au niveau rénal favorisant l'élimination du glucose par excrétion urinaire ⁹⁹.

Il est clairement établi que l'efficacité du traitement du DT2 dépend du stade auquel il a été diagnostiqué. Dans le cas de DT2 à des stades très avancés, et face à l'inefficacité des traitements cités ci-dessus, la FID propose comme traitement ultime l'injection d'insuline ²¹.

(3) Atteintes hépatiques associées au DT2

Cette partie a pour but de balayer les mécanismes principaux de la mise en place de l'IR et de la stéatose hépatique dans le contexte du DT2 en restant focalisé sur les perturbations du métabolisme hépatique.

a) *Inflexibilité métabolique*

L'organisme est constamment confronté à des transitions nutritionnelles, c'est-à-dire des cycles de jeûne suivi d'état nourri, ou situation post-prandiale, obligeant l'organisme à adapter sa source d'énergie au statut nutritionnel. Cette notion, de changement de source énergétique, est appelée flexibilité métabolique. Celle-ci est définie par Galgani et al. comme la capacité de l'organisme à adapter l'oxydation du carburant à la disponibilité de celui-ci afin que la synthèse d'ATP puisse être maintenue ¹⁰⁰. La flexibilité métabolique n'est pas un phénomène « on-off », mais implique des ajustements subtils étroitement contrôlés. C'est une réponse adaptative du métabolisme d'un organisme pour maintenir l'homéostasie énergétique. Le but est de faire correspondre la disponibilité et la demande de carburant au jeûne périodique, à la composition variable des repas, à l'activité physique et aux fluctuations environnementales ¹⁰¹. En effet, lors des périodes de jeûne, c'est-à-dire entre deux repas, la principale source d'énergie disponible et utilisée pour produire de l'ATP, est l'oxydation des lipides ¹⁰². En revanche, en condition nourrie (post-prandiale), une grande quantité de glucose issue de la digestion est

accessible. C'est pourquoi l'oxydation de celui-ci devient alors la source majeure d'énergie pour la production d'ATP ¹⁰³. A la fin des années 90, Kelley et son équipe ont constaté que, le muscle squelettique d'obèse IR est inflexible métaboliquement comparé au muscle squelettique de personnes minces ¹⁰⁴. Ce problème de changements de métabolisme est en lien avec le développement d'IR des tissus et de l'accumulation de lipides ectopiques, qui participe également à l'IR. Comme décrit dans la partie 1, le foie est responsable de la majeure partie des réactions biochimiques nécessaires au maintien de l'homéostasie glucidique et lipidique faisant du foie un pilier de la flexibilité métabolique (**Figure 12**). Le DT2 est associé à une inflexibilité métabolique du foie, caractérisée par une altération de la capacité de passer de l'oxydation du glucose à l'oxydation des lipides lors des transitions nutritionnelles. Les personnes obèses et/ou DT2, présentent des préférences inadaptées avec pendant les périodes de jeûne, une utilisation du glucose plutôt que des lipides comme source d'énergie. De nombreuses études ont ainsi mis en évidence l'inflexibilité chez des patients DT2, NAFLD, ou obèses ¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. La mitochondrie se trouve au centre de ce changement de substrat car celle-ci sélectionne le carburant permettant d'alimenter la chaîne respiratoire et de fournir entre 70 et 90% de la demande d'ATP par les cellules ¹⁰⁸. Dans ce contexte, l'afflux constant des différents types de substrats au niveau de la mitochondrie, va forcer à maintenir une fonction mitochondriale importante, favorisant l'apparition de dysfonctions mitochondriales. Le problème de l'inflexibilité métabolique, réside dans le fait que des signaux contradictoires sont perçus par la mitochondrie, se trouvant alors dans un état de confusion nutritionnelle aboutissant à une mauvaise gestion de l'équilibre de l'état de catabolisme/anabolisme participant à la mise en place de l'IR ¹⁰⁸.

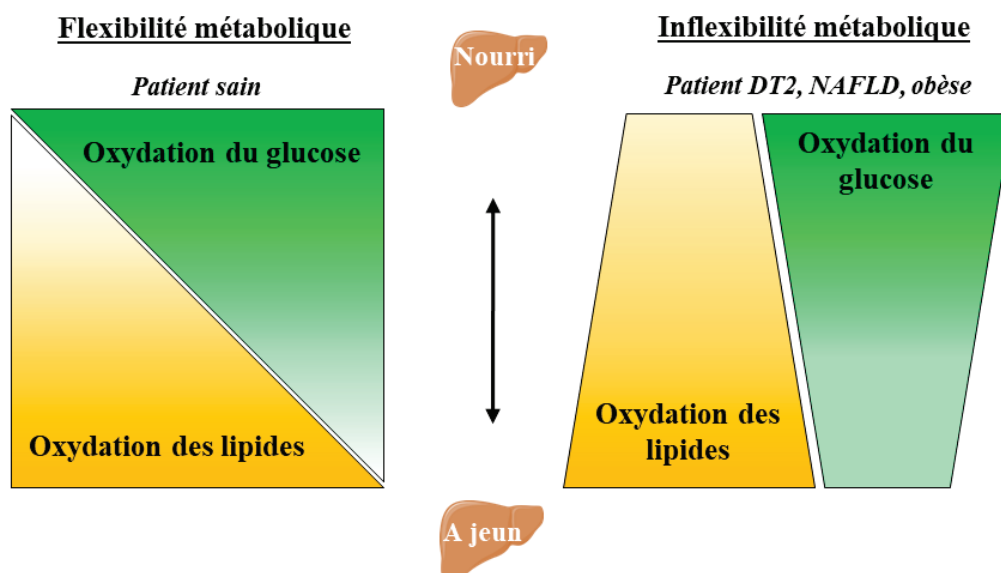


Figure 12 : Représentation schématique de la flexibilité métabolique chez un patient sain (à gauche) comparée aux patients IR, DT2, NAFLD et/ou obèse qui développent des inflexibilités métaboliques.

b) *Insulino-résistance hépatique*

Les mécanismes de l'IR hépatique des patients DT2, impliquent deux paramètres possibles, difficiles à distinguer sans approches précises : soit un défaut d'INSR dans le foie ; soit un défaut de transduction du signal dans la cellule, ou les deux ²⁵. Les mécanismes moléculaires de l'IR hépatique seront plus amplement détaillés dans la partie qui suit ; **II.A.Mécanismes de l'insulino-résistance**. En effet, la transduction du signal insulinémique peut être interrompue par la phosphorylation des résidus sérine d'IRS par de nombreuses kinases de stress comme mTORC1, JNK, IKK (inhibitor of K kinase), PKC (protéine kinase C), p70 S6 kinase, PKR dépendante de l'ARN double brin mais aussi des intermédiaires lipidiques comme le DAG (diacylglycérol) et les céramides, et des cytokines pro-inflammatoires et des ROS ¹⁰⁹ (**Figure 13** ²⁴). IRS, contient plus de 70 résidus Ser, chacun responsable de réguler négativement, positivement ou les deux, l'activité d'IRS. La phosphorylation de la sérine 307 peut être le résultat du rétrocontrôle du signal de l'insuline, celle-ci va empêcher l'interaction du domaine PTB de l'IRS avec la Tyr 960 phosphorylée du récepteur de l'insuline ¹¹⁰. Il est intéressant de noter que l'inhibition d'IRS1 ne dépend pas seulement de la phosphorylation du résidu Ser 307. En effet, c'est le cumul de la phosphorylation de plusieurs sites Ser/Thr sur IRS1 qui serait capable d'empêcher la phosphorylation de la Tyr (site activateur d'IRS) sur IRS1/2 par le récepteur de l'insuline ¹¹¹. La phosphorylation des Ser/Thr se trouvant à proximité des sites de phosphorylation Tyr empêche la liaison des domaines SH2 de ces effecteurs, inhibant la signalisation de l'insuline ¹¹⁰. Dans les phénomènes d'IR, IRS se trouve inhibé via la phosphorylation de la Ser 307 qui se trouve être une cible spécifique de JNK et IKK. Cependant, comme évoqué précédemment, une multitude de combinaison est possible, c'est alors l'association de nombreuses phosphorylations qui aboutit à la perturbation du signal insulinémique.

Cette IR entraîne une modification des flux métaboliques dans le TA, les muscles et le foie. Au niveau hépatique, l'IR se manifeste principalement par une absence d'inhibition de la glycogénolyse et de la néoglucogénèse, activant la production hépatique de glucose, même durant les phases post-prandiales, ce qui participe grandement à l'hyperglycémie des patients DT2 ^{112,113} (**Figure 14**). Aussi, l'insuline ne parvient pas à inhiber la lipolyse du TA favorisant la sécrétion d'AGL dans la circulation. Le flux important d'AGL participe également à la potentialisation de la néoglucogénèse via un effet allostérique sur la G6P et sur la glucokinase (GK). En ce qui concerne la lipogénèse *de novo*, les recherches ne sont pas encore claires. Ces dernières années, des études montrent que l'insuline stimule la lipogénèse *de novo* malgré la présence d'IR hépatique, pouvant participer au développement de stéatose chez ces patients. Ce paradoxe entre l'incapacité de l'insuline à inhiber la production hépatique de glucose, et l'efficacité de celle-ci à stimuler la lipogénèse chez des patients IR, est nommé « résistance à l'insuline sélective » ¹¹⁴. Cependant une étude très récente chez l'Homme, contrarie ce paradoxe et montre que chez des patients IR, l'insuline ne parvient pas à stimuler normalement la lipogénèse, alors

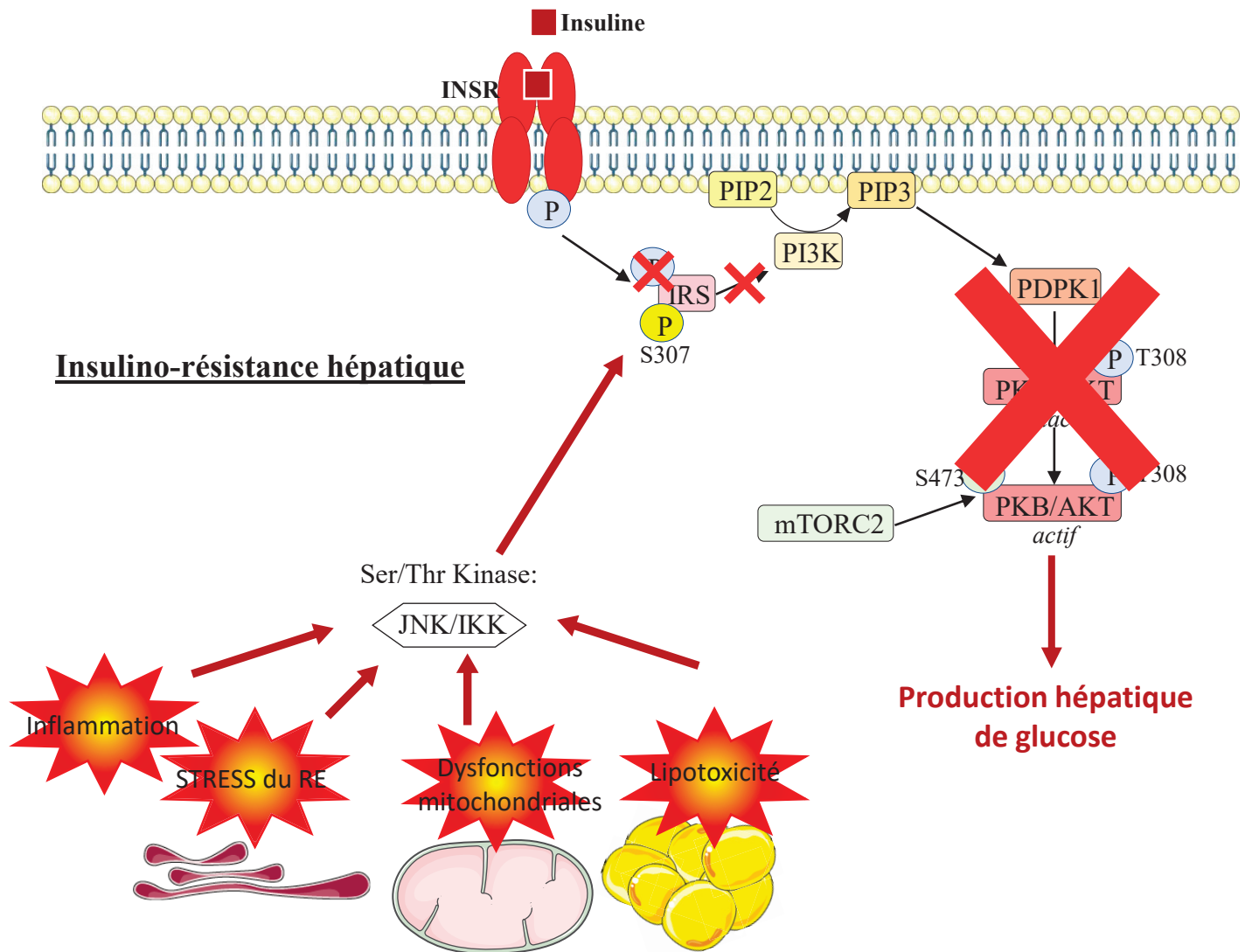


Figure 13: Représentation schématique de l'altération de la signalisation hépatique.

Différents facteurs peuvent favoriser l'activation de la Sérine/Thréonine kinases entraînant une inhibition de la voie de la signalisation de l'insuline retrouvée dans l'IR hépatique et responsable de l'hyperglycémie à jeun des patients DT2.

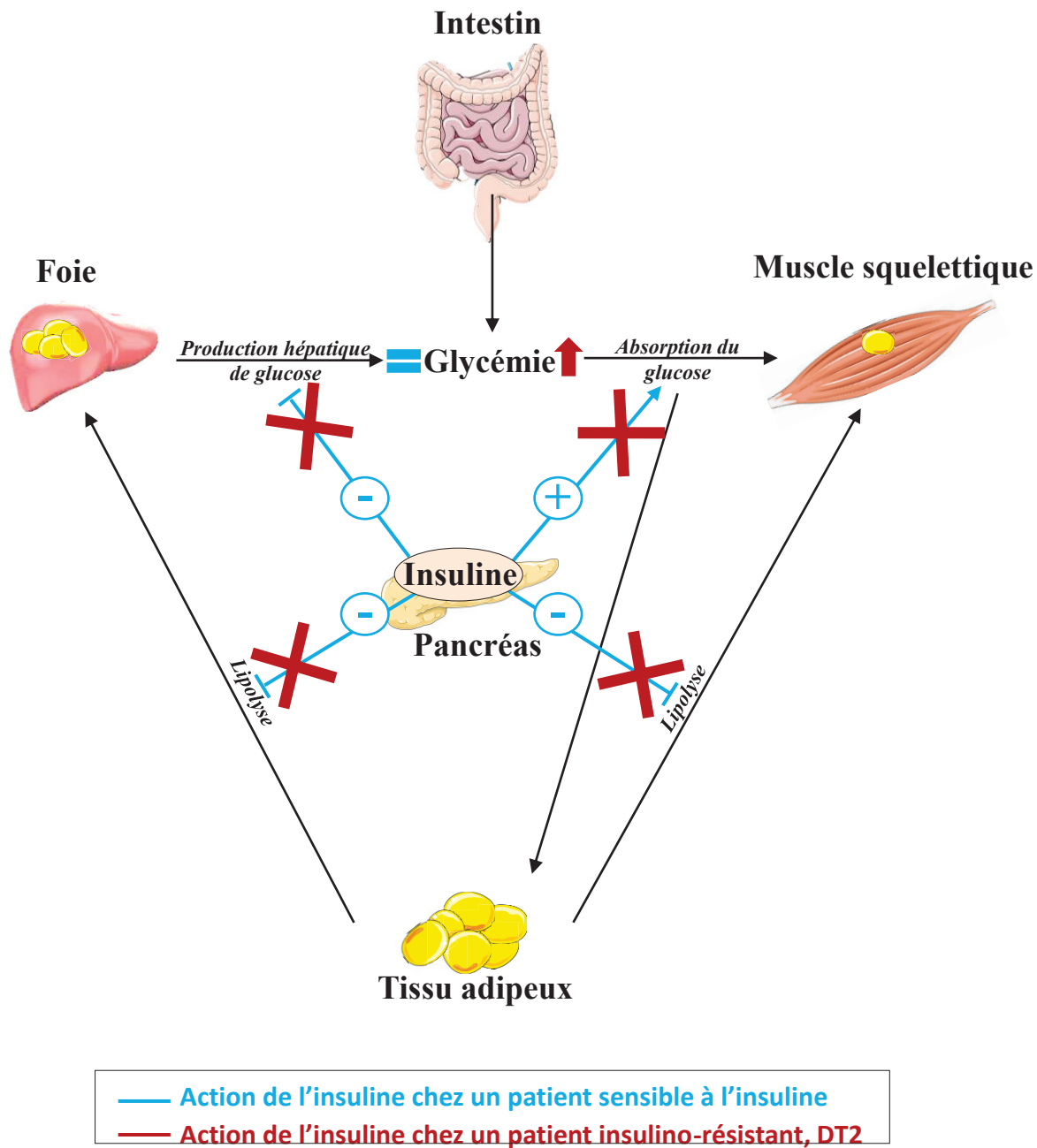


Figure 14: Représentation schématique de l'insulino-résistance des patients DT2

que cette voie est bien touchée par l'IR de ces patients ¹¹⁵. Ces phénomènes seront plus amplement détaillés dans la **II.B.(3)Altération du métabolisme lipidique**.

(1) Voie JNK/MAPK dans l'IR

La cascade des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) regroupe un ensemble d'enzymes responsables de voies de signalisation contrôlant la mitose dans les cellules eucaryotes. L'activation de la voie des MAPK est composée de 3 niveaux : les MAPK, les MAPK kinases (MAPKK = MAP2K) et les MAPKK kinases (MAPKKK = MAP3K). Ces 3 catégories regroupent chacune un grand nombre de kinases spécifiques impliquées dans cette cascade. Lorsque la voie des MAPK est activée par des signaux intra ou extracellulaires, la première kinase MAP3K est activée. Celle-ci va par la suite activer MAP2K en aval sur les résidus Ser et Thr la rendant active. Une fois active, MAP2K phosphorylera les résidus Thr/Tyr afin d'activer MAPK, transmettant ainsi le signal ¹¹⁶. JNK est une Ser/Thr kinase, qui appartient à cette dernière catégorie de MAPK. JNK est considérée comme l'un des effecteurs majeurs de la voie de signalisation MAPK, car c'est la dernière kinase à être activée au sein de la voie MAPK/JNK. Les autres effecteurs de la voie des MAPK sont MAPK p38, ERK1/2 et ERK5 ¹¹⁷. Il existe 3 JNK : JNK 1 et 2 qui sont exprimées de façon ubiquitaires et JNK 3 dont l'expression est restreinte au cerveau, testicules, pancréas et cœur ^{117,118}. Pour que JNK soit activée, il doit y avoir deux événements de phosphorylation sur les résidus Thr/Tyr pour une activation complète. Les activités de JNK sont régulées par des MAPK phosphatases qui catalysent l'élimination des groupes phosphates.

Les JNK portent ce nom car celles-ci ont la capacité de phosphoryler et activer les protéines c-Jun, des membres de la famille des facteurs de transcriptions AP-1 ^{111,119}. Ces facteurs de transcription sont à la fois impliqués dans la survie cellulaire et la progression du cycle cellulaire mais également dans la mort cellulaire programmée. Ainsi, JNK jouerait un rôle majeur de transducteur du signal, capable de générer des réponses opposées en fonction du contexte, de l'ampleur et de la durée de son activation. Son activation transitoire va ainsi favoriser la survie, la tolérance au stress et la prolifération cellulaire tandis qu'une activation soutenue de celle-ci favorise la mort cellulaire ¹¹¹. L'activation de JNK provoque une phosphorylation de la tyrosine d'IRS1 et IRS2 et parallèlement une phosphorylation de sérine/thréonine IRS1/IRS2 ¹²⁰. Le site de phosphorylation de JNK sur IRS1 est la sérine 307. Cette phosphorylation a la particularité d'inhiber l'interaction d'IRS1 avec le récepteur de l'insuline et d'inhiber la phosphorylation d'IRS1 par l'insuline bloquant la transduction du signal insulinémique ^{120,121}. JNK agit également comme un régulateur négatif de PPAR α et de FG21 dans les hépatocytes réduisant ainsi l'oxydation des AGL et la cétogenèse favorisant l'apparition de stéatose hépatique ¹¹¹.

(2) Voie IKK/NFκB dans l'IR

La voie NFκB (nuclear factor-kappa B) est une voie de signalisation cellulaire majeure dans l'apoptose induite par le stress, l'inflammation et la signalisation immunitaire. Les NF-κB, sont une famille de facteurs de transcription exprimés de façon ubiquitaire. NF-κB se trouve inactif lorsqu'il est lié à une protéine inhibitrice IκB (inhibitors of κB), le séquestrant dans le cytoplasme. Une multitude de signaux peut induire l'activation de NF-κB : des cytokines inflammatoires (TNF-α, IL-1), le lipopolysaccharide bactérien, un stress cellulaire etc. Celui-ci devient actif lorsque IκB est phosphorylé par la kinase IκB (IKK) permettant la libération de NF-κB et la migration de celui-ci dans le noyau où il induit la transcription de gènes cibles participant à la réponse inflammatoire et immune. IKK est composé de 2 sous-unités catalytiques IKKα et IKKβ, et d'une sous-unité régulatrice IKKγ. De façon intéressante, la sous-unité IKKβ est capable, tout comme JNK, de phosphoryler IRS sur les résidus Ser empêchant les interactions : récepteur de l'insuline/IRS, bloquant la propagation du signal insulinémique ¹²².

c) *Stéatose hépatique ou NAFLD*

La stéatose hépatique non alcoolique, ou NAFLD, se caractérise par l'accumulation anormale de TG dans les hépatocytes. Tout comme le DT2, l'aspect le plus problématique de la NAFLD est son caractère silencieux. Cependant, la NAFLD reste potentiellement réversible. Celle-ci est associée aux maladies métaboliques, à l'obésité, au DT2 et à un mode de vie sédentaire et une alimentation déséquilibrée. Les relations de cause à effet entre la NAFLD et le DT2 ne sont pas encore claires même si la présence d'une NAFLD encourage le développement du DT2. Ainsi, l'augmentation de la prise alimentaire induit une augmentation du stockage de l'énergie excessive sous forme de TG dans le TA et les organes périphériques. Cette accumulation en excès de lipides, peut entraîner une IR périphérique qui va se cumuler à la présence d'IR hépatique. Comme vu précédemment, l'incapacité de l'insuline à inhiber la lipolyse augmente le taux d'AGL circulant, qui seront naturellement captés par le foie. Afin de gérer au mieux cet afflux constant de lipide, le foie va augmenter ces exports de TG via les VLDL. Cependant l'IR des patients NAFLD, entravent la lipolyse de ces lipoprotéines dans la circulation, obligeant le foie à augmenter l'absorption de VLDL toujours chargé en TG ¹²³. Ainsi 80% des patients DT2 sont obèses et 70% des patients DT2 présentent une stéatose hépatique ^{124,125}. La relation étroite entre le DT2 et la NAFLD complique les investigations qui concernent le lien de causalité. L'état actuel des connaissances sur les mécanismes moléculaires de la NAFLD seront développés en ***II.B. Mécanisme de la stéatose hépatique.***

II. Partie 2 : Les mécanismes moléculaires de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique.

A. Mécanismes de l'insulino-résistance

(1) L'inflammation

Depuis de nombreuses années, les études sur le lien entre le DT2, l'obésité et l'inflammation se multiplient. Et ce n'est pas un hasard si les deux systèmes, immunitaire et métabolique, interagissent si souvent dans différentes pathologies. En effet, la plupart des molécules de signalisation comme JNK, IKK et PKC interviennent à la fois dans les voies de signalisation immunitaire et métabolique. On parle de capacité immunométabolique de ces molécules. Partant de ce principe, TLR (Toll like receptors), un composant de l'immunité innée, identifié comme un récepteur d'acide gras insaturé et polyinsaturé, interfère avec la signalisation de l'insuline via l'inhibition d'IRS1 par JNK et IKK ¹²⁶ (**Figure 15**). Ainsi, les souris ayant une inactivation de TLR4 sont protégées de l'IR induite par un régime riche en acide gras saturés ¹²⁷. Ce phénomène se retrouve également pour d'autres cytokines pro-inflammatoires comme TNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha). En effet, l'obésité associée au DT2, augmente de manière globale le TA via un stockage de TG dans les adipocytes. Lorsque la demande de stockage augmente, les adipocytes sont capables de s'hypertrophier afin d'augmenter leur contenu en TG. Cependant, cette hypertrophie induit des signaux de détresse et notamment une sécrétion de molécules chimio-attractives comme MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) impliqué dans la diapédèse des macrophages de la circulation sanguine au TA. Ce phénomène est appelé infiltration macrophagique ¹²⁸. Ce contexte favorise la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages du TA, tel que : le TNF- α et les interleukines 1- β et 6 (IL1- β et IL-6). Cela explique pourquoi ces cytokines augmentent dans la circulation sanguine des patients obèses ^{129,130}. Ainsi, des études chez l'Homme, montrent que l'utilisation d'anti-TNF- α et d'antagonistes d'IL-1 β , diminue le risque de développer un DT2 et entraîne respectivement une amélioration de la sensibilité à l'insuline et de la sécrétion de l'insuline ¹³¹⁻¹³³. Cependant, une telle approche, par des traitements ne ciblant qu'une cytokine, reste une stratégie discutée car toutes les études ne sont pas d'accord quant aux rôles précis de ces cytokines ¹³⁴. Par exemple, il existe des résultats contradictoires dans la littérature concernant IL-6 dans l'obésité et le diabète qui s'expliquent par le fait qu'IL-6 favorise l'IR pour certains tissus mais améliore également la sensibilité à l'insuline dans d'autres tissus comme le muscle ¹³⁵. TNF- α et IL-1 β , quant à eux, perturbent directement la signalisation de l'insuline dans le TA via une phosphorylation inhibitrice sur les résidus sérine/thréonine du IRS1, empêchant la bonne transduction du signal ¹³⁵. En parallèle, la lipolyse, qui ne se trouve plus inhibée par l'insuline, est potentialisée par ces cytokines favorisant les flux d'AGL. Il est important de noter que, les cytokines inflammatoires sont associées au TA viscéral (TAV), témoignant de l'importance de la localisation du dépôt adipocytaire dans l'installation de

l'inflammation à bas bruit de l'obésité. Ainsi, un flux d'AGL et de molécules inflammatoires se retrouvent dans la circulation sanguine et participent à l'installation d'une lipotoxicité et d'une inflammation entraînant la mise en place de l'IR. Le foie, via la veine porte, capte ces AGL et les stocke. Aussi, les cytokines circulantes, et notamment IL-6, stimulent la sécrétion hépatique de TG-VLDL renforçant la lipotoxicité ¹³⁶. L'augmentation d'IL6 dans les hépatocytes est induite par les AGL et est corrélée positivement avec la développement de lésions inflammatoires du foie ¹³⁷.

A noter que le TA n'est pas le seul site inflammatoire possible, d'autres organes intervenant dans l'homéostasie glucidique, participent à l'inflammation liée à l'IR. Ainsi, les cellules de Küpffer, macrophages résidant du foie, participent à l'établissement de l'état inflammatoire. En effet, une étude, utilisant un modèle de co-culture d'hépatocytes primaires de souris et de cellules de Küpffer, montre une altération de la signalisation à l'insuline due à l'activation de l'inflammasome par des fortes concentrations de glucose (HG : high glucose). Ce phénomène impliquerait la production de ROS à la suite de l'exposition au HG et passerait par l'activation de NFκB et Il-1 ¹³⁸. Dans ce sens, une inactivation de NFκB, dans les cellules de Küpffer, permet d'améliorer la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose des souris diabétique ¹³⁹. De plus, les cellules de Küpffer interviennent aussi dans la bascule de la NAFLD à la NASH (stéatose hépatique non alcoolique) avec une augmentation de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire altérant d'autant plus le métabolisme hépatique ¹⁴⁰.

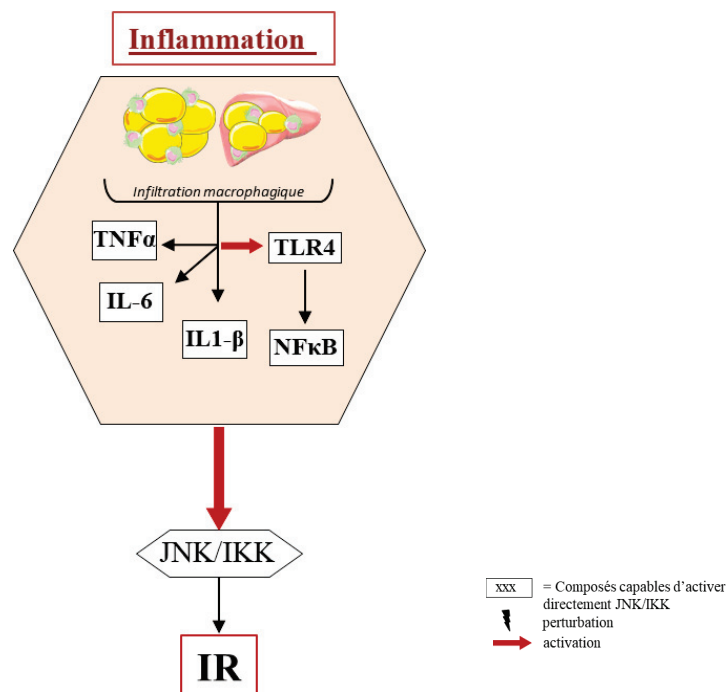


Figure 15 : Principaux composants de l'inflammation intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases.

(2) Lipotoxicité

Le développement du DT2 s'accompagne souvent d'un déséquilibre dans la balance énergétique, entraînant une augmentation du taux circulant d'AGL et aboutissant à l'accumulation de dépôts ectopiques de graisses dans les organes comme le muscle et le foie. Ainsi, l'évaluation des lipides hépatiques chez les patients est devenue un prédicteur fort de l'IR hépatique puisque près 70% des DT2 présentent une stéatose hépatique ^{141,142}. Ces dépôts ectopiques de graisses sont délétères pour les organes, on parle de lipotoxicité (mécanismes résumés dans la *figure 16*). Celle-ci serait centrale dans la mise en place de l'IR hépatique des patients DT2. En effet, le stockage des AGL circulants se fait préférentiellement dans le foie notamment car celui-ci reçoit, via la veine porte, un flux direct de lipides issus de la digestion et de l'absorption intestinale et également de la lipolyse du TA. A cela s'ajoute, comme vu précédemment dans : *I. B.(2)Métabolisme hépatique*, la capacité du foie à stocker les surplus nutritionnels sous forme de TG via la lipogenèse *de novo*. Ces différentes sources de lipides/glucides aboutissent bien souvent au développement d'une stéatose hépatique étroitement liée à l'apparition de l'IR des tissus. Cependant, il semblerait que la mise en place de l'IR hépatique ne dépende pas seulement du stockage de TG hépatique mais plutôt de l'accumulation d'intermédiaires lipidiques tel que le DAG ou les céramides. En effet, après leur entrée dans la cellule, les AGL subissent une estérification en Acyl-CoA transmis soit à un squelette glycérol afin de former des mono, di et triglycérides ; soit avec une sphingosine afin de former des céramides. Il est important de noter que les céramides et les DAG, contrairement aux TG, jouent un rôle très important de second messenger dans de nombreuses voies de signalisation. C'est pourquoi, leur accumulation excessive dans le foie peut poser problèmes. En ce qui concerne le DAG, son augmentation cellulaire peut provenir d'une discordance entre la synthèse de celui-ci et son intégration dans les TG. Le DAG active certaines isoformes de PKC, et notamment PKC ϵ isoforme la plus abondante dans le foie. PKC ϵ inhibe l'activité tyrosine kinase du INSR via une phosphorylation sur la Thr1160. Ceci perturbe toute la cascade de l'insuline dans les hépatocytes y compris la synthèse du glycogène, la régulation des gènes de la lipogenèse *de novo*, et de la néoglucogénèse. La phosphorylation du INSR, sur Thr1160, déstabilise sa configuration, altérant son activité tyrosine kinase et toute l'action de l'insuline en aval. Ainsi, une équipe a montré que des souris génétiquement insensibles à l'inhibition de PKC ϵ , sont protégées contre l'IR hépatique induite par une diète obésogène ¹⁴³. Ces données suggèrent que PKC ϵ serait l'effecteur dominant des DAGs dans l'IR hépatique. En accord avec ces données, une étude sur l'Homme a montré que le foie des patients obèses, ayant une IR hépatique, présentait un contenu en DAG augmenté associé à une activation renforcée de PKC ϵ ¹⁴⁴.

Les céramides interviennent également dans le développement de l'IR hépatique puisque ceux-ci interfèrent de différentes manières avec la cascade signalisation de l'insuline (*Figure 16*). D'une part, les céramides sont capables d'activer la PKC ζ et PP2A (protéine phosphatase 2A), ce qui altèrent à la

fois la translocation membranaire et l'activation d'Akt (ou PKB : protéine kinase B). D'autre part, ceux-ci amplifieraient la réponse inflammatoire via l'activation de NF- κ B¹⁴⁵. Cependant, il existe de nombreuses controverses au sujet de leur rôle dans l'induction de l'IR hépatique, induite par l'accumulation de lipides. En effet, selon le choix du type de rongeurs, de la durée et de la composition de la diète obésogène, les études montrent systématiquement la mise en place d'une IR hépatique avec une augmentation de DAG mais pas forcément une augmentation des céramides hépatiques¹⁴⁶. Il en est de même chez l'Homme, où une accumulation hépatique de DAG n'est pas nécessairement accompagnée d'une élévation de céramides hépatiques chez les patients ayant une IR hépatique¹⁴⁴. Une récente revue explique que ces contradictions pourraient venir du fait qu'il est important de regarder la nature des céramides et pas seulement la quantité de céramide. En effet, une approche lipidomique pourrait permettre de distinguer les différentes populations de céramides qui n'ont pas les mêmes propriétés intracellulaires¹⁴⁵.

Les AGL participent également à la lipotoxicité impliquée dans l'IR hépatique, notamment via le contrôle de la néoglucogénèse hépatique. En effet, l'augmentation des Acyl-Coa intracellulaires, activerait la G6Pase en faveur d'une augmentation de la néoglucogénèse et inhiberait la GK en faveur d'une oxydation du glucose¹⁴⁷. Aussi, les AGL agissent directement sur la voie de signalisation à l'insuline en activant les PKC δ hépatiques. Une fois activées, celles-ci phosphorylent les résidus sérines des INSR et des IRS les rendant inactifs, mais agissent également sur la transcription de gènes cibles via leurs effets sur PPAR (peroxysome proliferator activated receptor) et SREBP-1¹⁴⁸.

Il est important de garder à l'esprit que la mise en place de l'IR hépatique n'est pas uniquement due à l'accumulation de lipides dans le foie, mais qu'il s'agit d'un phénomène interconnecté entre des organes accumulant des défauts. De ce fait, l'augmentation de flux d'Acyl-Coa hépatique est capable d'activer le pyruvate carboxylase et ceci indépendamment de la signalisation canonique de l'insuline hépatique¹⁴⁹. Aussi, le foie via la sécrétion de la fétuine A, une hépatokine identifiée accrue dans le foie stéatosé d'humains et de rats, diminue la libération d'adiponectine par le TA et par conséquent influence le métabolisme énergétique. L'adiponectine présente des qualités de sensibilisation à l'insuline puisque celle-ci augmente la phosphorylation de l'INSR, l'oxydation des AGL et diminue la néoglucogénèse via des mécanismes passant par l'AMPK^{150,151}.

Même si le lien entre la lipotoxicité et l'IR hépatique est indéniable, ce phénomène reste encore un axe très étudié puisqu'aucune recherche n'a permis jusqu'à présent de statuer sur le lien de cause à effet.

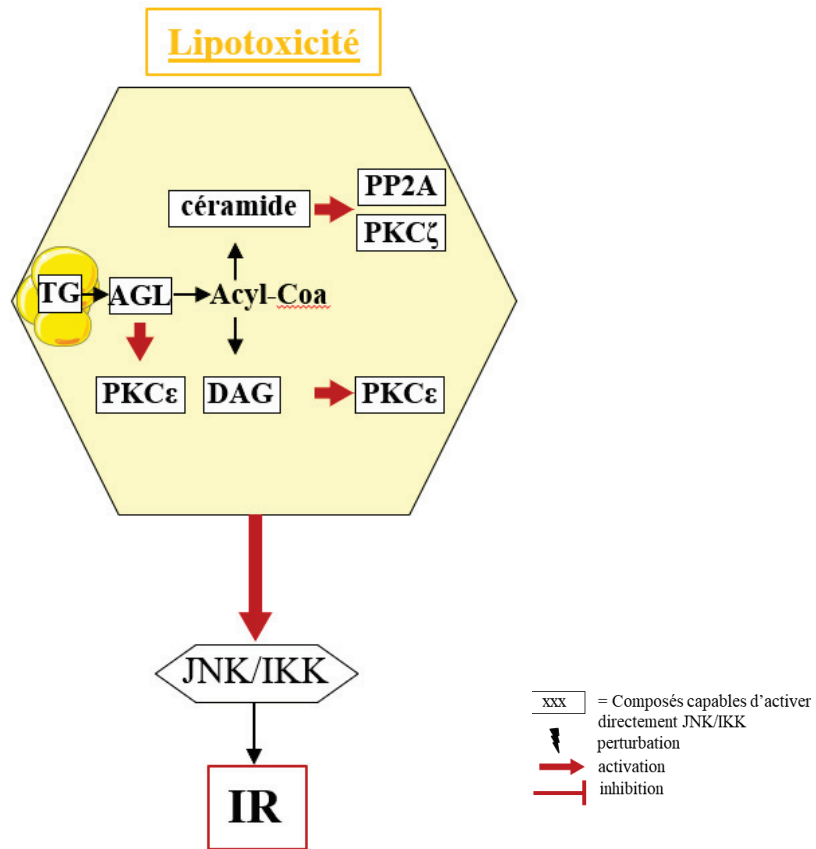


Figure 16 : Principaux composants de la lipotoxicité, intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases

(3) Stress du RE

Ces dernières années, les recherches ont mis en lumière une relation étroite entre l'activation du stress du RE et l'IR chez les DT2 et obèses (mécanismes résumés **figure 17**). En effet, Özcan et ses collaborateurs montrent la capacité d'IRE-1 à activer JNK, induisant une phosphorylation inhibitrice sur la sérine 307 d'IRS1 et par conséquent une perturbation de la cascade de signalisation de l'insuline. JNK est un régulateur central des réponses inflammatoires et immunitaires, activé par des AGL et la cytokine inflammatoire TNF α . Leurs recherches ont montré que, les souris obèses présentaient une augmentation du stress du RE et une hyperactivation de la JNK dans le TA et le foie. Une invalidation d'IRE-1, dans les fibroblastes embryonnaires de souris, les rendent incapables d'activer JNK face à des inducteurs du stress du RE ce qui protège les cellules de l'IR. Des effets protecteurs similaires ont été retrouvés dans des cellules hépatique via la surexpression d'XBP-1 (X-box binding protein-1), un facteur de transcription activé par IRE-1 et répresseur de l'UPR. Sa surexpression permet d'empêcher l'action de JNK et ainsi protège des éventuelles altérations de la cascade insulinémique. A l'inverse, une suppression XBP-1 chez les souris, entraîne une augmentation du stress du RE, une hyperactivation de

JNK et une altération de la signalisation à l'insuline associée à une IR et un DT2 ¹⁵². La surnutrition, l'obésité et le diabète peuvent être à l'origine d'un stress du RE ¹⁵³⁻¹⁵⁵. Il est encore difficile de savoir si le stress du RE est la cause ou la conséquence des dérèglements cellulaires et notamment lipidiques. En effet, les modèles d'étude du DT2 font apparaître une surcharge de lipides associée à une IR et un stress du RE sans possibilité de dissocier les différents effets. Ainsi, l'exposition des cellules HepG2 à des fortes concentrations de glucose ou du palmitate, induit un stress du RE qui active le facteur de transcription SREBP et favorise l'accumulation de lipides, comme dans le foie de souris obèse où SREBP-1c est retrouvé hyperactivé. L'inhibition du stress du RE, via la surexpression de la protéine chaperonne GRP78, améliore la sensibilité à l'insuline ^{156,157}. Un dérèglement de l'homéostasie calcique peut également conduire à l'induction d'un stress du RE puisque celui-ci agit comme un régulateur de nombreuses enzymes indispensables au bon fonctionnement cellulaire. De manière intéressante, une augmentation des taux intracellulaires de Ca^{2+} a été retrouvée dans les hépatocytes primaires de souris obèses et diabétiques ¹⁵⁸ et l'utilisation d'un chélateur de Ca^{2+} chez des rats HFD (high fat diet) a permis d'améliorer la sensibilité à l'insuline ¹⁵⁹. Les données suggèrent que l'augmentation de la production hépatique de glucose, retrouvée dans les modèles IR, serait véhiculée par l'activation, par le Ca^{2+} , de la CaMKII. D'une part la CaMKII induit la néoglucogénèse via l'activation de FOXO1 ¹⁵⁸, d'autre part celle-ci participerait à l'altération de la signalisation à l'insuline dans l'obésité ¹⁶⁰. En adéquation avec ces résultats, les souris déficientes en CaMKK2, une enzyme qui active les CaMK, sont protégées de l'obésité, de l'hyperglycémie et de l'intolérance au glucose induites par l'alimentation, et la suppression de cette enzyme spécifiquement dans le foie améliore la tolérance au glucose ¹⁶¹. Aussi, la pompe réticulaire SERCA, responsable de la recapture du Ca^{2+} du cytoplasme vers le RE, voit son activité réprimée par une altération de l'homéostasie lipidique et se retrouve même très peu exprimée dans le foie de souris ob/ob ^{162,163}. Fu et al montrent que, l'augmentation de PC (phosphatidyl choline) dans les membranes du RE inhibe SERCA ; ainsi une augmentation du rapport PC/PE (phosphatidyl éthanolamine) diminue la recapture du Ca^{2+} , altère le système de repliement des protéines réticulaires favorisant un stress du RE. Cette hypothèse est validée par l'inhibition de la PEMT (phosphatidyléthanolamine N-méthyltransferase), enzyme de conversion de PC en PE, qui rétablit le ratio PC/PE et ainsi améliore le stress du RE ¹⁶³. De même, la restauration l'expression de SERCA améliore la sensibilité à l'insuline hépatique et le stress du RE démontrant bien l'importance de l'homéostasie calcique dans le stress du RE et la physiopathologie de l'IR ^{162,163}. L'augmentation de la phosphorylation d'IP3R, dans des modèles d'animaux génétiquement obèses (db/db), pourrait expliquer l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire retrouvée précédemment. En condition physiologique, ce phénomène est retrouvé suite à un jeûne via l'activation de PKA qui induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation d'IP3R par phosphorylation et ainsi l'augmentation du Ca^{2+} cytosolique ¹⁶⁴. Toutes ces données relient directement l'homéostasie défectueuse du Ca^{2+} avec le stress RE, la signalisation à l'insuline et la dérégulation de la néoglucogénèse.

Il est important de mettre en relation le RE et la mitochondrie puisque ces derniers interagissent ensemble via des points de contacts appelés MAMs (mitochondria associated reticulum endoplasmic membranes). Ainsi une surcharge calcique du RE, ou le déclenchement de la réponse UPR peut directement impacter la fonctionnalité de la mitochondrie et par conséquent tout le métabolisme dont celle-ci est responsable. De ce fait, l'application d'un antioxydant sur une lignée cellulaire d'hépatocarcinome diminue le stress du RE, améliore la sensibilité à l'insuline, rétablit les niveaux d'expression des complexes OXPHOS de la mitochondrie et augmente la production d'ATP ¹⁶⁵. Ces données mettent également en avant une influence réciproque entre le RE et la mitochondrie via les ROS, principalement produits dans la mitochondrie pouvant activer un stress du RE. Ainsi la suppression de ROS diminue le stress du RE et restaure la sensibilité à l'insuline et la tolérance au glucose des souris mais ne rétablit pas la morphologie des mitochondries ¹⁶⁶.

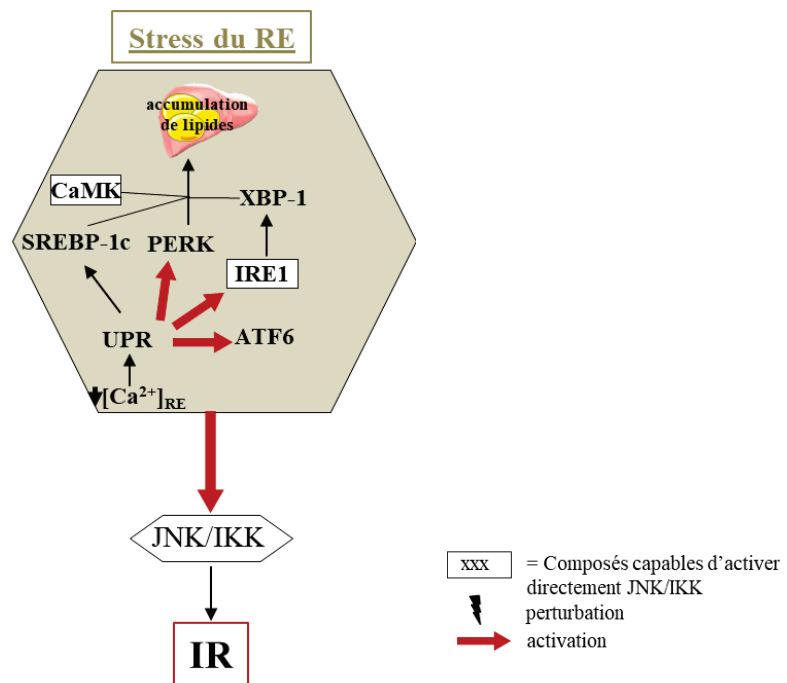


Figure 17 : Principaux composants du Stress du RE, intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases

(4) Dysfonctions mitochondriales

Depuis plusieurs années, les preuves se multiplient concernant l'implication des dysfonctions mitochondriales dans l'IR des patients diabétiques et obèses que ce soit au niveau musculaire, hépatique, du TA, ou encore dans les atteintes du pancréas ¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. En effet, la mitochondrie se situe au carrefour de nombreuses voies métaboliques, c'est pourquoi la moindre altération peut totalement changer l'homéostasie énergétique. Les dysfonctions mitochondriales décrites dans la partie qui suit sont résumées dans la **Figure 18**. Un premier lien entre la signalisation à l'insuline et la mitochondrie a été mis en évidence, dans le foie de volontaire sain, grâce à la découverte de 286 gènes associés

simultanément à la signalisation de l'insuline et à la mitochondrie, témoignant d'une relation étroite entre ces deux systèmes en condition physiologique ¹⁷⁰. Aussi, Petersen et al montrent que des dysfonctions mitochondriales, impliquées dans l'IR, étaient héréditaires ¹⁷¹. Des souris KO-IRS1 ou KO-IRS2, spécifiquement dans le foie, deviennent IR et présentent un nombre réduit de mitochondrie qui sont plus grandes, plus claires, et avec une respiration plus faible s'accompagnant d'une diminution de la production d'ATP ¹⁷². Cette étude démontre la réversibilité de ces anomalies fonctionnelles et morphologiques, grâce à l'inhibition du facteur de transcription FOXO1 et souligne le lien étroit entre la voie de la signalisation à l'insuline IRS/PI3K/FOXO1 et les fonctions mitochondriales. Aussi, les souris double KO IRS1 et IRS2 présentent une anomalie du métabolisme lipidique, avec une diminution de l'oxydation des lipides et une accumulation des TG dans le foie. De même, l'inhibition de FOXO1 permet également de corriger ces défauts ¹⁷².

En condition pathologique les ROS, produit par la mitochondrie, peuvent être délétères en interférant avec les cascades de signalisation notamment celle de l'insuline via l'activation de JNK qui induit une phosphorylation inhibitrice d'IRS-1 sur la sérine 307 ³³. Ainsi, chaque situation favorisant la production de ROS par la mitochondrie, participe directement à la perturbation du signal insulinique cellulaire retrouvée chez les patients atteints d'IR. S'il est encore difficile de savoir si les anomalies mitochondriales sont la cause ou la conséquence de la mise en place de l'IR hépatique en revanche il est indéniable que ceux-ci sont étroitement liés.

L'IR, dans le contexte de l'obésité, induit des besoins énergétiques nouveaux obligeant un remodelage morphologique et métabolique de la mitochondrie. Ainsi, l'expression d'OXPPOS a été retrouvée augmentée dans le foie de patients DT2 ¹⁷³. Cependant l'évaluation des fonctions mitochondriales est complexe puisque ce sont des structures très dynamiques qui s'adaptent perpétuellement. Ainsi les fonctions mitochondriales seraient augmentées dans le foie de patients obèses avec une stéatose mais complètement altérées dans le foie des patients obèses avec une NASH ¹⁷⁴. Pourtant une étude a montré que l'inhibition d'OXPPOS, plus spécifiquement du complexe 1 entraîne une amélioration de l'action de l'insuline dans une lignée d'hépatocytes ¹⁷⁵. Ainsi, la β -oxydation évolue selon la durée du régime obésogène puisque celle-ci est stimulée après 16 semaines de HFD chez les souris et se voit complètement diminuée dans des régimes plus longs de 32 semaines de HFD ¹⁷⁶. Cette adaptation de la β -oxydation, en fonction du temps de diète, est à mettre en lien avec le remodelage mitochondrial qui opère chez les souris ob/ob (21 semaines) en faveur d'une amélioration de la respiration mitochondriale ¹⁷⁷. Il est intéressant de noter que cette potentialisation de la respiration n'est pas retrouvée dans le foie de souris ob/ob moins sévère (6 semaines) prouvant que le remodelage mitochondrial est très dynamique et évolue avec le stade de développement de la pathologie ¹⁷⁷. Associée à l'altération de l'oxydation, Satapati et son équipe mettent en évidence à 32 semaines de HFD, une diminution de la cétogenèse et une augmentation du CK favorisant l'augmentation de la production de ROS et de l'altération des mitochondries ¹⁷⁶. Ainsi, il se peut que dans un premier temps la β -oxydation et la respiration soit potentialisées pour faire face à l'afflux d'AGL, puis, que la sur-mobilisation du

système altère les mitochondries effondrant la β -oxydation dans les modèles sévères¹⁷⁶. Cependant, il existe une discordance dans la littérature puisque plusieurs travaux sont plutôt en faveur d'une altération de la respiration et des fonctions mitochondriales, dans le foie des souris ob/ob, qui s'explique sûrement par le caractère très dynamique de ce remodelage en fonction de la sévérité de la pathologie^{178,179}. Malgré ces remodelages, le flux d'AGL, due à la constante lipolyse du TA chez les patients IR, est trop important pour être entièrement pris en charge par la mitochondrie c'est pourquoi l'excédentaire est stocké sous forme de TG stimulant leur élimination via les VLDL participant à l'hypertriglycéridémie des patients¹⁸⁰.

Ces remodelages touchent aussi les flux métaboliques mitochondriaux, avec une potentialisation du CK. En effet, les personnes IR présentent un CK 2 fois plus important avec une accumulation des TG hépatiques associée à une augmentation de 30% de la néoglucogénèse¹⁸¹. En condition physiologique, une augmentation du CK augmente la production d'ATP ; pourtant en situation d'IR, l'augmentation du CK s'associe à une diminution de la production d'ATP s'expliquant par des atteintes de l'efficacité de la chaîne respiratoire mitochondriale liée à une exposition chronique aux ROS¹⁸². L'augmentation du CK permettrait une plus grande production de NADH/FADH₂ afin de compenser les éventuels déficits mitochondriaux¹⁷⁶. Cependant, le CK étant une source majeure d'électrons pour le stress oxydatif cellulaire, son accélération s'accompagne d'une augmentation du stress oxydatif hépatique et d'une inflammation délétère, générant un cercle vicieux¹⁷⁶. Ainsi, dans l'IR hépatique, l'activité de la pyruvate carboxylase augmente alors que celle de la PDH diminue¹⁸³. En accord avec ces données, des souris HFD présentent une expression accrue de PDK2 associée à une diminution de l'expression de PDH dans leur foie¹⁸⁴. Ces données pourraient expliquer l'augmentation de la néoglucogénèse retrouvée chez les patients présentant une accumulation des TG hépatiques. En effet, la PDH contrôle l'entrée des substrats glycolytiques dans le CK via la décarboxylation oxydative du pyruvate. De ce fait, l'action inhibitrice de PDK2 sur PDH oriente le pyruvate vers la pyruvate carboxylase et donc la formation d'OAA qui servira de substrat à la néoglucogénèse¹⁸⁴. La création de souris KO-PDK2 hépatique, a permis de changer le flux métabolique en levant l'inhibition de la PDH. Ainsi le pyruvate s'oriente vers la PDH en faveur d'un flux céto-génique, plutôt que vers le CK, diminuant le stress oxydatif et l'inflammation, en adéquation avec l'amélioration de la tolérance au glucose et de la signalisation à l'insuline hépatique des animaux KO-PDK2 sous HFD¹⁸⁴. De manière intéressante, la dégradation du palmitate via le CK permet de produire 129 ATP tandis que 16 ATP sont produites lors de la cétogénèse ; malgré cela les souris KO-PDK2 ne présentent pas de diminution de la quantité d'ATP par rapport aux souris WT (wild type) probablement compensée par l'efficacité de la cétogénèse des souris KO-PDK2 comparée aux WT. Ces données sont en accord avec la diminution de malonyl-CoA et l'augmentation de la quantité de CC retrouvées chez les souris KO-PDK2 comparées aux WT¹⁸⁴.

Pour accompagner l'adaptation à la hausse des fonctions mitochondriales, la masse mitochondriale est également retrouvée potentialisée dans le foie de rats IR sous HFD (20semaines)

mais aussi dans le foie de patients NAFLD (dans les stades précoces) comparés aux sujets sains^{185,186}. Pourtant, la biogénèse, quant à elle, est retrouvée augmentée uniquement dans les modèles animaux mais pas chez l'Homme¹⁸⁷. A noter que l'augmentation de la masse mitochondriale ne nécessite pas forcément une augmentation de sa biogénèse, mais peut résulter d'une dégradation réduite des mitochondries dysfonctionnelles chez les patients NAFLD¹⁸⁷. Il est également possible que des mitochondries défectueuses s'accumulent, l'oxydation des lipides ne pouvant plus être correctement réalisée, une lipotoxicité se met en place et interfère avec la signalisation à l'insuline aggravant la situation métabolique.

Dans cette optique, l'une des stratégies, pour améliorer la sensibilité à l'insuline dans le foie des patients obèses et diabétiques, est de potentialiser l'oxydation des lipides afin de diminuer la lipotoxicité liée au stockage des lipides hépatiques^{188,189}. Il est important de noter que cette stratégie fonctionne alors que les modèles d'animaux utilisés ne montrent pas nécessairement une atteinte mitochondriale au niveau de l'oxydation lipidique. De manière intéressante, Monsénego et al. ont montré que l'augmentation de la capacité d'oxydation des AG permet d'améliorer la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline des souris HFHSD (high fat high sucrose diet) sans modification des TG hépatiques, témoignant d'une dissociation entre la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique¹⁸⁹. Aussi, l'expression de CPT1mt, dans le foie des souris HFHSD, transporteur génétiquement rendu insensible au rétrocontrôle négatif du malonyl-CoA, améliore la tolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline des souris sans modifications du taux de TG hépatique. Ces résultats peuvent s'expliquer par le fait que l'expression de CPT1mt s'associe à une diminution d'intermédiaires lipidiques (céramides et DAG) entraînant une diminution du stress oxydant et de l'activation des JNK pouvant interférer avec la voie de l'insuline. Cette étude apporte une perspective nouvelle au mécanisme d'IR hépatique et favorise le concept selon lequel la diminution de la stéatose hépatique n'est pas forcément nécessaire à l'amélioration de l'IR hépatique associée à l'obésité¹⁸⁹. L'implication et les mécanismes moléculaires de la stéatose dans le DT2 et l'obésité seront plus amplement détaillées dans la partie suivante ***II.B. Mécanismes de la stéatose hépatique.***

Comme vu précédemment, les données mettent en évidence une altération de l'homéostasie calcique, en lien avec l'IR et la stéatose, avec notamment une diminution du $[Ca^{2+}]_{RE}$ associée à un défaut de SERCA2 parallèlement à une augmentation du $[Ca^{2+}]_C$. En ce qui concerne le $[Ca^{2+}]_m$, celui-ci serait augmenté, dans le foie en contexte d'obésité, provoquant une augmentation du métabolisme mitochondriale associée à l'augmentation du stress oxydatif¹⁹⁰. En accord avec ces données, des animaux KO-MICU1 dans le muscle, présentent une augmentation du $[Ca^{2+}]_m$, due à l'absence de contrôle de MCU, associée à une élévation de la production de ROS, une diminution de la production d'ATP et un défaut de la morphologie des mitochondries¹⁹¹. Une autre étude, basée également sur des animaux KO-MICU1, montre que la régénération du foie de ces modèles était altérée, avec des hépatocytes qui étaient plus susceptibles d'ouvrir leur mPTP, prouvant les effets délétères d'une surcharge calcique mitochondriale¹⁹². En accord avec les données précédentes sur le RE, un traitement

induisant une IR via une lipotoxicité (palmitate) sur des hépatocytes primaires et lignées induit une diminution des $[Ca^{2+}]_{RE}$ et une augmentation des $[Ca^{2+}]_m$ ^{193,194}. Cette étude met en valeur l'origine du $[Ca^{2+}]_m$ provenant de ses contacts étroits avec le RE⁵⁸. Ces points de contacts seront plus amplement détaillés dans la partie *III. Les MAMs*.

Tout comme le RE, l'implication de la mitochondrie dans la mise en place de l'IR est indéniable mais reste encore très complexe notamment car nous ne savons pas encore le lien de cause à effet. Les études sur l'évolution des fonctions mitochondriales dans l'IR, menées chez l'Homme, restent rares et peu explicites avec une potentialisation, une altération ou aucun changement des fonctions mitochondriales entre une personne saine et une obèse. Les pistes de recherches concernant le transfert calcique sont prometteuses, au vu du rôle capital du Ca^{2+} dans le contrôle de nombreuses enzymes du métabolisme aérobie et notamment au niveau des flux provenant du RE.

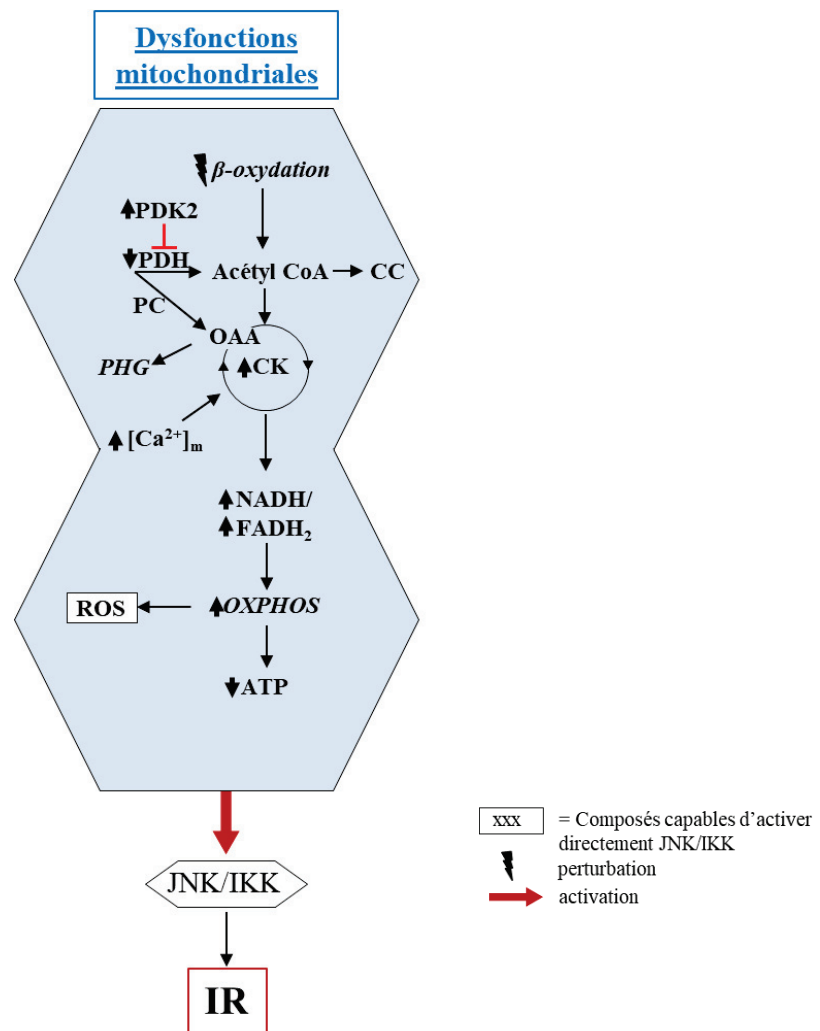


Figure 18 : Les principales altérations mitochondriales et composés intervenant dans l'IR via l'activation des Ser/Thr kinases.

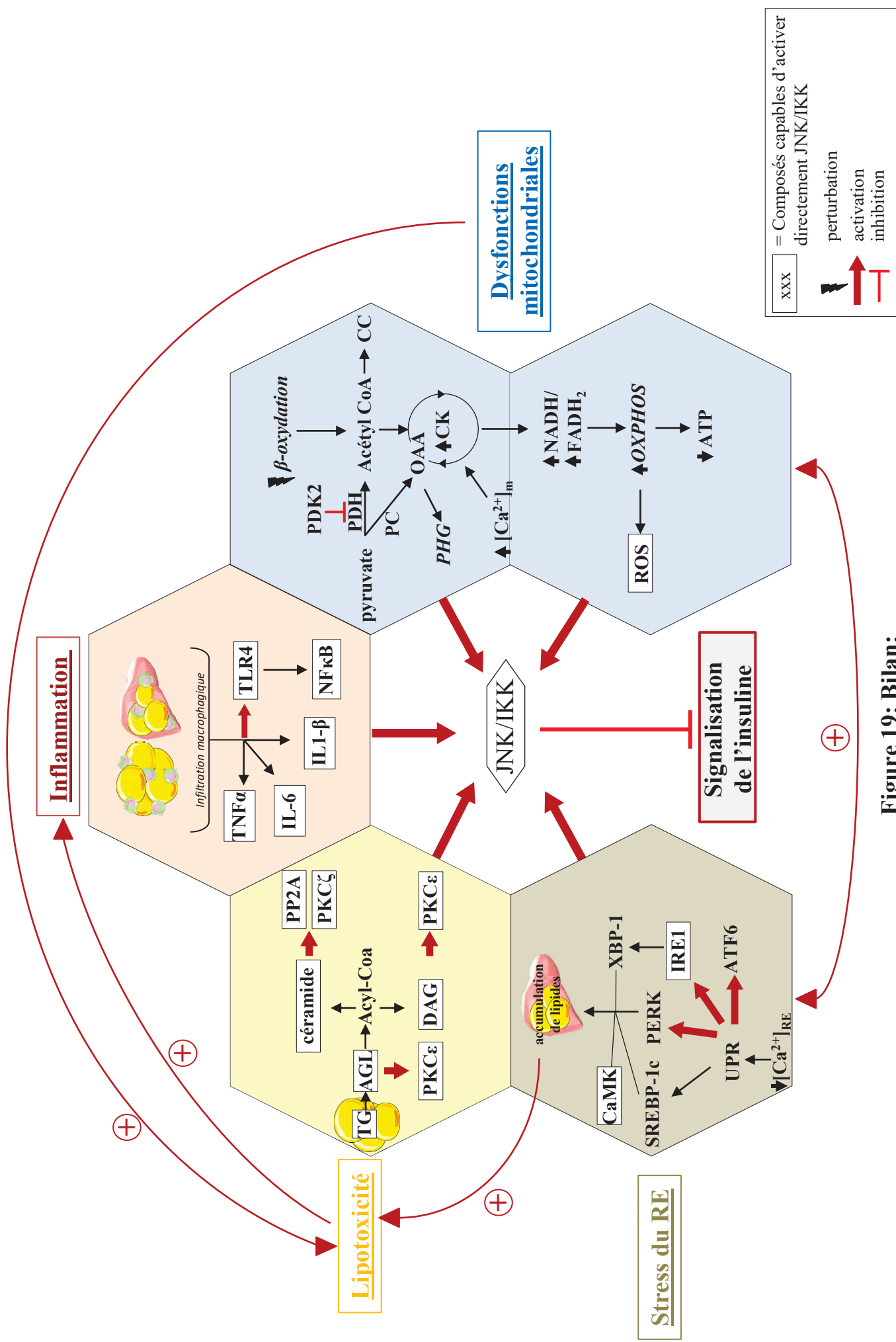


Figure 19: Bilan:

Intégration des mécanismes de l'insulino-résistance hépatique

Ses facteurs : l'inflammation, la lipotoxicité, le stress du RE et les dysfonctions mitochondriales vont s'induire mutuellement, générant un cercle vicieux et l'apparition de l'IR (*Bilan, Figure 19*).

B. Mécanisme de la stéatose hépatique

Les patients DT2 présentent une plus grande prévalence de la stéatose, qui se voit significativement augmentée lorsque le DT2 et s'accompagne d'obésité¹⁹⁵. A l'inverse, la présence d'une stéatose chez les patients augmente la prévalence du DT2. Dans ce sens, le contenu lipidique hépatique (TG, céramides, ou DAG) est devenu l'un des prédicteurs les plus justes de IR^{196,197}. Ainsi, le taux en TG hépatique présente une meilleure corrélation avec l'IR qu'avec le volume de TAV¹⁹⁸. Il est montré que l'augmentation de l'IMC, de la graisse corporelle et du TAV n'est pas associé à une IR en l'absence d'augmentation des TG hépatique¹⁹⁹. De manière intéressante, les lipides hépatiques dans la NAFLD sont majoritairement originaires de la lipolyse du TA, environ 60% , puis 25% proviennent de la lipogenèse *de novo* et pour finir 15% de la diète des patients^{32,200}. Ces données mettent bien en valeur la relation très étroite entre l'IR et la stéatose hépatique notamment avec l'absence d'inhibition de la lipolyse des patients DT2. Cependant, il est difficile d'établir une chronologie précise des altérations mises en place dans le DT2 associé à l'obésité. Bien entendu, les mécanismes développés dans la partie précédente sur l'IR, interviennent également dans l'établissement de la NAFLD puisque l'IR est un facteur de risque de la NAFLD et inversement⁹⁰. C'est pourquoi, ces mécanismes ne seront pas décrits une seconde fois dans la partie qui suit : comme le stress du RE et le stress oxydatif. Cette partie a pour but de compléter les dysfonctions majeures associées au développement de la NAFLD et notamment les altérations mitochondriales, la perturbation du métabolisme du pyruvate et des lipides ainsi que la dysbiose intestinale.

(1) Altérations mitochondriales et métabolisme du pyruvate

Les dysfonctions mitochondriales décrites dans le paragraphe suivant sont résumées dans la *Figure 20*.

La présence d'une NAFLD non traitée favorise l'apparition de complications et notamment de l'apparition d'inflammation qui conduit au développement d'une NASH chez ces patients. Cette pathologie est accompagnée d'une altération générale du métabolisme cellulaire. En effet, les adaptations positives de la mitochondrie, précédemment énoncées dans l'IR, associée à la NAFLD sont perdues, puisque l'on observe dans le foie des patients atteint de NASH, une respiration mitochondriale drastiquement diminuée comparé aux patients NAFLD¹⁸⁶. Ainsi, les stades précoces de la stéatose sont associés à un bilan énergétique positif tandis que les stades avancés de la NAFLD et du DT2 sont

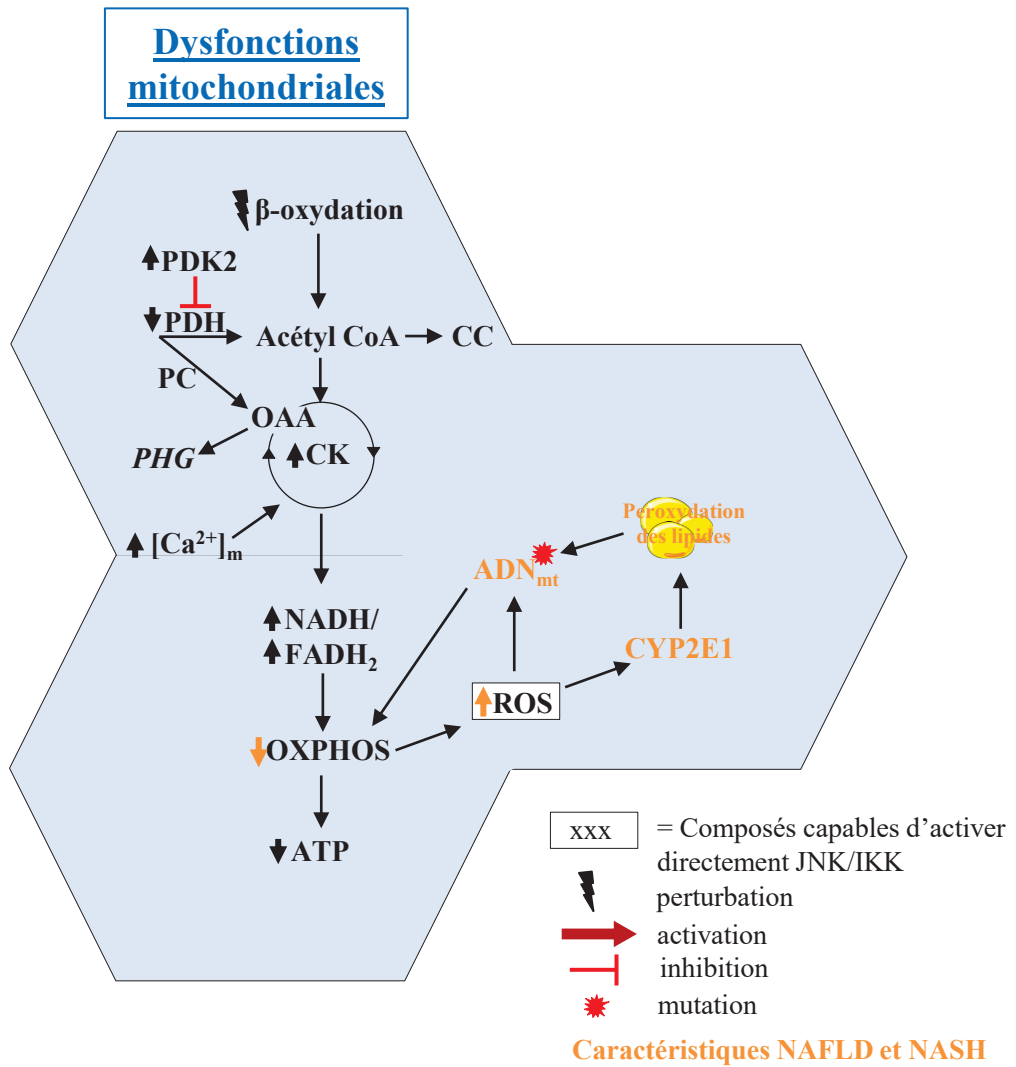


Figure 20 : Les principales altérations mitochondriales retrouvées dans l'IR et la stéatose hépatique au cours des NAFLD.

associés à un bilan énergétique déprimé ²⁰¹. La potentialisation de la respiration, qui opère dans les premiers stades de NAFLD, s'avère délétère si elle est maintenue puisqu'elle favorise la probabilité de production de ROS et donc d'atteintes mitochondriales comme vu précédemment. Comme dans l'IR, la potentialisation de la respiration ne produit pas plus d'énergie puisque les personnes obèses atteintes de NASH présentent un découplage des mitochondries et donc une diminution de la production d'ATP malgré l'augmentation de la respiration mitochondriale ¹⁸⁶. Les mitochondries sont donc des structures très dynamiques qui évoluent au cours de la maladie et qui pourraient augmenter leur capacité de respiration dans la NAFLD et l'obésité, et sévèrement décliner pendant le développement de la NASH ²⁰¹. L'évolution de la β -oxydation dans la NAFLD reste débattue avec une potentialisation retrouvée dans certaines études ²⁰² et une altération dans d'autres ²⁰³. Le renforcement de l'oxydation des lipides, par la mitochondrie, pourrait être une adaptation afin de gérer l'afflux d'AGL dans le contexte de l'obésité. En conséquence, les mitochondries peuvent devenir moins efficaces à cause d'une suractivation constitutive du métabolisme oxydatif pendant la NAFLD. De plus, les personnes ayant une IR hépatique et une NAFLD présentent également une augmentation du CK ^{176,181}. Ce processus permet une plus grande production d'équivalent réduits par une mobilisation importante d'OXPHOS mais augmente le stress oxydatif par la production de ROS. Ainsi, l'accumulation des lipides, retrouvée dans la stéatose, n'est pas uniquement due à une limitation de l'oxydation des lipides mais à la combinaison de défauts de la chaîne respiratoire, du stress oxydatif, de la production de ROS et de l'oxydation des lipides ^{176,181}.

Cette augmentation de la production de ROS, due à l'accélération du métabolisme mitochondriale favorise la peroxydation des lipides via l'activation du cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) ^{204,205}. Ce processus de peroxydation des lipides, serait le facteur déclencheur pour basculer de la simple stéatose à la NASH puisque les produits finaux de cette réaction sont des substances chimio-attractantes des cellules inflammatoires. Ainsi, l'augmentation de l'activité de CYP2E1 engendre une activation de l'inflammation et des lésions hépatiques chez les animaux NAFLD provoquant une NASH ²⁰⁴. Ces données concernent les patients NASH qui présentent une augmentation de CYP2E1 dans leur foie comparé aux patients sains ²⁰⁶. Ainsi, l'augmentation du stress oxydatif active les voies de l'inflammation passant par l'activation de NF κ B et de JNK entraînant, entre autres, la sécrétion de TNF α . Dans ce sens, les patients NASH présentent des taux de TNF α et de récepteur TNF significativement supérieurs aux patients ayant un foie sains mais aussi ayant une stéatose ²⁰⁷. L'utilisation de modèles de souris déficientes pour le récepteur de TNF montre que les animaux se trouvent protégés de la stéatose et des lésions hépatiques malgré la diète induisant des NASH ²⁰⁸.

Aussi, il se trouve que la gravité de la NASH dans le foie des patients est associée à une augmentation de la mutation de l'ADNmt et notamment des gènes de la chaîne respiratoire ²⁰⁹. De manière intéressante, le degré de sévérité des patients NASH est corrélé à l'augmentation de mutation/variant du cytochrome b (complexe III), qui est le site majeur de production des ROS dans la

mitochondrie²¹⁰. Il est probable que ces lésions de l'ADNmt soient la conséquence de la grande quantité de ROS et de lipides peroxydés produits dans le foie des patients NASH²¹⁰.

Dans ce contexte, l'accumulation de défauts mitochondriaux est amplifiée par le fait que les patients NASH présentent une diminution de l'autophagie comparé aux patients NAFLD favorisant l'accumulation de mitochondries défectueuses^{187,211}. Toutes ces données témoignent de l'importance de la mitochondrie dans la NAFLD et la NASH, en particulier du cercle vicieux qui se met en place dans ces pathologies complexes où chacun des défauts amplifie la toxicité du système.

Le point commun entre le métabolisme des lipides et celui du glucose est le CK, celui-ci va permettre d'orienter selon la qualité et le type de substrat vers une oxydation ou la formation de substrats anaplerotiques²¹². Comme évoqué précédemment dans I.Partie1, l'équilibre entre l'activité de la PDH et la PC tient un rôle critique dans l'orientation des flux métaboliques et notamment dans le dysfonctionnement métabolique causé par l'obésité et l'IR. Ainsi, dans le IR hépatique, un changement d'orientation du pyruvate opère en faveur d'une augmentation du CK au détriment de la céto-genèse^{183,184}. De manière intéressante, Go et al., montrent que les effets bénéfiques perçus dans l'inactivation de la PDK2 ne sont pas nécessairement la conséquence de l'augmentation de l'activité de la PDH mais plutôt le fait d'éloigner le flux de la PC. Dans ce sens, les recherches pour lutter contre la NAFLD se tournent de plus en plus vers le métabolisme du pyruvate et notamment vers des inhibiteurs du MPC (mitochondrial pyruvate carrier), le transporteur du pyruvate dans la mitochondrie²¹³. En effet, l'inhibition de l'entrée du pyruvate dans la mitochondrie diminue les flux anaplerotiques de la PC et ainsi diminue la néoglucogénèse, très présente chez les patients IR afin de favoriser la production d'acétyl-CoA via l'oxydation des lipides hépatiques. Les études constatent qu'une délétion de MPC permettait de diminuer la production hépatique de glucose et ainsi de protéger les animaux de l'hyperglycémie induite par un régime HFD²¹³. En revanche, pas de diminution significative de la stéatose et des TG hépatiques associés, ce qui s'explique par le fait que l'IR périphérique étant toujours présente l'afflux d'AGL, due à la lipolyse, reste important et favorise le stockage de TG hépatique²¹³. Ainsi, le ciblage du métabolisme du pyruvate, s'il est accompagné d'une prise en charge de l'IR périphérique, pourrait donner des résultats prometteurs dans le traitement de la NAFLD et du DT2.

(2) Altération du métabolisme lipidique

La stéatose hépatique ou NAFLD est une pathologie multifactorielle très complexe qui se définit principalement comme une accumulation anormale de graisse dans le foie, c'est pourquoi les recherches de traitements se tournent vers le métabolisme lipidique. Le foie est à la fois capable de stocker de l'énergie lorsque les substrats sont en excès et de mobiliser ces stocks lorsque l'organisme a besoin d'énergie. Le mécanisme de stéatose hépatique apparaît lorsqu'il y a déséquilibre entre les apports et les

demandes d'énergie. Ce phénomène est d'autant plus accéléré lorsque l'organisme est également touché par une IR et une hyperglycémie comme c'est le cas chez les DT2. Ainsi, le traitement de la stéatose doit se faire par des approches complémentaires prenant en compte l'IR périphérique et la stéatose ^{32,200}. La **figure 21** résume les différentes altérations, décrites ci-dessous, touchant le métabolisme des lipides dans la NAFLD et la NASH.

Comme vu précédemment, la dégradation de glucose par la PC et la PDH permet de fournir respectivement une molécule d'OAA et une molécule d'acétyl-CoA, qui, par condensation forme du citrate sous l'action de la citrate synthase, c'est la première étape du CK. Le citrate passe de la matrice mitochondriale vers le cytoplasme en empruntant l'antiport malate/citrate, appelé Slc25a1 (ou CIC), afin d'être clivé par la citrate lyase et de donner de l'OAA, qui sera recyclé et de l'acétyl-CoA, substrat essentiel à la lipogenèse *de novo*. Ainsi le contrôle des pools de citrate, via la modulation de ce transporteur mitochondrial Slc25a1 contrôle la lipogenèse *de novo*, c'est pourquoi l'extinction de Slc25a1 dans le foie et le TAV de souris les protège du développement d'une stéatose et rétablit leur homéostasie glucidique ²¹⁴. Cette étude renforce l'importance du dialogue TA et foie dans la NAFLD, puisque l'extinction de Slc25a1 seulement dans le foie ne protège que partiellement les animaux de la stéatose. D'autre part, le citrate est essentiel dans le contrôle de diverses enzymes du métabolisme notamment via un rôle inhibiteur de la PFK-2 (phospho-fructokinase-2), impliqué dans la glycolyse, mais aussi dans la néoglucogenèse, puisque son clivage dans le cytoplasme produit de l'OAA, substrat néoglucogénique ²¹⁴. Après le clivage du citrate dans le cytoplasme, l'acétyl-CoA va subir l'action de l'acétyl-coA-carboxylase (ACC) pour donner du malonyl-CoA qui à la suite d'une série de réactions menées par le complexe de l'acide gras synthase (FASN) donnera du palmitate. Ainsi l'inhibition de l'ACC hépatique chez des patients NAFLD réduit de 36% la stéatose hépatique mais de manière inattendue, augmente significativement le niveau de TG plasmatiques ²¹⁵. La diminution de la stéatose ne passerait pas seulement par la diminution de la lipogenèse *de novo*, mais également par la levée d'inhibition de CPT1 due à la diminution du malonyl-CoA favorisant l'oxydation des lipides. Cependant, le malonyl-CoA est également nécessaire à la formation d'acides gras poly-insaturés, l'absence de leur synthèse conduit à une activation de SREBP1c qui via l'activation de la GPAT1 (glycerol-3-phosphate acyltransférase 1) augmente la sécrétion de VLDL du foie ²¹⁵. La diminution de la lipogenèse *de novo* a également été étudiée via l'inhibition de FASN néanmoins, l'inactivation spécifique de FASN dans le foie de souris augmente le stockage des TG hépatiques, contrairement à l'inhibition d'ACC ²¹⁶. La principale différence entre l'inhibition de l'ACC et FASN est la modulation de l'activité de la β -oxydation. En effet, l'inhibition de FASN entraîne une accumulation de malonyl-CoA qui inhibe CPT1, bloquant l'oxydation des lipides ; au contraire l'absence d'ACC empêche la production de malonyl-CoA favorisant l'entrée des AG dans la mitochondrie via CPT1 pour leurs oxydations ²¹⁵. De manière intéressante, cette régulation par le malonyl-CoA semble disparue chez les personnes obèses ou ayant une NASH puisque l'activité de CPT1 augmente malgré les taux importants

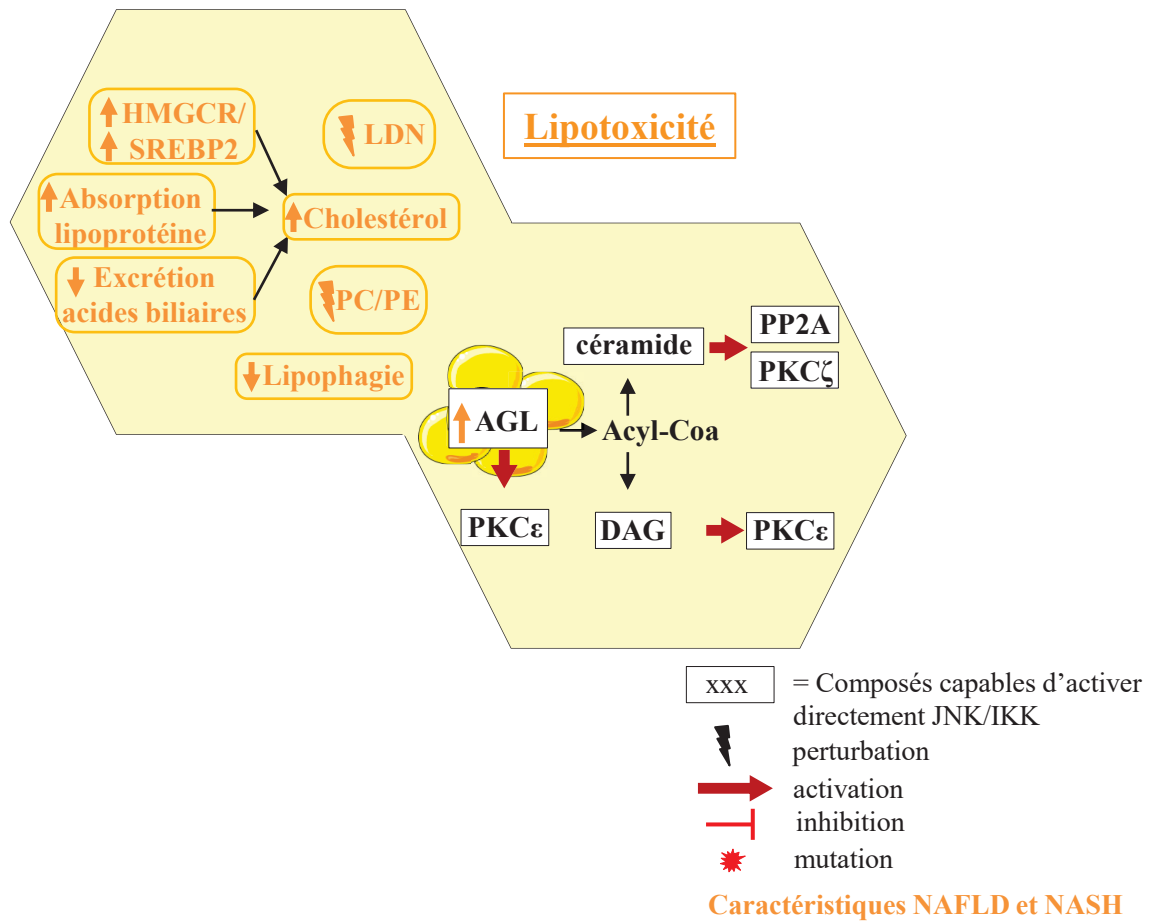


Figure 21 : Les principales altérations du métabolisme des lipides retrouvées dans l'IR et la stéatose hépatique au cours des NAFLD.

d'insuline et de malonyl-CoA. Ainsi, l'afflux important d'AG dans la mitochondrie entraîne une potentialisation de la β -oxydation¹⁸⁶. De nouvelles études sont donc nécessaires afin de trouver des inhibiteurs de la lipogenèse *de novo* permettant une diminution de la stéatose, sans augmentation des TG plasmatiques, comme traitement de la NAFLD.

De plus, en condition physiologique, l'insuline, parallèlement à l'inhibition de la néoglucogénèse, active la lipogenèse *de novo* afin de stocker l'énergie excédentaire. De ce fait, l'IR qui touche les patients NAFLD devrait avoir un blocage de l'activation de la lipogenèse *de novo* puisque la voie de signalisation de l'insuline est altérée. Pourtant, des études montrent au contraire que les TG hépatiques et circulants sont augmentés chez les patients IR. Ce paradoxe a été appelé « IR sélective » suggérant qu'il existe des voies de signalisation distinctes qui contrôlent indépendamment le métabolisme du glucose et des lipides¹¹⁴. L'altération d'IRS-2 et la potentialisation des enzymes de la néoglucogénèse (PEPCK et G6Pase) ont été retrouvées à la fois dans la NAFLD (stéatose simple) et la NASH comparées au contrôle, mais sans différence de niveau d'expressions entre NAFLD et NASH²¹⁷. En revanche, l'expression d'IRS-1, qui n'est pas modulée chez ces patients, se trouve corrélée positivement avec l'expression de FASN et de SREBP1c, témoignant d'une signalisation IRS1 fonctionnelle chez les patients NAFLD et NASH^{217,218}. Ces données s'accordent avec une étude précédemment décrite où les souris KO-IRS-1 présentaient une IR et une hyperglycémie sans développement de stéatose suite à un régime HFD, contrairement aux souris KO IRS-2 qui avaient une IR, une hyperglycémie et une stéatose. En adéquation avec ces données, les souris KO-IRS-1 connaissent une diminution des ARNm CD36 et PPAR γ qui peut expliquer la diminution de leur lipogenèse *de novo*²¹⁹. Par conséquent, il est possible que la transduction du signal insulinique contrôle, de manière indépendante, le métabolisme glucidique et lipidique via IRS1 ou IRS2. Dans le cas des NAFLD, le signal via IRS-1 est toujours intact, c'est pourquoi le métabolisme lipidique serait maintenu malgré l'IR des patients. Une étude récente montre que la lipogenèse *de novo* hépatique est inversement proportionnelle à la sensibilité à l'insuline hépatique et corporelle totale mais est corrélée positivement aux concentrations plasmatiques du glucose et de l'insuline. Ainsi l'augmentation du glucose et de l'insuline associée à une IR pourrait stimuler la lipogenèse *de novo* chez les patients NAFLD²²⁰. A l'opposé, une étude très récente montre que des sujets obèses ayant une NAFLD et une IR, les rendant incapables de diminuer leur production hépatique de glucose, se trouvent également incapables de stimuler la lipogenèse *de novo*. Par conséquent, l'augmentation de la lipogenèse *de novo* chez les NAFLD ne serait pas due à l'IR¹¹⁵. De plus, les patients NAFLD présentent une forte activation de ChREBP (carbohydrate response element binding protein), les chercheurs émettent donc l'hypothèse que l'augmentation de la lipogenèse *de novo* proviendrait principalement de l'abondance des substrats plutôt que de la stimulation par l'insuline et ainsi l'augmentation de la lipogenèse *de novo* chez les patients IR ne serait pas un paradoxe¹¹⁵. Toutes les études ne convergent pas vers la même idée, puisque certains supposent que l'augmentation de la lipogenèse *de novo* en contexte d'IR serait due à une

altération partielle du signal insulinique tandis que d'autre avance l'hypothèse que les patients présentent une IR bien réelle mais que l'abondance des substrats seraient la raison de la potentialisation de la lipogenèse *de novo*. De nouvelles études sont nécessaires pour préciser l'état de la transduction du signal IRS1 et IRS2 chez ces patients afin de mieux comprendre les mécanismes qui relient la NAFLD, l'IR et l'augmentation de la lipogenèse *de novo*.

Les patients NAFLD présentent également des taux élevés de cholestérol, notamment due à i) une augmentation de la synthèse du cholestérol via la suractivation de la HMGCR (enzyme intervenant dans la synthèse du cholestérol) et de SREBP2 (un facteur de transcription régulant l'homéostasie du cholestérol), ii) une augmentation de l'absorption de lipoprotéines riches en cholestérol et iii) une diminution de l'excrétion de celui-ci via les acides biliaires²²¹⁻²²³. De manière intéressante, l'augmentation de l'apport en cholestérol est corrélée avec l'augmentation de risque et de sévérité de développer une NASH²²³. Une autre classe de lipides essentielle est touchée dans la stéatose hépatique : c'est celle des PL. En effet, l'abondance de la PC et de la PE régule la taille et la dynamique des gouttelettes lipidiques. Ainsi, lors de conditions favorables aux stockages des TG, l'inhibition de la biosynthèse de la PC promeut la formation de grosses gouttelettes lipidiques, alors qu'une augmentation de la PE favorise la fusion des petites gouttelettes²²⁴. Aussi, la PC est le PL majoritaire et indispensable à la formation et à la stabilité des lipoprotéines comme les VLDL et les chylomicrons. Néanmoins, la PE joue également un rôle important dans l'assemblage et la sécrétion des VLDL, c'est pourquoi l'étude du rapport PC/PE reste le plus pertinent. Ainsi, une diminution de la production de PC entraîne une diminution de la sécrétion de VLDL et une augmentation du stockage de TG²²⁵. De nombreuses études ont développé des modèles animaux afin d'étudier l'impact de la modulation du rapport PC/PE sur le foie notamment via des modèles d'extinction génétique d'enzymes essentielles à la synthèse des PL. Prises ensemble, toutes ces études montrent que le rapport PC/PE, qu'il soit diminué ou augmenté, a des effets délétères sur le foie²²⁴. En effet, une délétion d'enzymes de synthèse (de PC ou de PE), diminue le rapport PC/PE et entraîne des lésions hépatiques associées à une NAFLD. Dans des modèles ob/ob et *Gnmt*^{-/-} (enzyme intervenant dans la production de PC), où le rapport PC/PE était largement augmenté, des NAFLD ont également été observés²²⁴. Le maintien du rapport PC/PE, dans un intervalle précis, est essentiel pour ne pas induire de lésions hépatiques. Aussi, de manière intéressante, l'ablation de la *Mfn2*, une protéine aux MAMs, entraîne une diminution du transfert de la PS du RE vers la mitochondrie et induit une stéatose, ceci sans modification du rapport PC/PE²²⁶. Cette étude montre que le rapport PC/PE n'est pas le seul indicateur des lésions hépatiques, et prouve l'importance des contacts mitochondrie-RE dans le développement de la stéatose qui sera développé dans la partie **III.C.(3).MAMS et stéatose**.

L'exportation des TG via les VLDL est également augmentée chez les patients NAFLD. Cependant, cette potentialisation ne serait pas le résultat de l'IR des patients, mais proviendrait de l'hyperinsulinémie qui en résulte^{227,228}. S'ajoute à cela l'émergence, depuis quelques années, d'une nouvelle voie d'élimination des lipides potentiellement impliquée dans la NAFLD : la lipophagie. En

effet, un nouveau concept d'autophagie des gouttelettes lipidiques a été montré *in vitro* et *in vivo* via la modulation de gènes nécessaire à la formation d'autophagosomes : dans des hépatocytes challengés en lipides ayant une extinction d'ATG5 (autophagy related), et dans des animaux KO-ATG7 sous diète HFD 16 semaines. Ainsi l'inhibition de l'autophagie, *in vivo* et *in vitro*, augmente les TG et les gouttelettes lipidiques aboutissant au développement d'une stéatose chez les animaux ²²⁹. A l'inverse, des teneurs élevées en lipides favorisent l'inhibition de l'autophagie et augmentent le stockage des gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes. Ainsi, les hépatocytes se retrouvent dans un cercle vicieux où l'autophagie réduite, augmente l'accumulation de lipides qui inhibe d'avantage l'autophagie ²³⁰. La colocalisation des gouttelettes lipidiques avec LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3), une protéine responsable de la biogenèse des autophagosomes, démontre que les lysosomes ne fusionnent pas directement avec les gouttelettes lipidiques mais avec les autophagosomes contenant les gouttelettes lipidiques ²³⁰. De manière intéressante, la formation de l'autophagosome se fait grâce à la conjugaison de LC3 avec la PE, par conséquent une altération des PL peut également interférer dans les mécanismes de l'autophagie et potentiellement de la lipophagie. Récemment, il a été montré une corrélation positive entre l'inhibition de l'autophagie chez des souris HFD et la progression de la NAFLD ²³¹. Des lipolysosomes ont également été retrouvés dans le foie de patients NAFLD et identifiés comme une caractéristique morphologique d'une lipophagie altérée ²³¹.

(3) Dysbiose intestinale

Ces dernières années, le microbiote est apparu comme un protagoniste actif et interconnecté à la physiologie humaine. Celui-ci joue le rôle d'un organe à part entière capable de moduler sa composition en fonction de son hôte, de l'environnement, de l'activité physique, des médicaments, et du régime alimentaire. Le microbiote entretient une relation complémentaire avec son hôte notamment en apportant des enzymes manquantes permettant une digestion plus complète de certains aliments mais également en facilitant l'absorption dans la circulation sanguine. Celui-ci intervient également dans la fonction immunitaire, interagissant et modulant directement des cellules immunitaires via l'afflux de métabolites. De nombreuses preuves sont maintenant établies concernant l'implication d'une dysbiose intestinale dans la physiopathologie de la NAFLD ²³². Il se trouve qu'une diversité du microbiote réduite est corrélée avec l'obésité et la NAFLD ²³³. De plus, un enrichissement du microbiote producteur d'éthanol est retrouvé chez les patients NASH, en accord avec l'augmentation de la concentration sanguine d'éthanol favorisant les lésions hépatiques ²³³. Les microbiotes sont ainsi modulés en fonction de l'atteinte et de ces évolutions : DT2, NAFLD ou NASH avec certaines souches favorisées par rapport à d'autre ²³⁴ (perturbations résumées dans **figure 22**). Il existe de véritables interactions bidirectionnelles entre la pathologie et la composition du microbiote, sans pour autant connaître le lien de cause à effet. De ce fait, la transplantation d'un microbiote de souris HFD, présentant une hyperglycémie et

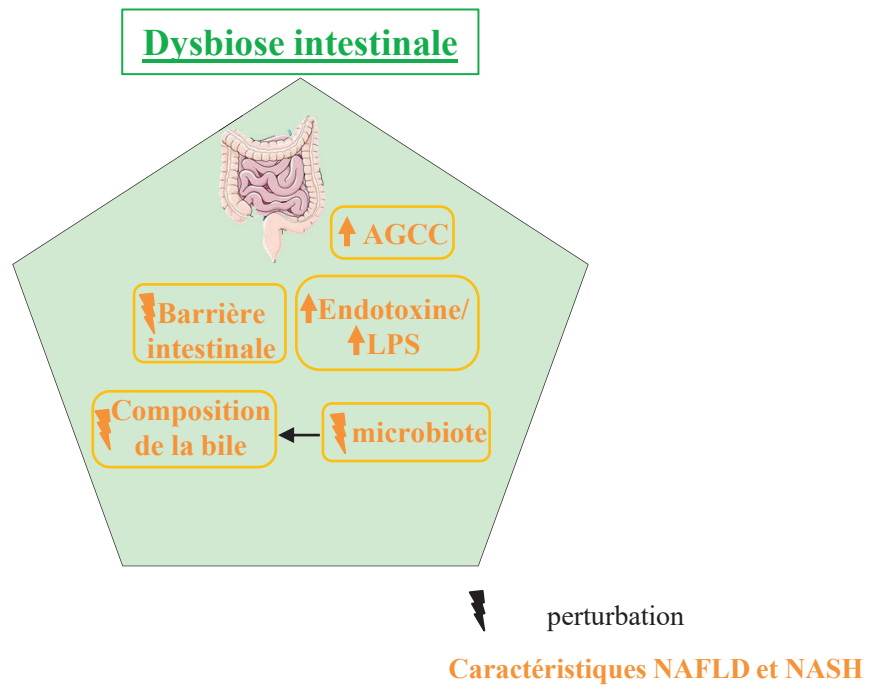


Figure 22 : Les principales altérations du microbiote intestinal retrouvées dans la NAFLD et la NASH

hyperinsulinémie, chez des souris dépourvues de microbiote, conduit à une hyperglycémie, hyperinsulinémie et s'ajoute à cela un développement de NAFLD chez les souris receveuses face à un régime HFD ²³⁵. De manière intéressante, l'intestin communique directement avec le foie via la veine porte, ainsi des souris exposées à un régime obésogène et dépourvues de microbiote intestinal présentent un taux plus faible de lipides hépatiques, prouvant une influence directe du microbiote sur le métabolisme hépatique ²³⁶. En condition physiologique, les cellules épithéliales de l'intestin sont reliées par des jonctions serrées empêchant les bactéries de pénétrer la muqueuse intestinale et la circulation sanguine ²³⁷. Dans le cas des patients NAFLD, la perméabilité de l'intestin est altérée, cependant les recherches ne sont pas parvenues à trancher si la NAFLD constitue une cause ou une conséquence de l'altération de la barrière intestinale ^{238,239}. Ainsi, une augmentation significative des concentrations systématiques d'endotoxine ou LPS (lipopolysaccharide), un composant de la paroi des bactéries gram-, est constatée chez les patients NAFLD ce qui participerait à l'IR et l'instauration d'une inflammation chez ceux-ci ²⁴⁰. Aussi, une étude récente montre que l'obésité, due à une hyperphagie chez les souris sous diète normale, n'est pas associée à une dysbiose intestinale, réfutant l'idée que la dysbiose intestinale est la cause de l'IR et de l'obésité ²⁴¹

La fermentation des fibres par le microbiote permet la production d'AG à chaîne courte (AGCC) pouvant intervenir dans les mécanismes d'IR et de NAFLD. En effet, ceux-ci passent dans la circulation et sont métabolisés comme source d'énergie mais peuvent également être utilisés comme messagers intracellulaires. Les AGCC sont capables de réguler la sensibilité à l'insuline en activant les dépenses énergétiques, et de diminuer l'accumulation des graisses dans le TA et le foie via l'activation de récepteurs aux protéines G, mais ils interviennent également dans la production de cytokines pro-inflammatoires ^{242,243}. D'autres AGCC, comme le butyrate et le propionate, agissent eux sur l'homéostasie glucidique via l'activation de la néoglucogénèse intestinale ²⁴⁴. Le microbiote module aussi l'absorption et la composition de la bile ce qui pourrait participer au phénotype de NAFLD notamment car celle-ci participe à la solubilisation, l'absorption et la digestion des lipides, mais également dans l'équilibre des PL ²³². En effet, la choline, un nutriment essentiel à la production de PC, provient principalement de l'alimentation et son absorption est dépendant de la digestion par le microbiote ²³². Ainsi, comme vu dans le précédent paragraphe, une altération de la synthèse de la PC peut conduire à une NAFLD, il n'est donc pas étonnant qu'un régime pauvre en choline amène au développement de stéatose ²⁴⁵.

L'un des principaux axes de recherche consiste actuellement à répertorier par séquençage et description des compositions des différents microbiotes associés à ces pathologies afin de connaître les populations caractéristiques de la NAFLD et de dévoiler de nouvelles stratégies de traitement.

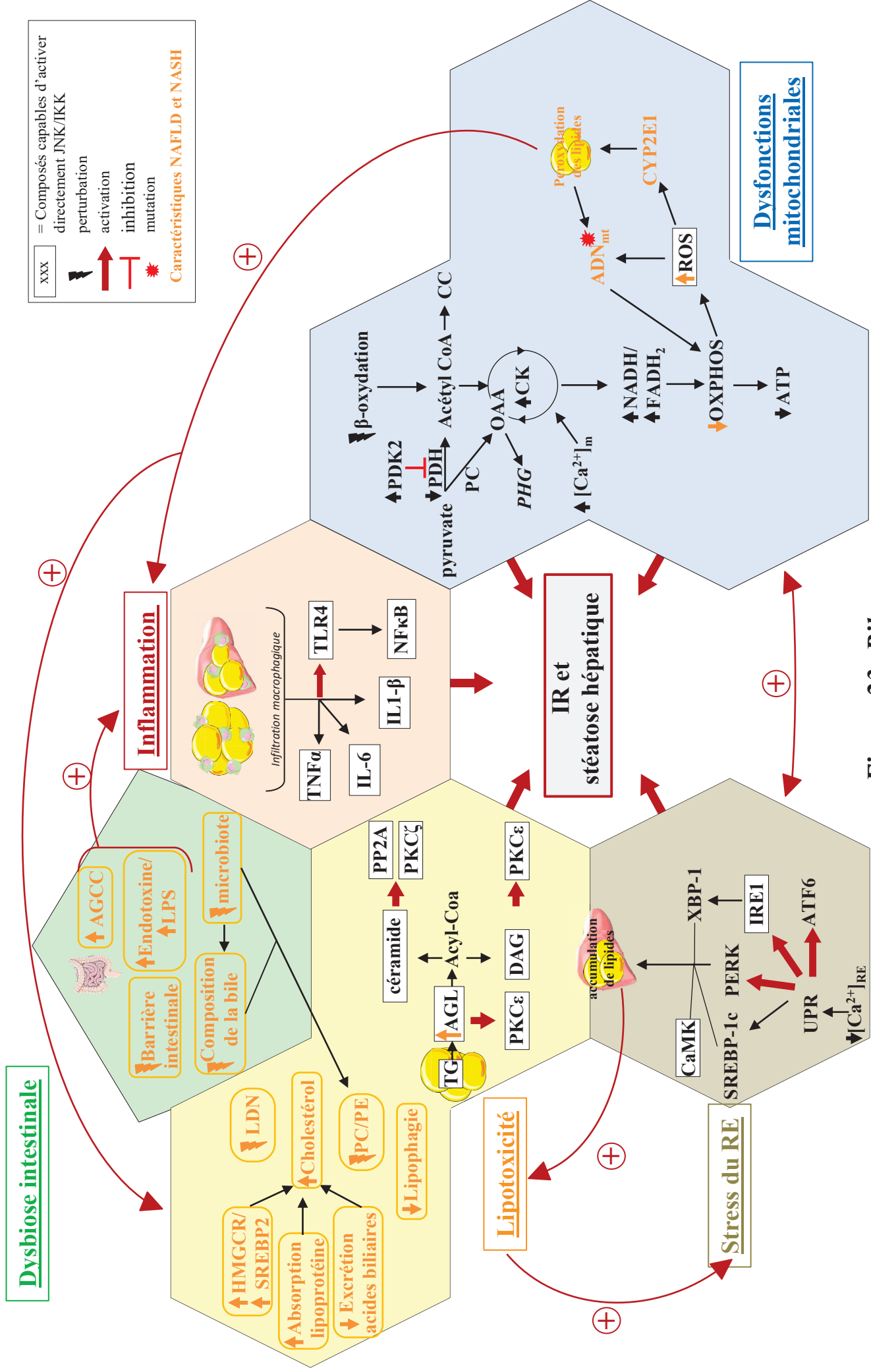


Figure 23: Bilan:

Intégration des mécanismes de l'IR et de la stéatose hépatique

Les facteurs participants au développement dans l'IR et la NAFLD et la NASH vont mutuellement s'influencer et s'entretenir (schéma bilan *Figure 23*), c'est pourquoi il est essentiel de garder une vision globale de toutes les atteintes dans les recherches de traitements.

III. Partie 3 : Les MAMs (mitochondria-associated membranes)

A. De leur découverte à leurs rôles physiopathologiques

(1) Une histoire de communication

La mitochondrie et le RE ne sont pas des structures indépendantes, mais interagissent entre elles via des points de contacts appelés MAMs (Mitochondria-Associated Membranes). Ces contacts ne se font pas par fusion membranaire mais par une juxtaposition des membranes permettant l'interaction de protéines de part et d'autre de ces organites, conférant à ces micro-domaines des fonctions spécifiques.

La MET (microscopie électronique à transmission), a permis en 1952, à Wilhelm Bernhard, d'observer pour la première fois des rapprochements entre le RE et la mitochondrie dans le foie de rat ²⁴⁶. Près de 40 ans plus tard, Vance et son équipe réalisent le premier isolement de MAMs par fractionnement subcellulaire ²⁴⁷. Dans les années suivant cette découverte, ces contacts sont observés dans différents organes et espèces comme chez les plantes ²⁴⁸, les champignons ²⁴⁹ et les humains ²⁵⁰. La synthèse de PL fût l'une des premières fonctions associée aux MAMs. Vance, en 1990, a constaté, dans le foie de rat, qu'il existait des activités enzymatiques dans la fraction mitochondriale « crude » (fraction de mitochondrie non pure contenant des fragments de RE), qui étaient absentes de la fraction mitochondriale pure. Vance proposa la présence d'une fraction X, responsable de la biosynthèse des PL, et notamment du transfert des lipides du RE à la mitochondrie ^{247,251}, qui correspondait aux MAMs. Au fil des années, la présence de canaux et de flux calciques furent constatés entre le RE et les mitochondries. De plus, l'utilisation de la microscopie 3D de haute résolution, pour l'analyse structurale des MAMs, combinée à l'imagerie confocale, utilisant des sondes fluorescentes sensibles au Ca^{2+} , a permis de confirmer ces échanges calciques aux MAMs et de préciser qu'environ 20% de la surface des mitochondries était en contact avec le RE ^{58,252}. Les contacts entre le RE et la mitochondrie sont alors établis, non plus comme des simples rapprochements physiques, mais en tant que plateforme ubiquitaire et complexe aux multiples fonctions cellulaires (pour plus de détails concernant la découverte des MAMs voir ²⁵³). Les MAMs, 70 ans plus tard, sont également appelées MERCs (Mitochondria-ER contacts) et les recherches sur le sujet ont connu un véritable essor permettant la découverte de nombreux acteurs aux MAMs et leur conférant une place centrale dans le métabolisme cellulaire ^{254,255}.

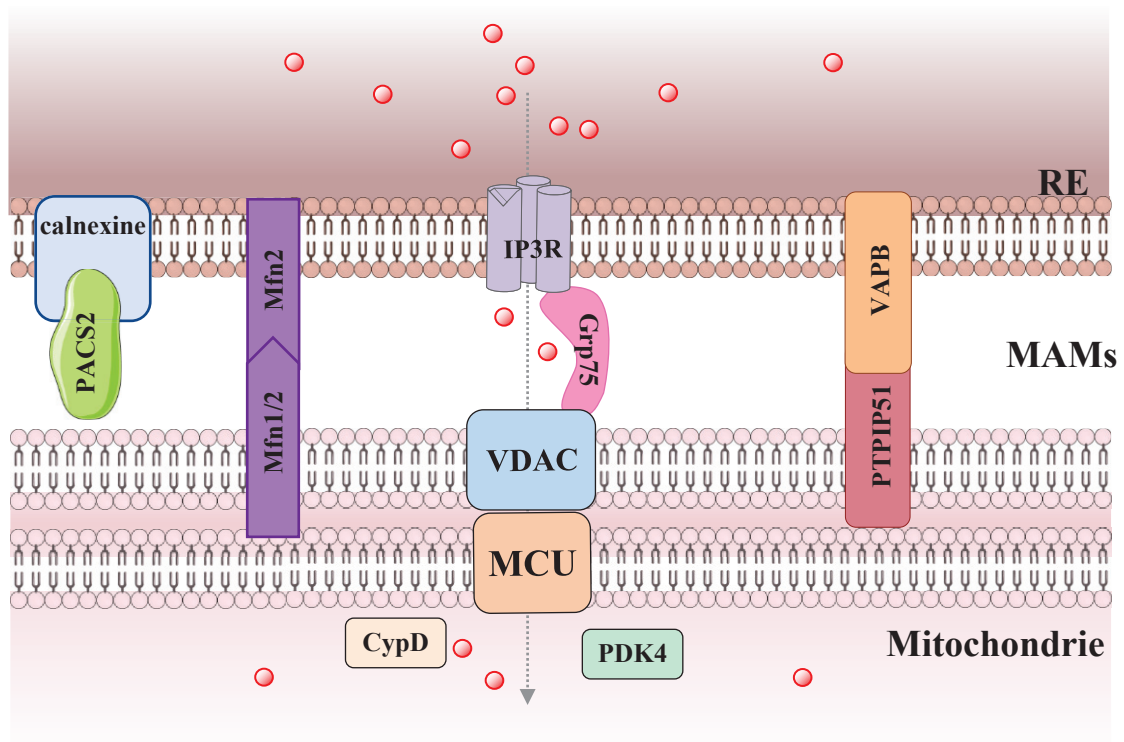


Figure 24: Représentation schématique des principaux complexes protéiques des MAMs

(2) Structure des MAMs

Les MAMs sont des structures complexes, maintenues et stabilisées grâce à des protéines qui se situent de part et d'autre de la mitochondrie et du RE, et qui interagissent : soit directement, soit en formant des complexes multiprotéiques. Celles-ci sont retrouvées chez tous les mammifères.

Un complexe similaire a été identifié par Kornmann et al chez les levures liant la mitochondrie et le RE, appelé ERMES (ER-mitochondria encounter structures). Ils ont montré que ce complexe était composé de 4 protéines (Mmm1, Mdm10, Mdm12 et Mdm34) se répartissant soit à la membrane externe de la mitochondrie, soit dans le cytoplasme ou à la membrane du RE. ERMES joue un rôle structural chez la levure, puisque celui-ci permet la communication entre les deux organites, mais également fonctionnel en intervenant dans les flux calciques, la dynamique mitochondriale et la biosynthèse des PL ²⁵⁶. En effet, une suppression des complexes ERMES diminue la conversion de PS en PE et PC, et l'expression d'un « tether » chez des mutants ERMES rétablit la synthèse des PL validant le rôle fonctionnel des interactions entre la mitochondrie et le RE dans la biosynthèse des PL ²⁵⁶. Les études se sont multipliées afin d'identifier, chez les mammifères, les acteurs des MAMs essentiels à leur structure et de comprendre les fonctions de ces domaines, pour la plupart, similaires au complexe ERMES chez la levure.

Les contacts mitochondrie-RE impliquent à la fois le RER mais également le REL, bien que les mécanismes d'interaction fassent intervenir des protéines spécifiques ²⁵⁷. Il faut savoir que la composition protéique des MAMs est propre à chaque organe et dépend d'un grand nombre de facteurs comme l'état nutritionnel ou le stress cellulaire. En effet, une étude protéomique a constaté que seulement 30% des protéines des MAMs du cerveau étaient communes aux protéines des MAMs de foie ²⁵⁸. Plusieurs études protéomiques des MAMs s'accordent sur la richesse de ces contacts avec plus de 1000 protéines présentes sur cette interface ²⁵⁸⁻²⁶³. Cependant, ces études démontrent également que seules 50% des protéines identifiées aux MAMs appartiennent à la mitochondrie ou au RE, suggérant l'importance d'autres compartiments à ces contacts ou témoignant du caractère non pur des fractions. Il est important de noter qu'il n'existe aucune protéine spécifique des MAMs, puisque celles-ci, de par leur localisation subcellulaire (mitochondrie, RE ou autres compartiments), interviennent également dans d'autres fonctions cellulaires ²⁶⁴. Dans la partie qui suit sont décrites les protéines structurelles des MAMs les plus étudiées à l'heure actuelle (*Figure 24*).

- **PACS2** (Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2)

PACS2 intervient dans la localisation des canaux ioniques entre les compartiments subcellulaires ²⁶⁵. Récemment, celle-ci a été identifiée comme une protéine régulatrice des MAMs contrôlant à la fois les contacts mitochondries-RE et l'homéostasie du RE ²⁶⁶. La diminution de l'expression de PACS2 dans des modèles de cellules neuronales induit une altération de la structure

mitochondriale et de l'homéostasie du RE, combinée à une diminution du nombre de contacts entre ces deux organites. L'absence de PACS2 perturbe la localisation des canaux IP3Rs, entraînant une diminution du transfert calcique du RE vers la mitochondrie et un blocage de l'apoptose dans ces cellules²⁶⁶. En accord avec cette étude, PACS2 est retrouvé comme « tether » des MAMs dans le foie de souris puisque sa surexpression potentialise les flux calciques aux MAMs²⁶⁷. Aussi, Aslan et al montre que le rôle pro-apoptotique de PACS2 est régulé par la phosphorylation d'Akt sur sa Ser437²⁶⁸.

PACS2 intervient aussi indirectement dans la régulation des flux calciques, notamment via la calnexine, une protéine chaperonne du RE, qui a son tour régule les flux calciques en interagissant avec les pompes réticulaires SERCAs. En temps normal, 80% de la calnexine se trouve au RE, préférentiellement aux MAMs, et l'inactivation de l'expression de PACS2 redistribue la calnexine du RE/MAMs vers la membrane plasmique, perturbant l'homéostasie calcique du RE et de la mitochondrie^{56,269}.

- **Mfn1/2**

Les Mfns sont des protéines de la famille des « dynamin-related GTPase » qui existent sous deux isoformes, la Mfn1 et la Mfn2, ayant chacune des fonctions et une localisation différente. Même si les deux isoformes présentent une activité GTPase, Mfn1 détient une activité bien plus efficace que Mfn2, nécessaire au maintien de la morphologie mitochondriale²⁷⁰. Mfn1 est essentielle dans le contrôle de la dynamique mitochondriale, tandis que Mfn2 semble intervenir dans la stabilisation des contacts mitochondrie-RE. En effet, Mfn2 est présent à la membrane du RE et peut former des homodimères (Mfn2-Mfn2) ou des complexes hétéroprotéique (Mfn2-Mfn1) avec les Mfn1 ancrées à l'OMM²⁷¹. Mfn2 est l'isoforme la plus retrouvée aux MAMs, cependant son rôle dans la dynamique des MAMs est encore controversé. L'étude originale²⁷¹ et plusieurs autres par la suite²⁷²⁻²⁷⁶ ont montré, dans des tissus différents et via différentes techniques, qu'une ablation de la Mfn2 diminue les interactions mitochondrie-RE en faveur d'un rôle de « tether » de la Mfn2 aux MAMs. Tandis que d'autres études ont montré qu'une diminution de l'expression de la Mfn2 renforçait les MAMs illustrant plutôt un rôle de « spacer » de la Mfn2²⁷⁷⁻²⁷⁹. Il se pourrait que cette controverse soit liée à des différences clonales dans les cellules utilisées soit à la nature des contacts mesurés, puisque la modulation de Mfn2 régule différemment les contacts étroits et larges. A ce titre, Cieri et al montre que l'inhibition de la Mfn2 conduit à une augmentation des MAMs « étroites » et une diminution des MAMs « larges » ce qui peut expliquer les différences de rôle « tether » vs « spacer » de la Mfn2 retrouvée dans la littérature²⁸⁰.

Une équipe a récemment montré que la protéine Parkin pouvait, par ubiquitination, réguler la Mfn2 et par conséquent impacter les MAMs. Ainsi, un mutant Mfn2, non ubiquitinable, était incapable de restaurer ces interactions mitochondrie-RE. Ces données vont dans le sens d'un rôle de « tether » de la Mfn2 aux MAMs et démontrent un nouveau mécanisme de régulation de la Mfn2 dans les MAMs²⁸¹.

- **PTPIP51- VABP** (protein tyrosine phosphatase-interacting protein51)- (vesicule-associated membrane protein associated protein B)

Récemment, l'étude des maladies neurodégénératives a permis de découvrir de nouvelles protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité des MAMs : PTPIP51, une protéine de l'OMM, et VABP une protéine au RE ^{282,283}. En effet, les auteurs de ces études ont identifié, dans certaines maladies, une rupture des interactions PTPIP51/VABP associée à une altération des interactions et des échanges calciques entre le RE et la mitochondrie, démontrant le rôle clef de ces protéines dans le maintien de l'intégrité et de la fonction des MAMs ²⁸²⁻²⁸⁴. En accord avec ces données, dans les cardiomyocytes, PTPIP51 serait augmentée aux MAMs lors des phénomènes d'ischémie/reperfusion, entraînant une augmentation des MAMs et du flux calcique ²⁸⁵. PTPIP51/VABP interviennent également dans les mécanismes de formation d'autophagosome grâce à leur rôle de « tether », permettant le rapprochement des deux organites ²⁸⁶. De manière intéressante, une étude récente a montré que l'invalidation de la protéine VABP n'induisait pas de diminution des contacts mitochondrie-RE ²⁸⁷. Ceci s'explique par la découverte d'une nouvelle protéine au RE, MOSDP2 (motile sperm domain-containing protein 2), capable d'interagir avec PTPIP51 afin de maintenir les contacts mitochondrie-RE ²⁸⁷. Cependant des études supplémentaires paraissent indispensables pour préciser son rôle et son fonctionnement aux MAMs.

- **IP3R1-Grp75-VDAC**

L'une des fonctions les plus importantes, opérant aux MAMs, est la signalisation calcique. Il y a quelques années, Szabadkai et al ont montré grâce à des co-immunoprécipitations (co-IP) qu'une protéine chaperonne cytosolique, Grp75 (glucose-regulated protein 75), interagit avec des canaux calciques de la mitochondrie et du RE, respectivement VDAC et IP3R. Ce complexe multiprotéique IP3R-Grp75-VDAC, aux MAMs, est responsable des transferts calciques du RE vers la mitochondrie ⁶⁶.

Il existe 5 isoformes d'IP3Rs dans l'organisme, ayant chacune une fonction et une influence sur l'efficacité du transfert calcique ^{288,289}. Dans le foie, les 3 isoformes les plus abondantes sont IP3R1, IP3R2 et IP3R3 ²⁹⁰. A noter que la répartition d'IP3Rs dans le foie se trouve hétérogène le long de l'acinus. Il est rapporté qu'IP3R est retrouvé de manière plus abondante dans les hépatocytes péricentraux spécialisés dans la glycolyse, la glycogénolyse, et les activités de désintoxication plutôt que dans les hépatocytes périportaux responsables de la glyconéogenèse, de la synthèse d'urée, de la formation de la bile et de l'activité catabolique des lipides ^{291,292}. VDACs, canal calcique mitochondrial présent dans les MAMs, existe sous 3 isoformes différentes. En comparant l'expression de VDAC dans le foie, le rein, le cœur et le cerveau de rat, il a été montré que l'isoforme VDAC1 est la plus abondante chez les mammifères ^{293,294}. Plusieurs études ont montré que ce complexe IP3R-Grp75-VDAC exerce un contrôle sur l'intégrité des MAMs puisque la diminution d'expression de Grp75 entraîne une

diminution des MAMs dans les cellules neuronales de souris et dans les cellules d'hépatocarcinome humain ^{274,295}. Aussi, une diminution de l'expression de VDAC1 dans ces mêmes cellules induit une diminution des contacts Grp75-IP3R1 évoquant une altération des MAMs ²⁷⁴. La diminution d'expression d'IP3R1, dans le foie de souris diminue les transferts calciques aux MAMs, mais l'étude ne précise pas l'intégrité de celles-ci ²⁶⁷. En revanche, d'autres données montrent que des souris KO-IP3R1 dans le foie ²⁹⁶ ou un triple KO IP3Rs dans une lignée cellulaire de lymphome de poulet ²⁹⁷, présentent la même quantité de contacts mitochondrie-RE qu'une souris WT ce qui pourrait laisser à penser qu'IP3Rs n'est pas indispensable au maintien des MAMs. Ces données ne sont pas en accord avec une étude très récente, utilisant la microscopie à super résolution, qui démontre le rôle indispensable d'IP3Rs dans le maintien des MAMs, indépendamment de son rôle dans le flux calcique ²⁸⁸.

De plus, notre équipe a découvert que la cyclophiline D (CypD), une protéine chaperonne de la mitochondrie qui contrôle l'ouverture du mPTP, est présente aux MAMs et interagit avec le complexe VDAC1-Grp75-IP3R1 dans le foie et le cœur de souris ^{274,275}. Ces études montrent que la CypD est indispensable pour le maintien de la structure des MAMs puisque l'absence de CypD, son inhibition pharmacologique dans les cellules H9C2 ²⁷⁵ ou l'utilisation de souris KO-CypD dans le foie ²⁷⁴, diminue la quantité de MAMs et/ou le transfert de Ca²⁺ entre les organites.

Récemment il a été montré que dans le muscle PDK4 interagit avec le complexe IP3R-Grp75-VDAC et module l'activité des MAMs. PDK4 est la seule isoforme présente aux MAMs, du côté de la mitochondrie. L'étude dévoile 2 populations de PDK4, une qui régule le complexe PDH dans la matrice mitochondriale afin de diminuer l'oxydation du pyruvate et une qui est impliquée dans la formation des MAMs et le transfert du Ca²⁺ ²⁹⁸. Une diminution de l'expression de PDK4 altère la formation des MAMs, réduit les flux calciques et favorise l'accumulation de Ca²⁺ mitochondrial ²⁹⁸.

Une autre étude a révélé que TG2 (transglutaminase type 2) interagit avec Grp75 aux MAMs et par conséquent modifie l'interaction du complexe IP3R-Grp75-VDAC et l'homéostasie des MAMs. TG2 fait partie d'une famille d'enzymes ubiquitaires, responsables des modifications protéiques post-traductionnelles Ca²⁺ dépendante. C'est une protéine multifonctionnelle qui fonctionne comme une protéine disulfure isomérase, une protéine kinase, une protéine scaffold et en même temps une ADN hydrolase. Aux MAMs, l'absence des interactions TG2-Grp75 induit une augmentation des contacts IP3R3 et Grp75, associée de manière surprenante à une diminution des contacts mitochondrie-RE et de leur composition et une altération des échanges calciques entre les deux organites. Etant donné que l'activité de TG2 dépend du Ca²⁺, il est possible que l'augmentation de contact IP3R3-Grp75 soit un comportement compensatoire pour essayer de maintenir des interactions entre les organites. Ces résultats s'accordent avec l'augmentation de l'expression de Grp75 aux MAMs qui est trouvée dans les lignées cellulaires KO-TG2 ²⁹⁹.

(3) Fonctions des MAMs

Les cellules eucaryotes ont une compartimentalisation de leurs fonctions, c'est pourquoi une communication entre les organites est essentielle pour maintenir l'homéostasie cellulaire. Les MAMs, qui permettent la communication entre le RE et la mitochondrie, tiennent un rôle clef dans de nombreuses fonctions cellulaires. Dans les hépatocytes de souris, une mitochondrie sur quatre possède des contacts avec le RE, ces MAMs couvrent 4 à 11% de la surface totale de la mitochondrie ³⁰⁰. Récemment, des études montrent que la distance entre les deux organites, au sein des MAMs, varie selon la nature du RE avec une distance de 10 à 50nm avec le REL, et entre 50 et 80nm avec le RER ^{257,297}. Il a été proposé que cette distance inter-organite varie également selon la fonction des MAMs. Ainsi les échanges calciques opèreraient lorsque les MAMs ont une largeur de 20 à 25nm tandis que les échanges lipidiques entre le RE et la mitochondrie seraient optimaux à une distance de 10nm. En effet, la proximité du RE et de la mitochondrie à 10nm entraînerait la mise en place de ponts protéiques hydrophobes permettant les échanges de lipides. Dans cette conformation, les échanges de Ca^{2+} seraient impossibles car l'encombrement stérique des protéines formant le complexe calcique serait trop important, empêchant le passage du Ca^{2+} ²⁵⁷. Dans leur revue, Giacomello et Pellegrini, évoquent la complexité d'attribuer une distance précise à une fonction donnée notamment car il n'existe pas à ce jour de lien moléculaire universel des MAMs. A ce titre, les contacts de 20nm, évoqués dans les échanges Ca^{2+} , peuvent aussi correspondre à des MAMs-lipides « dormants », tout comme les contacts plus larges (>30nm) qui correspondraient à des contacts calciques ou des phagocytaires « dormants » prêts à se rapprocher pour passer en conformation active ²⁵⁷. Par conséquent, il serait important de prendre la profondeur intermembranaire des MAMs comme un paramètre structurel régulé par la cellule et qui définit sa fonction. Cette subtilité participe probablement aux controverses associées aux MAMs. Les différentes fonctions décrites ci-dessous sont résumées dans un schéma bilan, **Figure 25**.

- **Transfert lipidique (Figure 25 A)**

La mitochondrie abrite, dans sa matrice, l'oxydation des lipides tandis que le RE prend en charge la lipogenèse, témoignant de l'importance de ces organites dans l'homéostasie lipidiques. Dans les années 90, il a été montré que les MAMs intervenaient dans les échanges de PL ²⁴⁷. Par la suite, Vance et son équipe ont prouvé le rôle essentiel des MAMs, dans la synthèse de PL, grâce à un fractionnement cellulaire prouvant que l'enzyme réticulaire phosphatidyléthanolamine N-méthyltransferase (PEMT), essentielle à la synthèse de la PC à partir de la PE, est enrichie aux MAMs et que son expression se restreint aux hépatocytes ³⁰¹. De manière intéressante, il a été suggéré que ces mécanismes se déroulent lorsque la mitochondrie et le RE se trouvent à une distance optimale située entre 0 et 10nm ²⁵⁷.

Les PL jouent trois rôles essentiels dans la cellule : énergétique, structural et fonctionnel. Leur synthèse est le résultat d'une fine collaboration entre le RE et la mitochondrie au niveau des MAMs. De nombreuses études ont précisé les modalités de cette synthèse, la PS est synthétisée du côté du RE grâce à la présence de deux enzymes réticulaires les phosphatidylsérine 1 et 2 (PSS1/PSS2), localisées toutes deux dans les MAMs ³⁰². Ensuite, la PS nouvellement synthétisée est alors transmise à l'OMM. Les mécanismes de transports des PL entre les organites ne sont pas encore clairs, mais les équipes s'accordent à dire qu'il s'agirait d'un flux passif associé à une juxtaposition membranaire entre le RE et la mitochondrie ³⁰³. La synthèse se poursuit au sein de la mitochondrie dans l'IMM, la PS est alors décarboxylée en PE grâce à la phosphatidylsérine décarboxylase (PSD) ^{304,305}. Ensuite la PE formée a plusieurs possibilités : être exportée vers d'autres compartiments, ou transmise au RE où elle sera convertie en PC par la PEMT. De manière intéressante, la PC, uniquement synthétisée dans le RE, est le PL le plus abondant dans la mitochondrie. Les mécanismes qui régissent son importation ne sont pas clairs mais feraient intervenir la protéine steroidogenic acute regulatory protein (StAR) contenant des motifs START connu pour le transfert d'autres lipides ³⁰³. La PS, quant à elle, serait transportée via un complexe protéique ancré à l'OMM et impliquant ORP5/8 (oxysterol binding related proteins 5/8) ³⁰⁶. Une étude récente montre que la PS aurait la capacité de se lier à la Mfn2, permettant de créer des micro-domaines enrichis en PS et favorisant son transport ²²⁶. Les souris Mfn2-KO, utilisé dans cette étude, présentent une altération des MAMs associée une diminution de la synthèse des PL et du transfert de PS du RE à la mitochondrie. La réinstaurer des MAMs via un linker artificiel a permis de rétablir les niveaux de PS via l'amélioration des taux de PSS2, mais pas de PE ou PC, démontrant un rôle essentiel des MAMs à la synthèse de PS, mais suggérant l'implication d'autres mécanismes à la synthèse des autres PL. Aussi, il a été montré que PERK, un acteur et senseur du stress du RE, possède une activité lipide kinase permettant la synthèse aux MAMs d'acide phosphatidique (PA), le précurseur de tous les PL ³⁰⁷.

Les MAMs semblent également centrales dans la synthèse des TG puisque deux enzymes essentielles y sont retrouvées : DGAT2 (diacylglycérol transferase2) et ACS4 (Acyl CoA synthase 4). Les ACS catalysent les premières étapes nécessaires à l'oxydation, l'élongation et la désaturation des AG. De manière intéressante, chaque isoforme est répartie spécifiquement dans les différents compartiments subcellulaires et régulée de manière indépendante, notamment par l'état nutritionnel. C'est l'isoforme 4 qui est la plus enrichie aux MAMs ³⁰⁸. DGAT2 est, quant à elle, l'enzyme majeure de l'étape finale de la biosynthèse des TG. Celle-ci contient une séquence de 5 acides aminés nécessaire à son adressage aux MAMs. Cependant, sa localisation est dite dynamique puisqu'elle est retrouvée à la surface du RE, de la mitochondrie et des gouttelettes lipidiques, où celle-ci jouerait le rôle de pont entre ces différents compartiments ³⁰⁹.

Un autre lipide essentiel à la stabilité des membranes mitochondriales est le cholestérol. La synthèse du cholestérol étant réticulaire, son importation dans la mitochondrie est obligatoire. Très tôt

il a été montré la présence aux MAMs d'enzymes impliquées dans le métabolisme du cholestérol comme l'acyl-Coenzyme A : cholesterol acyltransferase I (SOAT1/ACAT1)³¹⁰. Par la suite, une étude a montré que la modulation du cholestérol aux MAMs influençait le transport de PS dans la mitochondrie, suggérant un potentiel rôle du cholestérol dans le contrôle de la dynamique des MAMs³¹¹. Aussi, StAR un transporteur du cholestérol, est également présent dans les MAMs et a pour particularité d'interagir et/ou d'être régulé par des protéines mitochondriales aux MAMs : TOM22 (translocase of the outer membrane of mitochondria 22) et VDAC2³¹². La protéine 3 contenant le domaine AAA (ATAD3) est enrichie au niveau des MAMs et participerait également à la régulation de la stéroïdogénèse en canalisant le cholestérol entre le RE et les mitochondries³¹³. En accord, les fibroblastes dérivés de patients atteints de délétions du gène ATAD3, montrent une altération du métabolisme du cholestérol et des dommages à l'ADNmt³¹⁴.

Aussi, la cavéoline 1 (CAV1), découverte lors d'une analyse protéomique des MAMs dans le foie, pourrait agir comme une protéine d'échafaudage nécessaire au transport du cholestérol du RE vers les mitochondries. En effet, les souris CAV1-KO présentent une altération des contacts mitochondrie-RE et une accumulation de cholestérol libre dans les MAMs²⁶⁰.

Enfin, les MAMs sont également impliqués dans le métabolisme des sphingolipides et des gangliosides. En effet, une sphingomyélinase, située au niveau des MAMs, produit des céramides, qui sont transférés dans les mitochondries pour un métabolisme ultérieur³¹⁵. De plus, une étude a découvert des microdomaines enrichis en glycosphingolipides, au sein des MAMs, où le ganglioside GM1 s'accumule préférentiellement, afin d'interagir avec la forme phosphorylée d'IP3R1 et de moduler les échanges de Ca²⁺ entre les organites³¹⁶. Mêmes si certains points restent à approfondir, notamment en ce qui concerne le transport entre les organites, toutes ces études s'accordent pour placer les MAMs comme centraux dans le contrôle du métabolisme lipidique.

• **Dynamique mitochondriale (Figure 25 B)**

La microscopie à haute résolution a montré l'implication des contacts mitochondrie-RE dans différentes étapes précoces de la fission qui précèdent le recrutement de Drp1 à la mitochondrie. Premièrement, une étude récente a montré la nécessité des contacts mitochondrie-RE pour autoriser l'initiation de la réplication de l'ADNmt, mais également pour recruter les protéines nécessaires à la réplication³¹⁷. Aussi, cette association spatiale, ADNmt et contact mitochondrie-RE, représente les futurs sites de fission de la mitochondrie permettant la répartition de l'ADNmt dans les deux futures mitochondries filles. Ainsi, l'une des premières étapes de la fission mitochondriale, serait la réplication de l'ADNmt dans la matrice mitochondriale spécifiquement aux sites de contact avec le RE³¹⁷. Deuxièmement, l'IFN2 (inverted formin 2), une protéine réticulaire, induit la polymérisation de filaments d'actine dans les zones de contact mitochondrie-RE permettant au RE de s'enrouler autour de la mitochondrie afin de réduire le diamètre de la mitochondrie : c'est ce qu'on appelle la « pré-

constriction »^{37,318,319}. Récemment, une équipe a précisé ce phénomène et démontré un nouveau rôle de Drp1, indépendant et complémentaire de son rôle d'oligomérisation et de l'hydrolyse du GTP. Elle a montré qu'il existait deux populations de Drp1 : une recrutée à l'OMM pour procéder à l'étranglement des mitochondries et une autre, associée à l'acide phosphatidique dans le RE, et qui permet la formation de tubules périphériques favorisant les interactions ER-mitochondries³²⁰. Drp1 joue, par conséquent, un double rôle dans la fission puisque celui-ci participe à la constriction de l'OMM et facilite les interactions mitochondrie-RE. Ces contacts ainsi formés, fournissent une plateforme idéale pour recruter les différents acteurs de la fission. De plus, l'implication des MAMs dans la fission semble essentielle puisque ce phénomène nécessite des composés inhérents aux MAMs tels que des PL et du Ca^{2+} ^{319,321,322}. Cependant, le lien entre MAMs et dynamique mitochondriale n'est pas linéaire puisqu'une altération des MAMs est associée à un état fissionnée des mitochondries et une diminution de la respiration mitochondriale dans les hépatocytes traités au glucose³²³. Cette régulation permet d'adapter les flux métaboliques en fonction de l'état nutritionnel et ainsi ralentir l'oxydation des lipides par la mitochondrie pour favoriser la lipogenèse lorsque les glucides sont en excès à l'état post-prandial³²⁴.

- **Transfert calcique (Figure 25 C)**

Comme évoqué précédemment, le RE procède à des échanges calciques avec la mitochondrie⁵⁸, notamment via le complexe VDAC-Grp75-IP3R (Patergnani et al, 2011) plaçant les MAMs au carrefour de ce mécanisme. La création de micro-domaine riche en Ca^{2+} est nécessaire pour faire face à la faible affinité de MCU et permettre l'entrée de Ca^{2+} ^{325,326}. De manière intéressante, la phosphorylation de PDH (correspondant à son état inactif) va pouvoir être utilisée comme un indicateur de la quantité de Ca^{2+} mitochondriale puisqu'une forte concentration de Ca^{2+} favorise la déphosphorylation de PDH. En accord avec ces données, une diminution du transfert calcique RE-mitochondrie est en faveur d'une augmentation de la phosphorylation de PDH et par conséquent un ralentissement du CK accompagné d'un défaut de production d'ATP dans la mitochondrie⁵⁹.

De manière logique, la composition des MAMs impacte les transferts calciques : soit en agissant directement sur les canaux calciques, soit de manière indirecte en modulant les contacts mitochondrie-RE. En faveur d'une régulation des canaux calciques, TOM70, une protéine de l'OMM, et S1R (Sigma 1 receptor), une chaperonne du RE, sont retrouvées aux MAMs et participent à la régulation des transferts calciques en interagissant directement avec IP3Rs^{327,328}. De même, la CypD, protéine mitochondriale impliquée dans l'apoptose, est retrouvée aux MAMs et interagit avec le complexe IP3R-grp75-VDAC afin de réguler les flux calciques. Ainsi, une perte de la CypD altère les MAMs et les flux calciques dans le cœur²⁷⁵ et dans le foie^{274,329}. D'autres protéines comme Grp75 et Mfn2, ayant des rôles de « tether » aux MAMs, semblent essentiels aux transferts calciques puisqu'une diminution ou une ablation de celles-ci entraîne une altération des MAMs associée à une diminution du transfert

calcique ^{66,271,272}. Cependant, des résultats contradictoires ont été trouvés pour la Mfn2 dont l'invalidation provoquerait une augmentation des MAMs accompagnée d'une augmentation du transfert calcique ^{277,278}. De la même façon, PML (promyelocytic leukemia), un suppresseur de tumeur et acteur de l'apoptose retrouvés aux MAMs, agit sur le transfert calcique via la modulation d'un complexe macromoléculaire impliquant IP3R, Akt et PP2A ³³⁰.

L'augmentation du transfert calcique aux MAMs favorise le métabolisme aérobique et par conséquent la production et la libération d'H₂O₂ dans l'IMS, entraînant le gonflement des crêtes mitochondriales ³³¹. Booth et al démontrent que la libération d'H₂O₂ intervient préférentiellement aux MAMs et en réponse à l'absorption de Ca²⁺ par la mitochondrie, créant un environnement rédox aux MAMs qui faciliterait les flux calciques via l'oxydation d'IP3R ^{331,332}. De même, plusieurs protéines rédox sont retrouvées aux MAMs, et seraient capables d'interagir directement avec IP3R et SERCA et de moduler leur activité afin de réguler les flux calciques ³³³. Dans la matrice mitochondriale, ces protéines rédox sont également capables d'oxyder MCU, entraînant une augmentation de son oligomérisation et de son activité ³³⁴ et provoquant une surcharge calcique qui devient alors délétère pour la cellule ³³⁵. A l'inverse, un blocage des flux calciques sortant d'IP3R va induire de l'autophagie ³³⁶. Ainsi, les MAMs permettent une régulation fine des transferts calciques afin de maintenir les flux nécessaires au soutien de la bioénergétique cellulaire sans basculer dans des concentrations délétères pouvant enclencher l'apoptose.

- **UPR (Figure 25 D)**

Comme vu précédemment dans *II.A.(3) Stress du RE*, le stress du RE est très important dans les mécanismes d'IR et de manière intéressante les MAMs sont étroitement lié à l'UPR ³³⁷. Durant la phase adaptative du stress du RE (avant les altérations du RE) il y a une modification de la structure du RE et de la répartition des mitochondries en faveur d'une augmentation du nombre de MAMs, entraînant une augmentation du transfert calcique du RE vers la mitochondrie. Ainsi, la mitochondrie renforce sa production d'énergie sous forme d'ATP, indispensables à la production par le RE des protéines et enzymes nécessaires à l'UPR pour résoudre le stress ³³⁸. Cette augmentation de MAMs, retrouvée par Bravo et son équipe lors d'un stress du RE, est cohérente avec l'augmentation de la présence de Mfn2 aux MAMs, retrouvée lors d'une induction chimique d'un stress du RE par Ngoh et son équipe ³³⁹. Ils ont montré que le stress du RE induisait une surexpression de la Mfn2, nécessaire pour obtenir une réponse UPR appropriée. En effet, l'ablation de Mfn2 augmente l'expression de protéines chaperonnes du RE et entraîne une activation excessive des 3 voies de l'UPR favorisant la mort cellulaire ³³⁹. A noter que la Mfn2 interagit physiquement avec PERK, un des transducteurs des signaux de l'UPR retrouvé aux MAMs, et le maintient inactif en condition basale ^{166,340}. En revanche, aucune donnée ne permet de savoir quelle Mfn2 interagit avec PERK, la réticulaire, la mitochondriale ou les deux ²⁵⁵. Aussi, PERK participe au maintien des MAMs, puisque son ablation induit une diminution des contacts-mitochondrie-

RE³⁴⁰, mais aussi à la protection de la mitochondrie durant le stress du RE en induisant une hyperfusion mitochondriale³⁴¹. Un autre acteur de la réponse UPR, IRE1 est crucial au maintien des MAMs, notamment parce que celui-ci stabilise IP3R et module son activité. Un KO-IRE1 dans le foie de souris, entraîne une délocalisation d'IP3R des MAMs aboutissant à une altération des MAMs et des transferts calciques³⁴². Une étude a également montré l'implication de S1R, une chaperonne interagissant avec Grp78 aux MAMs, dans la stabilisation des flux calciques du RE vers la mitochondrie. En condition de stress du RE, S1R se détache de Grp78 et se relocalise pour interagir avec IRE1 afin de contrôler la survie cellulaire. Cependant, de nouvelles études sont nécessaires pour explorer les mécanismes précis par lesquels les MAMs régulent le stress du RE³²⁸.

- **Apoptose (Figure 25 E)**

En condition normale, le Ca²⁺ entre dans la mitochondrie afin de maintenir les concentrations nécessaires à la bioénergétique cellulaire. En effet, un blocage de ces flux constitutifs provoque l'induction de l'autophagie pour compenser cette privation d'énergie³³⁶. Cependant, certaines situations de stress cellulaire, par exemple la réponse UPR prolongée, font parvenir des concentrations trop importantes de Ca²⁺ dans la matrice mitochondriale, ce qui peut déclencher les phénomènes d'apoptose³⁴³. L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un phénomène physiologique normal et essentiel au développement et à l'homéostasie tissulaire. Celle-ci est induite lors d'un stress cellulaire intense et/ou un stress qui se maintient malgré la mise en place de stratégies, par la cellule, pour l'abréger. Ce phénomène nécessite l'intervention de protéines issues de la famille des Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) qui comprend : des protéines pro- et des anti-apoptotiques³⁴⁴. Les MAMs se trouvent également liées au phénomène d'apoptose notamment pour leurs rôles dans la fission mitochondriale. En effet, une équipe a montré que la fission mitochondriale, et notamment la relocalisation de Drp1 du cytoplasme vers l'OMM, était une étape indispensable à l'apoptose puisque l'inhibition de Drp1 bloque la mort cellulaire³⁴⁵. De même, le RE vient s'enrouler autour de la mitochondrie pour marquer le site de fission et recruter des acteurs de la fission et de la mort cellulaire : comme Bax (Bcl-2 associated X) une protéine pro-apoptotique de la famille des Bcl-2³⁴⁶. La protéine transmembranaire réticulaire Bap31, forme ainsi un complexe avec Bcl-2 et la protéine Fis-1, impliquée dans la fission mitochondriale, permettant un transfert calcique pro-apoptotique vers les mitochondries³⁴⁷⁻³⁴⁹. A l'inverse il y a une interaction entre Mfn2 et la forme soluble inactive de Bax qui active les Mfn2 et favorise la fusion mitochondriale³⁵⁰. Dans des conditions de stress cellulaire, les MAMs apportent les lipides nécessaires et indispensables à l'oligomérisation de Bax. L'entrée massive de Ca²⁺ favorise également cette oligomérisation, indispensable à l'apoptose^{346,351}. Cette surcharge calcique augmente la production de ROS, la perméabilisation de l'OMM et de l'IMM, diminue le potentiel de membrane de la mitochondrie, ce qui favorise la libération du cytochrome c et l'ouverture du mPTP activant la cascade de signalisation apoptotique^{351,352}. Cependant, un excès ou un manque d'apoptose induit des pathologies c'est pourquoi cette fonction nécessite une régulation fine. Ainsi, Bcl-2 peut inhiber l'apoptose en réduisant la

libération du Ca^{2+} vers les mitochondries, mais également en se liant à Bax empêchant son oligomérisation et la formation de pores Bax / Bak (Bcl-2 homologues killer)³⁵³⁻³⁵⁵. Aussi, PML, présent aux MAMs, contrôle l'apoptose via la modulation des flux calciques par phosphorylation d'IP3R³³⁰.

- **Autophagie (Figure 25 F)**

L'autophagie est un phénomène physiologique activé par une privation nutritionnelle ou un stress cellulaire, qui permet soit de réapprovisionner en nutriment la cellule via un recyclage des composants cellulaires, soit de favoriser l'élimination des éléments endommagés³⁵⁶. L'autophagie est notamment beaucoup étudiée dans les processus cancéreux. En effet, le microenvironnement des tumeurs est très pauvre en glucose et en oxygène ; l'autophagie constitue une source de carbone alternative pour maintenir une bioénergétique cellulaire³³⁶. Dans ce sens, la diminution du transfert calcique aux MAMs entraîne une diminution de la production d'ATP, ce qui est perçu comme des conditions de stress aboutissant à l'activation de l'autophagie³⁵⁷. Plusieurs études montrent l'importance des flux calciques aux MAMs dans la régulation de l'autophagie, cependant le rôle du Ca^{2+} en tant qu'inhibiteur ou activateur de l'autophagie est encore discuté^{336,358}. Il semblerait que les deux fonctions pro et anti-autophagique coexistent dans la cellule, néanmoins des différences dans la cinétique, l'amplitude, et la localisation spatiale.

Des flux calciques orienteraient leurs rôles dans l'autophagie³⁵⁷. Comme vu précédemment dans le paragraphe *III.A.(2) Structure des MAMs*, la surexpression du couple VAPB-PTPIP51, « tether » des MAMs, augmente les MAMs et les flux calciques associés et inhibe l'autophagie basale, tandis que leur extinction induit l'autophagie. L'utilisation d'un linker artificiel permet de s'affranchir de la manipulation de protéines endogène aux MAMs et prouve le rôle direct des interactions mitochondrie-RE dans les phénomènes d'autophagie²⁸⁴. Cependant, certaines études montrent à l'inverse qu'une perte des MAMs inhiberait la formation des autophagosomes³⁵⁹⁻³⁶¹. De manière intéressante Gómez-Suaga et son équipe montrent que les MAMs évoluent de manière différente selon les signaux d'induction de l'autophagie, ce qui pourrait expliquer les contradictions retrouvées dans la littérature²⁸⁴. Missiroli et son équipe montre que PML est un répresseur de l'autophagie puisque sa perte entraîne une diminution du transfert calcique du RE à la mitochondrie et une activation de l'autophagie. Aussi, p53, une protéine réticulaire localisé aux MAMs, intervient dans le maintien de PML aux MAMs^{362,363}. En plus du rôle central des flux calciques des MAMs dans la régulation de l'autophagie, les MAMs permettent d'apporter les PL nécessaires à la bonne composition des autophagosomes³⁵¹. De plus, les pré-autophagosomes prennent origine aux MAMs via la Syn17 qui recrute l'acteur essentiel à la formation des autophagosomes : ATG14³⁵⁹. En effet, l'induction de l'autophagie à la suite d'une privation nutritionnelle entraîne une relocalisation d'ATG14 et d'ATG5 aux MAMs pour débiter la formation des autophagosomes³⁵⁹. De manière intéressante, l'autophagie et la dynamique mitochondriale sont intimement liées, notamment via la Syn17 qui va se dissocier de Drp1 au profit de

ATG14. La Syn17 participe aux étapes précoces de l'autophagie et promeut la fission en s'associant à Drp1 dans les états de nourri, alors qu'une privation de nutriment oriente les interactions de la Syn17 de Drp1 vers ATG14L, diminuant la fission en faveur de la fusion et permettant une production plus importante d'ATP. Ce phénomène de fusion permet aux mitochondries d'échapper à la clairance autophagique en faveur de l'apoptose ³⁹. En effet, seules les mitochondries altérées subissent ces processus d'autophagie pour garantir un contrôle de qualité des mitochondries et maintenir un métabolisme mitochondrial optimal. Ce phénomène est nommé mitophagie et est en lien direct avec les MAMs puisque celles-ci inhibent l'initiation de ce processus ²⁷³. Cependant de nouvelles études restent indispensables pour comprendre la voie de dégradation sélective des mitochondries ²⁷³.

- **L'homéostasie glucidique (Figure 25 G)**

Durant ces dernières années, un nouveau rôle des MAMs dans le contrôle de l'homéostasie glucidique est apparu notamment via le contrôle de la signalisation et de la sécrétion de l'insuline. En effet, plusieurs acteurs de la signalisation de l'insuline ont été retrouvés aux MAMs : PKB/Akt ³³⁰, mTORC2 ³⁶⁴, PTEN ³⁶⁵, GSK3 β ³⁶⁶, et PP2A ^{323,330} plaçant les MAMs dans un nouveau carrefour de signalisation.

L'un des acteurs principaux de la signalisation de l'insuline est Akt, une Ser/Thr kinase qui est phosphorylée par l'insuline aux MAMs, la rendant active. Tubbs et al ont montré que l'insuline stimule les interactions Akt/IP3R et pAkt/IP3R dans les HuH7 ²⁷⁴. Ces données sont en adéquation avec l'étude de Betz qui montre que pAkt inhibe IP3R en le phosphorylant, entraînant un blocage du flux calcique du RE à la mitochondrie ³⁶⁴. La formation d'un complexe PML-Akt-PP2A régule l'activité d'Akt en le maintenant dans sa forme inactive et permet un largage du Ca²⁺ entre la mitochondrie et le RE ^{274,330,364,367}. De la même façon, la phosphatase PTEN empêche l'activation d'Akt pour permettre les flux calciques ³⁶⁵. Akt est également régulé par la kinase mTORC2, localisé aux MAMs du côté du RE ³⁶⁴. L'insuline régule la localisation de cette kinase et entraîne son enrichissement aux MAMs, où celle-ci contrôle et active Akt. Le complexe mTORC2-Akt régule 3 systèmes : i) les flux calciques via la phosphorylation d'IP3R; ii) la glycolyse via la phosphorylation d'HK2 (hexokinase 2), favorisant son interaction à VDAC iii) l'intégrité des MAMs via la phosphorylation de PACS2 ^{364,368}. Nous savons qu'Akt et GSK3 β , une enzyme clef de la glycogénèse et de l'homéostasie glucidique, se régule mutuellement afin de s'adapter à l'état énergétique et stimuler ou non la synthèse de glycogène. En effet, Akt inhibe GSK3 β et stimule la synthèse du glycogène, tandis que GSK3 β régule Akt en agissant sur la kinase en amont de mTORC2, empêchant la liaison mTORC2-Akt ³⁶⁹ ; cependant le rôle des MAMs dans cette interaction mutuelle n'est pas connu. L'implication de tous ces acteurs de la signalisation à l'insuline converge d'une manière ou d'une autre vers le contrôle de l'intégrité des MAMs et des flux calciques via la modulation de mTORC2 ou d'Akt.

Notre équipe a donc démontré que l'intégrité de la MAM est requise pour la signalisation de l'insuline dans plusieurs tissus cibles de l'insuline : le foie ²⁷⁴ le muscle squelettique ³⁷⁰ et cardiaque ³⁷¹. En effet, l'altération des MAMs par inhibition génétique ou pharmacologique de protéines aux MAMs altère la signalisation et l'action de l'insuline dans les hépatocytes et le muscle squelettique, tandis que l'induction des MAMs, par la surexpression de protéines des MAMs, l'améliore ^{274,370}. En accord avec nos données, une perturbation de l'entrée du Ca^{2+} dans la mitochondrie altère la signalisation de l'insuline dans les cardiomyocytes hypertrophiques ³⁷². Inversement, des modèles KO-Akt et KO-mTORC2 induisent une altération des MAMs associée à une perturbation de leur métabolisme énergétique, prouvant le rôle essentiel de mTORC2 dans le contrôle de l'intégrité des MAMs et du métabolisme énergétique ^{364,373}. De même, des modèles KO-Mfn2 et KO-CypD dans le foie et/ou dans le muscle montre une diminution de l'activation de la voie AKT/IRS2/PI3K, reflétant une altération de la signalisation de l'insuline, se traduisant dans les 2 cas par un intolérance au glucose ^{274,329,374-376}. Etant donné les contradictions retrouvées dans la littérature, quant au rôle de la Mfn2 en tant que « tether » ou « spacer » des MAMs (*voir paragraphe III.A.(2) Structure des MAMs*), les mécanismes d'action précis de la Mfn2 dans la signalisation de l'insuline ne sont pas clairs, mais feraient intervenir les flux calciques et l'intégrité des MAMs ^{271,272,277}. L'un des points communs de toutes ces études est la modulation de protéines induisant une modification de l'homéostasie calcique aux MAMs se répercutant sur de nombreuses fonctions cellulaires et notamment la signalisation à l'insuline (Patergnani et al. 2011; C. H. Wang and Wei 2017).

Les cellules β pancréatiques sont des senseurs du glucose circulant qui ajustent la sécrétion d'insuline à la glycémie. L'exocytose d'insuline nécessite une cascade de signalisation impliquant notamment une augmentation du rapport ATP / ADP, et du Ca^{2+} cytosolique ³⁷⁸. Les MAMs interviennent dans ce phénomène notamment grâce à leur rôle dans l'homéostasie calcique puisqu'il est maintenant bien établi que le Ca^{2+} mitochondrial est essentiel pour la production d'ATP en réponse à la stimulation par la glucose dans les cellules β ^{379,380}. Ainsi, l'invalidation de MCU ou MICU1, présents aux MAMs, ralentit la production d'ATP en réponse à une stimulation par le glucose et par conséquent diminue la sécrétion d'insuline par les cellules INS1 ^{381,382}. D'autres facteurs aux MAMs influencent la sécrétion de l'insuline dans les cellules β , notamment Bcl-2 et Bcl-xL via ANT (adenine nucleotide translocase) et VDAC, afin de moduler les flux calciques ³⁸³. La CAV1, également retrouvée aux MAMs, stabilise les vésicules endosomales contenant l'insuline dans les cellules β , ainsi les modèles CAV1-KO présentent une hyper-sécrétion d'insuline ²⁶⁰. L'intégrité des MAMs est également nécessaire à la sécrétion de l'insuline puisque l'utilisation de siGrp75 dans des cellules INS1-E entraîne une diminution significative MAMs et des échanges calciques, et diminue la sécrétion d'insuline stimulée par le glucose ³⁸⁴.

Toutes ces études montrent la place centrale des MAMs dans la signalisation et la sécrétion de l'insuline, et donc leur rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie glucidique. En conclusion, il

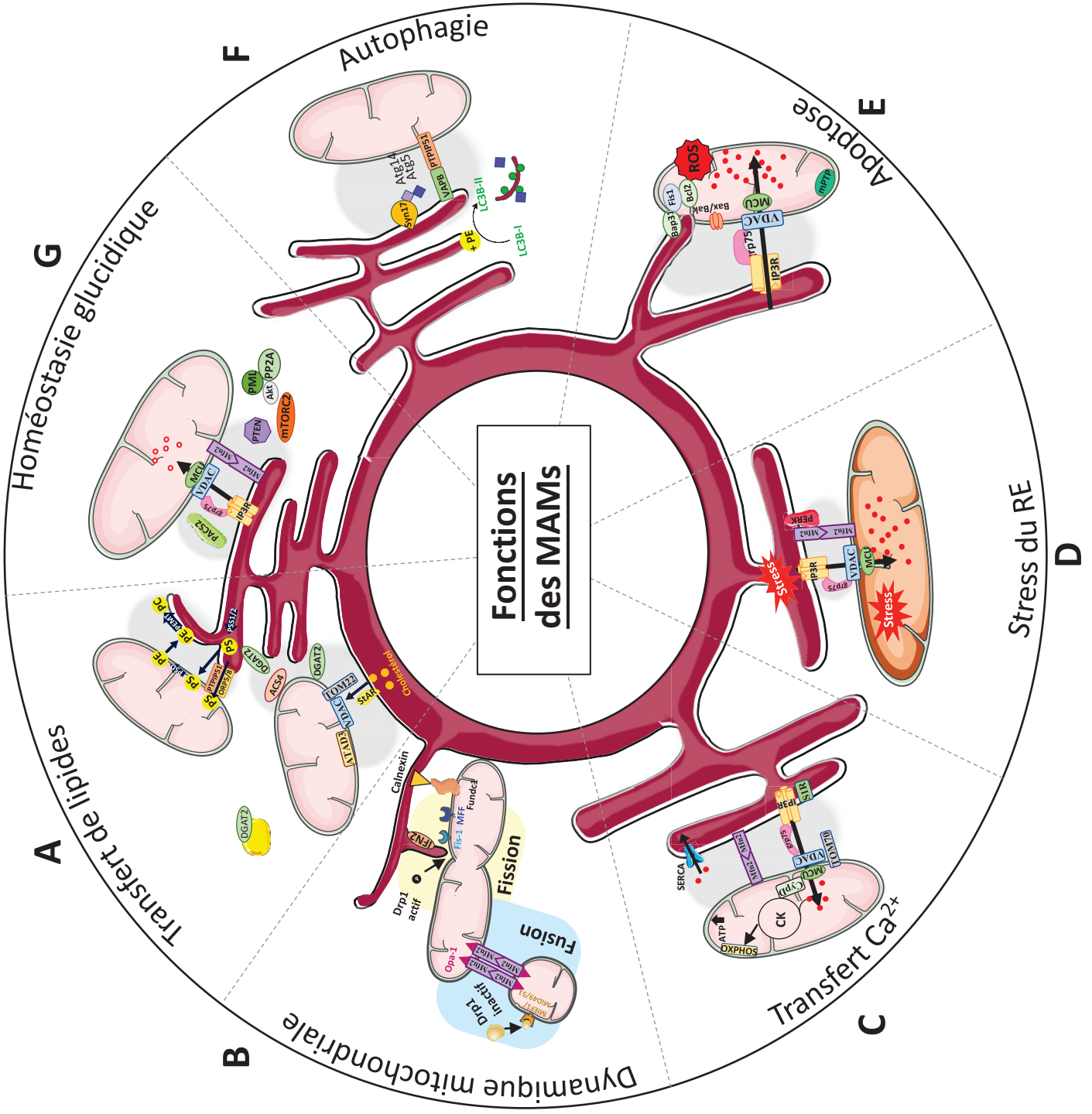


Figure 25: Schéma récapitulatif des principales fonctions des MAMs

semblerait qu'il y ait une relation réciproque entre les MAMs et la signalisation de l'insuline puisque toutes modulations qui impactent l'une se répercutent sur l'autre (la relation IR et MAMs sera développée dans le paragraphe *III.C.(2) MAMs-IR*).

(4) Régulations des MAMs

Pour comprendre mieux le fonctionnement des MAMs, il est nécessaire d'en comprendre leurs régulations ; actuellement il a été montré que des hormones ²⁷⁴, des facteurs de croissance ³⁶⁴, des nutriments ³²³, des neurotransmetteurs ³⁸⁵ et le NO (monoxyde d'azote) ³⁷⁶ étaient capables de moduler les interactions entre la mitochondrie et le RE (*Figure 26*).

Ainsi, Betz et al a montré que mTORC2, est présent aux MAMs, et est capable de réguler les MAMs en réponse à des facteurs de croissance. mTORC2 est composé de nombreux acteurs dont mTOR (target of rapamycin), rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mLST8, Sin1 (stress-activated protein kinase (SAPK)-interacting protein), protor (PRR5) ³⁸⁶, et est présent aux MAMs du côté du RE ³⁶⁴. De façon intéressante, mTOR intervient dans le relais et la transduction de signaux extra et intracellulaires comme les facteurs de croissances, et les hormones, dont l'insuline précédemment décrite (*I.A.(2) b) Contrôle hormonal de l'homéostasie glucidique*) et impliquée à la fois dans le métabolisme et la division cellulaire. Betz et al montre que l'insuline favorise la localisation de mTORC2 aux MAMs et induit une augmentation des interactions IP3R-Grp75-VDAC. L'étude démontre que mTORC2 est actif aux MAMs, où il va phosphoryler Akt sur S473. Les MAMs constituent une plateforme indispensable à cette activité de phosphorylation d'Akt puisque l'altération des MAMs, induite par l'extinction de la Mfn1/2 dans les cellules, empêche la liaison mTORC2-Akt. Akt une fois activé par mTORC2, aux MAMs, va à son tour induire la phosphorylation de protéines résidentes aux MAMs HK2, PACS2 et IP3R, en accord avec Tubbs et al qui montrent une augmentation des interactions Akt-IP3R en réponse à l'insuline dans les HuH7 ²⁷⁴. L'insuline induit la formation du complexe mTORC2-Akt qui contrôle i) l'intégrité des MAMs via PACS2 ii) les fonctions des MAMs via le contrôle des flux calciques par la phosphorylation d'IP3R3, iii) la glycolyse via la phosphorylation d'HK2 (hexokinase 2) favorisant son interaction avec VDAC ^{364,368}. Il est intéressant de noter que les souris KO-rictor dans le foie, présentent une diminution de 40% des MAMs et une perturbation du métabolisme avec une hyperinsulinémie, une intolérance au glucose et une néoglucogénèse accrue, témoignant du rôle des MAMs dans le métabolisme.

De plus, p66shc, une protéine adaptatrice de facteur de croissance qui appartient à la famille de ShcA, et intervient dans l'homéostasie redox, est localisée aux MAMs du côté de la mitochondrie ³⁸⁷. Aux MAMs, p66shc transfère dans l'IMS où il interagit avec le cytochrome c pour utiliser les équivalents réduits de la chaîne respiratoire de la mitochondrie et produire de l'H₂O₂ ^{387,388}. A noter que

Régulation par:

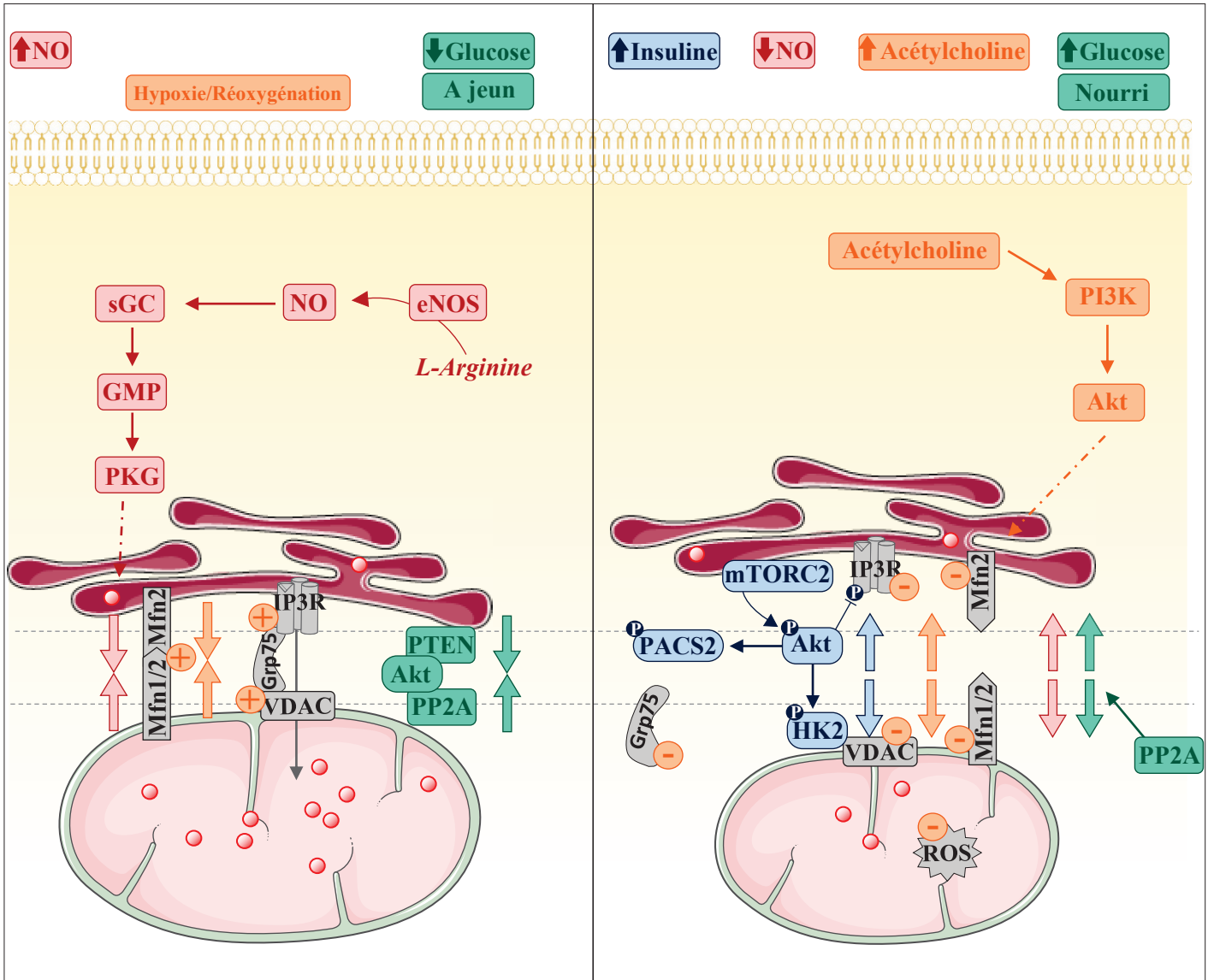


Figure 26: Schéma récapitulatif des principales régulations des MAMs

les niveaux de p66shc aux MAMs sont augmentés avec l'âge en adéquation avec l'augmentation de ROS par les mitochondries ³⁸⁹. Cependant les MAMs n'ont pas spécifiquement été explorés dans ces études, la présence de cette protéine adaptatrice des facteurs de croissance, p66shc, aux MAMs dévoile une nouvelle piste pour la régulation des MAMs par les facteurs de croissance.

Récemment, l'acétylcholine est apparue comme un régulateur des MAMs dans les phénomènes d'ischémie/reperfusion (I/R) ³⁸⁵. L'acétylcholine est le principal neurotransmetteur du nerf vague, il a été montré comme protecteur contre les lésions d'I/R en inhibant la formation de ROS via la voie PI3K/Akt. L'étude montre que l'hypoxie/réoxygénation (H/R) sur des cellules endothéliales induit une augmentation des interactions VDAC-grp75-IP3R1, une augmentation du Ca²⁺ mitochondrial et de la mort cellulaire. De plus, l'acétylcholine bloque le relargage du Ca²⁺ dans le cytosol par le RE et diminue les concentrations calciques de la mitochondrie comparés aux cellules endothéliales H/R. L'utilisation d'un siVDAC diminue les interactions du complexe VDAC1/Grp75/IP3R1 ce qui permet de prévenir le transfert calcique aux MAMs et diminuer la mort cellulaire via l'amoindrissement du Ca²⁺ dans la mitochondrie. De même, l'extinction de Mfn2, via un siARN, protège les cellules endothéliales des lésions induites par l'H/R en diminuant les MAMs et l'entrée du Ca²⁺ dans la mitochondrie. Les auteurs ont montré que l'acétylcholine diminue les MAMs via l'inhibition des interactions VDAC/grp75/IP3R et de l'expression de Mfn2. Cette régulation passerait par l'inhibition de la production de ROS via l'activation de la voie PI3K/Akt ³⁸⁵. Les auteurs montrent également que l'acétylcholine induirait l'augmentation de la synthèse de NO dans les cardiomyocytes en augmentant les niveaux de eNOS (NO synthase endothéliale) ³⁸⁵, or notre équipe a récemment démontré dans le foie, que les MAMs étaient régulées par le NO ³⁷⁶. L'acétylcholine pourrait donc réguler les MAMs directement par le contrôle des interactions mais également via le NO.

En effet, notre équipe a montré que l'augmentation de NO par eNOS augmente les MAMs, tandis qu'une inhibition de la production de NO diminue les MAMs dans le foie de souris ³⁷⁶. De plus, les résultats montrent qu'une augmentation de la synthèse du NO améliore la sensibilité à l'insuline et qu'une inhibition de l'action du NO altère la signalisation de l'insuline dans les cellules HuH7 et les hépatocytes primaires de rat et de souris. Le NO contrôlerait l'intégrité des MAMs par la voie sGC/cGMP/PKG afin de contrôler la signalisation à l'insuline ³⁷⁶, en accord avec nos précédentes données qui montrent que l'intégrité des MAMs est nécessaire au contrôle de la signalisation de l'insuline ^{274,370}. Ainsi, l'altération des MAMs par FATE1 ou l'extinction de la CypD bloque la régulation des MAMs et de la signalisation de l'insuline par le NO ³⁷⁶. Il semblerait que cette régulation des MAMs par le NO, passe par l'activation de PKG par le NO, cependant de nouvelles investigations seront nécessaires pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

En réponse à des variations nutritionnelles, la mitochondrie et le RE subissent chacun des modifications afin de maintenir l'homéostasie métabolique ^{390,391}. En effet, la mitochondrie s'adapte à

l'état métabolique du tissu, via i) des modifications aigus de son réseau visant à moduler qualitativement sa fonction, et ii) des mécanismes de transcription à plus long terme, visant à augmenter le nombre de mitochondrie ³⁹². Ainsi, les cellules nourries maintiennent leurs mitochondries dans un état fissionné, tandis que dans des conditions de jeûne ou de restriction alimentaire, les mitochondries ont tendance à être dans un état fusionné. L'adaptation de la bioénergétique implique un remodelage de l'architecture mitochondriale pouvant affecter le complexe respiratoire de la mitochondrie et par conséquent la synthèse de l'ATP ³⁶. Le RE contribue également au métabolisme cellulaire en participant quasiment à toutes les branches anaboliques et cataboliques, telles que la synthèse et la dégradation des protéines, du glycogène, des lipides membranaires, la néoglucogenèse, le stockage des graisses, et le métabolisme des hormones. De ce fait, il est aussi actif dans l'adaptation métabolique face aux changements nutritionnels, notamment grâce à sa sensibilité à la variation des acides aminés disponibles. Il induit soit une production d'acides aminés, via l'activation de l'autophagie en réponse à la privation nutritionnelle, soit une inhibition de l'autophagie via la libération de protéines spécifiques en situation d'une abondance d'acides aminés ³⁹⁰. Toutes ces études mettent en évidence les régulations du RE et de la mitochondrie par les variations nutritionnelles et placent également ces deux organites comme de véritables senseurs nutritionnels, capables d'ajuster leurs fonctions au métabolisme cellulaire. De ce fait, il n'est pas surprenant de voir une régulation des MAMs par les variations nutritionnelles. En effet, comme discuté ci-dessus, l'état de jeûne ou de privation nutritionnelle induit des phénomènes d'autophagie qui se trouvent être initiés spécifiquement par les MAMs, suggérant le rôle de senseur nutritionnel des MAMs. L'induction de l'autophagie par le jeûne est associée à un renforcement des MAMs ³⁵⁹. En adéquation avec ces résultats, l'invalidation de Mfn2 altère considérablement l'autophagie induite par le jeûne, et étant donné que la Mfn2 régule les MAMs, cela suggère une régulation nutritionnelle passant par les MAMs ³⁶¹. Bernhard W. puis Sood et al montre aussi que les MAMs sont régulées dans le foie de souris en situation post prandiale avec des contacts mitochondrie-RE induit à distance des repas ^{300,393}. En adéquation avec ces données, notre équipe a démontré que les interactions mitochondrie-RE sont régulées par les transitions nutritionnelles dans le foie des souris, avec une réduction des MAMs dans le foie des souris nourries comparées aux souris à jeûn pendant une nuit ³²³. De manière intéressante, cette régulation nutritionnelle des MAMs est également retrouvée dans le foie des souris suite à une consommation de glucose, ainsi qu'*in vitro* dans des cellules HuH7, où de fortes concentrations de glucose diminuent les interactions et les échanges de Ca²⁺ entre le RE et la mitochondrie, pointant le glucose comme un régulateur clé des MAMs dans le foie à l'état post-prandial ³²³. Enfin, cette régulation des MAMs par le glucose permet d'adapter la dynamique et la fonction des mitochondrie aux besoins de la cellule ³²³. En accord avec nos données, une étude récente a également retrouvé une régulation des MAMs par le glucose sur des cellules endothéliales rétinienne, avec une diminution des MAMs lors de traitements à de forte concentration de glucose ³⁹⁴. Cette régulation des MAMs, par des taux de glucose élevés, impliquerait la voie des PP et l'activation de PP2A, du moins dans le foie, puisque son inhibition génétique et pharmacologique empêche la régulation de l'intégrité

de la MAMs et du transfert de Ca^{2+} par le glucose³²³. Ces résultats sont en adéquation avec l'étude de Giorgi et al qui montre la présence de PP2A aux MAMs et son implication dans la régulation des flux calciques via un contrôle de l'activité d'Akt et de la phosphorylation d'IP3R³³⁰. Aussi, notre équipe a montré que le palmitate était capable de diminuer les MAMs dans les cellules HuH7 et les myotubes, dévoilant une régulation des MAMs par le palmitate^{274,370}. Actuellement, le glucose et le palmitate sont les seuls nutriments identifiés dans le foie comme régulateur des MAMs^{274,323,370}. Cependant, il serait intéressant d'étudier d'autres nutriments afin de préciser les mécanismes de régulations des MAMs. A noter que ces régulations nutritionnelles sont en accord avec l'étude de Báez-ruiz et al, qui montre que l'activité d'IP3R1 fluctue dans le foie des souris en fonction de leurs états nutritionnels. En effet, les souris nourries après 22h de jeûne présentent une diminution de près de 50% de l'activité d'IP3R1 hépatique comparées aux souris à jeun³⁹⁵. Cette notion très importante coïncide avec la diminution de MAMs retrouvée dans le foie des souris à jeun et, est à mettre en relation avec la découverte dernièrement de fluctuations circadiennes de l'homéostasie calcique mitochondriale³⁹⁶. En effet, des travaux récents, sur des lignées cellulaires d'hépatocarcinome humain (HepG2), montrent une activité respiratoire mitochondriale rythmée autonome qui serait provoquée par l'activation oscillatoire de la PDH, qui à son tour serait liée à des stimulations oscillatoires médiées par le Ca^{2+} . Cela révèle que ces oscillations de Ca^{2+} mitochondrial sont dépendantes de l'activité du MCU, et notamment des flux de Ca^{2+} sortant des RyRs du RE, probablement aux MAMs, suggérant l'implication de l'horloge circadienne dans la régulation des flux de Ca^{2+} aux MAMs³⁹⁶. Toutes ces données nous amènent logiquement à poser l'hypothèse d'une régulation circadienne et nutritionnelle des MAMs qui permettrait d'adapter le métabolisme cellulaire aux besoins. Les MAMs pourraient contribuer à la répartition adaptative de l'énergie pendant les transitions nutritionnelles et par conséquent à la flexibilité métabolique. Ainsi les MAMs jouent un rôle dans le développement des maladies métaboliques qui sont associée à une perte de la flexibilité métabolique, ces notions seront plus amplement détaillée dans la partie : **III.C.(1)MAMs-inflexibilité métabolique.**

(5) Physiopathologie des MAMs

Au cours de ces dernières années, l'évolution des techniques d'analyse des MAMs a permis d'explorer le rôle physiopathologique des MAMs, notamment dans les maladies neurodégénératives, le cancer, l'inflammation, et les désordres métaboliques. Néanmoins, même si plusieurs protéines déterminantes de ces pathologies ont été retrouvées aux MAMs, le lien de cause à effet reste encore à démontrer : l'altération des MAMs participe-t-elle directement à l'initiation de ces désordres ? Ou sont-elles la conséquence de ces conditions pathologiques ? La partie qui suit a pour but de survoler les relations entre les MAMs et les maladies neurodégénératives, le cancer et l'inflammation de manière non exhaustive (**Figure 27**). Le lien entre MAMs et les désordres métaboliques sera plus amplement détaillé dans la partie **III.C. MAMs et désordres métaboliques.**

a) MAMs – maladies neurodégénératives

Le vieillissement progressif de la population engendre une augmentation perpétuelle du développement des maladies neurodégénératives. Les recherches de ces dernières années ont mis en exergue différentes anomalies de conformation de protéines à l'origine de ces désordres, cependant les mécanismes à l'origine de ces défauts restent encore débattus. De manière intéressante, il a été remarqué une corrélation entre le développement de plusieurs désordres neurodégénératifs et l'altération des contacts mitochondrie-RE³⁹⁷⁻⁴⁰⁰. De plus, de nombreuses protéines associées aux maladies neurodégénératives ont été retrouvées aux MAMs, même si les fonctions de chacune d'entre elles ne sont pas toujours explicites^{351,401,402} (**Figure 27 A**).

La maladie d'Alzheimer (AD) est la maladie neurodégénérative la plus répandue dans notre société. Elle est définie par l'accumulation progressive du peptide β -amyloïde ($A\beta$), résultant du clivage de la protéine précurseur amyloïde (APP) dans le cerveau et induisant la formation de dépôts extracellulaires toxiques : les plaques amyloïdes. Ce processus lent aboutit à une toxicité neuronale se traduisant par une désorganisation de la structure et une dégénérescence des neurones. Les MAMs constituent le site du clivage de l'APP produisant le peptide $A\beta$ (Schreiner et al., 2015). De plus, les protéines Preseniline 1 et 2 (PSEN1 et PSEN2), retrouvées aux MAMs, sont mutées dans certaines formes d'AD, où celles-ci contribuent à l'altération des MAMs et au processus de dépôt amyloïde⁴⁰¹. Aussi, la perturbation de l'homéostasie calcique semble centrale dans l'AD, puisque celle-ci entraîne un défaut de nombreux processus intracellulaires, des dysfonctions de la mitochondrie et une sensibilité à la mort cellulaire⁴⁰³. A l'heure actuelle, il semblerait que l'AD soit associé à une augmentation des MAMs^{397,399,404}.

La deuxième pathologie neurodégénérative la plus fréquente en France est la maladie de Parkinson (PD). Celle-ci est également liée aux MAMs, et est caractérisée par la mort des neurones dopaminergique et la présence d'agrégats cytosoliques d' α -synucléine (α -syn)⁴⁰⁵. La PD est associée à la mutation de protéines retrouvées aux MAMs, notamment PINK1, Parkin, DJ-1, et α -syn. La modulation de ces protéines entraîne simultanément une altération et de la structure et de la fonction des MAMs. Cependant, des études restent indispensables pour statuer sur la potentialisation ou l'altération des MAMs dans la PD, étant donné les résultats controversés de la littérature^{281,398,406}.

Un autre exemple d'altération des MAMs dans les maladies neurodégénératives est l'ALS (sclérose latérale amyotrophique), qui se traduit par une dégénérescence des motoneurones et du cortex moteur. Les causes génétiques de ce trouble sont notamment la mutation de protéines telles que VAPB, PTPI51, TDP (TAR-DNA-binding protein 43) et FUS (fused in sarcoma). De manière intéressante, il a été montré que le complexe VAPB/PTPI51, tether des MAMs, est responsable des échanges calciques aux MAMs et impliqués dans l'ALS (De Vos et al. 2012). Aussi les protéines TDP et FUS, retrouvées

accumulées dans l'ALS, contrôlent les interactions VAPB-PTPI51. Ainsi la surexpression de TDP et FUS induit une diminution des interactions mitochondrie-RE via GSK3 β ^{283,407}. Dernièrement, une étude a montré que les contacts mitochondrie-RE, médiés par VAPB-PTPI51, régulent les fonctions synaptiques et que ces contacts sont altérés dans l'ALS²⁸⁴. Cette étude suggère que l'altération des MAMs, passant par le complexe PTPI51/VAPB, pourrait être à l'origine de l'altération des fonctions synaptiques retrouvée dans de nombreuses maladies dégénératives²⁸⁴.

b) MAMs – cancer

Selon l'OMS, le cancer est la deuxième cause de décès dans le monde avec 8.8 millions de décès en 2015. Le cancer représente un ensemble de maladies pouvant toucher tous les organes. Celui-ci se définit comme une prolifération anarchique de cellules anormales qui peut être associée à une migration de ces cellules dans d'autres organes, c'est ce qu'on appelle les métastases⁴⁰⁸.

Dans des cellules normales, le glucose est métabolisé en pyruvate, via la glycolyse, puis métabolisé par OXPHOS afin de produire de l'énergie. Ce phénomène de phosphorylation oxydative, par la mitochondrie, est le processus le plus rentable avec la production de 36 à 38 molécules d'ATP pour une molécule de glucose dégradée, contre 2 à 4 molécules d'ATP via la glycolyse. En ce qui concerne les cellules tumorales, celles-ci adaptent leur métabolisme à leur besoin prolifératif, c'est-à-dire un métabolisme plus glycolytique qu'oxydatif. Ainsi, le pyruvate formé par la glycolyse est converti en lactate plutôt que d'être dirigé vers le CK, et ceci indépendamment de la variation du taux d'oxygène et de la bioénergétique mitochondriale. Ce phénomène est connu sous le nom d'« effet Warburg »⁴⁰⁹. Normalement, la production d'ATP par l'oxydation dans la mitochondrie régule par un rétrocontrôle négatif la glycolyse. Dans les cellules tumorales, ce rétrocontrôle étant absent, la voie de la glycolyse s'accélère permettant la production d'une plus grande quantité d'ATP. Cette accélération alimente la voie des PP qui se trouve aussi dépourvue de rétrocontrôle négatif par l'ATP, dans les cellules tumorales. La production de ribose 5-P par la voie des PP est indispensable aux cellules tumorales, puisque celui-ci est un précurseur des acides nucléiques, essentiels lors des phénomènes de prolifération cellulaire. Aussi, HK2, une enzyme indispensable à la glycolyse et retrouvée aux MAMs, est surexprimée dans les cellules cancéreuses. Celle-ci lie à VDAC et inhibe les voies pro-apoptotiques afin de prévenir la mort cellulaire, de ce fait HK2 est indispensable aux étapes d'initiation des tumeurs et de la progression tumorale^{410,411}.

Les MAMs sont enrichies en enzymes impliquées dans la synthèse et le transport des lipides, le transfert de Ca²⁺ et en protéines oncogéniques / oncosuppressives, qui modulent les voies de signalisation cellulaire impliquées dans les processus physiologiques et physiopathologiques⁴¹² (**Figure 27 B**). En effet, les lipides types PS et PC, produits aux MAMs, sont capables d'activer les voies de

prolifération et de survie cellulaire, notamment via les voies PI3K/Akt.⁴¹³ Ainsi la cellule cancéreuse, en plus d'augmenter sa prolifération, essaie également d'échapper aux phénomènes de mort cellulaire programmée (apoptose) en maintenant un faible niveau de flux calcique aux MAMs, afin de ne pas surcharger la mitochondrie en Ca^{2+} ⁴¹⁴. Néanmoins, une étude récente a montré que les cellules cancéreuses devaient maintenir un flux calcique constitutionnel entre le RE et la mitochondrie, afin de soutenir le métabolisme et la bioénergétique pour la survie de la cellule cancéreuse⁴¹⁵. Ainsi, les MAMs jouent un rôle crucial dans le contrôle des voies apoptotiques via le transfert calcique mais aussi la bioénergétique cellulaire. De nombreux acteurs présents aux MAMs et capables de moduler le flux calcique sont impliqués dans les phénomènes de cancer. C'est le cas de PTEN, qui est sous-exprimé dans de nombreux cancers humains (Chalhoub and Baker 2009; Myers et al. 1998), entraînant ainsi une altération du relargage de Ca^{2+} par le RE, une concentration calcique mitochondriale plus faible en faveur d'un environnement anti-apoptotique³⁶⁵. MCU intervient également dans le contrôle des flux calciques et notamment dans le devenir des cellules : la croissance de la tumeur et le comportement métastatique^{416,417}. S1R et Grp78 sont des chaperonnes fortement exprimées dans les cellules cancéreuses potentiellement métastatiques⁴¹⁶⁻⁴¹⁸. En conditions de stress chronique du RE, impliquant une déplétion prolongée du Ca^{2+} réticulaire, S1R transloque des MAMs vers le RE périphérique et atténue les dommages cellulaires, empêchant ainsi la mort cellulaire³²⁸. Un autre modulateur du Ca^{2+} , impliqué dans le cancer et retrouvé aux MAMs, est p53³⁶². Celui-ci joue un rôle de suppresseur de tumeur puisqu'il favorise la recapture du Ca^{2+} par les SERCA entraînant une $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE}}$ importante avantagant un relargage du RE à la mitochondrie et donc l'apoptose⁴¹⁹. Dans un certain nombre de cancers, p53 est retrouvé muté ou son expression altérée, favorisant la progression cellulaire et la résistance aux chimiothérapies⁴²⁰⁻⁴²². PML, situé aux MAMs et initialement impliqué dans la leucémie promyélocytaire aigüe, contrôle l'activité de p53 et améliore son fonctionnement⁴²³ ; son activité est largement diminuée dans de nombreux cancers^{423,424}. Comme vu précédemment, Akt-mTORC2 module également les transferts calciques et l'initiation de l'apoptose via la régulation d'IP3R aux MAMs^{367,425,426}. Toutes ces adaptations des flux calciques ne sont pas uniquement là pour rendre les cellules cancéreuses résistantes à l'apoptose, mais aussi pour faciliter la survie des cellules endommagées⁴²⁷. Depuis peu, il a été montré que l'altération du métabolisme mitochondrial des cellules cancéreuses était associée à des mutations de certaines déshydrogénases mitochondriales et résultait d'une reprogrammation métabolique nécessaire pour soutenir la croissance et la prolifération incontrôlées dans l'environnement tumoral⁴²⁸. Aussi, une inhibition des flux calciques, soit par déplétion des canaux type IP3R ou pharmacologiquement, augmente l'expression de marqueurs de l'autophagie aux MAMs et la production de ROS, entraînant un arrêt de la croissance de la tumeur dans les modèles de souris ayant un cancer des poumons⁴²⁹. Aussi, l'équilibre redox de la cellule tumorale est associé à la prolifération cellulaire, puisqu'il a été montré que les cellules tumorales présentent une très grande quantité de ROS⁴³⁰. Cependant, ce phénomène rend les cellules tumorales plus sensibles aux ROS, puisque celles-ci vont atteindre plus rapidement le seuil létal⁴³¹. Cet équilibre redox est, comme vu précédemment, étroitement

lié aux MAMs, notamment par la présence d'acteurs de l'homéostasie redox comme ERO1- α (endoplasmic reticulum oxidoreductin 1- α) et PERK, impliqués dans l'initiation et la progression tumorale, et surexprimés dans différents types de tumeur ^{412,432,433}.

De nombreuses protéines de la famille des Bcl, comme Mcl-1, sont localisées aux MAMs et sont intimement liées au développement des tumeurs, notamment via leurs actions sur les flux calciques et l'apoptose ⁴³⁴. La protéine anti-apoptotique Bcl-2, (précédemment décrite et retrouvée aux MAMs) est augmentée dans les cellules cancéreuses permettant aux cellules de survivre malgré l'expression massive des protéines pro-apoptotiques ^{435,436}. D'une part, Bcl-2 interagit avec IP3R pour stopper les flux calciques vers la mitochondrie afin d'empêcher la surcharge calcique mitochondriale et l'apoptose. D'autre part, celui-ci inhibe directement VDAC pour supprimer les transferts de Ca²⁺ pro-apoptotique ⁴³⁷. Comme Bcl-2, Bax est surexprimé, cependant, son action s'oppose à Bcl-2 puisqu'il augmente les flux calciques ⁴³⁸. A noter que Bcl-2 procède, en parallèle du blocage des flux sortant du RE, à l'inhibition de la formation du complexe Bax/Bak à la mitochondrie aboutissant ainsi à un effet anti-apoptotique dans les cellules cancéreuses ³⁵³. De la même famille, la protéine anti-apoptotique Bcl_{XL} est retrouvée aux MAMs où celle-ci est capable d'interagir avec IP3R et VDAC ^{437,439}. Ces liaisons sont capables soit d'améliorer les flux calciques pour une meilleure bioénergétique mitochondriale ⁴³⁹, soit de bloquer les flux calciques pour prévenir la surcharge mitochondriale et ainsi protéger contre l'apoptose ^{437,440}.

Ainsi toutes ces données montrent le rôle essentiel des MAMs dans le maintien de la prolifération cellulaire notamment via le contrôle des échanges en Ca²⁺ et PL.

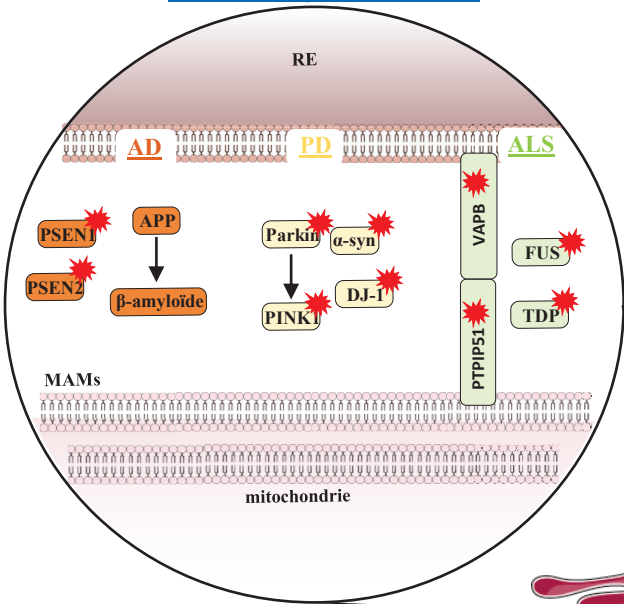
c) MAMs – inflammation/immunité

Depuis quelques années, de nombreuses études ont montré le rôle critique des MAMs dans l'initiation de l'inflammation contre des pathogènes infectieux et dans le développement des maladies inflammatoires. Comme précédemment mentionné, les MAMs contrôlent un grand nombre de fonctions cellulaires comme le transfert de Ca²⁺, de lipides, le contrôle de l'autophagie, faisant des MAMs une plateforme parfaite pour les voies de signalisation de l'inflammation ⁴⁴¹ (**Figure 27 C**).

La réponse immunitaire innée est régulée par des récepteurs appelés PRRs (pattern recognition receptors), qui sont capables de reconnaître des pathogènes extérieurs (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), mais aussi des dommages cellulaires induits par un agresseur (damage-associated molecular patterns et DAMPs). Cette famille comprend les TLRs et CLR (C-type lectin receptor), chargés de reconnaître les agressions extracellulaires ; et les RLRs (RIG-1 like receptor) et NLRs (NOD-like receptor), senseurs cytosoliques spécialisés dans la reconnaissance de signaux de danger cytosoliques ⁴⁴². Le récepteur NLRP3 (NOD-like receptor protein 3) appartient à la sous-famille des

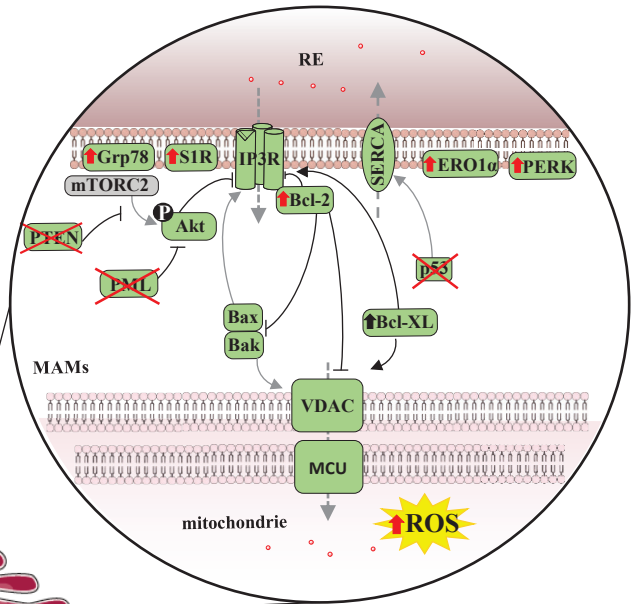
A

Maladies neurodégénératives

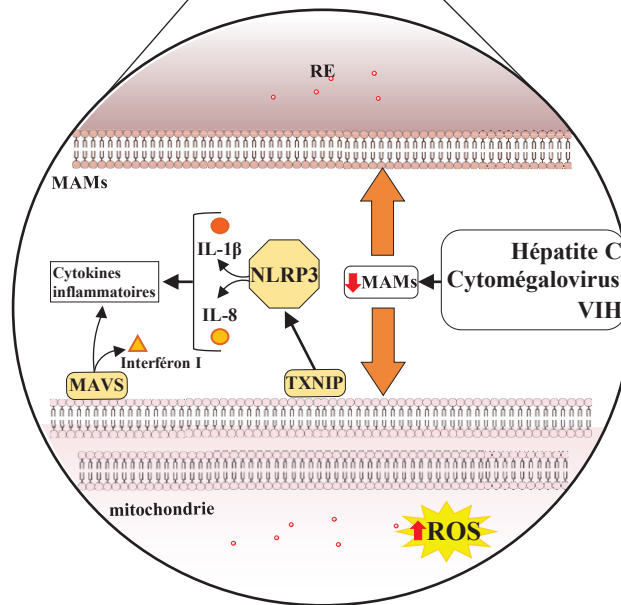


B

Cancer



C



Inflammation/immunité

Figure 27: Schéma récapitulatif des altérations des MAMs retrouvées dans les maladies neurodégénératives (A), le cancer (B) et l'inflammation/immunité (C).

NLRs, présent dans tous les tissus mais prédominant dans les macrophages. C'est le seul complexe des NLRPs a avoir été décrit comme associé aux MAMs ⁴⁴³. Les MAMs interviennent dans l'activation de l'inflammasome, défini comme un macro-complexe servant de plate-forme activatrice de la caspase 1. Ce macro-complexe consiste en l'interaction d'un récepteur PRR, ici NLRP3, d'un effecteur la pro-caspase 1 et d'un adaptateur ASC (apoptosis-associated speck like protein containing a CARD) capable d'interagir avec le récepteur et avec la procaspase1. Le rapprochement de la pro-caspase 1, lors de l'activation de NLRP3, entraîne leur auto-activation induisant la maturation de la pro-IL-1 β ou la pro-IL-18 dans leur forme active ⁴⁴². De nombreux signaux de danger traduisant des dommages membranaires ou des modifications de l'homéostasie ionique et métabolique de la cellule, tels que des variations d'ATP intracellulaire, de l'homéostasie calcique, la formation de cristaux de cholestérol, ou la production de ROS par la mitochondrie, peuvent être un signal de l'activation de l'inflammasome NLRP3. Une équipe a en effet montré que les ROS, générés par la mitochondrie, activent l'inflammasome, puisqu'une inhibition des complexes I et III de la chaîne respiratoire ou une extinction de VDAC altèrent l'activation de l'inflammasome. Ils ont aussi montré que le NLRP3, non actif, se localise à la membrane du RE et que son activation entraîne une relocalisation aux MAMs ⁴⁴³. Dans ce sens, l'utilisation d'inhibiteur de la mitophagie/autophagie induit une augmentation de l'action de NLRP3 et de la sécrétion de IL-1 β due à l'accumulation de mitochondries endommagées et à l'augmentation de la production de ROS ⁴⁴⁴. De ce fait, les flux calciques, ont également une place critique dans le contrôle et l'activation de NLRP3 ; d'une part via la production de ROS mais également via l'impact sur la bioénergétique mitochondriale ⁴⁴⁵. Un des partenaires de NLRP3, situé aux MAMs, est la Thioredoxine interacting protein (TXNIP), qui interagit et active NLRP3 ⁴⁴⁶. Dans un contexte non inflammatoire, TXNIP interagit avec la thiorédoxine (TRX, une protéine antioxydante cellulaire) et est donc indisponible pour une interaction avec NLRP3. L'activation de l'inflammasome, provoque la dissociation de TXNIP à TRX, lui permettant de se lier au NLRP3 et de se transloquer vers les MAMs / mitochondries. ⁴⁴³. Dernièrement, le stress du RE s'est également placé comme activateur et régulateur de NLRP3 ⁴⁴⁷. Toutes ces études montrent qu'il existe donc un lien très fort entre les dommages de la mitochondrie, les ROS, le stress du RE, les MAMs et, l'assemblage et l'activation de l'inflammasome, cependant les mécanismes précis liant l'ensemble de ces facteurs restent encore inconnus aujourd'hui.

La réponse immunitaire innée antivirale fait intervenir les MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein), des protéines résidentes des MAMs, interagissant avec les senseurs cytosoliques précédemment cités, les RLRs et/ou NLRs, afin d'activer une cascade de réactions induisant la transcription d'interférons I et de cytokines inflammatoires⁴⁴¹. De ce fait, les MAVS constituent un second partenaire de NLRP3 qui régulent sa localisation et par conséquent l'activation de l'inflammasome, bien que les mécanismes précis restent encore peu explicites ⁴⁴⁸. Aussi, les MAMs contrôlent les MAVS au cours de l'infection à l'hépatite C en coordonnant la signalisation entre la mitochondrie, le péroxysome et les MAMs ⁴⁴⁹. Du fait de l'importance des MAMs dans la réponse

antivirale, il n'est pas surprenant que de nombreuses protéines virales ciblent les MAMs. En effet, il a été montré que des virus comme le cytomégalovirus ²⁵⁹, l'hépatite C ⁴⁵⁰, le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) ⁴⁵¹ avaient pour stratégie d'altérer les contacts entre le RE et les mitochondries et d'éliminer les mitochondries associées aux MAVS ⁴⁴¹.

Les MAMs participent aussi à la mise en place de l'inflammation de certaines maladies telles que les maladies neurodégénératives ou le DT2. En effet, dans la AD, l'accumulation de protéines A β favorise la production de ROS ⁴⁵². En sachant que dans l'AD, la protéine A β s'accumule aux MAMs, il est possible que cela soit en faveur d'une production de ROS aux MAMs, entraînant des troubles de l'homéostasie cellulaire suffisants pour activer les processus inflammatoire via NLRP3 ⁴⁵³. Ces résultats tendent à démontrer l'importance des MAMs dans l'inflammation, faisant de celles-ci une potentielle nouvelle cible thérapeutique pour les maladies inflammatoires.

B. Principales techniques d'exploration des MAMs

Les MAMs étant des structures très dynamiques, leur étude nécessite donc l'utilisation de plusieurs techniques complémentaires à la fois structurales et fonctionnelles. Émergeant comme une véritable plateforme sensible aux divers substrats et signaux cellulaires, le contexte et l'environnement expérimental des MAMs est ainsi déterminant pour l'analyse des résultats. La partie ci-dessous a pour but de répertorier les principales techniques d'exploration des MAMs et développer celles utilisées lors de ma thèse afin de discuter des limites et des points forts de celles-ci.

(1) Etude structurale

L'exploration structurale des MAMs peut se faire par différentes approches de microscopie (à transmission ou fluorescente) permettant de caractériser les attaches protéiques, le nombre de MAMs, la surface et/ou la largeur des interfaces entre la mitochondrie et le RE ⁴⁵⁴⁻⁴⁵⁶ (**Figure 28 A**).

Le fractionnement subcellulaire élaboré par Wieckowski et al, a été utilisé durant ma thèse. Il consiste en une succession de centrifugation et d'ultracentrifugation, puis une séparation de la fraction mitochondriale « crude » sur un gradient de percoll, permettant l'obtention de différentes fractions : cytoplasmique, RE, mitochondrie pure, et MAMs ⁴⁵⁷. Un grand nombre d'analyses protéomiques de ces fractions ont permis la découverte de centaines de protéines aux MAMs ^{258,259,262,394}; en revanche à ce jour, aucune analyse lipidomique des MAMs n'a été effectuée.

La visualisation de ces structures peut se faire via la MET sur des coupes de tissus ou cellules fixés. La préparation des échantillons nécessite de nombreuses étapes, entre autres, fixation,

déshydratation, imprégnation, et inclusion. Cette approche par la MET, à l'avantage d'être complète, puisque celle-ci apporte un grand nombre d'informations quant à la quantité, la longueur et la largeur des MAMs (0-10, 10-20, 20-30, 30-40 et 40-50 nm). De manière intéressante, il est possible de regarder si un sous-type de contact en particulier, associé à une fonction précise, est altéré ou non. Il est important de noter que très peu d'études précisent quel sous-type de MAMs est analysé, rendant difficile la comparaison des études et pouvant expliquer les divergences existant dans la littérature. Une faiblesse de cette technique est le fait d'explorer les MAMs sur un plan unique, limitant la vision en 3D des MAMs et également de se limiter à une partie du foie en sachant qu'il existe une zonation du foie qui fait énormément varier les fonctions des hépatocytes. De nouvelles techniques peuvent être associées à la ME, comme l'ET (Electron tomographie) ou la SEM (scanning electron microscopie) pouvant générer des images 3D permettant une meilleure exploration de l'organisation spatiale ⁴⁵⁶.

Il est nécessaire d'accompagner ces approches par des techniques complémentaires permettant d'informer quant à la présence de complexes protéiques au niveau de ces rapprochements membranaires.

Pour cela notre équipe a développé, en complément de ces analyses, la technique d'*in situ* PLA (*in situ* proximity ligation assay) sur tissus ou cellules fixées afin de pouvoir quantifier le nombre de contacts mitochondrie-RE ⁴⁵⁸. Cette technique d'immuno-détection est basée sur la reconnaissance par des anticorps primaires d'une protéine du côté du RE, et d'une autre protéine du côté de la mitochondrie, puis l'ajout d'anticorps secondaires spécifiques des deux anticorps primaires couplés à des brins d'ADN complémentaires. Ces brins d'ADN vont s'hybrider si les deux protéines ciblées se trouvent à une distance inférieure ou égale à 40nm. Ainsi, l'ajout d'oligonucléotides marqués (fluorescents ou couplés à l'HRP) et l'amplification du signal par PCR nous permettra de visualiser un point fluorescent/brun à chaque rapprochement de ces protéines. Les protéines principalement ciblées pour quantifier les MAMs sont : IP3R1 du côté du RE et VDAC1 du côté de la mitochondrie correspondant aux composants du canal calcique des MAMs, mais d'autres couples peuvent être utilisés. Cette technique permet de conclure sur la quantité de MAMs, représentée par le canal calcique, mais ne nous renseigne pas sur la longueur et la largeur des contacts. En ce qui concerne la quantité de MAMs détectée, il faut également être attentif à de possibles variations de i) l'expression des protéines ciblées par le PLA dans l'organe et ii) de la densité mitochondriale, qui pourraient en partie biaiser les résultats. La technique d'*in situ* PLA, tout comme la MET, nécessite la fixation des échantillons, c'est pourquoi il est nécessaire de multiplier les conditions et de compléter par une étude fonctionnelle afin d'évaluer la composante dynamique des MAMs.

Récemment, la mise au point d'un biosenseur des MAMs : SPLICS (split-GFP-based contact site sensor), utilisable sur cellules vivantes, permet d'apporter une dimension dynamique à l'exploration structurale des MAMs ²⁸⁰. Néanmoins, il nécessite d'être exprimé dans les cellules, et peut avoir des répercussions cellulaires. Le SPLICS consiste en l'utilisation de 2 parties de GFP, une adressée au RE

et une à la mitochondrie, qui sont non fluorescentes lorsque celles-ci sont séparées et qui sont fluorescentes lors de leur assemblage dans les contacts étroits entre la mitochondrie et le RE. Ainsi, les MAMs se visualisent par l'émission d'une fluorescence permettant l'analyse en temps réel des contacts mitochondrie-RE. Cette équipe a développé deux longueurs de SPLICS ; un court (8-10nm) et un long (40-50nm) permettant l'étude de différentes MAMs ^{280,459}.

Des techniques d'imagerie de pointe émergent de plus en plus pour explorer les MAMs avec une haute résolution et sont associées à de la reconstitution 3D telles que la STED (stimulated emission depletion) et même SR-FACT (super resolution fluorescence-assisted diffraction computational tomography), qui combine la tomographie et la microscopie fluorescente ^{288,460-462}. Ces différentes approches permettent de calculer précisément la distribution des contacts mitochondrie-RE au sein d'un échantillon plus épais et notamment, grâce au SR-FACT, de suivre durant une longue période l'évolution des MAMs ⁴⁶⁰.

L'exploration des MAMs, par ces différentes techniques, se limite à la structure mais fait défaut quant à la fonctionnalité des MAMs : notamment le transfert calcique et de PL. C'est pourquoi, toutes ces approches doivent être complétées par des techniques fonctionnelles des MAMs.

(2) Etude fonctionnelle

La fonctionnalité des MAMs est très souvent explorée via la mesure des transferts calciques et complétée avec de la respiration mitochondriale permettant de préciser la fonctionnalité des mitochondries. Cependant l'exploration du transfert des PL entre le RE et la mitochondrie nous informe aussi sur la fonctionnalité des MAMs ⁴⁶³, mais reste peu présente dans la littérature, c'est pourquoi elle ne sera pas abordée dans la partie qui suit.

L'étude de l'accumulation de Ca^{2+} dans la mitochondrie, en réponse à une libération par le RE, peut se faire via l'utilisation d'une sonde, le 4mtD3CPV, ratiométrique sensible au Ca^{2+} et basée sur la technique de FRET ⁴⁶⁴ (**Figure 28 B**). Cette sonde caméléon, est constituée de deux fluorophores : un donneur d'énergie YFP et un accepteur d'énergie CFP reliés entre eux par une protéine très sensible au Ca^{2+} . Lorsque celle-ci interagit avec du Ca^{2+} , un changement de conformation opère rapprochant YFP et CFP, ce qui va faciliter le transfert d'énergie et se traduire par une augmentation du ratio de fluorescence YFP/CFP. Cette sonde est spécifiquement exprimée dans la matrice de la mitochondrie grâce à une séquence d'adressage. Cette sonde permet la mesure le Ca^{2+} basal présent dans la matrice mitochondriale et à la suite d'une stimulation (IP3, histamine, ATP) entraînant la libération de Ca^{2+} du RE. Si une mitochondrie se trouve fonctionnellement proche du RE, alors le Ca^{2+} libéré par le RE sera réabsorbé par la mitochondrie engendrant une augmentation du ratio YFP/CFP.

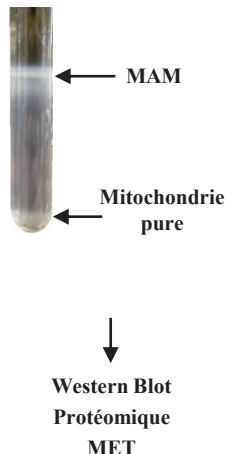
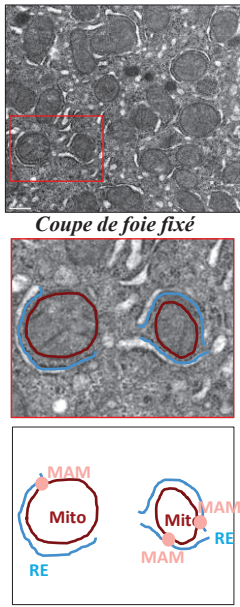
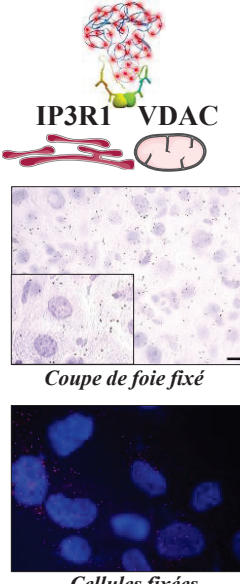
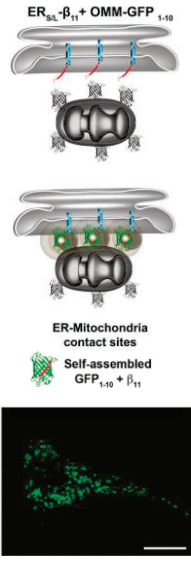
Giacomello et son équipe ont mis au point une sonde, le N33D1CPV, permettant de mesurer les « hot spot » de Ca^{2+} à la surface de la mitochondrie et par conséquent aux MAMs ⁴⁶⁵ (**Figure 28 B**). Cette sonde se base sur une technologie, similaire au 4mtD3CPV précédemment décrit, avec 2 fluorochromes YFP et CFP, reliés par un domaine D1 sensible aux grandes variations de Ca^{2+} et possédant la séquence spécifique d'adressage de TOM20 à l'OMM côté cytosolique (le 33^{ème} acide aminé et de la partie N-terminale) ⁴⁶⁵. Cette sonde permettrait de détecter les flux de Ca^{2+} aux MAMs après relargage de Ca^{2+} par le RE, de façon plus directe que le 4mtD3CPV qui mesure le Ca^{2+} absorbé par la mitochondrie.

L'approche complémentaire de la mesure calcique, est celle de la mesure de la consommation d'oxygène par les mitochondries à l'aide d'un oxymètre. La technique consiste à mesurer la consommation d'oxygène, dans une chambre thermostatée et agitée en continue, via une électrode de Clark séparée de la chambre par une membrane perméable à l'oxygène. Comme vu précédemment, les mitochondries et le RE s'influencent mutuellement, c'est pourquoi lorsque la respiration est mesurée sur des mitochondries isolées, ces dernières peuvent maintenir toutes leurs fonctionnalités, mais présenter des défauts lorsque celles-ci restent dans leur environnement natif à proximité du RE. Ainsi, dans le but d'explorer les dysfonctionnements mitochondriaux liés aux atteintes des MAMs, il est plus pertinent de mesurer la respiration mitochondriale en réponse aux substrats glucidiques ou lipidiques sur des cellules entières (non perméabilisées), afin que les contacts entre le RE et la mitochondrie soient maintenus. La fonctionnalité de chaque complexe s'étudie par contre sur cellules perméabilisées par l'ajout de substrat respiratoire spécifique à chaque complexe, en conditions saturantes. Cette approche est complémentaire de la mesure de la respiration sur cellules entières, puisqu'elle permet de mettre en évidence des défauts intrinsèques à la mitochondrie qui peuvent se cumuler à ceux liés aux contacts mitochondrie-RE.

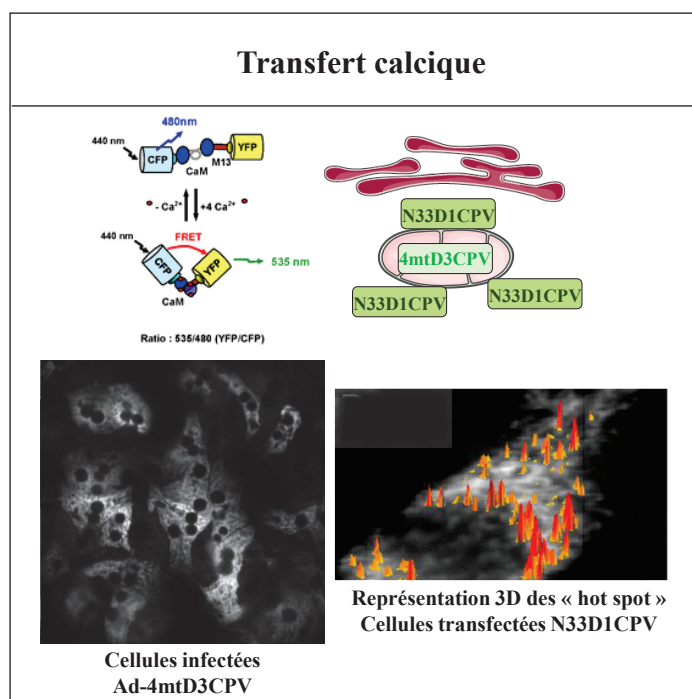
(3) Modulation des MAMs

Afin de comprendre le rôle des MAMs sur le métabolisme cellulaire, il est important de pouvoir moduler les interactions mitochondrie-RE via des approches génétiques ou pharmacologiques. Etant donné que la régulation physiologique des MAMs est peu connue, peu de stratégies pharmacologiques sont disponibles pour réguler les MAMs. Par conséquent, les MAMs sont plus classiquement modulés en surexprimant des protéines des MAMs qui vont rompre ou renforcer les interactions mitochondrie-RE. Néanmoins, comme aucune des protéines n'est spécifique des MAMs, on ne peut exclure que les répercussions de la surexpression de ces protéines soient médiées par un effet indépendant des MAMs. Classiquement, la stratégie est de moduler de manière indépendante différentes protéines des MAMs, et si les effets sont confirmés quelle que soit la protéine surexprimée, alors un effet MAM dépendant peut-être proposé. Une stratégie alternative, que nous avons utilisée dans le cadre de cette thèse, est de

A. Exploration structurale des MAMs

Fractionnement subcellulaire	MET	<i>in situ</i> PLA	SPLICS
 <p>MAM</p> <p>Mitochondrie pure</p> <p>Western Blot Protéomique MET</p>	 <p>Coupe de foie fixé</p> <p>Coupe de foie fixé</p> <p>MAM Mit RE</p>	 <p>IP3R1 VDAC</p> <p>Coupe de foie fixé</p> <p>Cellules fixées</p>	 <p>ER-β_{11} + OMM-GFP₁₋₁₀</p> <p>ER-Mitochondria contact sites</p> <p>Self-assembled GFP₁₋₁₀ + β_{11}</p> <p>Cellules vivantes transfectées</p>

B. Exploration fonctionnelle des MAMs



C. Modulation des MAMs

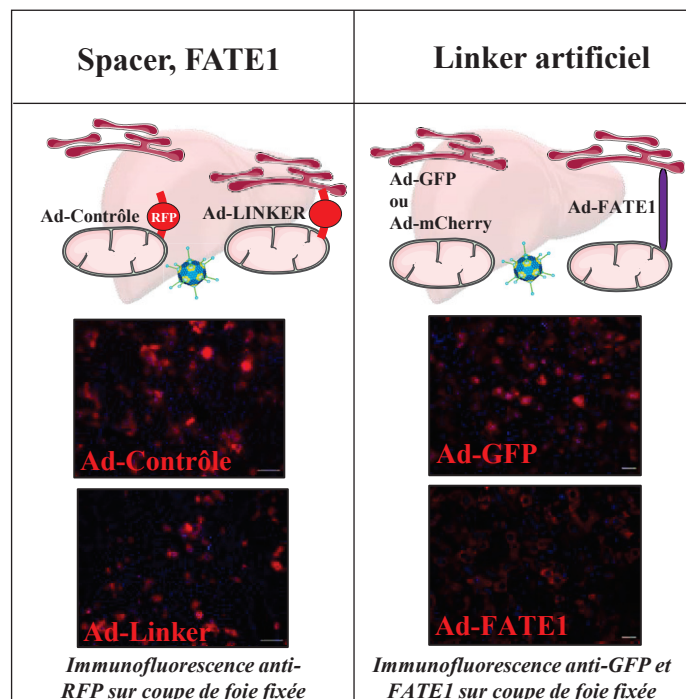


Figure 28: Principales techniques d'exploration des MAMs. (A) Techniques d'exploration structurale des MAMs, (B) Explorations fonctionnelles, (C) Modulation des MAMs par des protéines non exprimées aux MAMs

surexprimer des protéines « spacer » ou « linker » qui ne sont pas exprimées de manière endogène dans les cellules, afin de rompre ou renforcer les MAMs respectivement (**Figure 28 C**).

(a) Linkers

Un linker synthétique a été développé par le groupe de G. Hajnozky (MitoCare, Philadelphie, USA)²⁹⁷. Ce linker, d'une longueur de 20 à 25 nm, consiste en une protéine RFP encadrée par un site d'ancrage à la mitochondrie en N-terminal (mAKAP1) et un site d'ancrage au RE (yUBC6) en C-terminal. La même protéine RFP ne possédant qu'un site d'ancrage à la mitochondrie constitue le vecteur contrôle. Nous avons récupéré ces vecteurs et construit des adénovirus permettant de surexprimer ces protéines *in vitro* dans des hépatocytes primaires et *in vivo* dans le foie de souris. Csordás et al précisent dans leur étude que le linker s'ancre au niveau de contacts déjà existants dans la cellule et augmente ainsi la surface d'interactions et non le nombre de contacts²⁹⁷. Plusieurs équipes indépendantes ont également montré que l'expression du linker augmente significativement le transfert calcique aux MAMs^{226,267,297}, validant le renforcement des contacts mitochondrie-RE dans différents types cellulaires. L'avantage du linker est qu'il permet d'augmenter les contacts mitochondrie-RE sans modification de l'expression de protéines endogènes aux MAMs, qui pourraient avoir d'autres fonctions en dehors des MAMs, attestant du rôle des MAMs dans les effets cellulaires observés. La faiblesse de cette technique est que les rapprochements inter-organites sont permanents et non modulables, ce qui peut entraîner des effets chroniques délétères puisque trop de transfert calcique du RE à la mitochondrie peut soit dépléter le RE en Ca²⁺ soit surcharger la mitochondrie et entraîner l'ouverture du mPTP et induire l'apoptose^{466,467}.

(b) FATE1

L'équipe du Docteur Enzo Lalli (Nice, France) a découvert l'existence d'une protéine réticulaire FATE1 (Foetal and Adult Testis Expressed 1), un antigène du cancer testiculaire, qui agit comme un « spacer » entre le RE et la mitochondrie⁴⁶⁸. FATE1 a une expression restreinte aux cellules germinales des testicules en situation physiologique et voit son expression stimulée dans certains types de cancers. La surexpression de FATE1 dans des cellules ACC (adrenocortical carcinoma) entraîne une diminution significative du pourcentage de mitochondries en contact avec le RE, visualisé par MET, et de l'absorption de Ca²⁺ par la mitochondrie lors d'une stimulation d'IP3R, témoignant d'un découplage fonctionnel des organites⁴⁶⁸. Ce découplage inter-organites médié par FATE1 permet dans ces cellules une résistance à la mort cellulaire par apoptose causée par des agents pharmacologiques⁴⁶⁸. FATE1 est une petite protéine de 22kDa, ancrée au RE, et qui interagit avec l'emerin du côté du RE et avec la mitofilin du côté mitochondrial⁴⁶⁸. Par conséquent, il est probable que son rôle de « spacer » passe via la formation d'un macro-complexe multi-protéique permettant d'augmenter la distance entre les organites. Pour l'utilisation de cet outil *in vitro* dans des hépatocytes primaires et *in vivo* dans le foie de souris, notre équipe a produit des adénovirus permettant l'expression de FATE1 (Ad-FATE1) et de la

GFP ou RFP en contrôle (Ad-GFP ou Ad-RFP). Le laboratoire a précédemment validé que la surexpression de FATE1 diminuait bien les contacts mitochondrie-RE dans des myotubes humains en culture primaire, dans le muscle de souris et dans les cellules HuH7, attestant le rôle de spacer des MAMs de FATE1 dans les cellules/tissus cibles l'insuline^{370,376}. De même que pour le linker précédemment décrit, l'avantage de cette approche est que la surexpression de FATE1 permet de moduler les MAMs sans toucher à l'expression de protéines endogènes, puisque cette protéine n'est pas exprimée dans la plupart des cellules. C'est pourquoi, nous avons choisi cette approche dans le cadre de cette thèse car FATE1 n'est pas exprimée dans le foie. Cependant, on peut à nouveau reprocher à ce système de ne pas être dynamique et ainsi de figer l'interface mitochondrie-RE.

C. MAMs et désordres métaboliques hépatiques

Le RE et la mitochondrie sont des organites indispensables à l'homéostasie cellulaire. Comme discuté précédemment, chacun d'eux est perturbé dans l'IR et la stéatose hépatique ; néanmoins, il n'est pas clair si ces altérations sont inter-reliées et quel est le rôle de la communication entre le RE et la mitochondrie dans les désordres métaboliques ? En effet, les MAMs sont responsables de nombreuses fonctions cellulaires qui sont altérées dans le DT2 et la stéatose hépatique, comme l'homéostasie du Ca^{2+} et des lipides. De plus, la présence aux MAMs d'acteurs de la signalisation de l'insuline et de l'homéostasie énergétique favorise l'intérêt autour des MAMs dans le contexte des maladies métaboliques. Notre équipe a été la première à s'intéresser à cette question et un ensemble de travaux au cours des 8 dernières années confirment le rôle clé des MAMs dans le « sensing » des nutriments et le contrôle de l'action et de la sécrétion d'insuline^{274,323,384,469}, faisant des MAMs un régulateur clé de l'homéostasie glucidique. Néanmoins, des résultats divergents sont également apparus dans la littérature²⁶⁷, nous amenant à questionner le rôle des MAMs dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline hépatique dans le cadre de cette thèse. Au cours des 3 prochaines parties, le rôle des MAMs dans l'inflexibilité métabolique, l'IR et la stéatose hépatique vont être développés de manière indépendante, même s'il est important de noter que ces 3 dysfonctions métaboliques sont intimement reliées et peuvent s'impacter mutuellement.

(1) MAMs – Inflexibilité métabolique

Comme développé précédemment dans *I.B. Atteintes associées au DT2*, les patients DT2 vont présenter une inflexibilité métabolique traduite par une incapacité à passer d'un métabolisme oxydatif du glucose, en période post-prandiale, à un métabolisme oxydatif des lipides lors des phases de jeûne. Le foie va jouer un rôle essentiel dans cette flexibilité métabolique puisqu'il est impliqué dans le contrôle de l'homéostasie du glucose et des lipides. De manière intéressante, notre équipe a démontré que les

MAMs étaient régulées au cours des transitions nutritionnelles chez la souris ³²³, suggérant un rôle des MAMs dans le contrôle de la flexibilité métabolique (**Figure 29**). En effet, la transition d'un état à jeun à un état nourri diminue les contacts mitochondrie-RE dans le foie de souris. Cette régulation est mimée *in vivo* par une consommation de sucrose et reproduite *in vitro* par des concentrations élevées de glucose, pointant ce dernier comme régulateur clé des interactions mitochondrie-RE en période postprandiale. Au niveau mécanistique, cette régulation des MAMs par le glucose fait intervenir la voie des PP et l'activation de la phosphatase PP2A, et impacte la dynamique et la fonction mitochondriale. Ainsi, nous proposons que les MAMs permettraient d'adapter le métabolisme hépatique à la disponibilité en glucose : à jeun les MAMs seraient induites pour favoriser l'oxydation des lipides en provenance du TA au sein des mitochondries, alors qu'à l'état nourri, les MAMs seraient diminuées pour limiter le métabolisme oxydatif mitochondrial et favoriser le stockage de glucose sous forme de lipides ³²³. De manière intéressante, les souris ob/ob perdent cette régulation nutritionnelle des MAMs et présentent à jeun une altération des MAMs, associée à une fission et une diminution de la respiration mitochondriale, suggérant que la perturbation des MAMs participent aux dysfonctionnement mitochondriaux dans le foies des souris ob/ob ³²³. En accord avec l'induction des MAMs par le jeûne, il a été montré que la privation de nutriments provoque une inhibition de mTOR qui active l'autophagie et favorise la formation d'autophagosome aux MAMs ^{359,470}. A l'inverse, une abondance de nutriments, via un régime HFD, chez la souris est suffisant pour activer mTORC1 et inhiber l'autophagie ¹⁵⁴. Parallèlement une altération des MAMs via l'ablation de Mfn2 et PACS2 (2 protéines des MAMs) entraîne une altération de la formation des autophagosomes ^{300,359,361}. Aussi l'expression de la Mfn2 a été identifiée positivement corrélée à l'oxydation du glucose et à la fission mitochondriale ^{471,472}. Ainsi ces données renforcent l'idée de l'implication des MAMs dans le contrôle de la flexibilité métabolique.

Une bonne flexibilité des mitochondries repose sur un grand nombre d'enzymes et notamment la PDH qui oriente le flux du pyruvate. La PDH est contrôlée par une famille d'enzymes, les PDK, qui sont régulées en fonction du statut nutritionnel ²⁹⁸. De manière intéressante, l'isoforme PDK4, la seule retrouvée aux MAMs, est capable de contrôler leur formation via une interaction avec VDAC, Grp75 et IP3R1 ²⁹⁸. A jeun, le glucagon et l'AMPc stimulent l'expression de PDK4 via la voie AMPc-PKA-CREB favorisant la production hépatique de glucose, dans le foie de souris à jeun favorisant le métabolisme mitochondrial ⁴⁷³. PDK4 est essentielle dans l'orientation des flux métaboliques, et de manière intéressante celle-ci est retrouvée très présente dans le muscle squelettique de patients DT2 ⁴⁷⁴ et en situation de jeûne chez des souris dans le foie, le rein et le cœur ^{475,476}. Néanmoins, une autre équipe a montré, dans le foie des souris IR, une diminution de PDK4 accompagnée d'une augmentation de la PDH suite au jeûne ⁴⁷⁷, contrairement aux données de Thoudam, dans le muscle qui lui, trouve une augmentation de PDK4 ²⁹⁸. En effet, Lee et al expliquent que les PDK seraient modulées différemment selon les tissus, et notamment dans l'IR, avec une augmentation de PDK4 dans le muscle alors que dans le foie, PDK4 serait diminué mais PDK2 augmentée ^{184,478}. La régulation de PDK4 étant tissu-

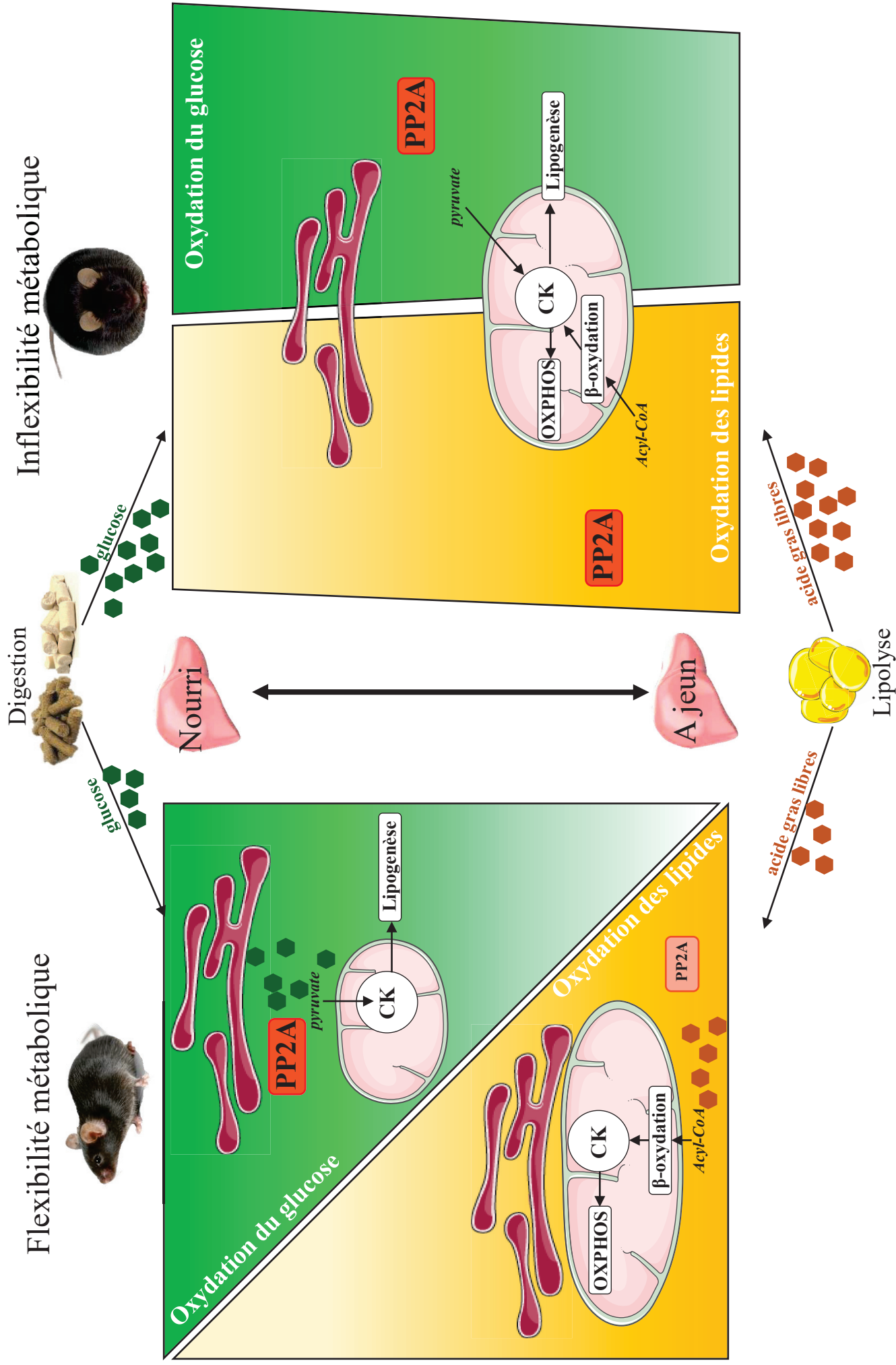


Figure 29: Représentation schématique des MAMs dans l'inflexibilité métabolique dans le contexte de désordres métaboliques

dépendante, des explorations comme Thoudam et al pourraient être menées dans le foie afin de mieux comprendre le rôle de PDK4 dans la dynamique des MAMs.

Toutes ces données suggèrent un rôle très important des MAMs dans l'inflexibilité métabolique associée au DT2 et à l'obésité. Ce rôle de senseur nutritionnel des MAMs met l'accent sur l'importance de la dynamique des MAMs en fonction de l'environnement nutritionnel. Ainsi, le facteur important dans le DT2 est la perte de la dynamique des MAMs lors des transitions nutritionnelles qui pourrait être à l'origine du blocage du switch de substrat glucose/lipide caractéristique des DT2.

(2) MAMs – IR

Les mécanismes moléculaires de l'IR, caractéristique du DT2, ne sont pas encore parfaitement définis, mais pourraient passer par l'inhibition des protéines IRS via leur phosphorylation sur des résidus sérines. De nombreux facteurs sont capables d'activer des sérines/thréonines kinases responsables de la phosphorylation des protéines IRS sur sérines comme le stress oxydatif, l'inflammation, le stress du RE, l'accumulation d'intermédiaires lipidiques et les dysfonctions mitochondriales ^{479,480}.

Dans le contexte de l'obésité et du DT2, plusieurs études ont rapporté une altération des MAMs dans le foie IR, avec néanmoins des résultats contradictoires. En effet, notre équipe a montré une diminution des contacts mitochondrie-RE, par *in situ* PLA et MET, dans le foie de différents modèles murins d'obésité et de DT2 (ob/ob et HFHSD), suggérant une altération des MAMs dans le foie IR ^{274,323} (**Figure 30**). En adéquation avec nos résultats, *in vitro* l'utilisation d'un traitement palmitate, provoquant une IR, sur des cellules HepG2 et HuH7 diminue la phosphorylation d'Akt et induit une altération des MAMs ^{194,274,481}. A l'inverse, l'induction des MAMs via la surexpression de différentes protéines des MAMs (Mfn2, Grp75, CypD) prévient l'altération de la signalisation à l'insuline dans les cellules HuH7, traitées au palmitate et les hépatocytes primaires de souris ob/ob ²⁷⁴. Shinjo et son équipe ont décrit une altération précoce des MAMs par le palmitate avec une diminution significative des transferts calciques aux MAMs après seulement 3 h de traitement, et une altération de la signalisation de l'insuline après 9h d'exposition au palmitate dans les cellules HepG2. La surexpression de la Mfn2 dans ces hépatocytes a permis de rétablir l'intégrité des MAMs et l'activité d'Akt, via la restauration de sa phosphorylation sur S473, obtenue spécifiquement aux MAMs via l'action de mTORC2 ⁴⁸¹. Ces données renforcent l'idée d'une altération des MAMs dans l'IR, notamment via l'inhibition de l'action de mTORC2 sur Akt. De manière intéressante, des études rapportent une diminution de l'expression de la Mfn2 dans le foie de rats obèses et de patients obèses ^{226,375}. Même si la Mfn2, peut être considéré comme un tether des MAMs, l'absence d'exploration des contacts mitochondrie-RE dans ces études ne nous permet pas de conclure ; même si des données *in vivo*, appuient notre hypothèse, puisque des souris KO-CypD, qui présentent une diminution des MAMs dans leur foie, associée à une altération des transferts Ca²⁺,

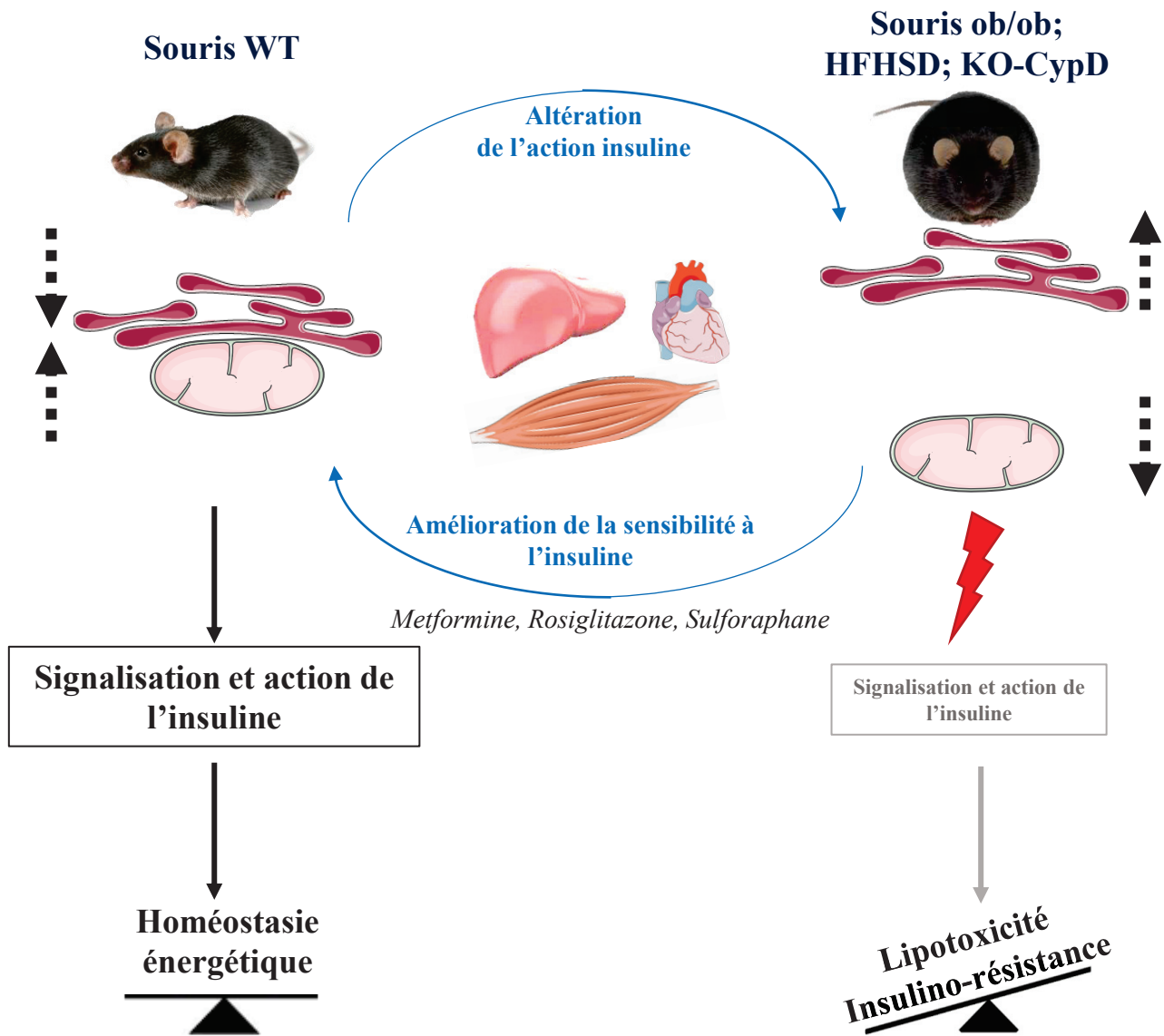


Figure 30: Schéma représentatif de la dynamique des MAMs dans le cœur, le muscle squelettique et le foie en situation d'insulino-résistance

développent une IR et stéatose hépatique ^{274,329}. Le traitement de souris obèses et IR (ob/ob, HFHSD et CypD-KO) avec un agent anti-diabétique (Metformin ou Rosiglitazone) provoque une amélioration de leur sensibilité à l'insuline et restaure les MAMs dans le foie ²⁷⁴. De même, le sulforaphane, suggéré comme potentiel nouvel anti-diabétique, a permis de prévenir l'altération des MAMs dans le foie et la tolérance au glucose des souris ob/ob et HFHSD ⁴⁸². Cependant, il est important de noter que dans ces études, nous ne pouvons pas savoir si l'amélioration des MAMs constitue une cause ou une conséquence de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline.

A l'inverse, Arruda et al ont reporté une augmentation des MAMs en MET dans le foie de souris ob/ob et HFD, associée à une augmentation du niveau d'expression de PACS2 ²⁶⁷ (**Figure 31**). Dans cette étude, l'inhibition d'IP3R1 et de PACS2 entraîne une diminution des MAMs et du flux calcique entraînant une amélioration du phénotype mitochondriale et de la tolérance au glucose chez les animaux obèses. La surexpression d'un linker, via un adénovirus, dans le foie des souris HFD court, augmente fortement les MAMs et accélère les effets délétères du HFD ²⁶⁷. Une augmentation des MAMs associée à une augmentation du transfert calcique a aussi été rapportée par une équipe indépendante dans des hépatocytes isolé de souris HFD ²⁹⁶. Tout comme Arruda et al, une équipe a montré que l'ablation de PACS2 protège de l'IR induite par un HFD, cependant ils ont remarqué que ce phénotype était associé à une augmentation significative de FGF21 ⁴⁸³. A noté que FGF21 est très impliqué dans le contrôle du métabolisme du glucose et diminue les concentrations de glucose et de TG circulants ^{255,484}. Cette induction de FGF21 est retrouvée suite à la modulation de certaines protéines aux MAMs, ce qui peut expliquer l'amélioration des phénotypes trouvés dans ces études, comme Fundc1 ⁴⁸⁵ principalement impliquée dans la mitophagie et l'autophagie, qui lorsque celle-ci va être inhibé dans le muscle ; cela va améliorer la sensibilité à l'insuline dans des modèles obèse via FDG21 ⁴⁸⁶. Ces données mettent en valeur une faiblesse de ces études : la modulation de protéines endogènes aux MAMs, peuvent avoir d'autres fonctions cellulaires en dehors des MAMs.

A noter que la controverse, concernant la modulation des MAMs en situation d'IR, est retrouvée dans un autre tissu, notamment le muscle, premier site d'utilisation du glucose en réponse à l'insuline. Notre équipe a montré que différents modèles de souris DT2 et obèses présentent une diminution des MAMs associée à une IR dans le muscle squelettique ³⁷⁰. De la même manière que dans le foie, le renforcement des contacts mitochondrie-RE, via la surexpression de protéines aux MAMs, permet de prévenir l'IR induite par un traitement palmitate dans des myotubes primaires humains. En accord avec ces expériences, nous avons retrouvé une altération des MAMs dans les myotubes de patients obèses et/ou DT2, témoignant d'une relation étroite entre l'altération des MAMs et l'IR ³⁷⁰. Pourtant, une équipe indépendante obtient des résultats contraires avec une induction des MAMs dans des myotubes de souris HFD en réponse à un traitement au palmitate ²⁹⁸. En revanche, dans le cœur de souris HFHSD, en accord avec nos données dans le muscle et le foie, l'IR est associée à une altération des MAMs et une perturbation du transfert calcique ⁴⁸⁷. L'utilisation d'un linker artificiel dans le cœur de souris HFHSD

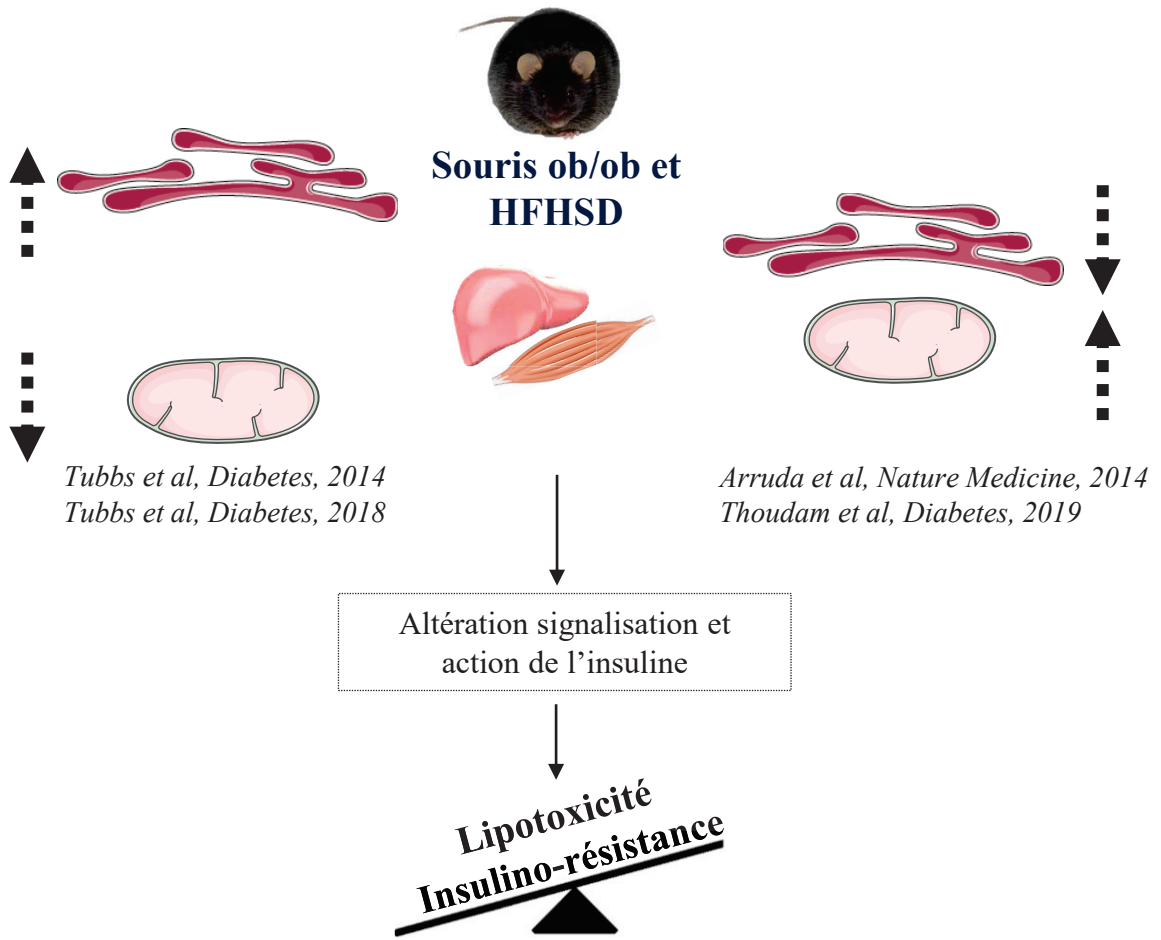


Figure 31: Controverse des MAMs dans le foie et le muscle dans le contexte de l'insulino-résistance et de l'obésité

court, restaure les MAMs, le transfert calcique et les fonctions contractiles⁴⁸⁷. Il est important de noter que la Mfn2, comme dans le foie, a été retrouvée diminuée dans le muscle de rat obèse et dans le muscle squelettique de patients DT2 et obèses^{471,488}. Sachant que la Mfn2 intervient dans les interactions mitochondrie-RE, il serait intéressant de regarder comme sont les MAMs dans ces modèles^{271,272,277}. De même, une étude protéomique récente sur le cerveau de souris DT2, montre une diminution significative de Grp75 chez les souris DT2³⁹⁴. De même, les MAMs n'ont pas directement été étudiées par cette équipe, cependant d'autres études montrent que l'extinction de Grp75 entraîne une diminution des MAMs, par conséquent la diminution de Grp75 dans le cerveau de souris DT2 serait en adéquation avec nos résultats qui associent une altération des MAMs avec le développement du DT2^{274,295}. Des résultats divergents n'épargnent également pas les autres tissus puisqu'une altération des MAMs dans les modèles HFD comparés aux souris SD dans le rein et les neurones POMC, a été trouvée^{489,490} alors qu'une autre équipe décrit une augmentation des MAMs dans les oocytes provenant de souris HFD⁴⁹¹.

Il est intéressant de noter, que le point commun de ces stratégies, visant à moduler les MAMs via la modification de protéines endogènes aux MAMs (Mfn2, mTORC2, IP3R1, Grp75, CypD), pourrait être l'impact sur l'homéostasie calcique se répercutant ensuite sur la signalisation à l'insuline et l'homéostasie glucidique^{164,364,372,374}. La diminution de la capacité d'absorption de la mitochondrie à tamponner le flux de Ca^{2+} sortant du RE peut induire une augmentation des $[Ca^{2+}]_c$ ⁵⁶. Ainsi, dans le cas d'une altération des MAMs, la mitochondrie se trouve éloignée du RE, d'où une diminution des échanges de Ca^{2+} entre les deux organites ; il est donc possible que cela augmente les $[Ca^{2+}]_c$ ce qui serait en adéquation avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline via un chélateur de Ca^{2+} intracellulaire chez le rat HFD¹⁵⁹.

Face à tous ces résultats, on ne peut exclure que la régulation des MAMs dans l'IR se fasse de manière tissu-spécifique. Il semblerait également que l'implication des MAMs dans le DT2 et l'obésité ne se limitent pas simplement à une altération ou une potentialisation, et pourraient évoluer en fonction de l'état pathologique. En effet, toutes ces études ont observé les MAMs dans des modèles d'obésité chronique, mais aucune investigation n'a encore été faite quant à l'évolution des MAMs en fonction du temps durant l'IR. Comprendre si l'intégrité des MAMs est impliquée dans la mise en place de l'IR, est essentielle dans le développement de stratégies préventives, puisque chez les patients l'état d'IR précède le développement du DT2⁴⁹².

(3) MAMs – stéatose hépatique

La stéatose hépatique et l'IR sont intimement liées et s'influencent mutuellement, c'est pourquoi il est actuellement difficile de savoir quelle anomalie métabolique précède l'autre. Il a été rapporté que la masse mitochondriale dans le foie de patients NAFLD augmentait significativement afin de supporter l'augmentation de l'activité du CK¹⁷⁷. De plus, chez les souris obèses une augmentation du pyruvate hépatique a été pointée, et ceci a été confirmé chez l'Homme avec une augmentation des taux de

pyruvate plasmatique chez les patients NAFLD associée à une diminution du taux d'Acétyl-CoA hépatique ⁴⁷⁷. Même si de nombreuses modifications du métabolisme et des fonctions mitochondriales ont été observées avec la NAFLD, l'implication des MAMs dans la stéatose reste actuellement très peu connue, puisqu'il est difficile d'étudier le lien direct entre stéatose et MAMs, en dissociant l'IR dans les modèles d'obésité (résumé du lien entre MAMs et stéatose : **figure 32**). Notre équipe a démontré que la perte de CypD, chez la souris, était associée à une altération des interactions et des échanges calciques entre le RE et la mitochondrie, une IR et une accumulation de lipides dans le foie des souris ³²⁹. *In vitro*, l'inhibition de PKCε prévient l'IR induite par l'inhibition de l'expression de la CypD, suggérant que l'accumulation de lipides, en particulier les DAG, serait responsable de l'IR hépatique ³²⁹. L'utilisation de modèle de souris NAFLD, ayant reçu une diète déficiente en méthionine et choline (MCD) a permis de mettre en valeur une forte augmentation du stress du RE, une diminution de l'expression de SERCA2 aux MAMs associée à une surcharge calcique de la mitochondrie ⁴⁹³. L'expression d'un facteur de croissance hépatique, HSS (hepatic stimulator substance), permet de maintenir l'expression de SERCA aux MAMs et ainsi d'augmenter la recapture du Ca²⁺ du cytosol vers le RE, diminuant ainsi le stress du RE et la surcharge calcique de la mitochondrie, ainsi que la production de ROS. La dynamique des MAMs dans ce modèle n'a pas été étudiée, il n'est donc pas possible de conclure en faveur d'une altération ou d'une augmentation des MAMs, même si l'expression de SERCA2 aux MAMs est très diminuée dans le foie des souris NASH ⁴⁹³. Les MAMs permettent de faire le lien entre le stress du RE, l'altération de l'homéostasie calcique, la production de ROS et l'accumulation de lipides dans la NAFLD. En effet ces phénomènes s'influencent mutuellement puisqu'une accumulation de lipides dans le foie entraîne un stress du RE, des dysfonctions mitochondriales et une production de ROS, et à l'inverse une activation du stress du RE directement ou en altérant le métabolisme mitochondriale entraîne une accumulation anormale de lipides ⁴⁹⁴. Ainsi l'activation pharmacologique de Nrf2 (nuclear factor E2-related factor 2) inhibe le stress du RE, l'inflammation et le stress oxydatif ce qui rétablit la sensibilité à l'insuline et inhibe la stéatose chez les souris obèses ⁴⁹⁵. Toutes ces données placent le stress du RE et l'homéostasie calcique, tout comme dans l'IR, au centre du développement de la NAFLD, suggérant que le maintien de la dynamique des MAMs puisse être indispensable dans l'équilibre de ces systèmes. De même, VDAC1, canal mitochondrial essentiel aux transferts calciques aux MAMs, se trouve régulé par de nombreux facteurs comme le Ca²⁺, les ROS et l'accumulation de lipides ⁴⁹⁶. Ainsi, dans le foie stéatosé humain et dans les modèles génétiques et diététiques d'obésité, il a été retrouvé une diminution de la phosphorylation de VDAC impliquant une modulation du flux calcique dans ces modèles ⁴⁹⁷. La phosphorylation de VDAC est corrélée avec la sévérité de la stéatose, ce mécanisme passerait par l'inactivation de GSK3, lors de l'accumulation de lipides, la rendant incapable de phosphoryler VDAC. La perte de phosphorylation du VDAC est en fait une caractéristique de la stéatose dans la phase précoce de la pathogenèse de la NAFLD ⁴⁹⁸. Ces données peuvent être corrélées avec l'augmentation significative de StAR, chez les patients NASH comparés aux patients avec stéatose simple ²²², protéine connue pour interagir/réguler VDAC aux MAMs ³¹². Ces arguments sont en faveur

d'une potentielle altération de la composition des MAMs dans la NAFLD qui participerait à la mise en place des perturbations mitochondriales et de l'homéostasie calcique impliquées dans la NAFLD ⁴⁹⁹.

L'homéostasie calcique joue aussi un rôle important dans la mise en place de la NAFLD, que ce soit au niveau du RE mais également au niveau de la mitochondrie. L'augmentation de l'apport en lipides, en contexte d'obésité, oblige le foie à augmenter ces stockages intra-cellulaires sous forme de gouttelettes lipidiques et ceci semble dépendre des flux calciques et notamment d'IP3R1 au RE. En effet, des souris KO-IP3R1, sous HFD, montrent une réduction du nombre de gouttelettes lipidiques dans le foie, associée à une diminution du Ca²⁺ mitochondrial, ce qui prévient l'apparition de dysfonctions mitochondriales et rend les souris résistantes au développement de NAFLD ²⁹⁶. Cependant, ce mécanisme serait indépendant des MAMs, puisque les souris KO-IP3R1 et WT présentent la même quantité de contacts de MAM en MET ²⁹⁶.

De même, Hernandez-Alvarez et son équipe, montrent une diminution de l'expression de Mfn2 durant la progression de la stéatose à la NASH des patients, mais sans modification de la Mfn1 ²²⁶. Ainsi, après 3 semaines de HFD, la Mfn2 diminue significativement dans le foie des souris comparé au groupe contrôle, cependant cette diminution est largement plus importante dans un modèle d'induction de la NASH par une diète MCD. Il en est de même chez l'Homme, où une diminution spécifique de la Mfn2 lors de l'aggravation de la stéatose à la NASH, mais sans modification de la Mfn1, a été retrouvée ²²⁶. Dans cette étude, les MAMs n'ont pas été explorées, pourtant de précédentes études ont montré que la diminution d'expression de la Mfn2 induisait une altération des MAMs ²⁷¹⁻²⁷⁶, ce qui coïncide avec nos données qui montrent une altération des MAMs associé à l'IR ^{274,370}. Les souris Mfn2-KO dans le foie, ont une augmentation de l'apoptose qui est l'une des spécificités du passage de la stéatose à la NASH et une augmentation de la prolifération cellulaire et de la fibrose, ce qui favorise l'apparition de cancer du foie ²²⁶. La surexpression de la Mfn2 dans le foie des souris KO, permet de rétablir l'inflammation, de normaliser les TG et de diminuer le stress du RE qui était suractivé chez ces souris ²²⁶. Le blocage du stress du RE, par la surexpression de Grp78 dans le foie de ces souris, permet de rétablir l'inflammation, l'apoptose, la prolifération cellulaire et d'améliorer le métabolisme de la mitochondrie avec une augmentation de l'oxydation de l'oléate et une diminution de la production de ROS. Cependant cela ne permet pas de rétablir le niveau de TG ²²⁶. Hernandez via ces résultats, montre que les dysfonctions mitochondriales, l'inflammation, la fibrose, l'apoptose et l'augmentation de la prolifération cellulaire des souris KO se trouvent en aval du stress du RE. Ces modèles KO-Mfn2 dans le foie présentent également une altération du métabolisme des PL qui semblent indépendante du stress du RE. En effet, le blocage du stress du RE ne rétablit pas la PC et la PE, diminuées dans ces modèles, en revanche la réexpression de la Mfn2 rétablit l'homéostasie des PL. Ils montrent que dans la fraction MAMs des foies de souris KO-Mfn2, il y a une diminution significative du niveau d'expression de PSS1 mais pas de PSS2 avec une augmentation de PACS2 et Sig1R ²²⁶ témoignant d'un remodelage des MAMs similaires aux foies de souris ob/ob et HFD ^{226,267}. L'altération de l'homéostasie des PL pourrait être responsable

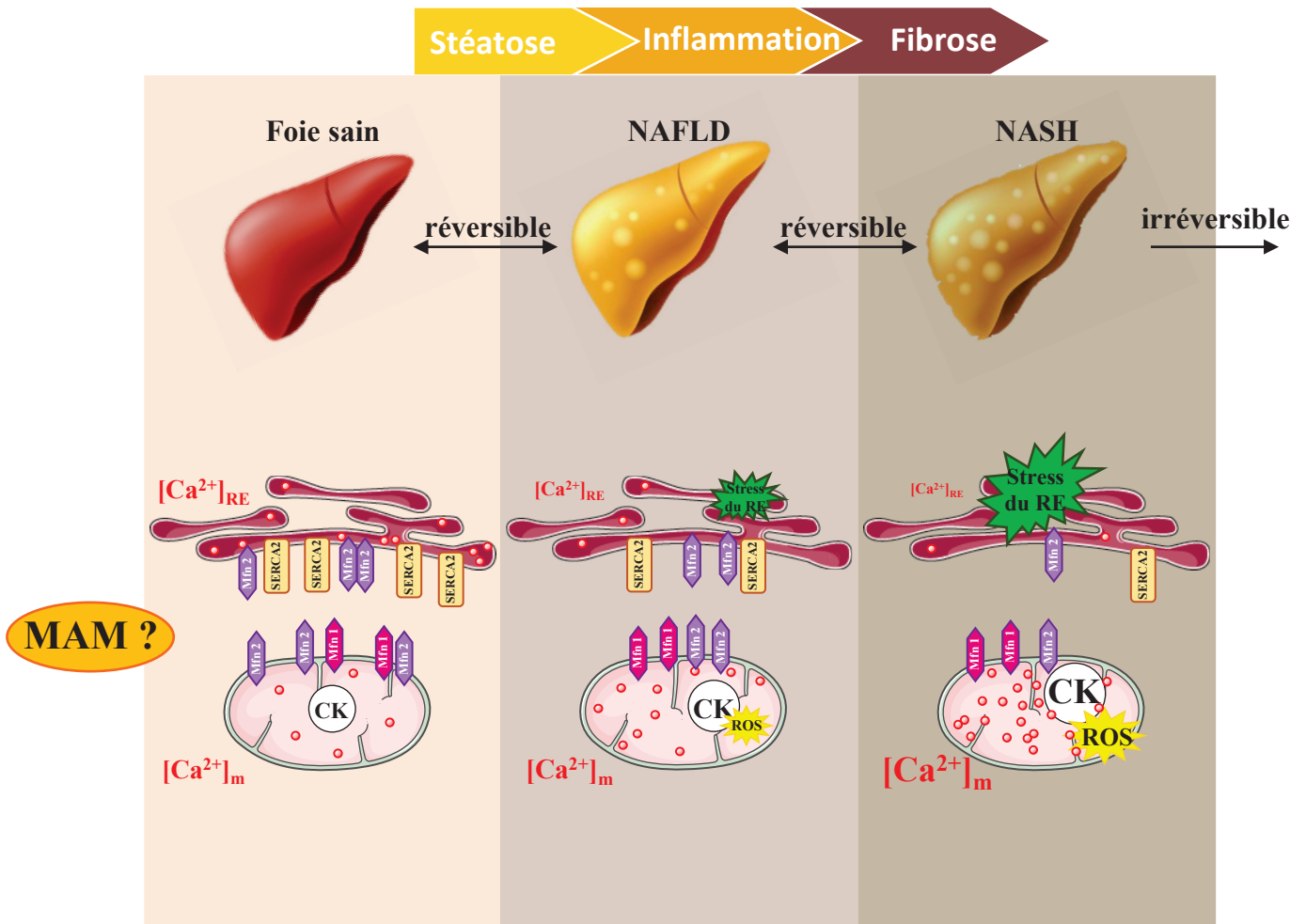


Figure 32: Schéma représentatif de la composition protéique du RE et de la mitochondrie durant le développement de la NASH

de ce réarrangement de MAMs, cependant l'altération des MAMs ne peut pas expliquer la diminution de PE et PC. L'expression d'un linker artificiel, induisant les MAMs, ne permet pas de rétablir la synthèse de PC et de PE ou de PSS1, ni le stress du RE ²²⁶. Ainsi, c'est bien la délétion de la Mfn2 qui est responsable de cette altération des PL. Elle participerait à la formation de microdomaines enrichis en PS, au niveau des MAMs, favorisant l'activité des protéines de transport ORP5/8 et VAT-1. ORP5/ORP8 ont la capacité de se lier à la PS, et de maintenir son transfert, afin de former du PE qui permet de maintenir une bonne morphologie et respiration des mitochondries ^{454,500}. La Mfn1, contrairement à la Mfn2, est connue pour sa capacité de liaison aux PL mais ne génère pas de domaine riche en PC ou PE. Hernandez et son équipe ont réussi à déterminer que la « clef » du fonctionnement provenait du domaine N-Terminal de la Mfn2 qui n'est pas présente dans la Mfn1 ²²⁶. Ces travaux dévoilent un nouveau rôle de la Mfn2 dans le métabolisme des PL et de la stéatose. Ainsi les altérations du métabolisme des PL vont directement impacter la fluidité et la dynamique des MAMs, la perturbation de celles-ci serait alors une conséquence de la stéatose. La perturbation du métabolisme des PL peut également impacter l'autophagie puisque l'initiation de ce phénomène, aux MAMs, nécessite l'assemblage de LC3B avec PE. La perturbation de la synthèse de PE pourrait altérer l'autophagie et potentiellement diminuer l'élimination des lipides via les phénomènes de lipophagie précédemment décrits dans le **II.B. Mécanisme de la stéatose hépatique**. Il a été montré un défaut de l'autophagie dans le foie des souris ob/ob, de même qu'il a récemment été montré une corrélation positive entre l'inhibition de l'autophagie chez des souris HFD et la progression de la NAFLD ^{154,231}. De plus une modification de l'homéostasie des PL, peut aussi impacter le stockage des lipides dans le foie puisque PC, nécessaire à la formation de gouttelettes lipidiques, est retrouvé fortement induit, comparé à la PE, dans des échantillons de RE de foie de patients obèses ¹⁶³.

Toutes ces données évoquent une altération du métabolisme lipidique, du Ca²⁺ et des dysfonctions mitochondriales, probablement en lien avec les MAMs, dans le développement de la NAFLD. L'expression de la Mfn2 a été retrouvée diminuée dans la progression de la stéatose à la NAFLD des patients ²²⁶. Hélas, l'absence d'exploration des MAMs dans ces biopsies ne nous permet pas de relier ce phénotype à une altération de la communication entre le RE et la mitochondrie. De même, aucune étude n'a analysé la dynamique des MAMs dans différents modèles murins de NAFLD, qu'il soit nutritionnel, mécanique ou chimique. Des investigations supplémentaires, notamment sur la chronologie d'apparition des altérations dans la NAFLD puisque la Mfn2 diminue très précocement dans le foie des souris HFD, permettront de mieux appréhender la modulation des MAMs dans la NAFLD.

Objectifs de thèse et Résultats

Contexte scientifique et objectifs :

Comme précédemment décrit, les MAMs jouent un rôle important dans le contrôle de la sensibilité à l'insuline du foie avec des répercussions sur l'homéostasie glucidique et lipidique, faisant de celles-ci une cible de choix pour de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le contexte de l'obésité, du DT2 et des NAFLDs. Cependant, le rôle précis des MAMs dans le contrôle de l'action de l'insuline est complexe et pas encore complètement élucidé, principalement parce que les MAMs sont des structures hautement dynamiques et hétérogènes avec de nombreuses protéines ayant des fonctions pléiotropiques en dehors des MAMs, conduisant ainsi à des résultats controversés dans la littérature. En effet, les travaux pionniers de notre équipe ont montré que les MAMs contrôlent la signalisation du glucose et de l'insuline dans le foie de souris et qu'une mauvaise communication entre le RE et la mitochondrie participe à l'IR hépatique²⁷⁴. Des résultats similaires ont été trouvés dans le muscle squelettique³⁷⁰ et dans le cœur³⁷¹ faisant des MAMs un régulateur de l'homéostasie glucidique au niveau du corps entier. Cependant, d'autres études ont rapporté un renforcement des MAMs dans le foie et le muscle de souris obèses^{267,298}. Ainsi, la dynamique des MAMs dans l'obésité chronique semble controversée et il manque à ce jour des études dynamiques de l'évolution des MAMs au cours de la pathologie. De plus, le lien de causalité entre les MAMs et la sensibilité à l'insuline hépatique n'est que partiellement défini puisque le ciblage de protéines endogènes des MAMs est une stratégie imparfaite, étant donné que ces protéines endogènes peuvent avoir d'autres fonctions cellulaires en dehors des MAMs. Ainsi, des travaux supplémentaires sont encore nécessaires pour statuer sur le rôle des MAMs dans le contrôle du métabolisme hépatique.

C'est face aux interrogations apportées par cette littérature que s'inscrivent les travaux menés dans le cadre de ma thèse. En effet, il était important pour nous, de complètement réévaluer le rôle des MAMs dans le foie au cours de l'obésité et de l'IR. Mes objectifs de thèse ont donc été :

- i) étudier la régulation en fonction du temps des interactions structurales et fonctionnelles entre le RE et la mitochondrie dans le foie de souris au cours de l'obésité et de l'IR induites par une diète riche en lipides et en sucrose (HFHSD).
- ii) définir le lien de cause à effet entre les MAMs, l'IR et la stéatose hépatique en modulant les contacts mitochondrie-RE dans le foie de souris via la surexpression à l'aide d'adénovirus de « spacer » et « linker » non exprimés de manière endogène.
- iii) déterminer s'il est possible de restaurer un bon dialogue entre le RE et la mitochondrie par des approches nutritionnelles visant à améliorer la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique. Pour cela, nous avons choisi d'inverser le régime de souris HFHSD et de les rebasculer sous diète standard permettant ainsi d'apprécier si les altérations des MAMs induites par une diète obésogène sont réversibles.

iv) étudier l'influence du fond génétique des souris dans les résultats controversés de la littérature sur la dynamique des MAMs dans l'obésité.

Les points i) à iii) ont été inclus dans mon article principal qui vous est présenté dans la **Partie 1**. Le point iv) correspondant à des résultats non publiés, est présenté dans la **Partie 2**. J'ai également eu l'opportunité de travailler en collaboration avec Francisco Jaque-Fernandez au sein de l'équipe de Vincent Jacquemont à l'Institut NeuroMyoGène (INMG, Lyon), qui se sont intéressés aux modifications intracellulaires de Ca^{2+} au sein de la fibre musculaire lors du couplage excitation-contraction au cours du DT2. Dans cette étude, j'étais chargée de la mise en place et du suivi métabolique d'un modèle expérimental de souris rendues IR par un régime obésogène pendant 16 semaines afin d'isoler le muscle fléchisseur court des orteils de la patte des souris et d'en étudier l'homéostasie calcique par électrophysiologie. Ce travail a donné lieu à une publication présentée en **Partie 3**.

Partie 1 : L'altération structurale et fonctionnelle des MAMs est un phénomène précoce et causal dans l'insulino-résistance et la stéatose hépatique.

- 1) **Résumé**
- 2) **Article n°1 : « ER-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis »**

Agathe Beulant, Maya Dia, Bruno Pillot, Marie-Agnès Chauvin, Jingwei Ji-cao, Christine Durand, Nadia Bendridi, Stéphanie Chanon, Aurélie Vieille-Marchiset, Hubert Vidal, Ludovic Gomez, Mélanie Paillard, and Jennifer Rieusset.

Soumis à « Journal of Hepatology », mai 2021.

Partie 2 : L'altération structurale des MAMs dans l'obésité est un phénomène récurrent et indépendant du fond génétique.

- 1) **Résumé**
- 2) **Résultats non publiés.**

Parties 3 : Préservation de la dynamique du Ca^{2+} intracellulaire lors du couplage excitation-contraction dans la fibre musculaire de souris obèses.

- **Résumé**
- **Article n°2 en collaboration : « Preserved Ca^{2+} handling and excitation-contraction coupling in muscle fibres from diet-induced obese mice »**

Francisco Jaque-Fernandez, **Agathe Beulant**, Christine Berthier, Mariana Casas, Laloé Monteiro, Bruno Allard, Jennifer Rieusset and Vincent Jacquemond.

Jaque-Fernandez F, **Beaulant A**, Berthier C, Monteiro L, Allard B, Casas M, Rieusset J, Jacquemond V. **Preserved Ca²⁺ handling and excitation-contraction coupling in muscle fibres from diet-induced obese mice.** Diabetologia. 2020 Nov;63(11):2471-2481. doi: 10.1007/s00125-020-05256-8. Epub 2020 Aug 25. PMID: 32840676.

I. Partie 1 : Les altérations structurales et fonctionnelles des MAMs sont des phénomènes précoces et causals dans l'insulino-résistance et la stéatose hépatique.

A. Résumé

Introduction :

Les maladies métaboliques telles que l'obésité, le DT2 et les NAFLDs sont des pathologies en pleine expansion depuis ces dernières années. Comprendre leurs mécanismes physiopathologiques est un enjeu crucial afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Récemment, les études démontrant l'implication des MAMs dans l'IR⁵⁰¹ et la stéatose⁴⁹⁴ hépatique se sont multipliées, plaçant les MAMs au centre de la régulation de l'homéostasie glucidique et lipidique. Cependant, des divergences dans la littérature sont apparues quant à la dynamique des MAMs dans des modèles murins d'obésité et d'IR chronique^{267,274}, sans qu'aucune étude ne se soit intéressée à la dynamique des MAMs au cours de l'évolution de la pathologie. De plus, le lien entre les MAMs, l'IR et la stéatose hépatique est actuellement associatif puisqu'aucune preuve de causalité n'est suffisamment convaincante, étant donné que les protéines endogènes modulées peuvent avoir d'autres fonctions intracellulaires en dehors des MAMs. La diversité des techniques d'investigations et des modèles d'étude des MAMs multiplient l'obtention de résultats divergents participant à la controverse actuelle.

Dans ce contexte, l'objectif de mon travail a été de statuer sur le rôle des MAMs dans l'IR et la stéatose hépatique grâce à des approches fiables qui allient l'utilisation de modèles physiologiques (*in vitro* : hépatocytes primaires de souris et *in vivo* : souris) et des techniques d'imagerie complémentaires permettant d'évaluer la structure et la fonction des MAMs dans chacun de nos nombreux modèles murins. Ainsi, nous avons étudié comment évoluent les contacts et les échanges de Ca²⁺ entre la mitochondrie et le RE au cours de l'obésité et de l'IR induite par une diète HFHSD (étude cinétique) et si ces modifications sont réversibles lorsqu'on replace les souris sous une diète standard. D'autre part, nous nous sommes intéressés au rôle causal des MAMs dans l'IR et la stéatose hépatique en modulant négativement ou positivement les MAMs, *in vivo* dans le foie de souris à l'aide d'adénovirus exprimant un « spacer » ou un « linker ».

Matériels et Méthodes :

L'évolution de la dynamique et de la fonction des MAMs au cours de l'obésité et de l'IR, ainsi que leur rôle causal, ont été étudiés *in vivo* en combinant différents modèles murins :

- ✓ **Un protocole nutritionnel en cinétique**, durant lequel des souris mâles C57Bl/6J-Ola-Hsd (Envigo) âgées de 5 semaines ont été soumises soit à un régime standard (SD), soit à un régime riche en sucre et en gras (HFHSD) durant 1, 4, 8, 12 ou 16 semaines.
- ✓ **Un modèle de surexpression hépatique d'un « spacer »**, au cours duquel des souris mâles C57Bl/6J-Ola-Hsd (Envigo) âgées de 11 semaines ont été infectées avec un adénovirus permettant la surexpression soit d'une protéine contrôle (GFP ou mCherry) soit du spacer FATE1 (10^9 pfu/ souris, injection dans le sinus rétro-orbital) et étudiées 15 jours post-infection. Nous avons utilisé la nomenclature suivante pour les identifier : Ad-GFP ou Ad-mCherry et Ad-FATE1.
- ✓ **Un modèle de surexpression hépatique d'un « linker »**, pendant lequel des souris mâles C57Bl/6J-Ola-Hsd (Envigo) âgées de 5 semaines ont été infectées avec un adénovirus permettant la surexpression soit d'une protéine contrôle (protéine RFP ancrée à la mitochondrie) soit du linker (protéine RFP ancrée à la mitochondrie et au RE) (10^9 pfu/ souris, injection dans le sinus rétro-orbital) et soumises à une diète SD ou HFHSD pendant 4 semaines. Il s'agit donc d'un protocole préventif au cours duquel nous mesurons l'impact du renforcement des MAMs sur les altérations métaboliques induites par une diète HFHSD. Nous avons utilisé la nomenclature suivante pour les identifier : Ad-Ctrl SD_{4w}, Ad-Ctrl HFHSD_{4w}, Ad-linker SD_{4w} et Ad-linker HFHSD_{4w}.
- ✓ **Un modèle de « Reversal diet »** au cours duquel des souris mâles C57Bl/6J-Ola-Hsd (Envigo) âgées de 5 semaines ont été placées sous une diète SD ou une diète HFHSD pendant 16 semaines, puis une partie des souris HFHSD ont été basculées à nouveau sous une diète SD pendant 4 ou 8 semaines consécutives (groupe RD pour Reversal Diet). Ainsi les souris SD, HFHSD ou RD terminent leur protocole nutritionnel à 20 ou 24 semaines et nous avons utilisé la nomenclature suivante pour les identifier : SD_{20w/24w}, HFHSD_{20w/24w} et RD_{4w/8w}.

Systématiquement, nous avons suivi l'évolution des paramètres métaboliques des souris (poids corporel, poids du foie, la glycémie ...) et réalisé des tests de tolérance au glucose (GTT) ou à l'insuline (ITT) afin d'étudier les conséquences sur l'homéostasie glucidique corps entier. La sensibilité à l'insuline du foie a été déterminée en étudiant la phosphorylation de la PKB en réponse à l'insuline soit *in situ* dans le foie après une injection ip d'insuline soit après isolement des hépatocytes. Nous avons également étudié comme effet métabolique de l'insuline, l'effet inhibiteur de l'hormone sur la production de glucose par les hépatocytes isolés. La stéatose hépatique a été déterminée soit par

histologie (coloration à l'huile rouge) soit biochimiquement, en quantifiant les TG dans le foie des souris.

Parallèlement, nous avons quantifié les contacts physiques entre la mitochondrie et le RE dans le foie des souris en combinant des approches d'imagerie par *in situ* PLA et MET.

La fonctionnalité des MAMs a été évaluée en mesurant les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie dans les hépatocytes primaires isolés des souris. Pour cela, les hépatocytes isolés ont été infectés avec un adénovirus exprimant le 4mtD3CPV, une sonde FRET calcique adressée spécifiquement à la mitochondrie. Par microscopie à fluorescence, nous avons mesuré les $[Ca^{2+}]_m$ en situation basale et après une stimulation à l'ATP disodique qui permet une libération d'IP3 et une activation de la sortie calcique du RE via IP3R, suite à l'activation de récepteurs purinergiques.

Dans certains modèles, nous avons mesuré la respiration mitochondriale sur des hépatocytes murins isolés entiers ou perméabilisés à la digitonine. Sur hépatocytes intacts, nous avons étudié la consommation d'oxygène mitochondriale en réponse à l'oxydation de palmitate. Sur hépatocytes perméabilisés, nous avons mesuré la consommation d'oxygène mitochondriale suite à l'activation des complexes I, II et IV.

Pour les études de surexpression hépatiques de « spacer » ou « linker », nous avons construit, amplifié et purifié des adénovirus spécifiques : Ad-GFP, Ad-mCherry, Ad-FATE1, Ad-Ctrl et Ad-linker. Ces outils génétiques ont été validés tout d'abord *ex-vivo* dans les hépatocytes primaires de souris et par la suite *in vivo* dans le foie des souris. Pour cela, nous avons mesuré leur impact sur la structure et la fonction des MAMs ainsi que sur la signalisation et l'action à l'insuline.

Résultats :

Au cours du protocole nutritionnel en cinétique, nous avons démontré par une double approche (*in situ* PLA et MET) que l'altération des contacts mitochondrie-RE est un phénomène précoce qui apparaît dès 1 semaine de HFHSD chez les souris, comme la prise de poids et l'intolérance au glucose. De plus, ces altérations précèdent le développement d'IR apparu plus tardivement, après 12 semaines de HFHSD et coïncidant avec le développement d'une stéatose hépatique. Cette dissociation structurale des MAMs se maintient après 4, 8, 12 et 16 semaines de diète. De manière intéressante, la diminution précoce des contacts physiques entre les deux organites s'accompagne d'une diminution des échanges calciques entre le RE et la mitochondrie après 1 et 4 semaines de HFHSD comparé aux SD respectifs. L'ensemble de ces données démontrent solidement que l'altération structurale et fonctionnelle des MAMs est un phénomène précoce au cours de l'obésité et de l'IR induite par une surnutrition. De manière inattendue, nous avons observé une augmentation du $[Ca^{2+}]_m$ basal, ainsi qu'une augmentation de l'accumulation induite par l'ATP, dans les hépatocytes après 16 semaines de HFHSD, en désaccord avec l'altération structurale des MAMs trouvées *in situ* dans le foie des souris. Ces résultats suggèrent

donc que soit la structure et la fonction des MAMs sont différentiellement régulées au cours d'une diète HFHSD chronique, soit cette différence structure/fonction est liée à notre modèle d'étude d'hépatocytes isolés et infectés par un adénovirus. Pour trancher entre ces deux hypothèses, nous avons mesuré les contacts mitochondrie-RE par *in situ* PLA dans les hépatocytes isolés et infectés avec la sonde calcique mitochondriale, et démontrés que ceux-ci étaient augmentés dans les hépatocytes HFHSD_{16w} vs SD_{16w}, en accord avec les données calciques, suggérant qu'il n'y a pas de régulation différentielle entre la structure et fonction des MAMs dans les hépatocytes isolés des souris HFHSD16w. Il est probable que l'isolement et l'infection d'hépatocytes de souris HFHSD_{16w}, qui ont des mitochondries altérées contrairement à ceux des régimes plus précoces, est délétère et augmente les contacts et les échanges calciques entre le RE et la mitochondrie. Ainsi, nos données alertent sur la difficulté d'explorer la fonctionnalité des MAMs dans les modèles déjà affaiblis par un long stress cellulaire et incitent à la prudence quant aux conclusions présentes dans la littérature. Indépendamment de cette limite, nos données démontrent que la dysfonction des MAMs constitue un événement précoce qui précède l'IR et la stéatose hépatique, suggérant que les altérations des MAMs pourraient jouer un rôle causal dans ces atteintes métaboliques.

Afin de le démontrer, nous avons décidé de moduler négativement ou positivement les MAMs via la surexpression d'un « spacer » ou d'un « linker » exogène dans le foie des souris, et de mesurer les conséquences sur la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique. Ces outils adénoviraux ont été validés *in vitro* dans des hépatocytes isolés et étudié *in vivo* dans le foie des souris.

La surexpression du spacer FATE1 dans des hépatocytes primaires de souris saines entraîne comme attendu une altération à la fois structurale et fonctionnelle des MAMs, avec une diminution des contacts et des échanges de Ca²⁺ entre le RE et la mitochondrie, validant l'outil moléculaire. De manière intéressante, cette déstructuration des MAMs s'accompagne d'une altération de la signalisation à l'insuline dans les hépatocytes Ad-FATE1 comparé aux hépatocytes Ad-mCherry.

De même, *in vivo*, après 15 jours de surexpression adénovirale nous avons pu constater par une double approche, MET et *in situ* PLA, que le nombre de contacts mitochondrie-RE était significativement diminué chez les souris Ad-FATE1 comparé aux souris Ad-GFP. Cette altération des MAMs est retrouvée, fonctionnellement avec une diminution significative du Ca²⁺ mitochondrial et des échanges calciques aux MAMs dans les hépatocytes isolés des souris Ad-FATE1 comparé aux souris Ad-GFP. De manière intéressante, l'altération des MAMs par FATE1 a entraîné une hyperglycémie à jeun de ces souris et une intolérance au glucose, mais sans modification de leur sensibilité à l'insuline systémique. Cependant, la signalisation de l'insuline et l'effet inhibiteur de l'insuline sur la production de glucose se trouvent altérés dans les hépatocytes isolés des souris Ad-FATE1, confirmant une IR hépatique. Les souris Ad-FATE1 présentent également une stéatose hépatique marquée comparée aux souris Ad-GFP, qui pourrait s'expliquer par des dysfonctions mitochondriales incluant une diminution

de leur capacité à oxyder les lipides et des atteintes oxydatives intrinsèques aux mitochondries. Ainsi, l'altération des MAMs par FATE1 est suffisante pour induire chez la souris saine une IR et stéatose hépatique et perturber l'homéostasie glucidique et lipidique.

En miroir, nous avons étudié les répercussions métaboliques de la surexpression d'un linker dans le foie des souris. Tout d'abord, nous avons validé *ex-vivo* que la surexpression du linker dans des hépatocytes isolés de souris augmentait les échanges de Ca^{2+} entre le RE et la mitochondrie. De manière intéressante, l'augmentation des MAMs par le linker a prévenu l'effet délétère du palmitate sur la signalisation de l'insuline, suggérant un potentiel effet insulino-sensibilisant du linker.

Afin de confirmer cela *in vivo*, nous avons infecté des souris avec Ad-Ctrl et Ad-linker et challengé les souris avec une diète HFHSD pendant 4 semaines afin de révéler un potentiel effet bénéfique. Nous avons confirmé que la surexpression du linker renforce également les contacts mitochondrie-RE dans le foie des souris, après 4 semaines de surexpression. En effet, par MET, nous avons constaté que le linker induisait non seulement les MAMs dans le foie des souris SD_{4w}, mais aussi prévenait l'altération des MAMs induite par 4 semaines de régime HFHSD. De manière intéressante, cette potentialisation des MAMs par le linker dans le foie des souris a permis de prévenir l'intolérance au glucose induite par la diète obésogène. Nous avons souhaité étudier les répercussions sur l'IR et la stéatose hépatique, cependant ce modèle de surnutrition de 4 semaines ne nous a pas permis de révéler un potentiel effet bénéfique du linker, étant donné que le HFHSD_{4w} n'a pas été suffisant pour induire une IR et une accumulation de lipides dans le foie des souris infectées. En revanche, l'analyse du nombre de gouttelettes lipidiques par coloration au Bodipy dans les hépatocytes des souris infectées et l'analyse de la respiration mitochondriale en présence de palmitate, montrent une tendance à un métabolisme oxydatif mitochondrial augmenté (ns) conduisant à une diminution significative du nombre de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes des souris HFHSD_{4w}. L'ensemble de ces données démontrent donc que l'induction des MAMs dans le foie permet de prévenir l'altération du métabolisme glucidiques induite par une diète obésogène.

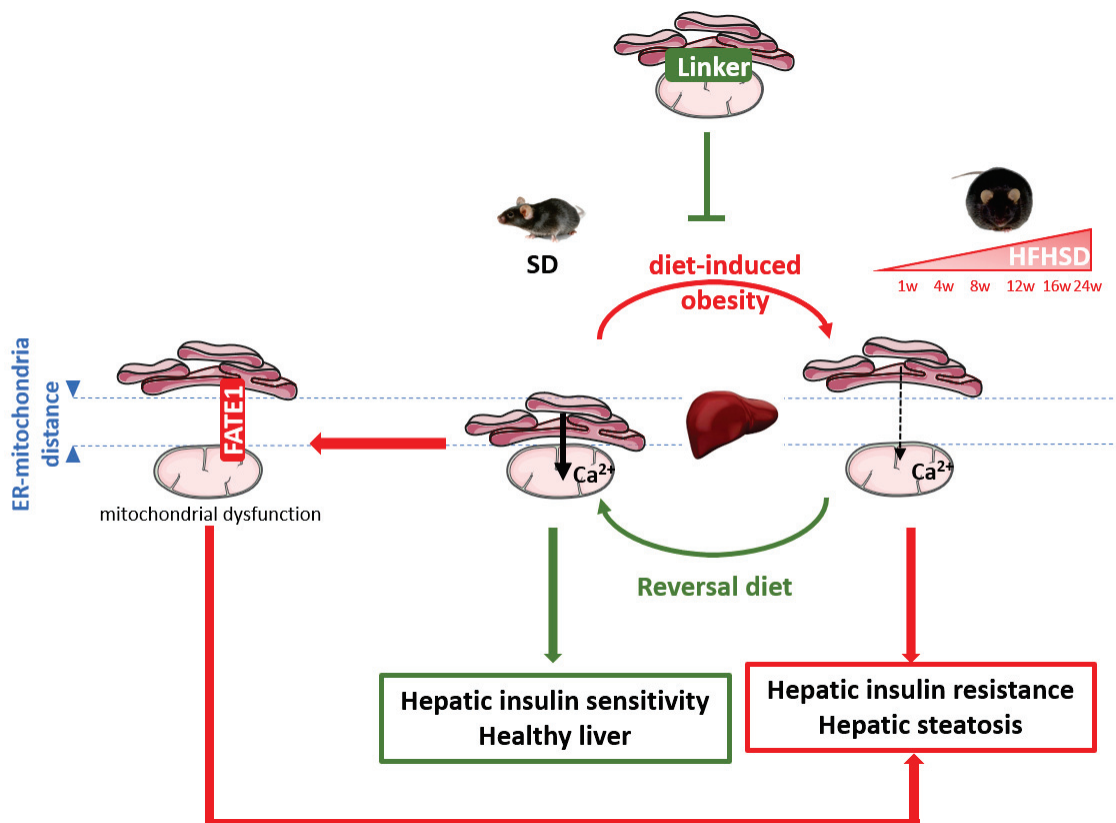
Pour finir, nous avons étudié la réversibilité des atteintes des MAMs par une approche nutritionnelle visant à replacer les souris HFHSD_{16w} sous diète standard pendant 4 ou 8 semaines. Nous avons démontré que le RD_{4w} permettait rapidement d'améliorer le poids corporel des souris obèses, de diminuer le poids et la stéatose de leur foie, d'améliorer leur intolérance au glucose, sans impacter l'IR systémique. La sensibilité à l'insuline du foie des souris RD_{4w} ne s'est pas améliorée puisque la phosphorylation de la PKB médiée par l'insuline, ainsi que l'effet inhibiteur de l'hormone sur la production de glucose, restent altérés dans les hépatocytes de souris RD_{4w}. En accord avec cette absence d'effet sur la sensibilité à l'insuline, la structure des MAMs n'est pas améliorée par le RD_{4w}. De manière intéressante, nous avons constaté que l'amélioration des MAMs arrivait plus tardivement, après un RD de 8 semaines, et coïncidait avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline systémique et hépatique. En

effet, le RD_{8w} améliore la réponse glycémique au cours d'un ITT et potentialise la signalisation à l'insuline et son effet inhibiteur sur la production de glucose qui deviennent similaires au groupe SD_{24w}. Ainsi, nos résultats démontrent que l'amélioration de la stéatose hépatique serait indépendante des MAMs, contrairement à la sensibilité à l'insuline hépatique. Cependant, nos résultats ne permettent pas de conclure si l'amélioration des MAMs est la cause ou la conséquence de l'amélioration du phénotype métabolique.

Conclusion :

En combinant des approches originales et complémentaires dans de nombreux modèles murins, l'ensemble de notre étude apporte un nouveau regard sur la dynamique des MAMs dans l'obésité et l'IR, et démontre que **l'altération structurelle et fonctionnelle des MAMs est un évènement précoce, causal et réversible de l'insulino-résistance et de la stéatose hépatique.**

B. Schéma bilan



C. Article n°1: « ER-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis »

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17

Endoplasmic reticulum-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis

18 Agathe Beaulant, Maya Dia, Bruno Pillot, Marie-Agnes Chauvin, Jingwei Ji-cao, Christine
19 Durand, Nadia Bendridi, Stephanie Chanon, Aurelie Vieille-Marchiset, Hubert Vidal, Ludovic
20 Gomez, Melanie Paillard, and Jennifer Rieusset

21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

Laboratoire CarMeN, UMR INSERM U1060/INRA U1397, Université Claude Bernard Lyon1,
F-69310 Pierre-Bénite et F-69500 Bron, France.

31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

Corresponding author: Jennifer RIEUSSET
Address: Laboratoire CarMeN
U1060 INSERM INRA 1397 CARMEN
Hôpital Lyon Sud - Secteur 2
Bâtiment CENS ELI-2D
165 Chemin du Grand Revoyet
F - 69310 PIERRE BENITE
Phone number: 33 (0)4 26 23 59 20, Fax: 33 (0)4 26 23 59 16
E-mail: jennifer.rieusset@univ-lyon1.fr

51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Word count: 8956 words

Number of Figures: 8

Keywords: hepatic insulin resistance, hepatic steatosis, mitochondria-associated membranes,
calcium signalling, mitochondria oxidative metabolism, lipid oxidation.

Conflict of interest: The authors have no conflict of interest for this work.

Financial support: This work was supported by INSERM and by a grant from “Fondation de
France” (n°00056853) to JR. AB was supported by a research fellowship from the French
government of higher education and research.

Author contribution: AB and JR designed the experiments, researched and analysed data,
contributed to discussion, and wrote the manuscript. MD, BP, MAB., JJ, CD, NB, SC, AVM,
LG and MP researched data. MP, LG and HV contributed to discussion and reviewed/edited
the manuscript. JR is the guarantor of this work and, as such, had full access to all the data in
the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data
analysis.

Abstract

Background & aims: Hepatic insulin resistance in the context of obesity and type 2 diabetes was recently associated with ER-mitochondria miscommunication, even if ER-mitochondria contact sites (MAMs) could have a dual role. Particularly, both the stage of the pathology and the candidate protein studied or modulated at MAMs might contribute to the controversy on this topic. Here, we aim to determine whether organelle miscommunication could play a time-dependent and causal role in hepatic insulin resistance and steatosis.

Methods: We analysed hepatic ER-mitochondria interactions and calcium exchange in diet-induced obese mice in a time dependent and reversible manner, and investigated their causal role in hepatic insulin resistance and steatosis by expressing in the mouse liver non-endogenously expressed organelle spacer or linker.

Results: We found that the disruption of ER-mitochondria interactions and calcium exchange was an early defect preceding hepatic insulin resistance and steatosis in diet-induced obese mice. Disrupting structural and functional ER-mitochondria interactions through the hepatic overexpression of the organelle spacer FATE1 was sufficient to alter the hepatic insulin signalling and action, and to disrupt glucose homeostasis in healthy mice. In addition, FATE1-mediated organelle miscommunication disrupted lipid-related mitochondrial oxidative metabolism and induced hepatic steatosis. At opposite, the reinforcement of ER-mitochondria interactions through the hepatic expression of a synthetic organelle linker prevented the diet-induced glucose intolerance after 4 weeks of overnutrition. Lastly, an 8-week reversal diet reversed hepatic organelle miscommunication, insulin resistance and steatosis in obese mice.

Conclusions: ER-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis, that can be reversed by switching on a healthy diet. Therefore, the nutritional targeting of MAMs might contribute to restore whole-body glucose and lipid homeostasis.

Lay summary:

Based on literature, the interactions between endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria could play a dual role in hepatic insulin resistance and steatosis during chronic obesity. Herein, we reappraise the time-dependent regulation of hepatic ER-mitochondria interactions and calcium exchange in diet-induced obese mice and their causal role in hepatic insulin resistance and steatosis. We show that organelle miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis, that can be improved by nutritional strategies.

Highlights:

- The reduction of ER-mitochondria interactions and calcium exchange are an early event preceding hepatic insulin resistance and steatosis in diet-induced obese mice.
- Disrupting ER-mitochondria communication is sufficient to induce hepatic insulin resistance and steatosis.
- Reinforcing ER-mitochondria interactions prevents diet-induced glucose intolerance.
- Switching on a healthy diet reverses ER-mitochondria miscommunication and improves hepatic insulin sensitivity and steatosis in obese mice

Introduction

1
2
3
4 Obesity, type 2 diabetes (T2D) and non-alcoholic fatty liver diseases (NAFLD) are
5 important metabolic disorders with increasing incidence and still unmet medical solutions.
6 These pathologies are associated with hepatic insulin resistance which is a major contributor of
7 fasting and postprandial hyperglycemia, as well as with hepatic lipid accumulation. Therefore,
8 understanding the molecular mechanisms of hepatic insulin resistance and steatosis is crucial
9 for developing new therapeutic strategies to improve whole-body glucose and lipid
10 homeostasis.
11

12
13
14
15
16 Organelle dysfunctions, particularly endoplasmic reticulum (ER) stress and
17 mitochondria alterations, are central in the physiopathology of hepatic insulin resistance and
18 steatosis ¹. Beyond the alterations of each organelle, their miscommunication recently emerged
19 as a new mechanism of altered hepatic insulin action ² and of hepatic lipid accumulation ³.
20 Indeed, ER and mitochondria interact at contact sites known as mitochondria-associated
21 membranes (MAMs) or mitochondria-ER contacts (MERCs), where they can exchange
22 phospholipids and calcium (Ca²⁺), hence modulating key signalling pathways and regulating
23 cellular homeostasis ⁴. Particularly, MAMs were recently identified as key hubs of nutrient and
24 hormonal signalling regulating insulin sensitivity and metabolic flexibility ⁵. Indeed, we
25 demonstrated that MAM dynamics is controlled by nutrient availability in mouse liver ⁶ and is
26 important for the control of hepatic ⁷ and muscular ⁸ insulin action, as well as for glucose-
27 stimulated insulin secretion by pancreatic β cells ⁹. Importantly, ER-mitochondria
28 communication is impaired in both liver ⁷ and skeletal muscle of different mouse models of
29 obesity and T2D. It is also altered in pancreatic β cells under glucotoxicity ⁹, as well as in β
30 cells of type 2 diabetic patients ¹⁰. In addition, recent studies also demonstrated that MAM
31 dynamics regulates hepatic ¹¹ and systemic ¹² lipid homeostasis, and that ER-mitochondria
32 miscommunication leads to hepatic steatosis ¹¹. Due to the crucial role of MAMs in metabolic
33 homeostasis in several organs, targeting of MAMs could be therefore a novel efficient strategy
34 to improve glycemia and dyslipidemia in the context of metabolic diseases.
35

36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51 However, the precise role of MAMs in the control of insulin action is complex and not
52 yet fully elucidated, mostly because MAMs are highly dynamic structure that can be modulated
53 in few minutes by numerous physiological signals ⁵. Furthermore, MAMs are heterogeneous
54 structures with different thickness, each one characterized by a specific function ¹³, and with
55 different protein actors which could have other functions outside of MAMs. When studied in
56 rodent models, MAM dynamics might also be influenced by several parameters, including the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 genetic background and the environmental housing of the mice that may lead to different signals
2 for example from the microbiota, the nutritional state of mice at the time of experiment, the
3 different stages and evolution of the pathology and eventually the zonation of hepatocytes when
4 looking at the liver. In addition, the methodologies and tools used to analyse MAM integrity
5 and function could differ between studies. We however demonstrated that different approaches,
6 such as transmission electronic microscopy (TEM) and *in situ* proximity ligation assay (PLA),
7 performed in isolated cells or in crude tissues provided similar results ^{6,7}. Nevertheless, all these
8 parameters have led to potential controversial results in the literature, and some authors reported
9 that the reinforcement of MAMs, instead of their disruption, can also be associated with hepatic
10 and muscular insulin resistance ^{14,15}. Therefore, further works are still required to definitively
11 define the role of MAMs in the control of cellular metabolism.
12
13
14
15
16
17
18
19

20 In the present study, we decided to reappraise the time-dependent regulation of
21 structural and functional ER-mitochondria interactions in mouse liver during diet-induced
22 obesity and insulin resistance. We also aimed at investigating the causality of ER-mitochondria
23 miscommunication in hepatic insulin resistance and steatosis, by modulating MAMs with non-
24 endogenously expressed organelle spacer and linker. We found herein that reduced ER-
25 mitochondria interactions and Ca²⁺ exchange are an early event during diet-induced obesity,
26 which precedes hepatic insulin resistance and steatosis, while switching back to a healthy diet
27 for 8 weeks reverses organelle miscommunication and improves hepatic insulin sensitivity and
28 steatosis. Importantly, disrupting MAMs with a spacer in the liver of healthy mice alters insulin
29 sensitivity and induces hepatic lipid accumulation, while reinforcing MAMs *in vivo* with a
30 linker improves diet-induced alterations of glucose homeostasis. Altogether, our data highlight
31 that ER-mitochondria miscommunication is an early, causal and reversible trigger of hepatic
32 insulin resistance and steatosis.
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Material and Methods

Mouse experiments

All mice studies were performed in accordance with the French Guide for the Care and Use of Laboratory Animals and were approved by the institutional animal research committee from PBES (ENS, Lyon) and/or the French ministry (#12658-2017112816023176, 21767-2019082214036668). For the kinetic nutritional study, 4-week-old male C57Bl/6J mice (Envigo) were acclimated to the animal facility for one week and then fed either with standard diet (SD) or a high fat high sucrose diet (HFHSD, 260-HF from SAFE) for 1 (SD_{1w}/HFHSD_{1w}), 4 (SD_{4w}/HFHSD_{4w}), 8 (SD_{8w}/HFHSD_{8w}), 12 (SD_{12w}/HFHSD_{12w}) or 16 weeks (SD_{16w}/HFHSD_{16w}). For the reversal diet protocol, mice were fed either with a SD or with a HFHSD for 16 weeks and then part of HFHSD_{16w} mice were switched on a SD for either 4 or 8 additional weeks (HFHSD_{16w}+RD_{4w/8w}), whereas a group of control mice were kept either on SD or on HFHSD (SD_{20w/24w} and HFHSD_{20w/24w}, respectively). For protocol with the organelle spacer, 12-week-old male C57Bl/6J mice (Envigo) were infected (retro-orbital injection, 10⁹ infection forming units/mouse) with recombinant adenovirus expressing Ad-GFP or Ad-mCherry (as controls depending of method constraints) and Ad-FATE1⁸ (fetal and adult testis-expressed 1) and mice were analysed 15 days later. For the protocol with the organelle linker, 4-week-old male C57Bl/6J mice (Envigo) were infected (retro-orbital injection, 10⁹ infection forming units/mouse) with recombinant adenovirus expressing Ad-Ctrl (mAKAP1-mRFP, as a control) or Ad-Linker (mAKAP1-mRFP-yUBC6)¹⁶ and then put at once either on a SD or a HFHSD for 4 weeks. Few days before the end of each protocol, glucose and insulin tolerance tests (GTT and ITT, respectively) were performed on 6h-fasted mice. For that, glucose (2mg/g body weight) or insulin (0.75mU/g body weight) were injected intraperitoneally and glycemia was monitored using a glucometer at the indicated time points. At the end of each protocol, overnight fasted mice were weighted, anesthetized with isoflurane for blood puncture and sacrificed by cervical dislocation for liver removal.

Isolation of primary mouse hepatocytes

Primary mouse hepatocytes (PMH) were isolated by a two-step collagenase perfusion method via the portal vein of mice. The liver was first perfused by portal vein at 37°C during 8 minutes with a Krebs-Ringer-Bicarbonate buffer (KRB) (NaCl 7g/l, KCl 0.35g/l, KH₂PO₄ 0.16g/l, MgSO₄ 0.29 g/l, NaHCO₃ 2 g/l, pH7.4) supplemented with 0.5mM EGTA, and then with 0.066% of collagenase type IV (Sigma) diluted in KRB supplemented with 1.3mM CaCl₂ until

1 the liver began to swell. After excising liver and dispersing the cells, the liver cell suspension
2 was centrifuged 3 minutes at 600 g at 4°C. After two washing steps with KRB supplemented
3 with 1% bovine serum albumine, the hepatocytes were re-suspended in cold culture medium
4 (DMEM 3g/l glucose (PAA) supplemented with 10% fetal-calf serum (FCS), 2mM L-
5 glutamine, 1% penicillin streptomycin solution, 7.5mM DL-sodium lactate). The percentage of
6 intact cells was determined by trypan blue exclusion method (on an average 70–90% of the
7 viable cells). PMH were plated on collagen-coated tissue culture plates in DMEM medium and
8 kept in a humidified cell culture incubator at 37°C and 5% CO₂. After 3-4 hours, PMH should
9 be attached to the collagen-coated dish and subsequently, the culture medium was removed and
10 replaced by fresh DMEM medium during 24h before experiments of insulin signalling or
11 glucose production. Alternatively, 3-4h post-seeded PMH were infected with 1 or 2
12 adenoviruses (spacer/linker and/or 4mtD3CPV) and incubated for 36 hours before Ca²⁺
13 measurements.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Analysis of insulin signalling**

27 Insulin-stimulated protein kinase B (PKB) phosphorylation was analysed either *in vivo* in the
28 liver of mice, or *ex-vivo* in isolated PMH. *In vivo*, 6h-fasted mice were injected with either NaCl
29 or insulin (10mU/g), and 15 minutes later mice were sacrificed and the liver rapidly removed
30 and frozen in liquid nitrogen. *Ex-vivo*, PMH were depleted in serum for 3 hours and then
31 incubated in DMEM without FCS in absence or presence of insulin (10⁻⁷M) for 15 minutes.
32
33
34
35
36
37

38 **Transmission electronic microscopy**

40 Fixation and post-treatment of liver biopsies, as well as the observations of ultrathin sections,
41 were performed as previously described ¹⁷. For each sample, 15 pictures at 25,000x
42 magnification were taken. ER and mitochondria were delimited using the Fiji® software and
43 the fraction of mitochondrial membrane in contact with ER within a 50nm range was calculated
44 and normalized to the mitochondrial perimeter and expressed as total % of organelle contact.
45 We also calculated the different types of MAMs according to the width of the contacts (0-10,
46 10-20, 20-30, 30-40 and 40-50 nm), as previously described ¹⁸. Results are the mean of all
47 analysed mitochondria.
48
49
50
51
52
53
54
55

56 ***In situ* Proximity Ligation Assay**

58 ER-mitochondria interactions were assessed by *in situ* proximity ligation assay (PLA, kit from
59 Sigma), by targeting the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) at the outer
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

mitochondrial membrane and the inositol trisphosphate receptor 1 (IP3R1) at the ER membrane, as previously described¹⁹ and thoroughly validated^{6,7}. A green fluorescent kit was used in fixed PMH, whereas a bright-field kit was used on paraffin-embedded liver, using the following primary antibodies: VDAC1 (Abcam, ab14734) and IP3R1 (Abcam, ab5804). In both cases, we analysed the VDAC1-IP3R1 dots per cell (after nucleus staining) on a minimum of 10 images/sample in 3-10 independent experiments and we expressed the results as the average of all analysed cells.

Calcium imaging

Measurements were performed at 37°C using a wide-field Leica DMI6000B microscope equipped with a 40x objective and an ORCA-Flash4.0 digital camera (HAMAMATSU). All Ca²⁺ measurements were performed, in the absence of extracellular Ca²⁺, in the following buffer (NaCl 1.4mM; KCl 50mM; MgCl₂ 10mM; HEPES 100mM; glucose 100mM EGTA 1mM, pH 7.4), after 36h of infection with Ad-4mtD3CPV overexpressing the FRET-based mitochondrial ratiometric Ca²⁺ probe²⁰. After 2-min basal fluorescence measurement, Na-ATP (100µM, added in puff) was added to stimulate ER-mitochondria Ca²⁺ exchange and acquisitions were continued during 2 min on 1 field/dish. The fluorescence ratio YFP/CFP was analysed with MetaFluor 6.3 (Universal Imaging) after removing background fluorescence. Results represent the average of all analysed cells in 5 dishes/condition from 4-6 independent experiments. In each case, average curves are illustrated and quantitative analyses of basal [Ca²⁺]_m, delta [Ca²⁺]_m (corresponding to the difference between basal and maximum peak) and of the area under the curve (AUC) [Ca²⁺]_m were performed.

Western Blot

After treatments, proteins of PMH or of mouse liver were lysated in RIPA buffer (150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL® CA-630, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0) and protein expression was quantified after SDS-PAGE (10%) migration using the following antibodies: PKB (#4691, Cell Signaling), pS473PKB (#4060, Cell Signaling), FATE1 (sc-101220, Santa Cruz), GFP (#2555, Cell Signaling), mCherry (ab167453, Abcam), RFP (ab62341, Abcam), Grp75 (sc-133137, Santa Cruz), VDAC1 (ab 14734, Abcam).

Glucose production

To evaluate glucose production, isolated PMH were incubated for 24 hours in KRB buffer containing CaCl₂ (1.3mM), supplemented with lactate (20mM), pyruvate (2mM), and forskolin

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

(10 μ M), in the presence or absence of insulin (10⁻⁷ M). Glucose levels were measured in the culture medium using a luminescent kit (Glucose-Glo(TM) Assay from Promega) and normalized by protein content of PMH. Results are expressed as the % of inhibitory effect of insulin on glucose production.

Lipid accumulation

Lipid accumulation in PMH was imaged and quantified using the Bodipy® lipid probe. For mouse liver, steatosis was quantified either by oil red O staining (ORO-k-250, Biognost) of fixed liver section or by quantifying triglyceride (TG) levels in liver lysates using a biochemical kit (Biolabo®).

Mitochondrial respiration

Mitochondrial oxygen consumption rate was measured either on intact or permeabilized PMH (500 000 hepatocytes) using the OROBOROS analyser at 25°C. For fatty acid oxidation (FAO)-related respiration, intact PMH were incubated in FAO assay buffer (111mM NaCl, 4.7mM KCl, 1.25mM CaCl₂, 2mM MgSO₄, 1.2mM NaH₂PO₄), supplemented with 2.5mM glucose, 0.5mM carnitine and 5mM Hepes (pH 7.4). Kinetic studies were performed by sequential addition of palmitate (200 μ M), oligomycin (2 μ M), FCCP (25 μ M), and rotenone/antimycine A (0.5 μ M/4 μ M). Etomoxir (40 μ M) was used to inhibit FAO. Results are expressed as both basal and FCCP-stimulated maximal respiration. For complexes-related respiration, PMH were permeabilized with digitonin (10 μ g/ml) and incubated in buffer containing 50mM Tris, 100mM KCl, 1mM EGTA, 5mM KH₂PO₄, and 1 mg/ml BSA, pH 7.4. Kinetic studies were performed by the sequential addition of glutamate/malate (20/5mM, complex I), ADP (2mM, to activate state 3 respiration), rotenone (0.5 μ M, inhibitor of complex I), succinate (20mM, complex II), thenoyltrifluoroacetone (TTFA, 40 μ M, inhibitor of complex II), N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD)/ascorbate, 1/10mM, complex IV) and azide (15mM, inhibitor of complex IV). Data are analysed using the Oroboros DatLab4 software and expressed as nanomoles of oxygen per minute per mg of total proteins.

Statistical analysis

Data are expressed as the mean \pm SEM. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software. Comparison between two groups was performed either with unpaired Student's t-test or Mann-Whitney depending on the normality of the data. Comparisons between more than 2 groups were analysed using ANOVA. Significance was defined as a value of p<0.05.

Results

Reduced ER-mitochondria interactions and Ca²⁺ exchange in liver of HFHSD are an early event preceding hepatic insulin resistance and steatosis.

In order to determine whether ER-mitochondria miscommunication during diet-induced obesity is time-dependent, we performed a kinetic analysis of MAM structure and function in the liver of mice following 1, 4, 8, 12 and 16 weeks of a SD or a HFHSD feeding. As shown in Figure 1A, HFHSD mice gained more weight as soon as 1 week of HFHSD feeding compared to SD mice. In addition, HFHSD mice became glucose intolerant as soon as 1 week of HFHSD feeding (Figure 1B), whereas they developed systemic insulin resistance later, after 12 weeks of HFHSD (Figure 1C). The weight of the liver (Figure 1D) and its content in lipids (Figure 1E) were significantly increased only after 12 weeks of HFHSD. Then, we analysed MAM structure in the liver of SD and HFHSD mice using *in situ* PLA. We previously validated that measurement of the VDAC1-IP3R1 proximity by *in situ* PLA is a reliable technique to quantify ER-mitochondria physical interactions¹⁹. As shown in Figure 1F and Supplementary Figure 1A-E, we observed that VDAC1-IP3R1 proximity was reduced as soon as after one week of HFHSD, and this reduction was overall maintained through all the HFHSD feeding period. To confirm these data, we also used TEM as a largely admitted methodology to investigate structural ER-mitochondria interactions²¹. We analysed the proportion of mitochondrial membranes in close contact (<50nm) with ER relative to the total mitochondria membrane in liver sections of mice fed with SD or HFHSD at both extremities of the nutritional protocol (1 and 16 weeks), as well as the occurrence of contacts depending on the gap width, ranging from 0 to 50 nm. We found that an early reduction of organelle interactions after 1 week of HFHSD feeding concerned only the closest contacts (0-10 nm) (Figure 1G, Supplementary Figure 2A), whereas all the contacts, ranging from 0 to 50 nm in width, are significantly reduced by 16 weeks of HFHSD feeding (Figure 1H, Supplementary Figure 2B), illustrating the worsening of the phenotype during overnutrition. In agreement, the number of contact per mitochondria is significantly altered only after 16 weeks of HFHSD (Supplementary Figure 2C). Altogether, these data demonstrate that structural ER-mitochondria interactions are disrupted early during diet-induced obesity, long before insulin resistance and liver steatosis.

Next, we analysed whether the observed ER-mitochondria miscommunication during HFHSD feeding resulted in alteration of MAM functions. As MAMs are key platforms for ER-mitochondria Ca²⁺ exchange^{22,23}, we imaged in isolated primary hepatocytes, the IP3R-mediated mitochondrial Ca²⁺ accumulation using the FRET-based 4mtD3CPV mitochondrial

1 Ca²⁺ sensor ²⁰. For that, primary hepatocytes of SD and HFHSD mice following 1, 4 and 16
2 weeks of diet were isolated and cultured. We first confirmed that the primary hepatocytes of
3 HFHSD_{16w} mice conserved the alterations of both insulin-stimulated PKB phosphorylation
4 (Supplementary Figure 3C) and glucose production (Supplementary Figure 3F) once isolated
5 and cultured, whereas no alteration was found as expected after 1 and 4 weeks of HFHSD
6 feeding (Supplementary Figure 3A-B and 3D-E). Then, primary hepatocytes were infected 4 to
7 6h after isolation with an adenovirus expressing the mitochondria-targeted Ca²⁺ probe (Ad-
8 4mtD3CPV, ²⁰). Thirty-six hours after infection, both basal and ATP-stimulated mitochondrial
9 Ca²⁺ concentration was measured in the absence of extracellular Ca²⁺ levels, as previously
10 performed ⁹. As shown in Figure 2A, one week of HFHSD feeding significantly reduced ATP-
11 stimulated mitochondrial Ca²⁺ accumulation (at both delta-peak and AUC levels, Figure 2C and
12 2D respectively), whereas basal mitochondrial levels were not modified (Figure 2B). As
13 illustrated in Figure 2E, we confirmed the reduction of ER-mitochondria Ca²⁺ exchange after 4
14 weeks of HFHSD feeding (Figure 2G-H) with no alteration of basal mitochondrial Ca²⁺ levels
15 (Figure 2F). Consequently, short diet-induced disruption of organelle interactions is associated
16 with reduced organelle Ca²⁺ exchange, confirming early organelle miscommunication during
17 diet-induced obesity. Surprisingly, after 16 weeks of HFHSD (Figure 2I), we measured a
18 significant increase of mitochondrial Ca²⁺ levels at both basal levels (Figure 2J) and following
19 ATP stimulation (at both delta-peak and AUC levels, Figure 2K and 2L, respectively). This
20 observation led us to postulate that either the function of MAMs is differentially regulated from
21 the structure after 16 weeks of HFHSD feeding, or that the increase of organelle Ca²⁺ exchange
22 in obese hepatocytes could reflect an adaptation process. To address this hypothesis, we decided
23 to measure ER-mitochondria physical interactions by *in situ* PLA in infected hepatocytes of
24 SD_{16w} and HFHSD_{16w} mice to mimic the conditions of Ca²⁺ measurements. As shown in
25 Supplementary Figure 3G, VDAC1-IP3R1 proximity is significantly increased in infected
26 HFHSD_{16w} hepatocytes compared to SD_{16w} hepatocytes, suggesting that infection of
27 hepatocytes with the mitochondrial Ca²⁺ sensor modified the MAM phenotype observed *in situ*
28 in the liver of mice. Taken together, these results demonstrate that disrupted ER-mitochondria
29 interactions and Ca²⁺ transfer are an early defect, present as soon as 1 and 4 weeks of
30 overnutrition, and preceding diet-induced hepatic insulin resistance and steatosis.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 **Disruption of ER-mitochondria interactions and calcium exchange is sufficient to induce** 57 **hepatic insulin resistance and steatosis** 58 59 60 61 62 63 64 65

1 To determine whether ER-mitochondria miscommunication could play a causal role in
2 diet-induced hepatic insulin resistance and steatosis, we investigated whether the experimental
3 disruption of MAMs was sufficient per se to alter glucose and lipid homeostasis in lean mice.
4 As no MAM protein is specific to ER-mitochondria contact sites, we decided to express the
5 non-endogenously expressed organelle spacer FATE1²⁴ in the liver of mice using an adenovirus
6 (Ad-FATE1), as previously performed in skeletal muscle⁸. First, we validated the efficacy of
7 Ad-FATE1 to disrupt organelle interactions and Ca²⁺ transfer in primary mouse hepatocytes.
8 As expected, FATE1 expression reduced VDAC1-IP3R1 proximity, measured by *in situ* PLA,
9 in 36 hours-infected hepatocytes (Figure 3A). In agreement, ATP-stimulated mitochondrial
10 Ca²⁺ accumulation was significantly reduced in Ad-FATE1 hepatocytes compared to Ad-
11 mCherry hepatocytes (illustrated in Figure 3B and quantified in 3D-E), confirming the FATE1-
12 mediated organelle miscommunication. Basal mitochondrial Ca²⁺ levels were surprisingly
13 increased by acute FATE1 expression (Figure 3C), suggesting an early adaptation of the
14 mitochondrial Ca²⁺ concentration to overcome the acute reduced ER-mitochondria Ca²⁺
15 transfer. Importantly, this reduction of organelle communication was associated with altered
16 insulin-stimulated PKB phosphorylation in Ad-FATE1 hepatocytes (Figure 3F), suggesting that
17 acute FATE1-related MAM disruption could induce hepatic insulin resistance.

18 Therefore, we infected 12 weeks old male C57BL/6 mice with either Ad-mCherry (as
19 control) or Ad-FATE1 (10⁹ pfu/mouse). Fifteen days later, around 50% of hepatocytes were
20 infected in the liver of infected mice with either adenovirus (Supplementary Figure 4A). The
21 expression of FATE1 was specific to the liver as it was not found in either skeletal muscle or
22 adipose tissue (Supplementary Figure 4B). Subcellular fractionation of the liver confirmed that
23 FATE1 was well targeted to the ER and present in MAM fractions, whereas it was not found
24 in pure mitochondria fractions (Supplementary Figure 4C). Then, we analysed ER-
25 mitochondria interactions in the liver of infected mice using both *in situ* PLA and TEM. FATE1
26 expression resulted in reduced VDAC1-IP3R1 proximity (Figure 4A) and in a reduced
27 proportion of mitochondrial membranes in close contact with ER for the closest contacts (0-10
28 and 10-20 nm, Figure 4B) in the liver of infected mice. Then, we isolated hepatocytes from Ad-
29 mCherry and Ad-FATE1 mice and we measured mitochondrial Ca²⁺ levels. As illustrated in
30 Figure 4C, chronic FATE1 expression significantly reduced both basal (Figure 4D) and ATP-
31 stimulated (Figure 4E-F) mitochondrial Ca²⁺ accumulation. Altogether, these data demonstrate
32 that FATE1 overexpression disrupted, as expected, both organelle interactions and Ca²⁺
33 exchange in the mouse liver.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Next, we investigated the repercussions of FATE1-mediated organelle miscommunication on metabolic homeostasis. Ad-FATE1 mice had similar body weight ($25.2\pm 0.57\text{g}$ vs $23.9\pm 0.52\text{g}$, $n=10$ mice/group, ns) and liver weight ($1.26\pm 0.07\text{g}$ vs $1.5\pm 0.11\text{g}$, $n=10$ mice/group, ns) than Ad-mCherry mice. We analysed systemic glucose homeostasis by performing both GTT (Figure 5A) and ITT (Figure 5B) on infected mice. Ad-FATE1 mice showed significant hyperglycemia after 6 hours of fasting (Figure 5C), and glucose intolerance during GTT (Figure 5D); while systemic insulin sensitivity was not modified by hepatic overexpression of FATE1 (Figure 5E). Nevertheless, when analysing hepatic insulin sensitivity, we found a reduction of insulin-stimulated PKB phosphorylation in the liver of Ad-FATE1 mice compared to Ad-mCherry mice (Figure 5F). Additionally, insulin-mediated inhibition of glucose production is dampened in chronic Ad-FATE1 vs Ad-mCherry isolated hepatocytes (Figure 5G). Lastly, we investigated hepatic lipid accumulation and found that chronic FATE1 expression induced hepatic steatosis, as both oil red O staining (Figure 5H) and biochemically measured triglyceride levels (Figure 5I) were increased in Ad-FATE1 liver. Taken together, these data demonstrate that FATE1-mediated organelle miscommunication alters hepatic insulin sensitivity and glucose homeostasis and induces hepatic steatosis.

We further asked if hepatic steatosis in Ad-FATE1 mice could be linked to reduced mitochondrial lipid oxidation secondary to organelle miscommunication. To this end, we measured palmitate-linked mitochondrial oxygen consumption in intact hepatocytes of Ad-mCherry and Ad-FATE1 mice. As shown in Figure 6A, FATE1 overexpression significantly reduced both basal and maximal FCCP-induced mitochondrial respiration under palmitate. Incubation of hepatocytes with etomoxir, an inhibitor of lipid oxidation, prevented as expected the FCCP-induced mitochondrial respiration in both Ad-mCherry and Ad-FATE1 PMH. However, both basal and maximal respiration were still lower in presence of etomoxir in Ad-FATE1 PMH compared to Ad-mCherry PMH (Figure 6A), suggesting potential additional intrinsic mitochondrial dysfunction. Therefore, we measured mitochondrial respiration in permeabilized hepatocytes in presence of substrates of complex I, II or IV. As shown in Figure 6B, basal mitochondria oxygen consumption was not modified by FATE1 expression, but maximal respiration in response to complexes II and IV activation was significantly reduced in Ad-FATE1 permeabilized hepatocytes, whereas a non-significant reduction was observed with complex I substrates. These effects are observed independently of change in mitochondria density (Figure 6C). Altogether, these data suggest that FATE1-mediated hepatic steatosis could be linked to both reduced mitochondrial lipid oxidation and intrinsic mitochondrial dysfunction.

Reinforcement of MAMs prevents HFHSD-induced glucose intolerance in mice

Then, we asked whether the reinforcement of organelle communication could therefore prevent diet-induced alterations of metabolic homeostasis. For that, we decided to use a previously developed organelle linker¹⁶ and firstly validated it in isolated primary mouse hepatocytes. As shown in Figure 7A, the adenovirus-mediated expression of the linker (Ad-Linker) increased the ATP-stimulated mitochondrial Ca²⁺ accumulation (at both delta-peak and AUC levels, Figure 7C-D, respectively), without modifying basal mitochondrial Ca²⁺ levels (Figure 7B), after 36 hours of infection. Interestingly, the Ad-linker effect was associated with a reduction of palmitate-induced alterations of insulin-stimulated PKB phosphorylation (Figure 7E), showing that reinforcing ER-mitochondria communication could improve hepatic insulin sensitivity. To assess this effect *in vivo*, we overexpressed the linker in the mouse liver by retro-orbital injection and consecutively challenged them with an HFHSD for 4 weeks. The duration of the HFHSD feeding in this preventive protocol was chosen in order to maintain the hepatic overexpression of the linker and because 4 weeks of HFHSD feeding was sufficient to disrupt the organelle communication (Figure 1). We confirmed that the infection of hepatocytes was conserved after one month of feeding with either adenovirus (Supplementary Figure 5A). Analysis of ER-mitochondria interactions by TEM showed that the linker significantly increased physical connections between organelle in both SD and HFHSD mice (Figure 7F, Supplementary Figure 5B), and even prevented the diet-induced organelle miscommunication (Figure 7F, Supplementary Figure 5B). Then, we analysed the repercussion on glucose homeostasis by performing a GTT. As shown in Figure 7G, the linker expression in SD_{4w} mice did not affect the GTT, but markedly improved the HFHSD_{4w}-induced glucose intolerance in mice, with a significant reduction of the area under curve (AUC) in Ad-Linker HFHSD_{4w} mice compared to Ad-Ctrl HFHSD_{4w} mice. We further analysed hepatic insulin sensitivity (Supplementary Figure 6A) and lipid accumulation (Supplementary Figure 6B) in the infected SD_{4w} and HFHSD_{4w} mice. However, as 4 weeks of HFHSD feeding was not sufficient to alter insulin sensitivity and induced hepatic steatosis, we did not find any beneficial effects of the linker on these parameters. Taken together, these data show that the linker-mediated reinforcement of organelle communication prevents the early diet-induced glucose intolerance, but the short duration of the HFHSD feeding was not sufficient to reveal an effect on hepatic insulin sensitivity and steatosis.

We further analysed the effects of the linker on lipid-related mitochondrial respiration. As shown in Figure 7H, the linker expression had a tendency to increase both basal and maximal

1 FCCP-induced mitochondrial respiration under palmitate, in both SD_{4w} and HFHSD_{4w}
2 hepatocytes compared to Ad-Ctrl cells, with even a significant induction of basal respiration
3 with the linker under HFHSD. However, 4 weeks of HFHSD feeding did not alter palmitate-
4 related mitochondrial respiration compared to SD_{4w}. Interestingly, the linker expression
5 reduced the number of lipid droplets in both SD_{4w} and HFHSD_{4w} hepatocytes, becoming
6 significant only after HFHSD feeding (Figure 7I). Altogether, these data suggest that the linker-
7 mediated reinforcement of organelle communication tends to increase the mitochondrial lipid
8 oxidation and to reduce the number of lipid droplets in the liver of infected mice, despite that
9 the duration of HFHSD feeding was not sufficient to strongly alter lipid homeostasis in infected
10 mice.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 **ER-mitochondria miscommunication is reversible when improving hepatic insulin** 21 **resistance and steatosis**

22 As experimental modulation of organelle communication confirms a role of MAMs in
23 the control of glucose homeostasis, we lastly investigated whether the disruption of MAMs in
24 the liver of diet-induced obese mice could be improved by a healthy diet. To this end, we
25 switched the HFHSD_{16w} mice on a SD for either 4 or 8 additional weeks (HFHSD_{16w}+RD_{4w/8w}),
26 whereas a group of control mice were kept either on SD or on HFSD (SD_{20w/24w} and
27 HFSD_{20w/24w}, respectively). The acute reversal diet (RD_{4w}) was sufficient to partially improve
28 body weight (Figure 8A), fasted glycemia (Figure 8B) and glucose intolerance (Figure 8C), as
29 well as hepatic steatosis (Figure 8D) compared to HFHSD_{20w} mice. However, both systemic
30 and hepatic insulin resistance was not significantly improved by 4 weeks of reversal diet (Figure
31 8E and 8F, respectively). Importantly, a longer reversal diet (RD_{8w}) reproduced all the
32 improvements of the short one (Figures 8H-K), and further improved systemic (Figure 8L) and
33 hepatic (Figure 8M) insulin sensitivity. In agreement, the metabolic effect of insulin on hepatic
34 glucose production is also improved by the long reversal diet in RD_{8w} hepatocytes
35 (Supplementary Figure 7), confirming that a longer reversal diet efficiently improved hepatic
36 insulin sensitivity. Then, we analysed in all mouse groups the hepatic ER-mitochondria
37 interactions by *in situ* PLA, in order to determine whether they followed or not the modulation
38 of hepatic insulin sensitivity. As shown in Figure 8G and 8N, we confirmed the reduction of
39 VDAC1-IP3R1 proximity in both HFHSD_{20w} and HFHSD_{24w} mice compared to their respective
40 SD mice. Importantly, only the long reversal diet (RD_{8w}) restored ER-mitochondria
41 communication in the mouse liver (Figure 8N), confirming the tight relationship between
42 organelle interactions and hepatic insulin sensitivity. Altogether, these data demonstrate that
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

the HFHSD-induced organelle miscommunication is reversible by a normal diet and is regulated in mirror of systemic and hepatic insulin sensitivity.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Discussion

1
2 The dynamic nature of MAMs led to controversial results regarding its link with hepatic
3 insulin resistance in mouse models of chronic obesity and T2D ^{7,14}; therefore, we tried to better
4 understand the time-dependent regulation of MAMs during diet-induced obesity and insulin
5 resistance and to determine the causality of MAM dysfunction on hepatic insulin resistance and
6 steatosis. Collectively, our data clearly demonstrate that the reduction of both ER-mitochondria
7 interactions and Ca²⁺ exchange in the mouse liver are an early, causal and reversible trigger of
8 hepatic insulin resistance and steatosis.
9

10
11 Throughout our study, we performed a substantial and careful analysis combining
12 several complementary imaging and metabolic approaches in primary hepatocytes and mouse
13 liver, in order to definitively decipher the regulation of MAM structure and function in link
14 with diet-induced hepatic insulin resistance and steatosis. Combining the kinetic study and the
15 reversal diet protocols allow us to extensively analyse organelle communication from 1 to 24
16 weeks of HFHSD feeding. Interestingly, obesity and glucose intolerance appear early with
17 HFHSD feeding, whereas systemic and hepatic insulin resistance, as well as hepatic steatosis,
18 are only observed after 12 weeks of overnutrition, demonstrating the occurrence of ER-
19 mitochondria miscommunication before the gradual diet-induced metabolic alterations. Indeed,
20 using both *in situ* PLA and/or TEM, we found that ER-mitochondria contact sites are
21 consistently reduced *in situ* in the liver of HFHSD mice as soon as 1 week and until 24 weeks
22 of HFHSD feeding. These results confirmed our previous observations that ER-mitochondria
23 interactions are disrupted in primary hepatocytes of HFHSD_{16w} mice compared to SD_{16w}
24 hepatocytes ⁷. However, these observations differ from another study showing a reinforcement
25 of organelle contact sites measured by TEM in the liver of diet-induced obese mice ¹⁴. The
26 nature of the obesogenic diet (HFD vs. HFHSD) or the metabolic state of mice (as MAMs are
27 regulated by nutrition state, ⁶) may participate to the differing results. Our morphological
28 analysis by TEM further suggests that the early HFHSD-induced disruption of MAMs concerns
29 the closest contacts (0-10 nm), whereas the structural alterations after longer overnutrition are
30 more global affecting all the gap width between 0 and 50 nm. We demonstrate for the first time
31 that one of the important functions of MAMs, the ER-mitochondria Ca²⁺ exchange, is also
32 reduced as soon as after 1 and 4 weeks of HFHSD feeding, pointing MAM dysfunction as an
33 early alteration during HFHSD. These data are in agreement with our previous observations
34 pointing that altered Ca²⁺ transfer from ER to mitochondria linked alterations of MAM integrity
35 to hepatic insulin resistance in cyclophilin D-KO mice ²⁵. However, we found that ER-
36 mitochondria Ca²⁺ exchange is increased in HFHSD_{16w} hepatocytes despite reduced contacts in
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 the HFHSD_{16w} liver. This unexpected observation suggests either a differential regulation
2 between MAM structure and function with chronic overnutrition or an impact linked to the
3 experimental model. The fact that ER-mitochondria interactions were increased in HFHSD_{16w}
4 hepatocytes vs SD_{16w} ones, following the infection with the mitochondrial Ca²⁺ probe and
5 contrary with what was observed *in situ* in the liver of obese mice, suggests that infection of
6 hepatocytes may have impacted organelle communication in HFHSD_{16w} hepatocytes that are
7 characterized by stressed and dysfunctional mitochondria²⁶, leading therefore to the measured
8 increased Ca²⁺ exchange in obese hepatocytes. This experimental condition was apparently
9 without consequence on HFHSD_{1w} and HFHSD_{4w} hepatocytes, likely because mitochondria are
10 functional at early stage of overnutrition²⁷. Of course, we cannot exclude at this stage that
11 increasing Ca²⁺ transfer with chronic obesity could be a long-term adaptive process to
12 compensate for the reduction of organelle contact sites, as mitochondrial Ca²⁺ overload was
13 previously found in *ob/ob* hepatocytes compared to lean controls¹⁴. However, in this study the
14 authors analysed MAMs in adenovirus infected lean and obese mice, and we cannot exclude
15 that the reinforcement of organelle contacts results from an adenovirus-linked adaptive process
16 as we observed in our study. Consequently, inherent experimental conditions to measure
17 mitochondria Ca²⁺ dynamics prevents to conclude on ER-mitochondria Ca²⁺ exchange in
18 chronic obesity, and genetic mouse models constitutionally overexpressing the mitochondrial
19 Ca²⁺ probe will be required in the future to definitively conclude on this question. Despite this
20 issue, our data clearly demonstrate that reduced ER-mitochondria interactions and Ca²⁺
21 exchange are an early maladaptive response to acute overnutrition preceding hepatic insulin
22 resistance and steatosis, pointing that ER-mitochondria miscommunication may be a cause of
23 these metabolic alterations.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

41 To confirm this assumption, we decided to experimentally modulate ER-mitochondria
42 communication specifically in the liver of mice using adenoviral strategy. We took care to inject
43 adenovirus in lean mice to overcome the limitation of this experimental approach with obese
44 mice described above. Importantly, we chose to modulate organelle communication using non-
45 endogenously expressed spacer and linker, as endogenous MAM proteins can have pleiotropic
46 effects outside of MAMs. In agreement, modulation of endogenous MAM proteins led to
47 different metabolic phenotypes in mice, as loss of cyclophilin D²⁵ or mitofusin 2²⁸ induced
48 hepatic insulin resistance and steatosis, whereas the down-regulation of IP3R1 and PCAS2
49 resulted in enhanced glucose intolerance in obese mice¹⁴. Therefore, we used FATE1 as an
50 organelle spacer, as FATE1 was reported as an ER protein exclusively expressed in testis (not
51 in the liver) and able to reduce organelle communication²⁴. In agreement, we previously
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 confirmed that its expression in mouse skeletal muscle reduced ER-mitochondria interactions
2 and altered insulin signalling⁸. Here, we demonstrated that hepatic FATE1 expression reduces
3 ER-mitochondria interactions and Ca²⁺ exchange and alters hepatic insulin signalling and
4 action, leading to fasted hyperglycemia in lean mice. Therefore, our data clearly show that
5 disrupting MAMs in the liver of lean mice is sufficient to induce hepatic insulin resistance and
6 to alter glucose homeostasis. Interestingly, reinforcing organelle interactions and Ca²⁺
7 exchange with the expression of an artificial linker prevented the HFHSD_{4w}-induced glucose
8 intolerance, confirming that preventing the early diet-induced organelle miscommunication is
9 sufficient to prevent metabolic alterations. Whereas we demonstrated a preventive effect of
10 reinforcing MAMs on diet-induced metabolic alterations, our results contrast with another
11 study showing that the linker worsens insulin resistance when expressed on mice already under
12 HFD for several weeks¹⁴.

21 Beyond being causal, our study further shows that ER-mitochondria miscommunication
22 is reversible as switching on a standard diet for 8 weeks is sufficient to improve both organelle
23 communication and hepatic insulin signalling and action in the liver of obese mice. It is well
24 known that food restriction is an effective strategy to improve glycemia in T2D patients²⁹.
25 Here, our data highlight that the improvement of systemic and hepatic insulin sensitivity linked
26 to RD requires 8 weeks, since only an improvement of obesity and glucose intolerance was
27 observed after 4 weeks of RD. Interestingly, only the RD_{8w} improved hepatic ER-mitochondria
28 interactions, at least at structural levels as we cannot unequivocally access MAM function in
29 obese hepatocytes, pointing once again that MAM structure is strongly linked to hepatic insulin
30 sensitivity. However, it is unclear whether the improvement of MAMs participates or is a
31 consequence of metabolic improvement, as both hepatic ER-mitochondria interactions and
32 hepatic insulin sensitivity are jointly regulated.

43 Both hepatic insulin resistance and steatosis are intimately connected during diet-
44 induced obesity without knowing, until now, which one precedes and triggers the other³⁰.
45 Interestingly, Mfn2-related organelle miscommunication was recently associated with hepatic
46 steatosis in NAFLD¹¹. Here, we found that ER-mitochondria miscommunication preceded
47 hepatic steatosis in diet-induced obese mice, that FATE1-related disruption of ER-
48 mitochondria interactions and Ca²⁺ exchange was sufficient to induce hepatic lipid
49 accumulation in lean mice. Interestingly, our respiration data on both intact and permeabilized
50 hepatocytes suggest that FATE1-related hepatic lipid accumulation relies on both a reduction
51 of mitochondrial lipid oxidation and alterations of mitochondrial bioenergetics, likely linked to
52 the deficient ER-mitochondria coupling. At opposite, the reinforcement of MAMs with the

1 linker tended to increase lipid-related respiration and reduced the density of hepatic lipid
2 droplets, pointing to a close relationship between MAM-related mitochondrial oxidative
3 metabolism and hepatic lipid accumulation. In agreement, previous findings showed that ER-
4 mitochondria coupling controls mitochondrial respiration ^{31,32} and that autophagy-regulated
5 fatty acid availability for oxidative phosphorylation involves MAMs ³³. Importantly, the
6 reversal diet improved hepatic steatosis before reinforcing organelle communication and
7 improving hepatic insulin sensitivity, suggesting that this improvement is MAM- and hepatic
8 insulin sensitivity-independent. It may also suggest that some intracellular lipids may influence
9 organelle communication, impacting the hepatic insulin sensitivity. Altogether, these data point
10 to an interconnected link between hepatic lipotoxicity, organelle miscommunication and
11 hepatic insulin resistance during diet-induced obesity.

12
13
14
15
16
17
18
19
20 As organelle miscommunication was also associated with skeletal muscle ⁸, adipose
21 tissue ³⁴ and heart ³⁵ insulin resistance, as well as with β cell dysfunction associated with
22 glucotoxicity ⁹, our present observations confirm the crucial role of MAMs in the control of
23 glucose homeostasis and suggest that targeting MAMs may be a novel and effective strategy to
24 improve whole-body metabolic homeostasis in multiple metabolic diseases.
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Bibliography

1. Rieusset J. Contribution of mitochondria and endoplasmic reticulum dysfunction in insulin resistance: Distinct or interrelated roles? *Diabetes Metab.* 2015;41(5):358-368. doi:10.1016/j.diabet.2015.02.006
2. Rieusset J. The role of endoplasmic reticulum-mitochondria contact sites in the control of glucose homeostasis: An update. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):1-12. doi:10.1038/s41419-018-0416-1
3. Wang J, He W, Tsai P, et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2020;19:1-19
4. Filadi R, Theurey P, Pizzo P. The endoplasmic reticulum-mitochondria coupling in health and disease: Molecules, functions and significance. *Cell Calcium.* 2017;62:1-15. doi:10.1016/j.ceca.2017.01.003
5. Theurey P, Rieusset J. Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. *Trends Endocrinol Metab.* 2017;28(1):32-45. doi:10.1016/j.tem.2016.09.002
6. Theurey P, Tubbs E, Vial G, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *J Mol Cell Biol.* 2016;8(2):129-143. doi:10.1093/jmcb/mjw004
7. Tubbs E, Theurey P, Vial G, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes.* 2014;63(10):3279-3294. doi:10.2337/db13-1751
8. Tubbs E, Chanon S, Robert M, et al. Disruption of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes (MAMs) Integrity Contributes to Muscle Insulin Resistance in Mice and Humans. *Diabetes.* 2018;33(0):1-44. doi:10.2337/db17-0316
9. Dingreville F, Panthu B, Thivolet C, et al. Differential effect of glucose on ER-mitochondria Ca²⁺ exchange participates in insulin secretion and glucotoxicity-mediated dysfunction of β -cells. *Diabetes.* 2019;68(9):1778-1794. doi:10.2337/db18-1112
10. Thivolet C, Vial G, Cassel R, Rieusset J, Madec A-M. Reduction of endoplasmic reticulum- mitochondria interactions in beta cells from patients with type 2 diabetes. Fiorina P, ed. *PLoS One.* 2017;12(7):e0182027. doi:10.1371/journal.pone.0182027
11. Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Vives S, et al. Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. *Cell.*

2019;177(4):881-895.e17. doi:10.1016/j.cell.2019.04.010

12. Anastasia I, Ilacqua N, Raimondi A, et al. Mitochondria-rough-ER contacts in the liver regulate systemic lipid homeostasis. *Cell Rep.* 2021;34(11):108873. doi:10.1016/j.celrep.2021.108873
13. Giacomello M, Pellegrini L. The coming of age of the mitochondria–ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* 2016;23(10):1417-1427. doi:10.1038/cdd.2016.52
14. Arruda AP, Pers BM, Parlakg l G, G ney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med.* 2014;20(12):1427-1435. doi:10.1038/nm.3735
15. Thoudam T, Ha CM, Leem J, et al. PDK4 augments ER–mitochondria contact to dampen skeletal muscle insulin signaling during obesity. *Diabetes.* 2019;68(3):571-586. doi:10.2337/db18-0363
16. Csordás G, Várnai P, Golenár T, et al. Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Mol Cell.* 2010;39(1):121-132. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.029
17. Bonnard C, Durand A, Peyrol S, Chanseume E, Inra F, Insa-lyon F. The Restart Project - let's fix our relationship with electronics The Restart Project. *J Clin Invest.* 2008;118(2):789-800. doi:10.1172/JCI32601DS1
18. Weaver D, Bartok A, Csordas G, Hajnoczky G. A Standardized Method to Quantify ER-Mitochondrial Interfaces in Electron Micrographs. *Biophys J.* 2017;112(3):133a. doi:10.1016/j.bpj.2016.11.735
19. Tubbs E, Rieusset J. Study of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Interactions by in situ Proximity Ligation Assay in Fixed Cells. *J Vis Exp.* 2016;2016(118). doi:10.3791/54899
20. Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, et al. Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chem Biol.* 2006;13(5):521-530. doi:10.1016/j.chembiol.2006.03.007
21. Scorrano L, De Matteis MA, Emr S, et al. Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-09253-3
22. Rowland AA, Voeltz GK. Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: Function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012;13(10):607-615. doi:10.1038/nrm3440
23. Marchi S, Patergnani S, Missiroli S, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum calcium homeostasis and cell death. *Cell Calcium.* 2018;69:62-72.

doi:10.1016/j.ceca.2017.05.003

24. Doghman- Bouguerra M, Granatiero V, Sbiera S, et al. FATE1 antagonizes calcium- and drug- induced apoptosis by uncoupling ER and mitochondria. *EMBO Rep.* 2016;17(9):1264-1280. doi:10.15252/embr.201541504
25. Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, et al. Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia.* 2016;59(3):614-623. doi:10.1007/s00125-015-3829-8
26. Vial G, Chauvin M-A, Bendridi N, et al. Imeglimin Normalizes Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity and Improves Mitochondrial Function in Liver of a High-Fat, High-Sucrose Diet Mice Model. *Diabetes.* 2015;64(6):2254-2264. doi:10.2337/db14-1220
27. Garcia J, Decker CW, Sanchez SJ, Ouk JM, Siu KM, Han D. Obesity and steatosis promotes mitochondrial remodeling that enhances respiratory capacity in the liver of ob/ob mice. *FEBS Lett.* 2018;592(6):916-927. doi:10.1002/1873-3468.13005
28. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5523-5528. doi:10.1073/pnas.1108220109
29. Ley SH, Ardisson Korat A V., Sun Q, et al. Contribution of the Nurses' Health Studies to Uncovering Risk Factors for Type 2 Diabetes: Diet, Lifestyle, Biomarkers, and Genetics. *Am J Public Health.* 2016;106(9):1624-1630. doi:10.2105/AJPH.2016.303314
30. A. Lockman K, J. Nyirenda M. Interrelationships between Hepatic Fat and Insulin Resistance in Non- Alcoholic Fatty Liver Disease. *Curr Diabetes Rev.* 2010;6(5):341-347. doi:10.2174/157339910793360879
31. Cárdenas C, Miller RA, Smith I, et al. Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP3 Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria. *Cell.* 2010;142(2):270-283. doi:10.1016/j.cell.2010.06.007
32. Bravo R, Vicencio JM, Parra V, et al. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 2011;124(14):2511. doi:10.1242/jcs.095455
33. Bosc C, Broin N, Fanjul M, et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun.* 2020;11(1):4056. doi:10.1038/s41467-020-17882-2
34. Wang CH, Chen YF, Wu CY, et al. Cisd2 modulates the differentiation and functioning

of adipocytes by regulating intracellular Ca²⁺ homeostasis. *Hum Mol Genet.* 2014;23(18):4770-4785. doi:10.1093/hmg/ddu193

35. Dia M, Gomez L, Thibault H, et al. Reduced reticulum–mitochondria Ca²⁺ transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2020;115(6):74. doi:10.1007/s00395-020-00835-7

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2 **Abbreviations:**

3 Ca²⁺: calcium; ER: endoplasmic reticulum; FATE1: fetal and adult testis-expressed 1; FCS:
4 fetal-calf serum; GTT: glucose tolerance test; HFHSD: high-fat and high-sucrose diet; IP3R1:
5 the inositol trisphosphate receptor 1; ITT: insulin tolerance test; KRB: Krebs-Ringer-
6 Bicarbonate; MAMs: mitochondria-associated membranes; MERCs: Mitochondria-
7 endoplasmic reticulum contacts; NAFLD: non-alcoholic fatty liver diseases; PKB: protein
8 kinase B; PLA: proximity ligation assay; PMH: primary mouse hepatocytes; SD: standard diet;
9 T2D: type 2 diabetes; TEM: transmission electronic microscopy; TMPD: N,N,N,N-
10 tetramethyl-p-phenylenediamine; TTFA: thenoyltrifluoroacetone; VDAC1: voltage-dependent
11 anion channel 1.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 **Acknowledgements:**

23 We thank Enzo Lalli (CNRS UMR7275, Valbonne, France) for the gift of FATE1 vectors;
24 Gyorgi Hajnoczky and Gyorgi Csordas (Thomas Jefferson institute, Philadelphia, USA) for the
25 generous gift of the ER-mitochondria linker and for sharing their macro to analyse ER-
26 mitochondria interactions by TEM; Roger Tsien's (University of California, San Diego, USA)
27 for the generous gift of 4mtD3cpv vector; Elisabeth Errazuriz for her technical help at the
28 CIQLE Imaging Center (Lyon, France); and Anaïs Alves (INSERM U1060, Lyon, France) for
29 her occasional help with TEM analysis.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure Legends

Figure 1: Disruption of ER-mitochondria interactions in the liver of HFHSD-fed mice precedes diet-induced hepatic insulin resistance and steatosis. A-E) Physiologic parameters of SD and HFHSD-fed mice from 1 to 16 weeks. Body weight (A), GTT (B), ITT (C), liver weight (D), and hepatic TG levels (E) in SD and HFHSD mice (n=3-6 mice/group). F) VDAC1-IP3R1 interactions measured by *in situ* PLA in the liver of SD and HFHSD mice (n=32-39 images in 3 mice/group). Representative images are illustrated in Supplementary Figure 1. G-H) Structural analysis of ER-mitochondria interactions by TEM in SD and HFHSD mice after 1 week (G) and 16 weeks (H) of feeding. Data are expressed as % MAM/mitochondria in 50 nm range (total interface) or according to range 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 and 40-50 nm (n= 142-177 mitochondria analysed in n=3 mice/group). AUC: area under the curve, AOC: area over the curve, *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 vs SD.

Figure 2: Early disruption of ER-mitochondria Ca²⁺ exchange in the liver of HFHSD-fed mice. Representative curves from one experimental day (A, E, I) and quantitative analysis of basal (B, F, J) and ATP-stimulated (C-D, G-H, K-L) mitochondrial Ca²⁺ accumulation measured in primary hepatocytes of SD and HFHSD mice after 1 week (left column, n=361-438 cells), 4 weeks (middle column, n=204-247 cells) and 16 weeks (right column, n=306-177 cells) of feeding. For ATP-stimulated mitochondrial Ca²⁺ accumulation, both the delta peak (C, G, K) and the area under curve (AUC, D, H, L) were quantified. **p<0.01; ****p<0.0001 vs respective SD; ns: non-significant.

Figure 3: FATE1-mediated disruption of ER-mitochondria interactions and Ca²⁺ exchange alters insulin signalling in mouse primary hepatocytes. A-F) Mouse primary hepatocytes were infected with Ad-mCherry (as control) or Ad-FATE1 for 48 hours (A, F), or co-infected for 36 hours with Ad-mCherry/Ad-FATE1 and Ad-4mtD3CPV for Ca²⁺ experiments (B-E). A) Representative images (scale bar=5µm) and quantitative analysis of VDAC1-IP3R1 interactions measured by *in situ* PLA (n= 84-116 images from n=4 independent experiments). B-E) Representative curves (B) and quantitative analysis of basal (C) and ATP-stimulated (D-E) mitochondrial [Ca²⁺] in infected hepatocytes (n=181-203 cells analysed in n=5 independent experiments). F) Representative Western-Blot (left) and quantitative analysis (right) of insulin-stimulated PKB phosphorylation in infected hepatocytes (triplicate in n=4

1 mice/group). AUC: area under the curve. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$ vs Ad-mCherry,
2 $p < 0.05$ vs (+) insulin.
3
4

5 **Figure 4: Hepatic FATE1 expression disrupts ER-mitochondria interactions and Ca^{2+}**
6 **exchange in healthy mice.** A-F) Mice were infected with Ad-GFP/mCherry (as control) or Ad-
7 FATE1 and hepatic ER-mitochondria interactions and Ca^{2+} exchange were analysed 15 days
8 later. A) Representative images (scale=10 μm) and quantitative analysis of VDAC1-IP3R1
9 interactions measured by *in situ* PLA in the liver of infected mice (n= 88-99 images analysed
10 from n=9-10 mice/group). B) Representative TEM images (scale bar=0.2 μm) and quantitative
11 analysis of ER-mitochondria interactions in the liver of infected mice. Data are expressed as %
12 MAM/mitochondria in 50 nm range (total interface) or according to range 0-10, 10-20, 20-30,
13 30-40 and 40-50 nm (n= 645-519 mitochondria analysed in n=10 mice/group). C-F)
14 Representative curves (C) and quantitative analysis of basal (D) and ATP-stimulated (E-F)
15 mitochondrial [Ca^{2+}] in infected hepatocytes (n=45-94 cells analysed in n=3 mice/group). AUC:
16 area under the curve, ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$ vs Ad-GFP/Ad-mCherry.
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28

29 **Figure 5: FATE1-mediated hepatic disruption of organelle communication induces**
30 **hepatic insulin resistance and steatosis in healthy mice.** A-I) Mice were infected with Ad-
31 GFP (as control) or Ad-FATE1 and phenotyped metabolically 15 days later. A-B) Average
32 curves of glycemia during a GTT (A, n=30-32 mice/group) and ITT (B, n=10-14 mice/group)
33 in infected mice. Quantitative analysis of 6h fasted glycemia (C), of AUC during GTT (D) and
34 of AOC during ITT (E) in infected mice. F) Representative Western-Blot (left) and quantitative
35 analysis (right) of insulin effect on PKB phosphorylation in the liver of infected mice (n=3
36 mice/group). G) Inhibitory effect of insulin on hepatic glucose production measured in primary
37 hepatocytes of infected mice (n=6 mice/group). H-I) Hepatic lipid accumulation in the liver of
38 Ad-FATE1 mice measured either by oil red O staining (H, image scale= 100 μM , n=14
39 mice/group) or biochemical quantification of TG (I, n=14 mice/group). AUC: area under the
40 curve, AOC: area over the curve, ns: non-significant. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$;
41 **** $p < 0.0001$ vs Ad-GFP.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

54 **Figure 6: FATE1-mediated hepatic disruption of organelle communication alters**
55 **mitochondria function in healthy mice.** A-B) Mice were infected with Ad-mCherry (as
56 control) and Ad-FATE1, and primary hepatocytes were isolated 15 days later. A) Basal and
57 maximal FCCP-induced mitochondrial oxygen consumption was measured either in intact
58
59
60
61
62
63
64
65

1 hepatocytes under palmitate in absence or presence of etomoxir (Eto) an inhibitor of lipid
2 oxidation (n=6 mice/group). B) Basal and maximal (in presence of ADP) mitochondrial oxygen
3 consumption was measured in digitonin-permeabilized hepatocytes (B, n=6 mice/group) in the
4 successive presence of substrates of complex I, II and IV. C) Mitochondria density measured
5 by quantitative PCR as the ratio between mitochondrial and nuclear DNA in liver of infected
6 mice (n=28-30 mice/group). ns: non-significant. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 vs respective
7 Ad-mCherry, #p<0.05, #####p<0.0001 vs Ad-mCherry FCCP.
8
9
10
11
12
13

Figure 7: Linker-mediated reinforcement of hepatic ER-mitochondria interactions and Ca²⁺ transfer prevents diet-induced glucose intolerance in HFHSD mice. A-D) Primary mouse hepatocytes were co-infected with Ad-Ctrl/Ad-linker and Ad-4mtD3CPV for 36 hours and Ca²⁺ signalling was imaged. Representative curves (A) and quantitative analysis of basal (B) and ATP-stimulated (C-D) mitochondrial [Ca²⁺] in infected hepatocytes (n=69-73 cells analysed in n=4 independent experiments). E) Analysis of insulin-stimulated PKB phosphorylation in isolated hepatocytes infected for 48 hours with Ad-Ctrl and Ad-linker (n=2 independent experiments in triplicate). Blots from BSA and palmitate-treated samples were processed in parallel. F-J) Mice were infected with Ad-GFP (as control) or Ad-FATE1 and fed with either an SD or a HFHSD for 4 weeks. F) ER-mitochondria interactions measured by TEM in the liver of infected mice. Data are expressed as % MAM/mitochondria in 50 nm range (total interface) or according to range 0-10, 10-20, 20-30, 30-40 and 40-50 nm (n= 249-441 mitochondria analysed in n=5 mice/group). G) Average curve of glycemia (at top) and quantitative analysis of AUC (at bottom) during a GTT performed in infected mice (n=10 mice/group). H) Basal and fccp-stimulated mitochondrial oxygen consumption measured in primary hepatocytes of infected mice (n=5 mice /group). I) Representative images (scale bar=10µm) and quantitative analysis of lipid droplet (LD) number in Bodipy-labelled infected hepatocytes (n=5 mice /group). AUC: area under the curve, FCCP: carbonyl cyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazon. *p<0,05, **p<0,01 vs Ad-Ctrl; #p<0,05 vs Ad-Ctrl-BSA(+) insulin; £££p<0,001 vs Ad-Ctrl palmitate (+) insulin; ☐☐p<0.01, ☐☐☐p<0.001, ☐☐☐☐p<0.0001 vs Ad-Ctrl HFHSD4W; \$\$\$p<0,0001, \$\$\$\$p<0.0001 vs Ad-Ctrl SD4W.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53

Figure 8: Hepatic ER-mitochondria miscommunication in HFHSD mice are reversible by switching on a healthy diet. Mice were fed with either a SD or a HFHSD for 16 weeks and then half of the HFHSD mice were switched on a SD for 4 (A-G, RD_{4w}, n=11-12 mice/group) or 8 (H-N, RD_{8w}, n=13-14 mice/group except for GTT n=6 mice/group) additive weeks. A, H)

1 Body weight of SD, HFHSD and RD mice after 4 (A) and 8 (H) weeks of RD. B, I) Fasted
2 glycemia of SD, HFHSD and RD mice after 4 (B) and 8 (I) weeks of RD. C, J) GTT performed
3 on SD, HFHSD and RD mice after 4 (C) and 8 (J) weeks of RD. D, K) Representative images
4 (at left, scale=50 μ M) and quantitative analysis of hepatic lipid accumulation (at right) measured
5 by oil red O staining on SD, HFHSD and RD after 4 (D) and 8 (K) weeks of RD (n= 4
6 mice/group). E, L) ITT performed on SD, HFHSD and RD mice after 4 (E) and 8 (L) weeks of
7 RD. F, M) Representative Western-Blot (at left) and quantitative analysis (at right) of insulin
8 effect on PKB phosphorylation on SD, HFHSD and RD liver after 4 (F) and 8 (M) weeks of
9 RD (n=4 mice/group). G, N) Representative images (at left, scale=10 μ M) and quantitative
10 analysis (at right) of VDAC1-IP3R1 interactions measured by in situ PLA on SD, HFHSD and
11 RD liver after 4 (F, n=23-40 images on n=3-4 mice/group) and 8 (M, n=36-38 images on n=4
12 mice/group) weeks of RD. AUC: area under the curve, AOC: area over the curve. *p<0.05;
13 **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001 vs respective HFHSD.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

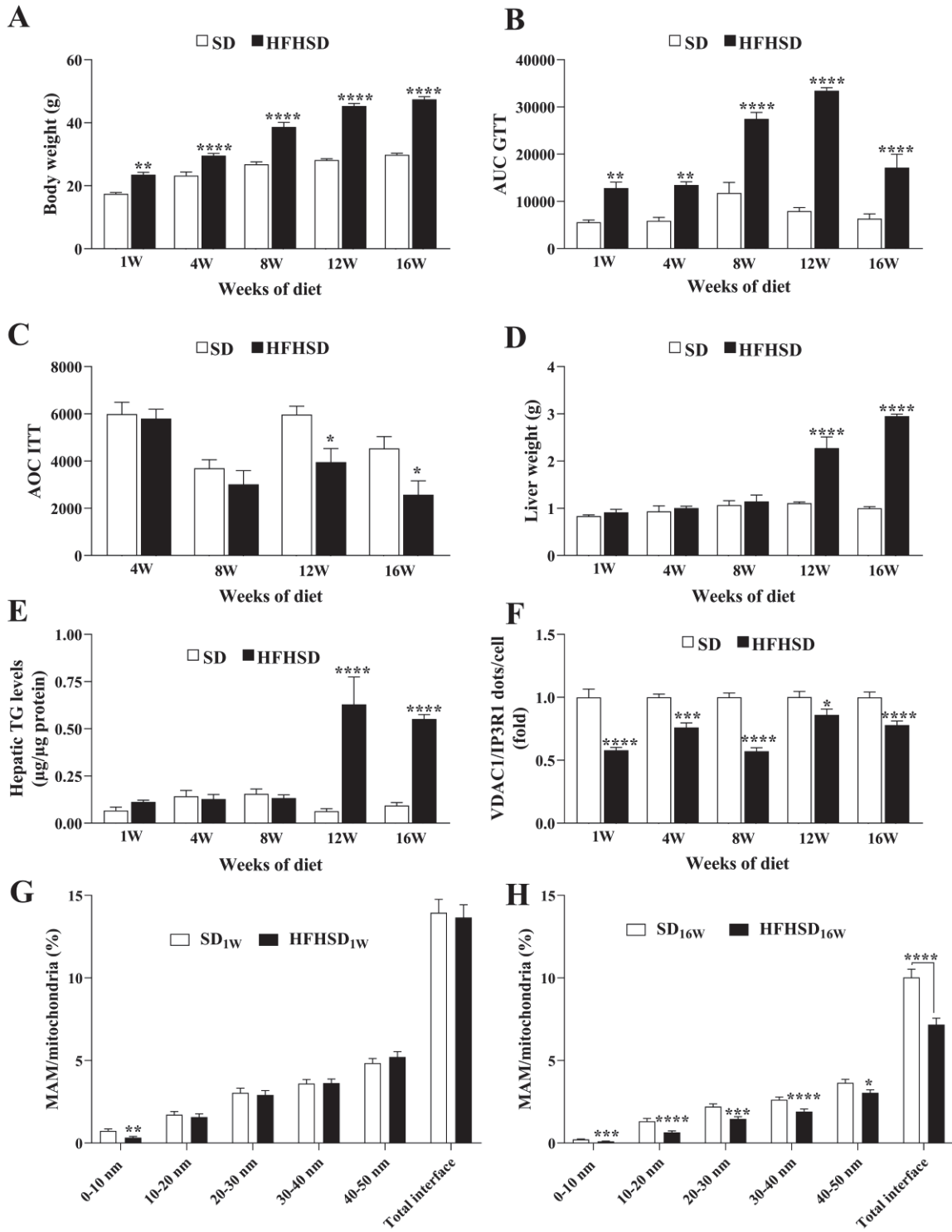


Figure 1

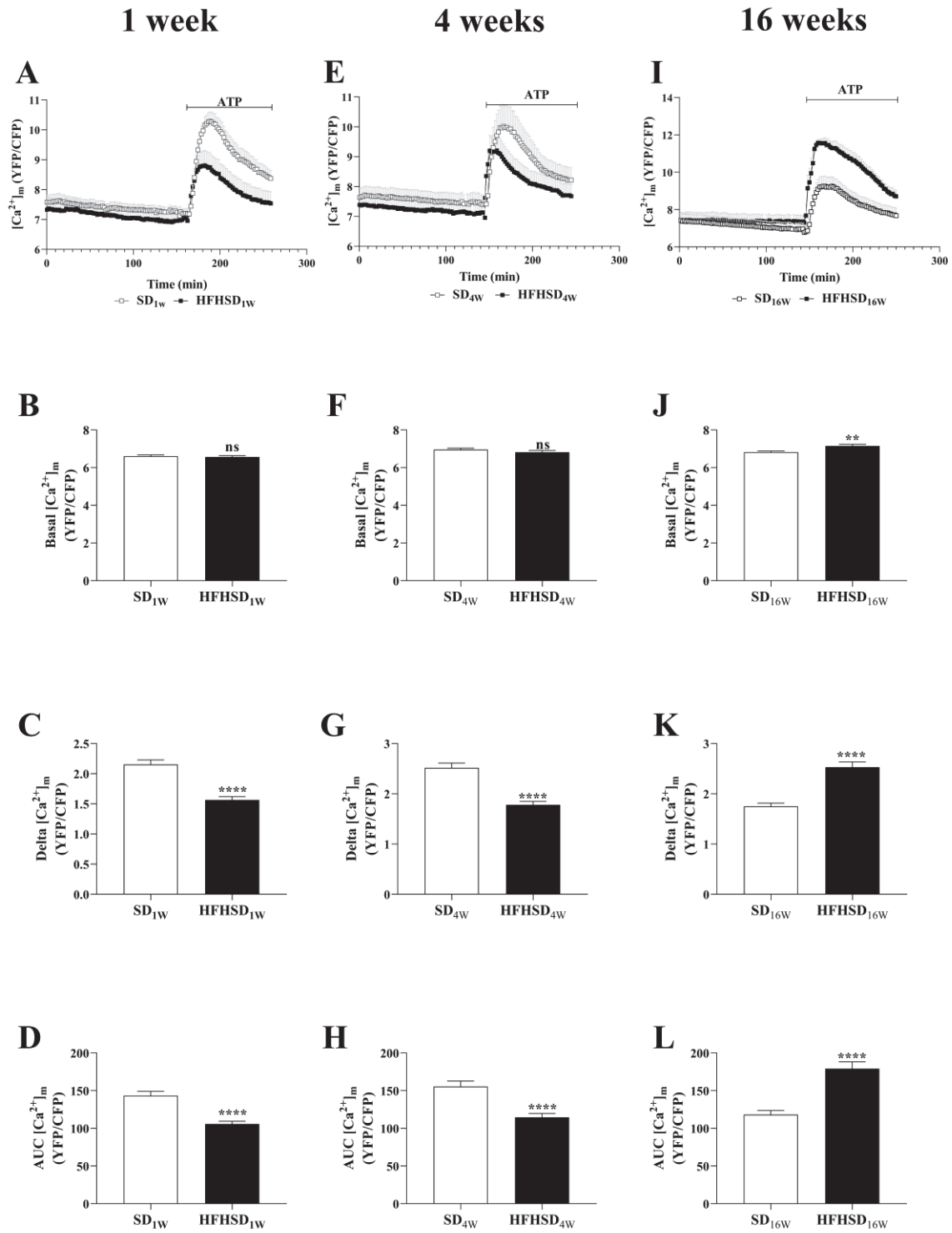


Figure 2

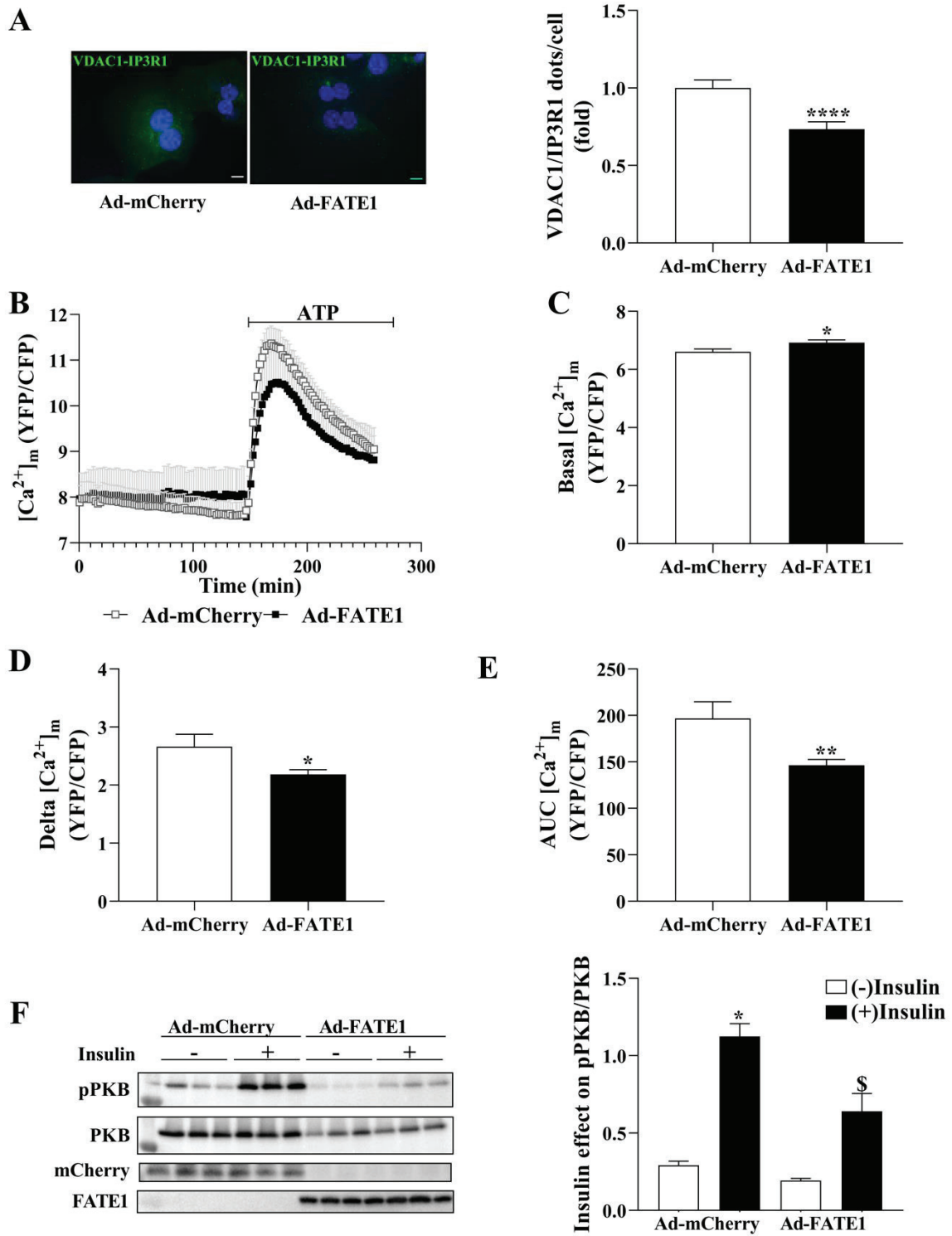
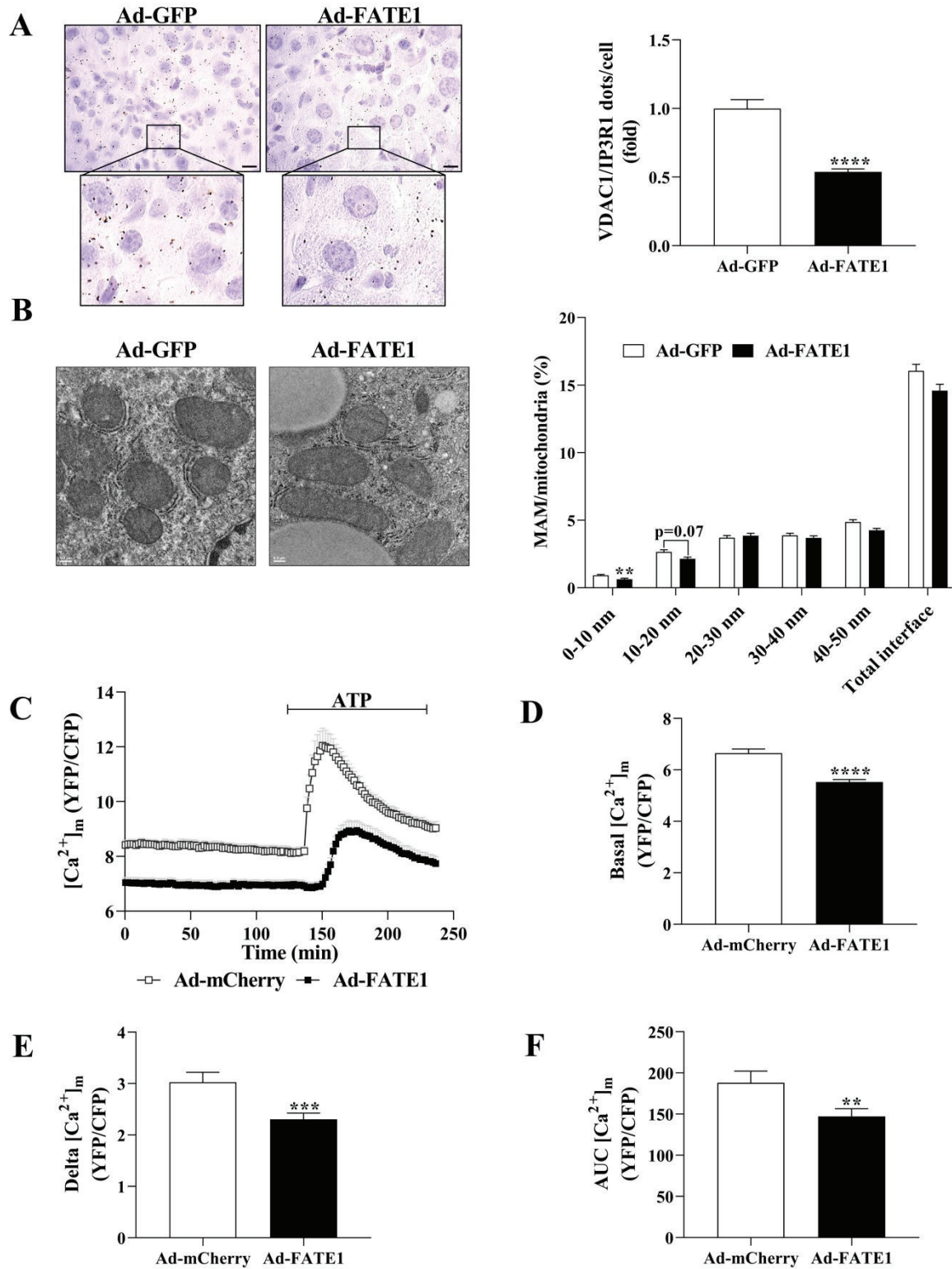


Figure 3



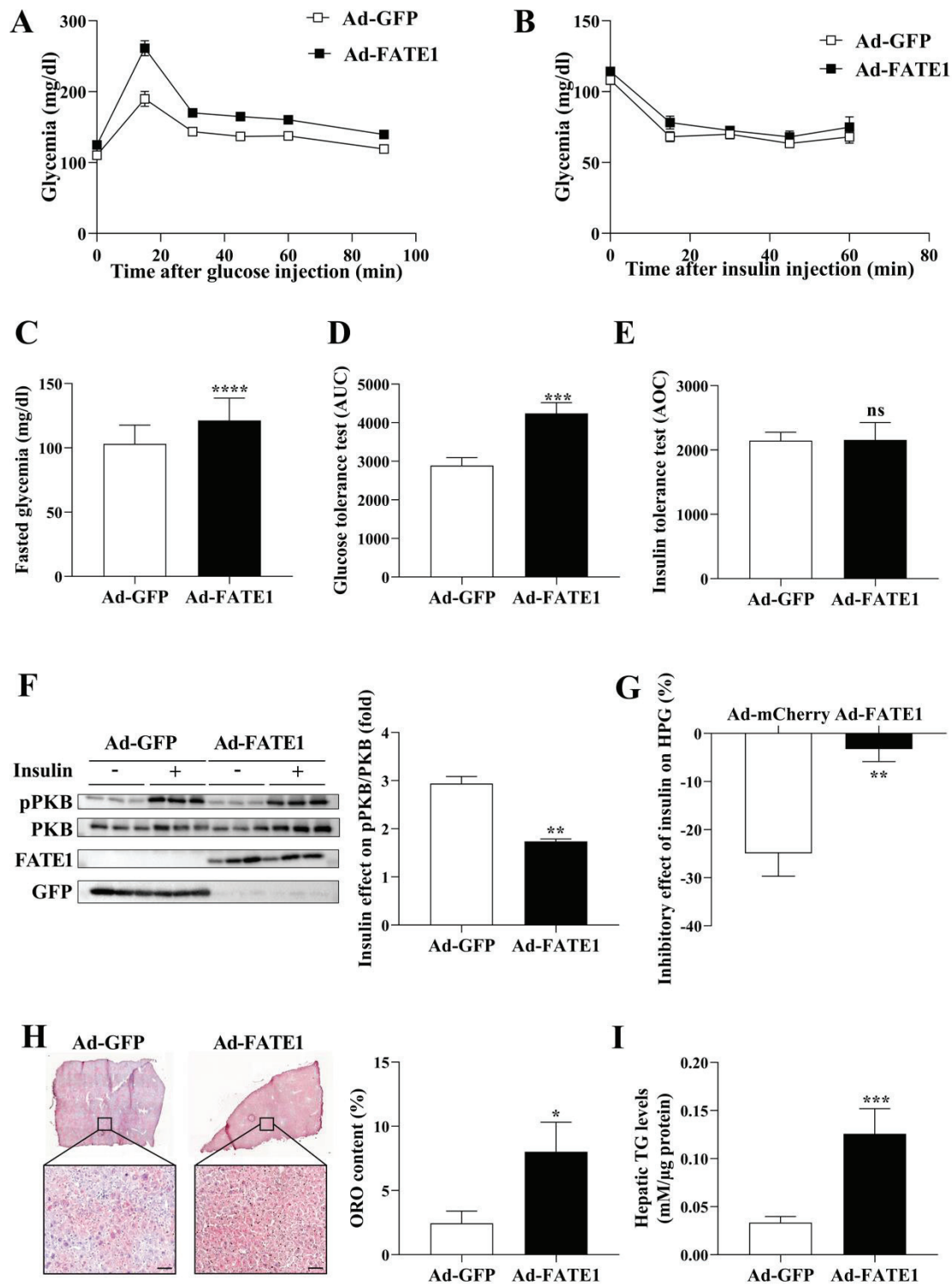
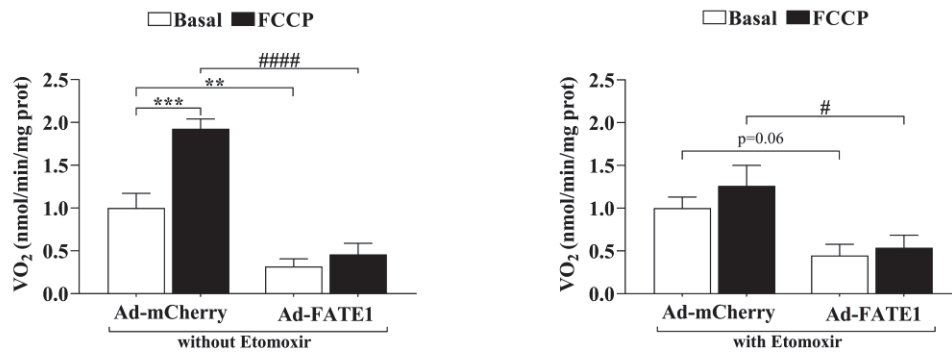


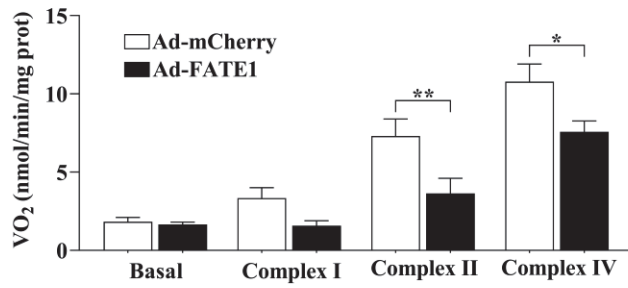
Figure 5

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

A



B



C

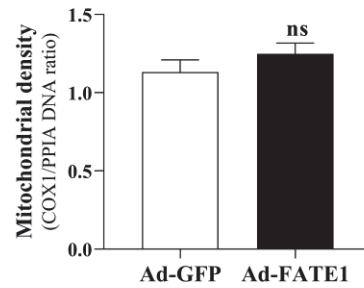


Figure 6

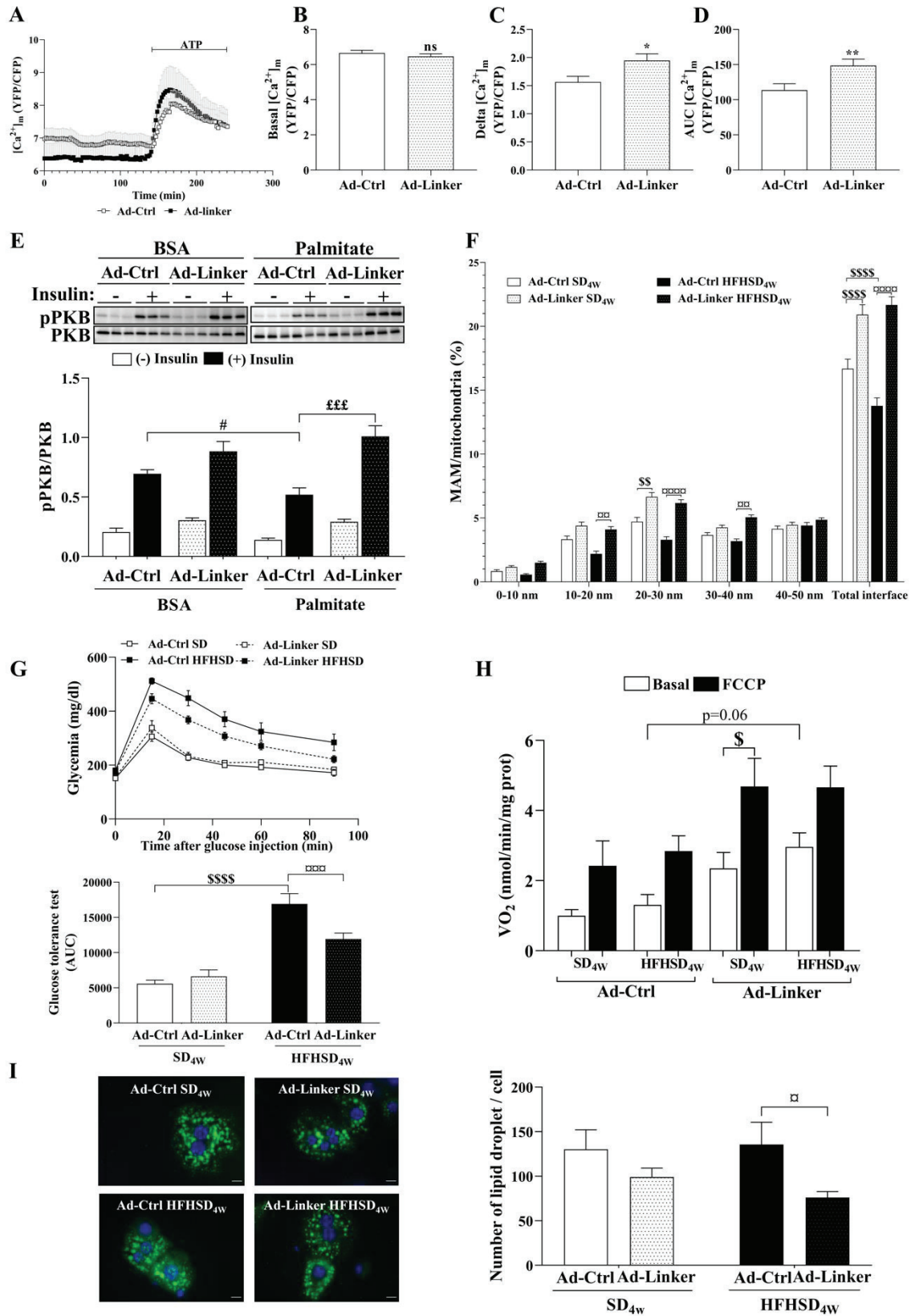


Figure 7

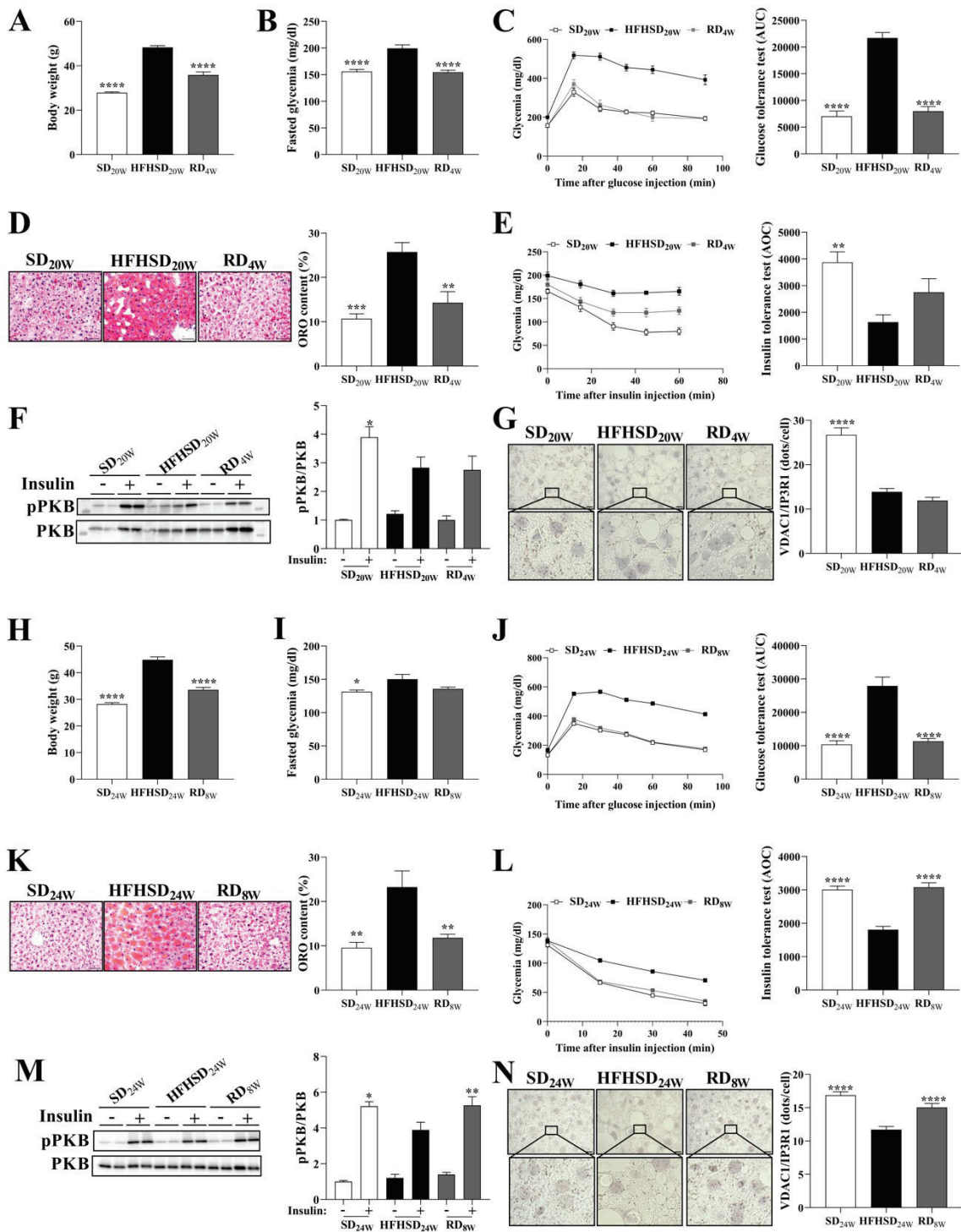


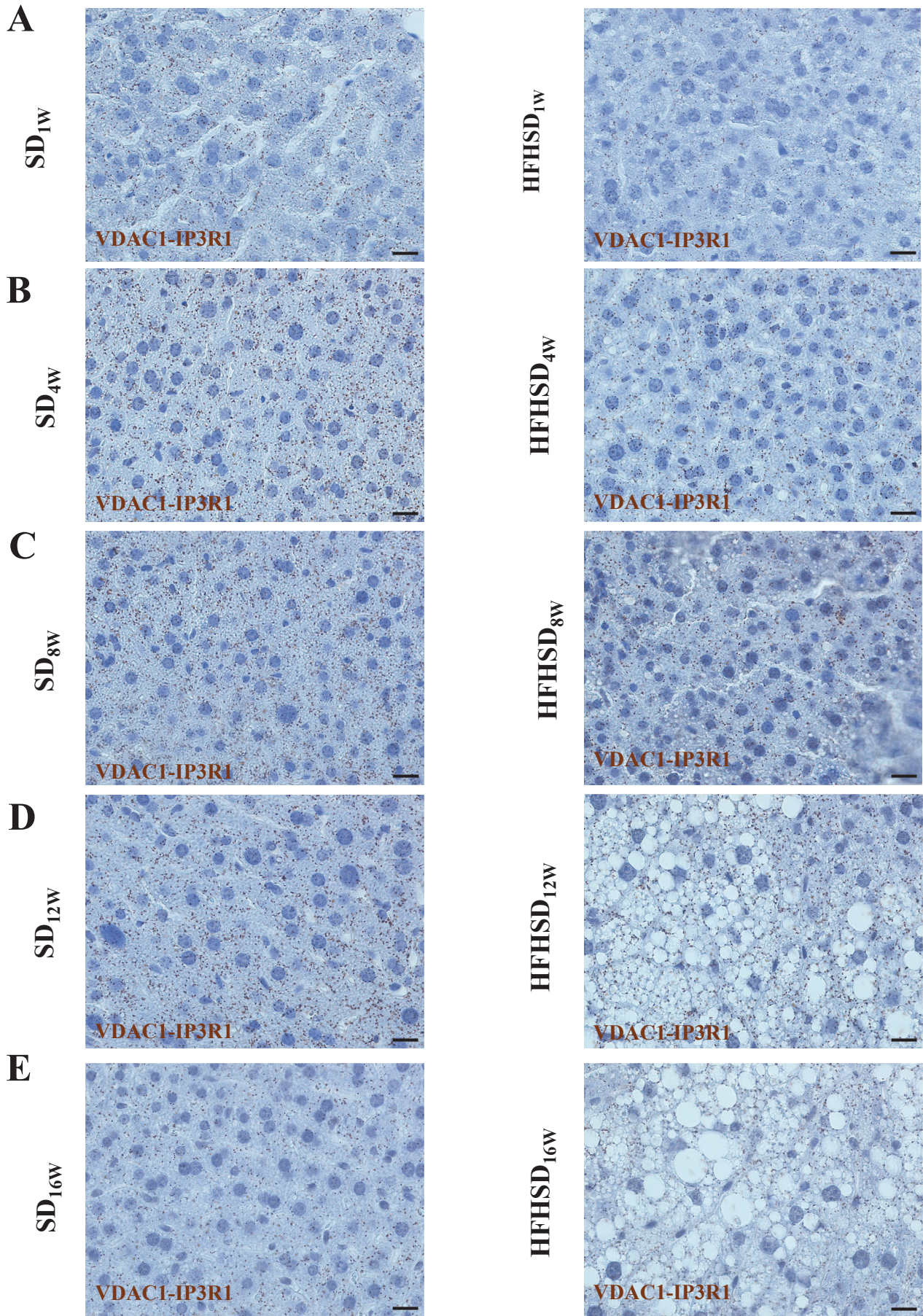
Figure 8

Endoplasmic reticulum-mitochondria miscommunication is an early and causal trigger of hepatic insulin resistance and steatosis

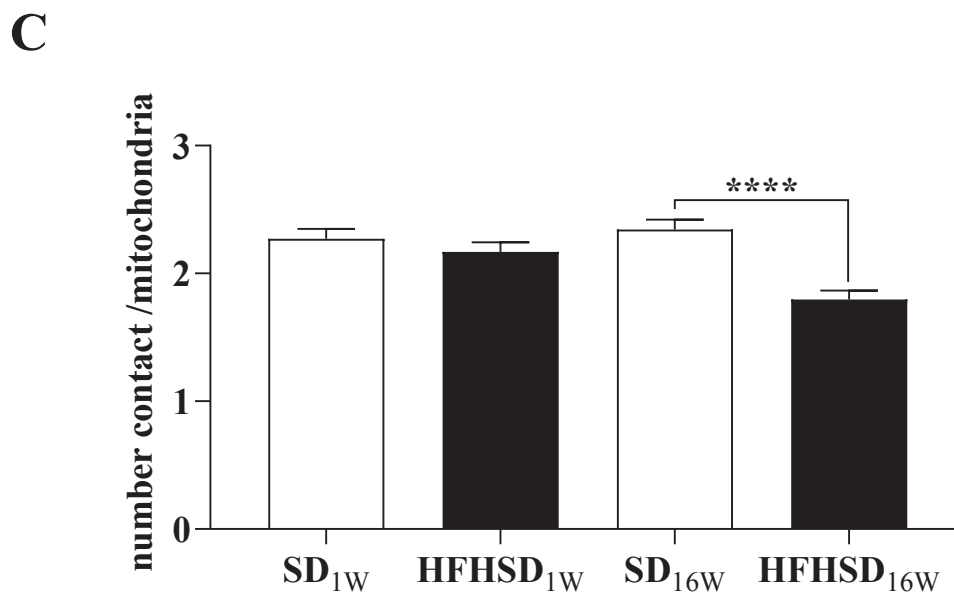
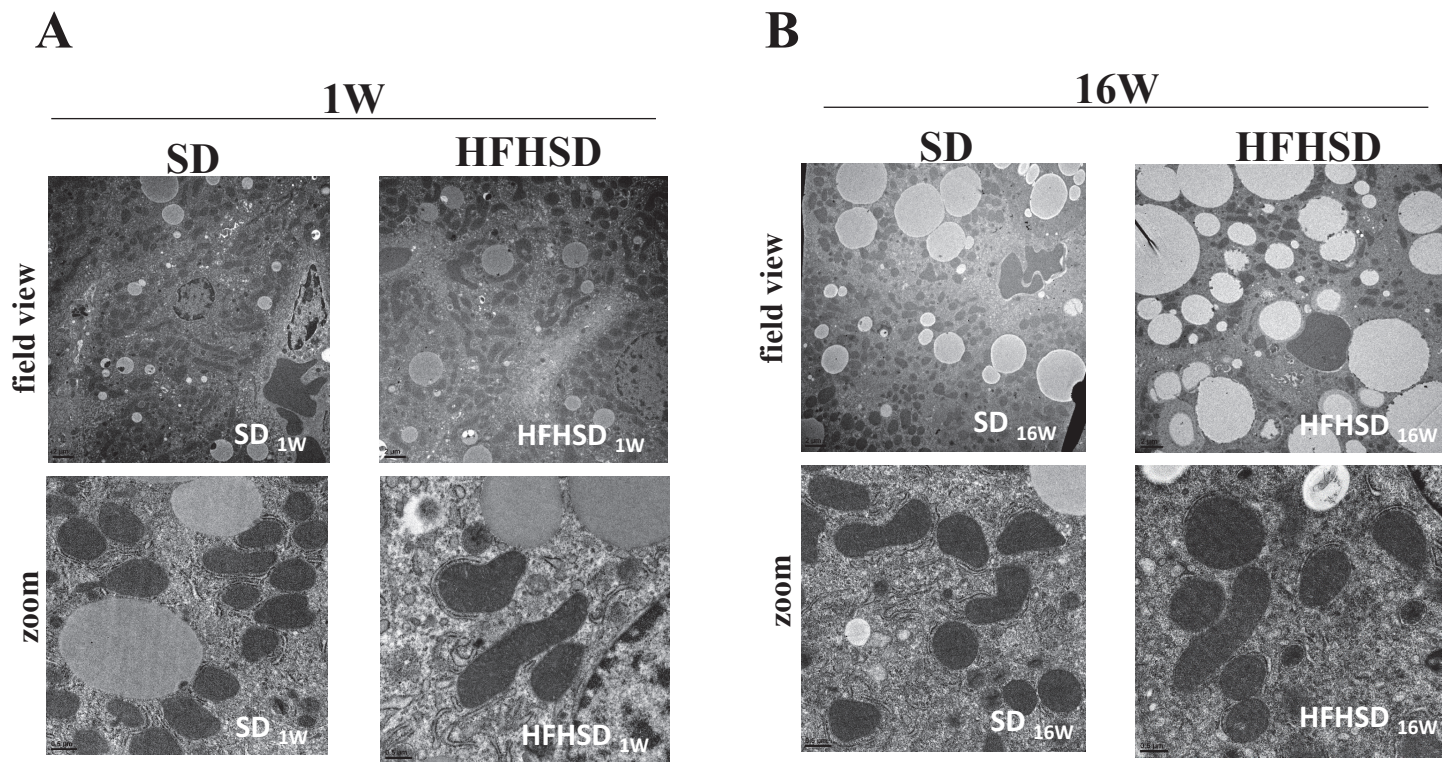
Agathe Beaulant, Maya Dia, Bruno Pillot, Marie-Agnes Chauvin, Jingwei Ji-cao, Christine Durand, Nadia Bendridi, Stephanie Chanon, Aurelie Vieille-Marchiset, Hubert Vidal, Ludovic Gomez, Melanie Paillard, and Jennifer Rieusset.

Table of content :

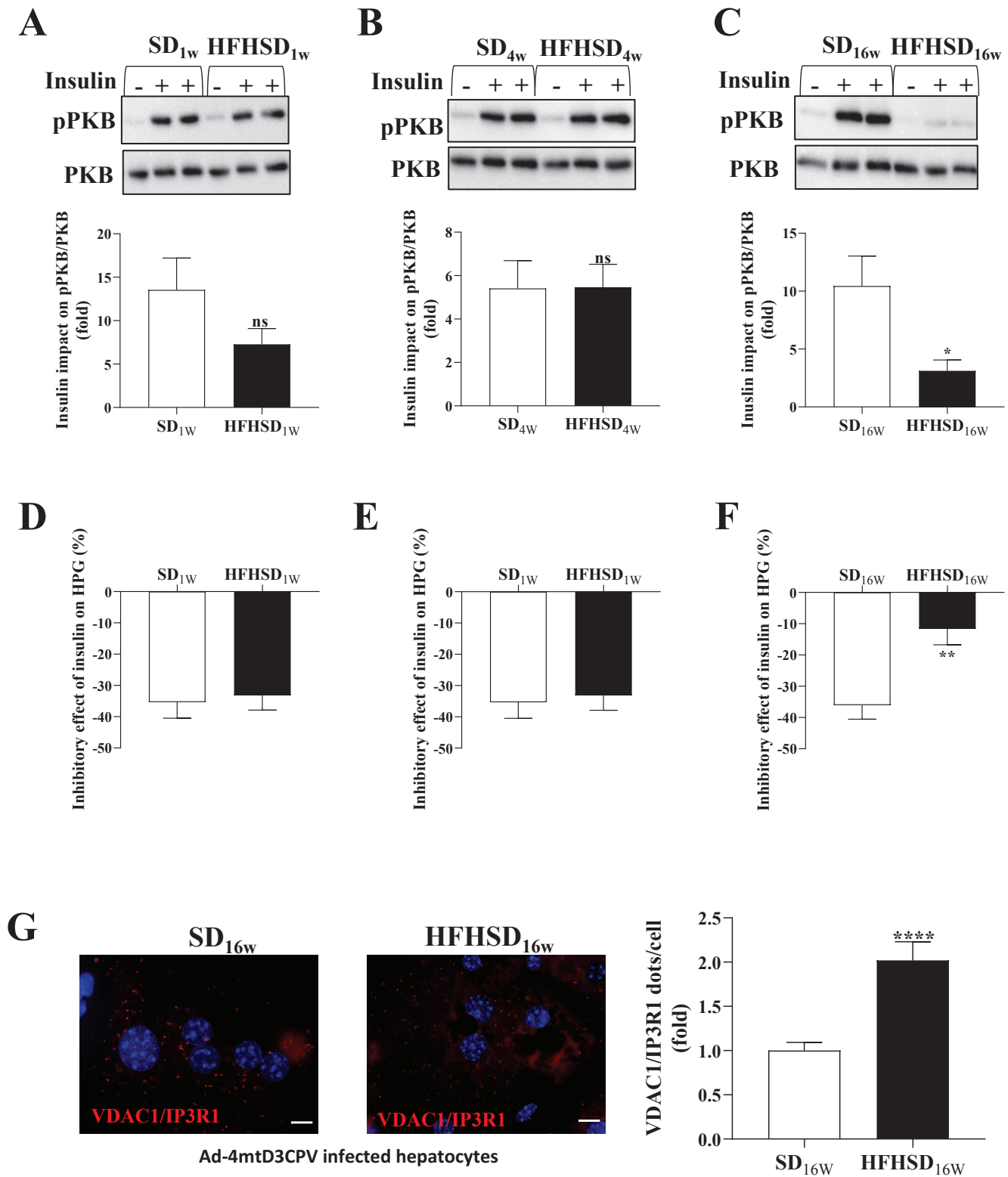
- Supplementary Figure 1 : page 2
- Supplementary Figure 2 : page 3
- Supplementary Figure 3 : page 4
- Supplementary Figure 4 : page 5
- Supplementary Figure 5 : page 6
- Supplementary Figure 6 : page 7
- Supplementary Figure 7 : page 8



Supplementary Figure 1: Early disruption of ER-mitochondria contacts site in liver of HFHSD-fed mice. A-E) Representative images (scale bar = 10 μ m) of VDAC1-IP3R1 contacts measured by *in situ* PLA on fixed liver of SD and HDHSD mice after 1 week (A), 4 weeks (B), 8 weeks (C), 12 weeks (D) and 16 weeks (E) of feeding. Brown dots illustrate VDAC1-IP3R1 proximity. Quantitative analysis is illustrated in Figure 1F.

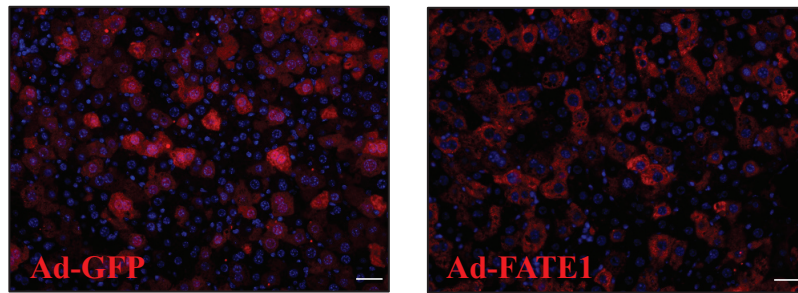


Supplementary Figure 2: Disruption of ER-mitochondria interactions in the liver of HFHSD mice after 1 week and 16 weeks of feeding. A-B) Representative TEM images (scale bar: field view=2 μ m; zoom =0,5 μ m) illustrating ER-mitochondria interactions in the liver of SD and HFHSD mice after 1 week (A) and 16 weeks (B) of feeding. In each panel, the upper image is a field view of liver whereas the image at bottom illustrates a zoom. Quantitative analysis of the % of mitochondria membrane in contact with ER is illustrated in Figures 1G and 1H. C) Quantification of the number of ER-mitochondria contacts per mitochondria after 1 and 16 weeks of SD or HFHSD (n= 142-177 mitochondria analysed in n=3 mice/group). ****p<0.0001 vs SD_{16W}.

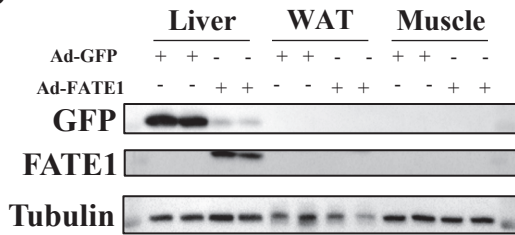


Supplementary Figure 3: Late alteration of hepatic insulin signalling after HFHSD feeding and impact of adenovirus infection on ER-mitochondria interactions in primary hepatocytes of HFHSD_{16w}. Representative Western blots (at top) and quantitative analysis (at bottom) of insulin effect on PKB phosphorylation in isolated primary hepatocytes of SD and HFHSD mice after 1 week (A), 4 weeks (B) and 16 weeks (C) of feeding (duplicate from n=4 mice/group). D-F Inhibitory effect of insulin on hepatic glucose production (HGP) measured in primary hepatocytes of SD and HFHSD mice after 1week (D), 4weeks (E), and 16 weeks (F) (n=6-11 mice/group). G) Representative images (at left, scale bar = 5µm) and quantitative analysis of VDAC1/IP3R1 dots/cells on primary mouse hepatocytes after 36h of adenovirus infection (with Ad-4mtD3CPV) (n=67-72 images, 4 mice/group). ns= non significant, *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.0001 vs SD_{16w}

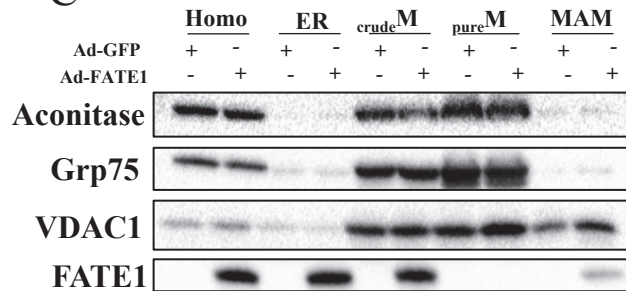
A



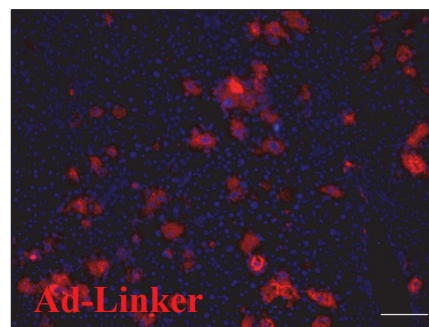
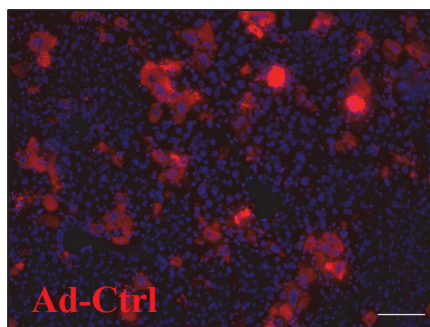
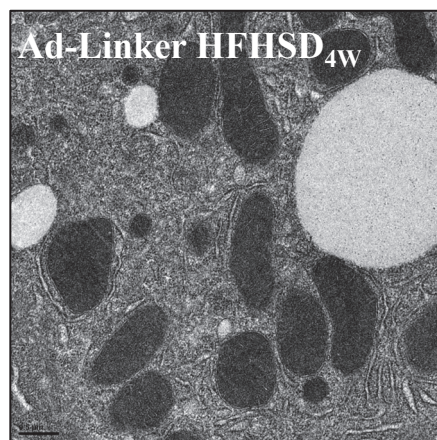
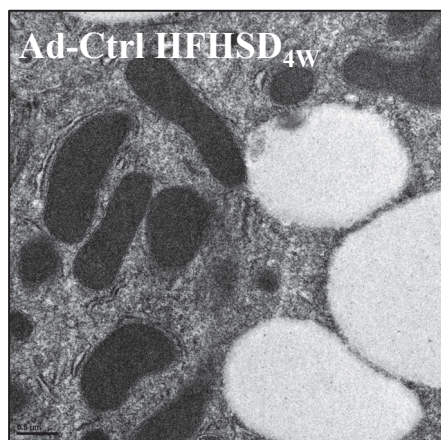
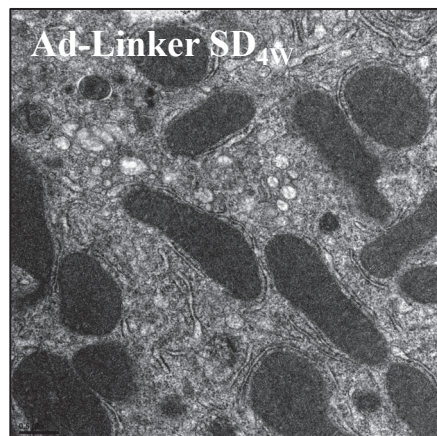
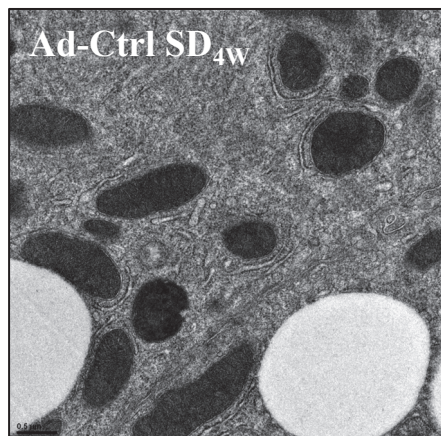
B



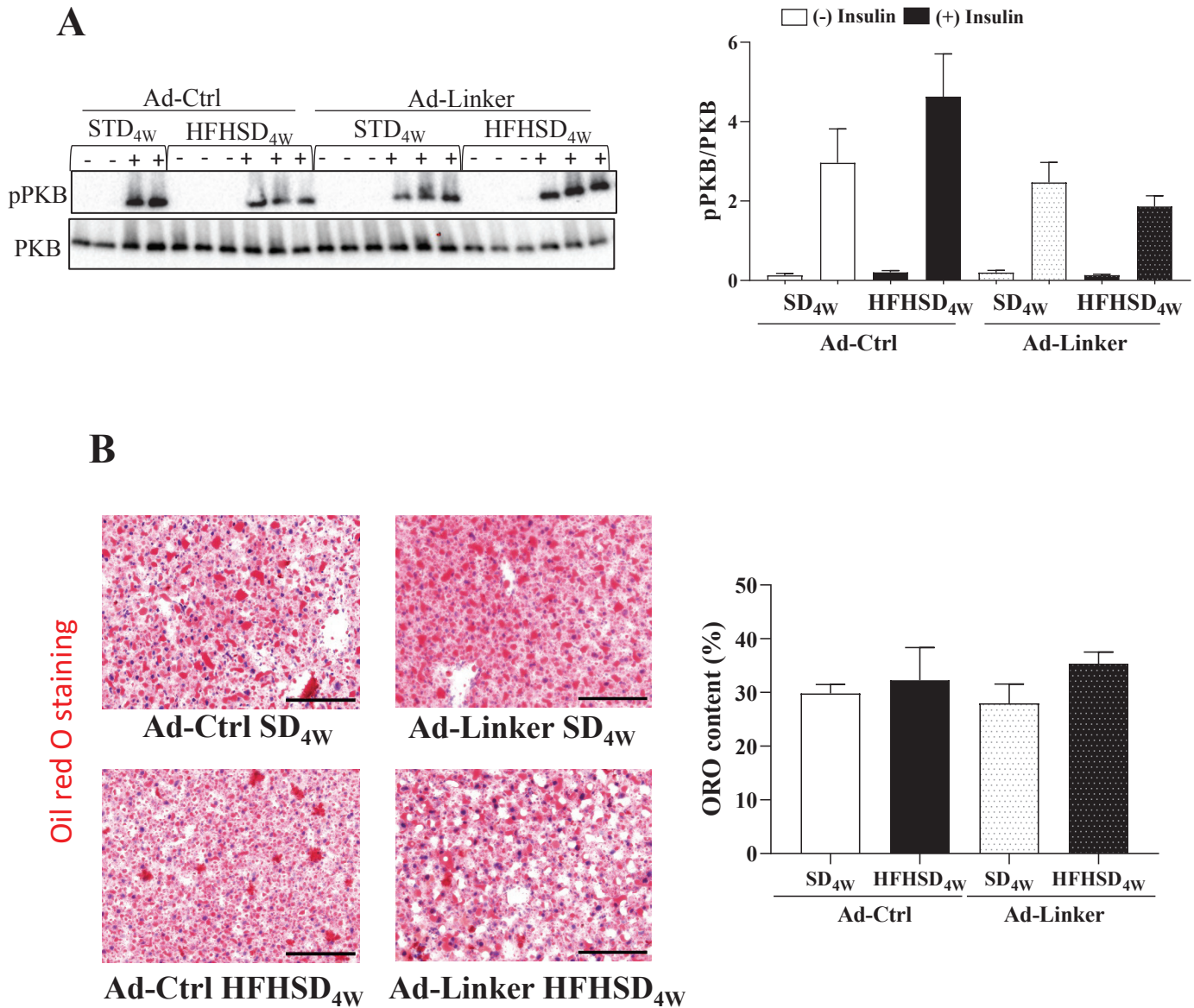
C



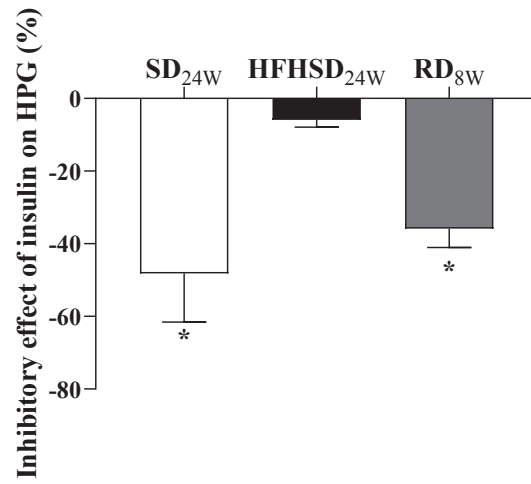
Supplementary Figure 4: Validation of both the expression and the addressing of FATE1 in infected mouse liver. A) Representative images (scale bar = 10 μ m) of immunofluorescence of GFP and FATE1 (revealed with a red secondary antibody) in the liver of ad-GFP and Ad-FATE1 infected mice after 15 days of infection (A). B) Representative Western blots in the liver, white adipose tissue (WAT) and skeletal muscle of infected mice, validating the specific infection of the liver (B). Representative Western blots in the different subcellular fractions (homogenates (Homo), ER, crude^M= crude mitochondria, pure^M= pure mitochondria and MAM) of the liver of infected mice, validating the addressing of FATE1 in hepatic ER and MAM fractions (C)..

A**B**

Supplementary Figure 5: Imaging of the infection of the liver with the Ad-Ctrl and Ad-linker after 4 weeks of infection and their impact on ER-mitochondria contact sites. A) Representative images (scale bar = 100 μ m) of RFP immunofluorescence in the liver of infected mice, validating that the expression of proteins (Ctrl and linker) is always present 4 weeks post-infection. B) Representative TEM images (scale bar = 0.5 μ m) illustrating ER-mitochondria interactions in the liver of infected mice after 4 weeks of SD and HFHSD feeding.



Supplementary Figure 6: Effect of the expression of the linker in the mouse liver on hepatic insulin signalling and lipid accumulation. A) Representative Western blots (at left) and quantitative analysis of insulin-mediated PKB phosphorylation in isolated primary hepatocytes of SD and HFHSD mice after 4 weeks of infection with Ad-Ctrl/Ad-Linker (n=4 mice/ group). B) Representative images (scale bar = 100µm) and quantitative analysis (%) of hepatic lipid accumulation measured by oil red O staining (ORO) in fixed liver of infected mice after 4 weeks of SD or HFHSD feeding (n=5 mice/group).



Supplementary Figure 7: Improvement of the metabolic effect of insulin in primary hepatocytes of obese mice after a reversal diet of 8 weeks (RD_{8W}). Inhibitory effect of insulin on hepatic glucose production (HGP) measured in primary hepatocytes of SD_{24W}, HFHSD_{24W} and RD_{8W} mice (n=5-6 mice/group). *p<0.05 vs HFHSD_{24W}.

II. Partie 2 : L'altération structurale des MAMs dans l'obésité et l'insulino-résistance est un phénomène récurrent et indépendant du fond génétique.

A. Résultats non publiés :

Introduction

Comme précédemment évoqué, des divergences dans la littérature sont apparues quant à l'évolution des MAMs dans le contexte d'obésité chronique dans différents tissus, avec certaines équipes qui mettent en avant une potentialisation des contacts^{267,298}, tandis qu'une altération des MAMs est retrouvée dans d'autres études^{274,323,371}. Comme nous avons pu le constater dans l'article n°1, les MAMs sont des structures très dynamiques et sensibles à l'environnement rendant complexe leur exploration structurale et surtout fonctionnelle. Comprendre d'où provient la divergence de la littérature pourrait permettre de mieux appréhender cette dynamique des MAMs afin d'affiner et d'ajuster les techniques d'exploration.

Parmi les variables pouvant conduire à cette divergence, nous nous sommes intéressés au fond génétique des souris C57Bl/6J. En effet, nous avons constaté que les équipes outre-Atlantique, qui trouvaient un renforcement des MAMs, dans l'IR et l'obésité utilisaient des souris du Jackson laboratory de fond C57Bl/6J, tandis que les équipes européennes, qui trouvaient une altération des MAMs, utilisaient des souris de chez Envigo de fond génétique C57Bl/6J-Ola-Hsd.

La souris C57Bl/6 est la première souche de souris à avoir son génome entièrement séquencé, et représente la souche la plus répandue dans le monde, notamment en matière de recherches portant sur les maladies métaboliques. Cette lignée fut développée en 1921, aux États-Unis, puis introduite dans deux laboratoires américains, le Jackson Laboratory (C57Bl/6J = **B/6J**) et le National Institutes of Health (C57Bl/6N = **B/6N**). Au fil des années, des dérives génétiques sont apparus dans le génome de ces souris, notamment une mutation spontanée sur le gène *nnt* (nicotinamide nucleotide transhydrogenase) dans les souris B6/J induisant une expression très faible de la protéine NNT dans le foie et les îlots pancréatiques des souris⁵⁰², tandis que les B6/N ont maintenu la forme sauvage du gène *nnt*. Un fait à prendre en considération, puisque la protéine NNT est une translocase de protons de la membrane interne mitochondriale qui intervient dans l'équilibre redox de la mitochondrie via l'élimination d'H₂O₂⁵⁰³. Le stress oxydatif et l'IR étant intimement liés, plusieurs études se sont questionnées quant à la sensibilité des souris B/6J et B/6N face à un régime obésogène. Les résultats montrent que les deux modèles, B/6J et B/6N sont sensibles au développement de maladies métaboliques, avec cependant quelques différences notables. En effet, les souris B/6J mutées présentent un défaut de sécrétion d'insuline au niveau des cellules β, qui se traduit par l'absence d'une hyperinsulinémie durant un HFHSD contrairement aux modèles B/6N, ce qui peut expliquer une prise de TA bien plus faible chez les souris

B/6J en comparaison avec les souris B/6N^{502,504-506}. Ainsi, la mutation *nnt* induit des régulations métaboliques différentielles face à un régime HFHSD et ceci principalement à cause de leurs défauts de sécrétion d'insuline. Étonnamment, aucune investigation n'a été faite sur les nombreux autres sous types de souris et notamment nos souris J-Ola-Hsd. Ainsi, ces observations nous ont conduit vers de nouveaux questionnements (Figure 1A) :

- Est-ce que la souche C57Bl/6/J-Ola-Hsd (B/6J-Ola) de chez Envigo présente la mutation *nnt* ?
- Une différence de fond génétique des souris pourrait-elle être à l'origine des résultats contradictoires sur les MAMs au cours de l'obésité génétique ou nutritionnelle ?
- La mutation du gène *nnt* peut-elle influencer la dynamique des MAMs dans des modèles d'obésité ?

Matériels & Méthodes :

Pour répondre à ces questions, nous avons effectué 2 protocoles afin de regarder l'évolution structurelle et fonctionnelle des MAMs au cours de l'IR lors d'une obésité soit **nutritionnelle**, soit **génétique** dans les différents fonds génétiques de souris utilisés dans l'étude des MAMs au cours de l'obésité et de l'IR :

- **Protocole d'obésité nutritionnelle** : Après une semaine d'acclimatation, les souris **B/6J** (Charles River, avec la mutation *nnt*), **B/6N** (Charles River, sans la mutation *nnt*) et **B/6J-Ola** (Envigo, mutation ou non, à déterminer) (âgées de 4 semaines) ont été nourries avec soit une diète standard (SD) soit une HFHSD pendant 8 semaines
- **Protocole d'obésité génétique** : Une simple semaine d'acclimatation est réalisée sur les souris **ob/ob_{Jax}** (Jackson laboratory, avec normalement la mutation *nnt*) et **ob/ob_{Ola}** (Envigo, mutation ou non, à déterminer) (âgées de 12 semaines) mutées sur le gène de la leptine entraînant une hyperphagie, et leurs contrôles respectifs **WT_{Jax}** (Charles River, avec la mutation *nnt*) et **WT_{Ola}** (Envigo, mutation ou non, à déterminer), possédant le gène sauvage de la leptine compétent donc normophagiques.

Nous avons procédé au génotypage du gène *nnt*, à partir de l'ADN extrait de la queue des souris, par PCR (*polymerase chain reaction*) via un test à 3 amorces permettant de discriminer l'allèle sauvage de *nnt* et l'allèle mutant dépourvu de 7-11 exons. Les amorces ont été conçues d'après l'étude de Nicholson et al⁵⁰⁶ et possèdent les séquences suivantes (5' → 3') :

- **Nnt-COM** (GTAGGGCCAACCTGTTTCTGCATGA)
- **Nnt-WT** (GGGCATAGGAAGCAAATACCAAGTTG)
- **Nnt-MUT** (GTGGAATTCCGCTGAGAGAACTCTT)

L'amorce Nnt-COM participe à l'amplification à la fois de l'allèle sauvage et du muté, tandis que les amorces « WT » et « MUT » sont spécifiques respectivement, de l'allèle sauvage et de l'allèle muté caractéristique des B/6J. Les produits d'amplification : de **579pb pour l'allèle type sauvage** et **743pb pour l'allèle muté**, ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%, puis colorés dans du bromure d'éthidium et visualisés en utilisant une boîte à lumière UV.

A l'issue de chaque protocole d'obésité (nutritionnel et génétique), nous avons étudié les paramètres métaboliques des souris (poids corporel, poids du foie, la glycémie à jeun...) et réalisé des GTT et ITT afin d'étudier les conséquences sur l'homéostasie glucidique corps entier.

Les souris B/6N n'étant pas utilisées dans les études controversées portant sur les MAMs dans l'obésité et l'IR, nous avons poursuivi les explorations en ne gardant que les souris B/6J ; B/6J-Ola sous SD ou HFHSD et les modèles obèses génétiquement. Dans les différents modèles, l'étude structurale des MAMs a été explorée par *in situ* PLA dirigé vers VDAC1 (côté mitochondrie) et IP3R1(côté RE) sur coupe de foie fixé, tandis que l'exploration fonctionnelle des MAMs a été réalisée sur hépatocytes primaires isolés à la fin des protocoles, comme décrit dans *l'article n°1*. Brièvement, 3-4 h post-isolation lorsque les hépatocytes ont adhéré, ceux-ci sont infectés par l'Ad-4mtD3CPV permettant la surexpression de la sonde calcique mitochondriale dans les hépatocytes. Les mesures de fluorescences sont ensuite effectuées, 36h post-infection, à 37°C dans du milieu dépourvu de Ca²⁺. Nous avons mesuré durant 2min les [Ca²⁺]_m basales, puis effectué une stimulation de 100µM d'ATP (ajouté sous forme de pulse). L'enregistrement des flux calciques mitochondriaux après ajout de l'ATP est maintenu durant 2min. Ces mesures nous permettent de calculer la [Ca²⁺]_m basale, le delta (correspondant à la différence entre le pic et la concentration basale) et l'AUC (area under the curve).

Résultats :

Dans un premier temps, nous avons génotypé les différents modèles de souris employés dans l'étude des MAMs dans l'IR et l'obésité ; ceux utilisés dans notre équipe : les **B/6J-Ola** et **ob/ob_{Ola}** (laboratoire Envigo) comparés aux modèles utilisés par les autres équipes et provenant du laboratoire Charles River (fournisseur européen du Jackson laboratory) : les **B/6J**, **B/6N** et **ob/ob_{Jax}**. Nos résultats confirment la présence du gène *nnt* muté (743 pb) chez les souris B/6J et qui se retrouve également dans le modèle ob/ob_{Jax} contrairement aux souris B/6N, du même fournisseur, qui présentent la forme sauvage du gène *nnt* (579pb) (Figure 1B). Aussi, nous avons pu constater que les souris utilisées au sein de notre laboratoire, les B/6J-Ola et les ob/ob_{Ola} portaient la forme sauvage du gène *nnt* (579pb), semblable au modèle B/6N. Par ces résultats, nous avons confirmé une différence de fond génétique entre notre équipe (B16/J-Ola et ob/ob_{Ola} forme sauvage) et l'équipe d'Arruda et Thoudam (B16/J, et ob/ob_{Jax} forme mutée), pouvant participer à la controverse.

Ensuite, nous avons étudié l'impact de cette mutation mitochondriale sur le phénotype métabolique des souris puis sur la structure et la fonction des MAMs dans le foie, en condition saine et d'IR associée à une obésité génétique (*ob/ob*) ou nutritionnelle (HFHSD_{8w}).

Pour le protocole **d'obésité nutritionnelle**, nous avons constaté que la prise de poids des souris suite au régime HFHSD_{8w} était semblable dans chaque groupe, en comparaison avec les souris SD_{8w}, indépendamment de la mutation *nnt* (Figure 2A). De même, le poids du foie des souris après 8 semaines de HFHSD, n'est pas significativement augmenté en comparaison avec les souris SD dans chacun des groupes (mutés ou non) (Figure 2B), en accord avec les données de l'article n°1 montrant une augmentation du poids du foie seulement après 12 semaines de HFHSD. En revanche, nous avons constaté que les souris mutées, B/6J sous HFHSD_{8w}, ne présentaient pas une hyperglycémie après une nuit de jeûne contrairement aux souris HFHSD_{8w} non mutées (B/6N, B/6J-Ola) qui présentent des glycémies significativement supérieures aux souris SD_{8w} (Figure 2C). De plus, le régime obésogène induit chez toutes les souris HFHSD_{8w}, une augmentation significative de l'AUC de leur GTT en comparaison avec les souris SD_{8w}, témoignant de la mise en place d'une intolérance au glucose des souris, indépendamment de leur fond génétique (Figure 2D). En accord avec nos résultats précédemment obtenus (article n°1), les souris HFHSD_{8w} ne présentent pas encore d'IR systémique, qu'il s'agisse des souches mutées ou sauvages (Figure 2E). Par conséquent, la mutation *nnt* interfère très peu avec la mise en place des désordres métaboliques induits par 8 semaines de surnutrition.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'évolution structurale et fonctionnelle des MAMs dans ces modèles nutritionnels. En accord avec nos précédentes études, 8 semaines de régime HFHSD induisent une diminution des contacts VDAC1-IP3R1 dans le foie des souris en comparaison avec le régime SD_{8w} (Figure 3A) et ceci dans chacun des groupes de souris, mutées ou non. Ainsi, l'altération structurale des MAMs dans un contexte d'obésité nutritionnelle est un phénomène robuste et constant qui n'est pas influencé par la mutation *nnt*. Ensuite, nous avons exploré la fonctionnalité des MAMs via la mesure des transferts calciques entre le RE et la mitochondrie sur des hépatocytes primaires. De manière intéressante, le régime HFHSD_{8w} induit, chez les souris mutées B6/J, une augmentation de la $[Ca^{2+}]_m$ basale contrairement aux souris non mutées, B6/J-Ola, qui diminuent leur $[Ca^{2+}]_m$ basale (Figure 3C). Aussi, une augmentation significative de l'AUC $[Ca^{2+}]_m$ mais pas du Delta, après stimulation par l'ATP est retrouvée chez les souris mutées, B/6J, témoignant d'une augmentation du transfert calcique aux MAMs, contrairement aux souris non mutées B6/J-Ola qui n'ont pas de variation de transfert de Ca^{2+} en fonction du régime (Figure 3D, 3E). Ces résultats mettent en avant une discordance entre la structure des MAMs, retrouvée altérée, et la fonctionnalité dans les modèles mutés qui semblent potentialisée. Ainsi, la mutation du gène *nnt*, semble augmenter l'accumulation de Ca^{2+} mitochondrial en situation d'IR dans l'obésité nutritionnelle, en accord avec les données d'Arruda et al.²⁶⁷. Même si le transfert de Ca^{2+} aux MAMs, dans nos modèles B/6J-Ola ne varie pas, ces souris présentent tout de

même une diminution du niveau de Ca^{2+} basal mitochondrial témoignant d'une altération de l'homéostasie calcique.

Pour le protocole d'**obésité génétique**, nous avons constaté, similairement au protocole d'obésité nutritionnelle, que le fond génétique n'influçait pas le poids corporel et le poids du foie qui sont augmentés significativement et de façon similaire dans les modèles *ob/ob_{Jax}* et *ob/ob_{Ola}* par rapport à leurs contrôles respectifs *WT_{Jax}* et *WT_{Ola}* (Figure 4A et 4B). De même, la mise en place de l'intolérance au glucose et de l'IR systémique, ne se trouvent pas impactées par la mutation, puisque les groupes *ob/ob_{Jax}* et *ob/ob_{Ola}* comparés respectivement aux *WT_{Jax}* et *WT_{Ola}* présentent une augmentation de l'AUC de leur GTT (Figure 4D) et de l'AOC de leur ITT (Figure 4E), indépendamment du fond génétique. Comme pour le protocole d'obésité nutritionnelle, la mutation *nnt* n'affecte pas la mise en place du phénotype métabolique face à une obésité génétique.

L'exploration structurale des MAMs montre une diminution significative des contacts VDAC1/IP3R1 chez les souris *ob/ob_{Jax}* et *ob/ob_{Ola}* en comparaison, respectivement, avec les *WT_{Jax}* et *WT_{Ola}*, confirmant à nouveau l'altération des MAMs dans l'IR indépendamment de la mutation. Concernant les fonctions des MAMs dans l'obésité génétique, étonnamment les $[\text{Ca}^{2+}]_m$ basales ne varient pas entre les souris *ob/ob* et les souris WT et ceci pour les deux fonds génétiques (Figure 5C). Cependant, les souris mutées *ob/ob_{Jax}* présentent une augmentation significative de l'AUC $[\text{Ca}^{2+}]_m$ mais pas du delta après stimulation à l'ATP, témoignant d'une augmentation du transfert calcique aux MAMs, en comparaison avec les souris *WT_{Jax}*, contrairement aux souris non mutées *ob/ob_{Ola}* et *WT_{Ola}* qui ne varient pas (Figure 5D et 5E). De façon surprenante, ces résultats dévoilent, comme pour l'obésité nutritionnelle, une régulation différentielle suivant le fond génétique entre la structure et les fonctions des MAMs puisqu'une altération des MAMs est retrouvée dans les modèles *ob/ob* en comparaison avec les WT, tandis que les fonctions calciques semblent potentialisées dans les modèles mutés *ob/ob_{Jax}* et non altérées dans les *ob/ob_{Ola}*.

Conclusion :

En conclusion, qu'il s'agisse de modèle d'obésité génétique ou nutritionnelle, le fond génétique n'influence pas de manière majeure le phénotype métabolique des souris. De même, la mise en place de l'intolérance au glucose et la sensibilité à l'insuline évoluent de la même manière quelle que soit la souche de souris avec cependant une hyperglycémie après une nuit de jeûne chez les souris non mutées obèses en comparaison avec les modèles mutés. Il est important de noter que l'altération structurale des MAMs, face à un environnement obésogène (génétique et nutritionnel), est un phénomène solide et reproductible puisque celui-ci est retrouvé dans chaque modèle d'obésité et ceci indépendamment du fond génétique. La mutation de *nnt* ne semble pas affecter la dynamique structurale des MAMs en situation d'IR, par conséquent les différences de fonds génétiques entre les équipes ne seraient pas à l'origine de la controverse dans la littérature. Cependant, les fonctionnalités pourraient être touchées par

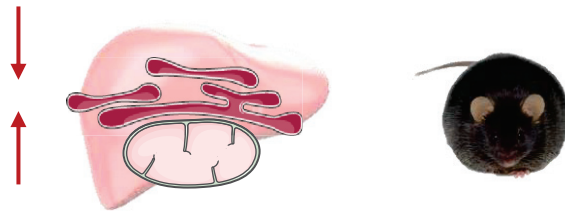
la mutation du gène *nnt*, puisque des divergences apparaissent entre les différents fonds génétiques. En effet, les souris mutées obèses, génétiquement et par la nutrition, présentent une augmentation à la fois de la $[Ca^{2+}]_m$ basale et de la $[Ca^{2+}]_m$ après stimulation à l'ATP, contrairement aux souris non mutées obèses. Ces résultats sont surprenants puisque nous nous attendions, pour les modèles non mutés, à retrouver une altération des flux calciques en adéquation avec l'altération structurale des MAMs, et en accord avec nos données sur les souris à 1 et 4 semaines de HFHSD (Article n°1). Il est possible que ce phénomène soit dû à l'expression de la sonde calcique dans les mitochondries puisque nous avons précédemment montré que la dynamique des MAMs peut être complètement bouleversée par l'application d'un stress dans des mitochondries déjà fragilisées par 16 semaines de HFHSD (article n°1). Nous ne pouvons donc pas exclure qu'après 8 semaines de diète, un phénomène similaire opère, ce qui pourrait expliquer que l'altération des MAMs ne soit pas accompagnée d'une diminution des fonctions calciques dans les modèles non mutés, comme attendu. Les modèles mutés obèses, quant à eux, présentent une induction importante de la $[Ca^{2+}]_m$, qui serait due au déséquilibre redox provoqué par la mutation comme l'a montré Navarro et al, où l'association d'une longue diète obésogène et de la mutation *nnt* entraînait une plus grande sensibilité à l'ouverture du mPTP⁵⁰⁷. Ceci peut s'expliquer par la relation qui lie le statut redox mitochondrial et l'activité de MCU, notamment le renforcement de son activité lors de l'augmentation de l'état oxydatif de la matrice mitochondriale³³⁴ favorisant l'entrée de Ca^{2+} et par conséquent la surcharge calcique. Ainsi, la mutation de *nnt*, pourrait favoriser l'activation de MCU entraînant une augmentation des entrées de Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale malgré la diminution de MAMs induite par l'obésité. Cette augmentation des échanges de Ca^{2+} entre la mitochondrie et le RE chez les souris mutées est en accord avec les résultats trouvés par Arruda et al²⁶⁷, même si une divergence existe sur les contacts physiques. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_m$ chez les souris mutées obèses, pourrait résulter à la fois de la perturbation des MAMs par la sonde calcique et/ou d'une altération de l'équilibre redox favorisant l'absorption du Ca^{2+} .

Nos résultats montrent que l'utilisation de souris de fonds génétiques différents ne peut expliquer la controverse de la littérature puisque l'altération structurale des MAMs est retrouvée dans chaque modèle obèse génétique et nutritionnel. Cependant, l'impact de la mutation de *nnt* sur la fonctionnalité des MAMs n'est pas négligeable, c'est pourquoi il est important de rester attentif aux modèles utilisés et d'intégrer cette composante dans les conclusions des futures études.

Controverse des MAMs dans le foie de souris obèses et l'insulino-résistance

A

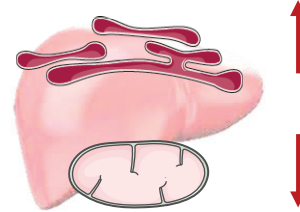
Renforcement des MAMs



Arruda et al. (2014)
Thoudam et al
(2019)
Jackson laboratory

C57Bl/6J

Altérations des MAMs



Tubbs et al. (2014); Theurey et al.
(2016), Rieusset et al. (2016)

Envigo

C57Bl/6J-Ola-Hsd

B

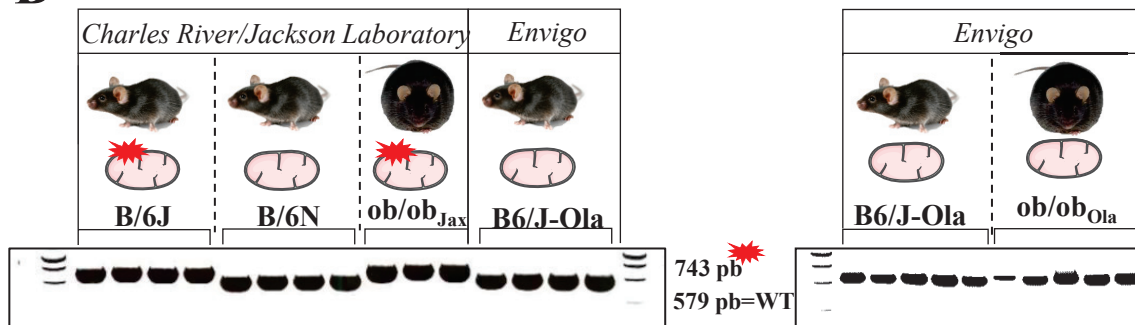


Figure 1: Modèles d'étude des MAMs dans l'insulino-résistance et l'obésité possèdent des fonds génétiques différents.

A) A gauche, les études trouvant une augmentation des MAMs en condition d'insulino-résistance, utilisent des modèles de souris C57Bl/6J fourni par le Jackson Laboratory. A droite, les études, menées par notre laboratoire, démontrant une altération des MAMs dans l'obésité sur des modèles C57Bl/6J-Ola-Hsd fourni par Envigo.

B) Génotypage du gène *nnt* par PCR des queues de souris : B/6J (C57Bl/6J), B/6N (C57Bl/6N) et ob/ob_{Jax} fourni par Charles River (fournisseur européen de Jackson Laboratory) et B6/J-Ola (C57Bl/6J-Ola-Hsd) et ob/ob_{Ola} issu d'Envigo (n= 3-5souris /groupe). Présence de la forme mutée de *nnt* chez les souris B/6J et ob/ob_{Jax} tandis que les souris B/6N, B6/J-Ola et ob/ob_{Ola}

Abréviations: pb = paire de base; *nnt* = nicotinamide nucleotide transhydrogenase; MAMs = mitochondria associated ER-membrane; = mutation sur le gène *nnt*.

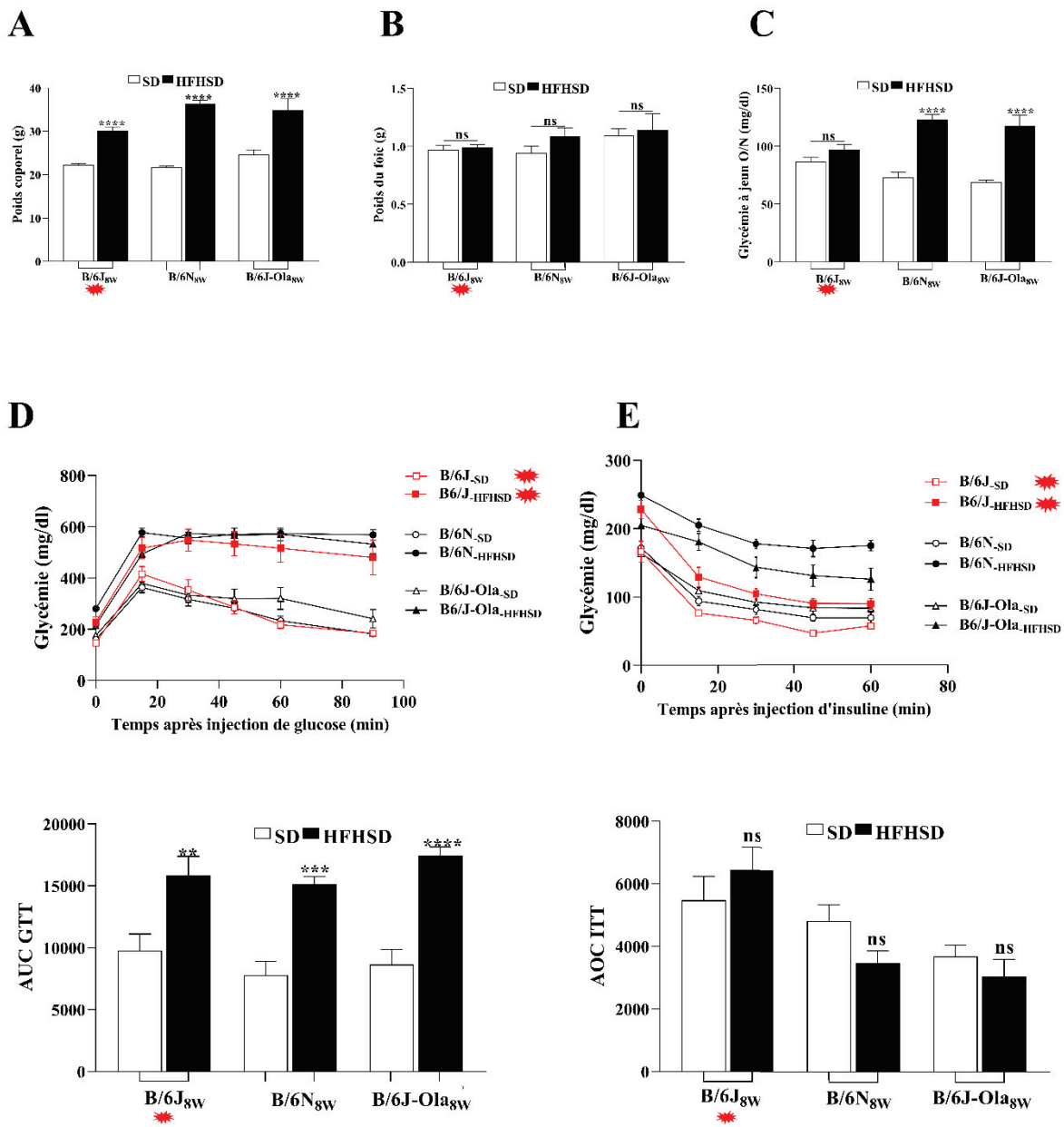


Figure 2 : Impact du fond génétique sur le phénotype métabolique dans le contexte de l'obésité nutritionnelle. Après 8 semaines de régime SD ou HFHSD chez les souris B/6J, B/6N, B/6J-Ola: le poids corporel (A), le poids du foie (B), la glycémie après une nuit de jeûne (C), la tolérance au glucose avec un GTT (D) et l'insulino-résistance (E) ont été mesurés. ns = non significatif, SD = standard diet, HFHSD = high fat high sucrose diet, O/N = over-night ; * = mutation *mnt*. n = 3-6 souris / groupe, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ vs SD.

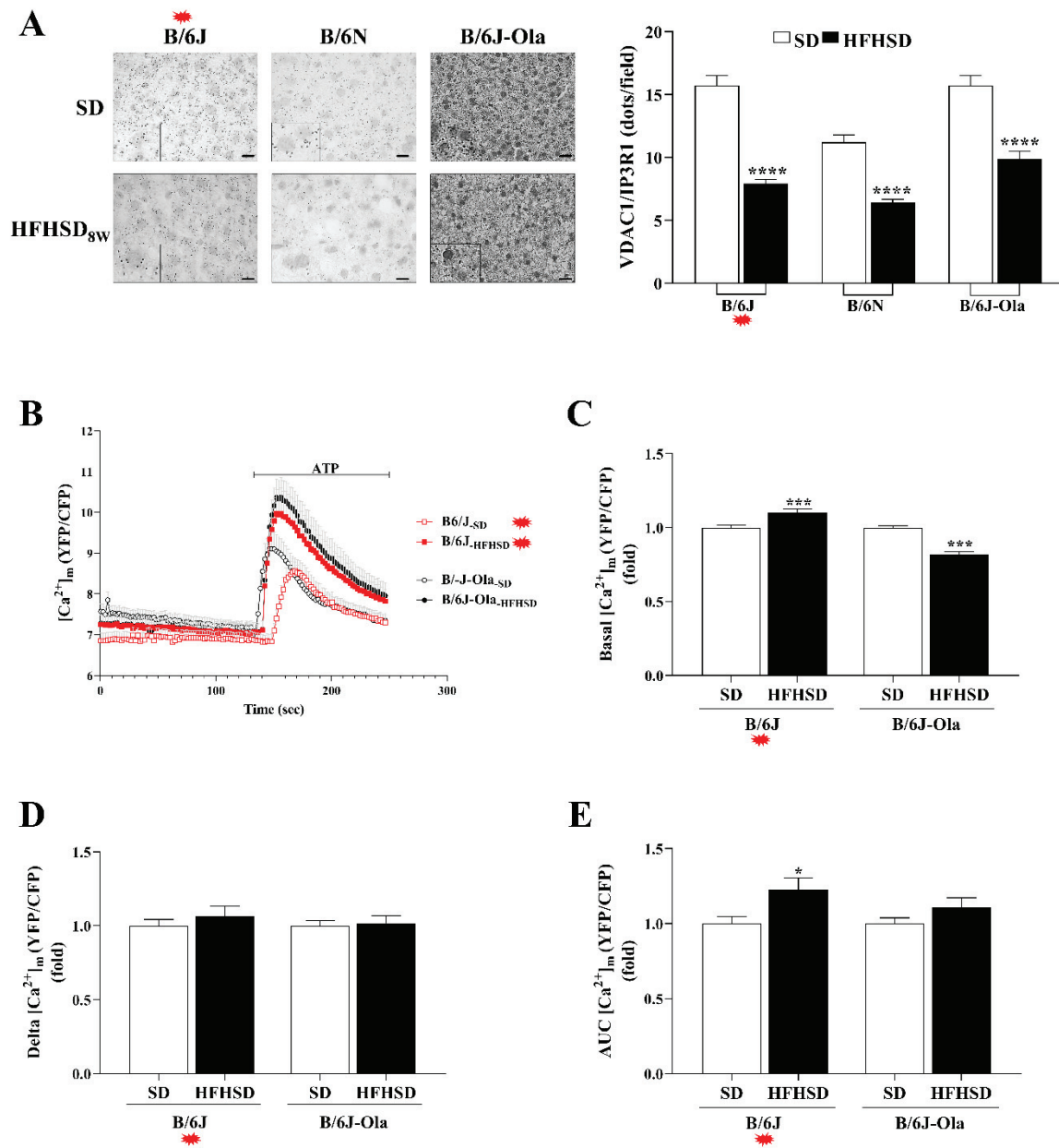


Figure 3: Impact du fond génétique sur l'étude structurale et fonctionnelle des MAMs dans l'obésité nutritionnelle. (A) Images représentatives (à gauche) et analyse quantitative (à droite) des interactions VDAC1-IP3R1 par *in situ* PLA dans le foie de souris B/6/J, B/6/N et B/6/J-Ola après 8 semaines de SD ou HFHSD (échelle 10µm ; n=30-50 images/souris ; n=3-5 souris/groupe). Courbe représentative du Ca²⁺ mitochondrial (B), et analyse quantitative du Ca²⁺ basal (C), du delta (D) et de l'AUC (E) chez les souris B/6/J, B/6/N et B/6/J-Ola après 8 semaines de SD/HFHSD (n=173-267 cellules). SD = standard diet, HFHSD = high fat high sucrose diet, AUC = area under the curve, * = mutation *mnt* ; *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001 vs SD.

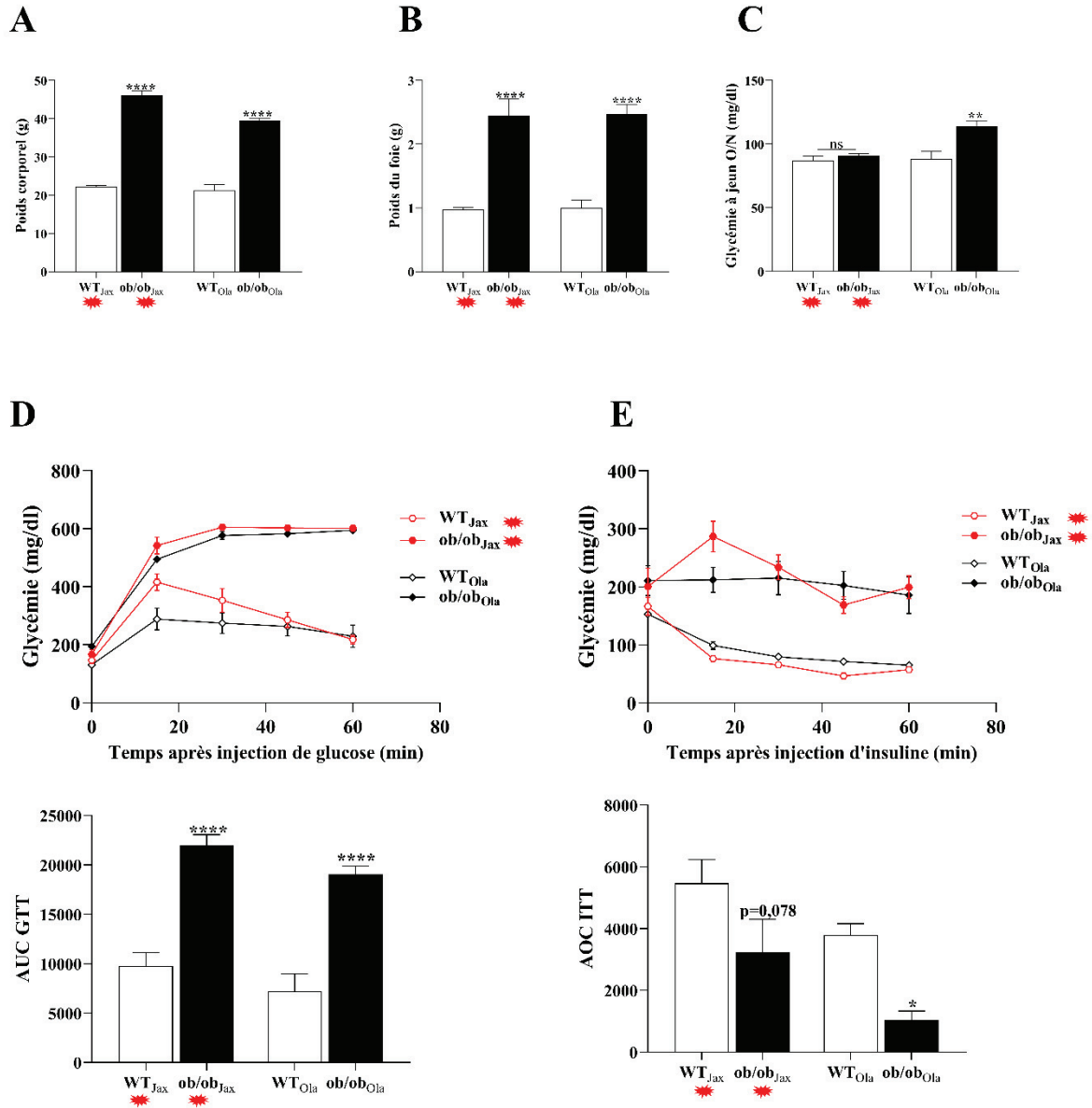


Figure 4 : Impact du fond génétique sur le phénotype métabolique dans le contexte de l'obésité génétique. Chez les souris WT_{Jax}, ob/ob_{Jax}, WT_{Ola} et ob/ob_{Ola}: le poids corporel (A), le poids du foie (B), la glycémie après une nuit de jeûne (C), la tolérance au glucose avec un GTT (D) et l'insulino-résistance (E) ont été mesurés. ns = non significatif, O/N = over-night ; * = mutation *ntl*. n = 3-6 souris / groupe, **p<0,01, ****p<0,0001 vs WT.

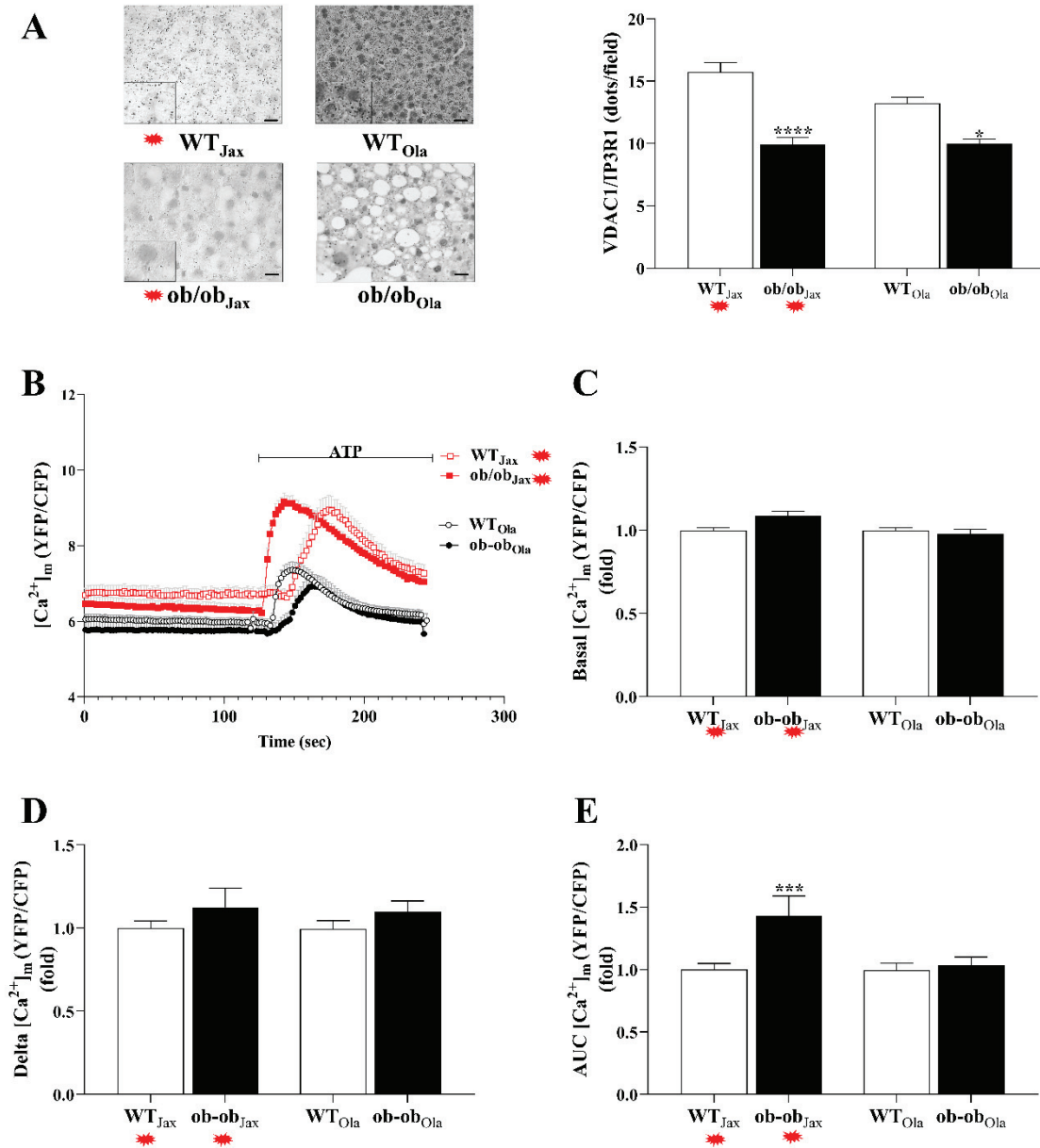
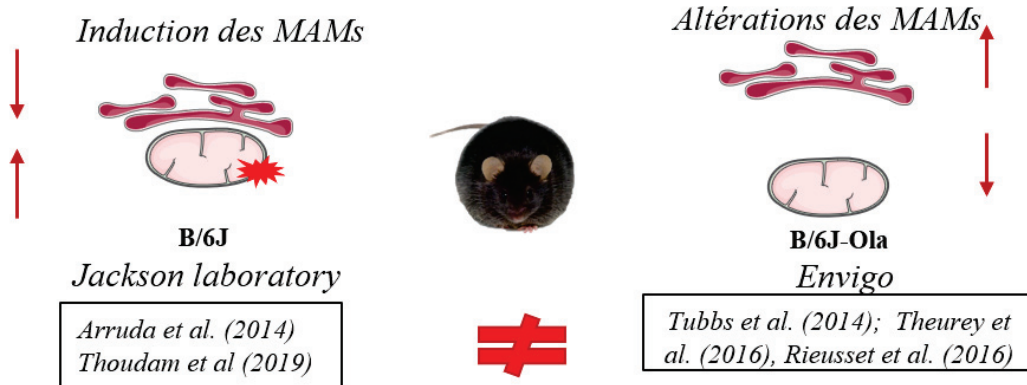


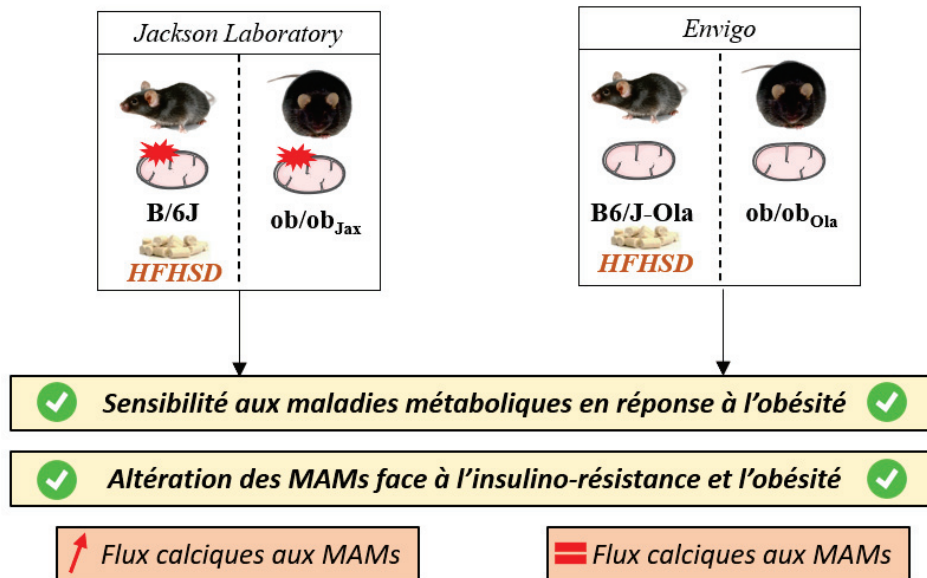
Figure 5: Impact du fond génétique sur l'étude structurale et fonctionnelle des MAMs dans l'obésité nutritionnelle. (A) Images représentatives (à gauche) et analyse quantitative (à droite) des interactions VDAC1-IP3R1 par *in situ* PLA dans le foie de souris WT_{Jax}, ob/ob_{Jax}, WT_{Ola} et ob/ob_{Ola} (A) (n=20-50 images/souris; n=3-4 souris/groupe). Courbe représentative du Ca²⁺ (B), mitochondrial et analyse quantitative du Ca²⁺ basal (C), du delta (D) et de l'AUC (E) chez les souris WT_{Jax}, ob/ob_{Jax}, WT_{Ola} et ob/ob_{Ola} (, n=47-207 cellules). AUC = area under the curve, * = mutation *mt*. *p<0,05; ***p<0,001; ****p<0,0001 vs WT.

B. Schéma bilan

Controverse des MAMs dans l'insulino-résistance et l'obésité



Impact de la mutation *nnt* ?



III. Partie 3 : Préservation des fonctions intrinsèques du Ca^{2+}

intracellulaire et du couplage excitation-contraction dans la fibre musculaire de souris obèse.

A. Résumé

Le DT2 et l'obésité sont des pathologies associées à des altérations de l'homéostasie calcique qui peuvent participer au développement de dysfonctions musculaires⁵⁰⁸. Aussi, des études ont montré qu'un régime HFD chez la souris pouvait induire une diminution de la force musculaire dans ces modèles^{509,510}. Le Ca^{2+} , dans le muscle joue un rôle essentiel à la fois dans les cascades de signalisation mais aussi dans la contraction musculaire. De manière étonnante, très peu d'études se sont intéressées à l'homéostasie calcique de la fibre musculaire au cours du couplage excitation-contraction (CEC) en contexte d'obésité. Le but de cette étude a été d'effectuer une caractérisation fonctionnelle approfondie de l'homéostasie calcique au cours du CEC dans la fibre musculaire isolée de souris rendues obèses et IR par un régime HFHSD pendant 16 semaines.

Les propriétés des fibres musculaires ont été étudiées avec des approches d'électrophysiologie de voltage-clamp sur cellules entières et d'imagerie confocale fluorescente.

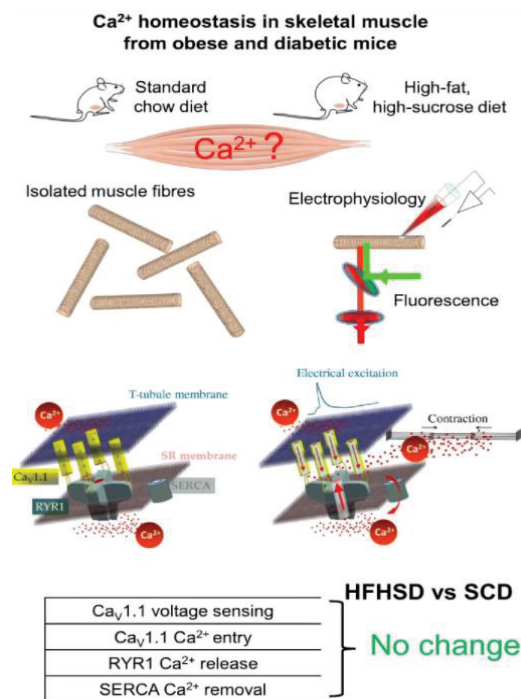
- L'intégrité et la densité du réseau des tubules transversaux (Tubule-T), responsables du transport de l'excitation membranaire à travers les fibres musculaires, ont été évaluées avec un colorant voltage sensible Di-8-ANEPPS.
- L'activité des canaux $\text{CaV}1.1$ a été étudiée en mesurant les courants de la membrane plasmique après application d'impulsions dépolarisantes voltage-clamp d'amplitudes croissantes.
- L'activité des RyRs a été évaluée par mesure du Ca^{2+} cytosolique par Rhod-2.
- La sensibilité des canaux $\text{CaV}1.1$ voltage-dépendants a été caractérisée par de courtes impulsions dépolarisantes de voltage-clamp. Le fluo-4 a permis la mesure de la libération spontanée de Ca^{2+} tandis que le fluo 4FF est utilisé pour mesurer la recapture du Ca^{2+} cytosolique par les SERCA dans le réticulum sarcoplasmique après une excitation. La réponse à un protocole de stimulation par fatigue (30 trains d'impulsions dépolarisantes de 5 ms de long délivrées à 100 Hz) a été déterminée à partir de la mesure de l'évolution temporelle du Ca^{2+} via le fluo 4FF.

Les différentes explorations d'électrophysiologie ont démontré que les fonctionnalités calciques étaient remarquablement bien conservées dans la fibre musculaire issue de souris HFHSD_{16w} en comparaison avec les souris SD_{16w}. En effet, les expériences montrent que la qualité des tubules-T est préservée dans la fibre musculaire malgré la diète obésogène, avec un maintien de l'organisation et de la densité des tubules-T essentiels au CEC. De même, pour les canaux voltage-dépendants $\text{CaV}1.1$, où

leur nombre et leur sensibilité ne sont pas modifiés dans les fibres HFHSD. Les RyRs et les SERCA présentent également des fonctions inchangées malgré le régime. Même si, les résultats évoquent une légère augmentation de l'activité spontanée des RyRs au repos en HFHSD, l'homéostasie globale de la fibre musculaire reste préservée. Et pour finir, les réponses au protocole de fatigue musculaire ne montrent pas de changement significatif des fibres selon le régime. Par rapport, aux données de la littérature évoquant une altération de l'homéostasie calcique cellulaire, il est possible que celle-ci soit bien présente dans ce modèle et suffisante pour altérer les cascades de signalisation, mais trop faible pour impacter le CEC. Aussi, il est important de noter que dans ce modèle, la fibre musculaire se trouve complètement isolée, et par conséquent on ne peut pas exclure la perte des régulations présentes *in vivo* liées à l'environnement gluco-lipotoxique lié au régime HFHSD.

En résumé, cette étude démontre l'étonnante préservation des fonctions calciques et du CEC dans la fibre musculaire isolée de souris rendues obèses et IR par une diète HFHSD.

B. Schéma bilan



Préservation des fonctions intrinsèques du Ca²⁺ intracellulaire et du couplage excitation-contraction dans la fibre musculaire de souris obèse (Jaque-Fernandez et al, 2020)

C. [Article n°2 en collaboration](#) : « Preserved Ca²⁺ handling and excitation–contraction coupling in muscle fibres from diet-induced obese mice »



Preserved Ca²⁺ handling and excitation–contraction coupling in muscle fibres from diet-induced obese mice

Francisco Jaque-Fernandez¹ · Agathe Beaulant² · Christine Berthier¹ · Laloé Monteiro¹ · Bruno Allard¹ · Mariana Casas³ · Jennifer Rieusset² · Vincent Jacquemond¹

Received: 4 May 2020 / Accepted: 6 July 2020
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2020

Abstract

Aims/hypothesis Disrupted intracellular Ca²⁺ handling is known to play a role in diabetic cardiomyopathy but it has also been postulated to contribute to obesity- and type 2 diabetes-associated skeletal muscle dysfunction. Still, there is so far very limited functional insight into whether, and if so to what extent, muscular Ca²⁺ homeostasis is affected in this situation, so as to potentially determine or contribute to muscle weakness. In differentiated muscle, force production is under the control of the excitation–contraction coupling process: upon plasma membrane electrical activity, the Ca_v1.1 voltage sensor/Ca²⁺ channel in the plasma membrane triggers opening of the ryanodine receptor Ca²⁺ release channel in the sarcoplasmic reticulum (SR) membrane. Opening of the ryanodine receptor triggers the rise in cytosolic Ca²⁺, which activates contraction while Ca²⁺ uptake by the SR ATPase Ca²⁺-pump promotes relaxation. These are the core mechanisms underlying the tight control of muscle force by neuronal electrical activity. This study aimed at characterising their inherent physiological function in a diet-induced mouse model of obesity and type 2 diabetes.

Methods Intact muscle fibres were isolated from mice fed either with a standard chow diet or with a high-fat, high-sucrose diet generating obesity, insulin resistance and glucose intolerance. Properties of muscle fibres were investigated with a combination of whole-cell voltage-clamp electrophysiology and confocal fluorescence imaging. The integrity and density of the plasma membrane network (transverse tubules) that carries the membrane excitation throughout the muscle fibres was assessed with the dye Di-8-ANEPPS. Ca_v1.1 Ca²⁺ channel activity was studied by measuring the changes in current across the plasma membrane elicited by voltage-clamp depolarising pulses of increasing amplitude. SR Ca²⁺ release through ryanodine receptors was simultaneously detected with the Ca²⁺-sensitive dye Rhod-2 in the cytosol. Ca_v1.1 voltage-sensing activity was separately characterised from the properties of intra-plasma-membrane charge movement produced by short voltage-clamp depolarising pulses. Spontaneous Ca²⁺ release at rest was assessed with the Ca²⁺-sensitive dye Fluo-4. The rate of SR Ca²⁺ uptake was assessed from the time course of cytosolic Ca²⁺ recovery after the end of voltage excitation using the Ca²⁺-sensitive dye Fluo-4FF. The response to a fatigue-stimulation protocol was determined from the time course of decline of the peak Fluo-4FF Ca²⁺ transients elicited by 30 trains of 5-ms-long depolarising pulses delivered at 100 Hz.

Results The transverse tubule network architecture and density were well preserved in the fibres from the obese mice. The Ca_v1.1 Ca²⁺ current and voltage-sensing properties were also largely unaffected with mean values for maximum conductance and maximum amount of charge of 234 ± 12 S/F and 30.7 ± 1.6 nC/μF compared with 196 ± 13 S/F and 32.9 ± 2.0 nC/μF in fibres from mice fed with the standard diet, respectively. Voltage-activated SR Ca²⁺ release through ryanodine receptors also exhibited very similar properties in the two groups with mean values for maximum rate of Ca²⁺ release of 76.0 ± 6.5 and 78.1 ± 4.4 μmol l⁻¹ ms⁻¹, in fibres from control and obese mice, respectively. The response to a fatigue protocol was also largely unaffected in fibres from the obese mice, and so were the rate of cytosolic Ca²⁺ removal and the spontaneous Ca²⁺ release activity at rest.

✉ Vincent Jacquemond
vincent.jacquemond@univ-lyon1.fr

¹ Institut NeuroMyoGène, UMR CNRS 5310 – Inserm U1217 – Université Claude Bernard Lyon 1 – Univ Lyon, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Lyon, France

² CarMeN Laboratory, Inserm, INRA, INSA Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1 – Univ Lyon, Pierre-Bénite, France

³ Programa de Fisiología y Biofísica, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Research in context

What is already known about this subject?

- Obesity and type 2 diabetes are associated with skeletal muscle dysfunction
- A high-fat diet induces a decrease in specific muscle force production

What is the key question?

- Does impaired Ca^{2+} homeostasis contribute to skeletal muscle dysfunction and weakness in a mouse model of obesity and type 2 diabetes?

What are the new findings?

- Ca^{2+} entry and voltage-sensing steps of excitation–contraction coupling at the plasma membrane level are unaffected in muscle fibres from obese mice
- Properties of intracellular Ca^{2+} handling by the sarcoplasmic reticulum are also completely preserved in muscle fibres from obese mice

How might this impact on clinical practice in the foreseeable future?

- The Ca^{2+} handling capacities of skeletal muscle that allow control of force production are intact in a mouse model of obesity and type 2 diabetes. These findings are important for our understanding of muscle function/dysfunction and may impact on clinical practice in relation to physical exercise in individuals with obesity or diabetes

Conclusions/interpretation The functional properties of the main mechanisms involved in the control of muscle Ca^{2+} homeostasis are well preserved in muscle fibres from obese mice, at the level of both the plasma membrane and of the SR. We conclude that intracellular Ca^{2+} handling and excitation–contraction coupling in skeletal muscle fibres are not primary targets of obesity and type 2 diabetes.

Keywords Ca^{2+} homeostasis · Cytosolic Ca^{2+} clearance · Excitation–contraction coupling · Obesity · Ryanodine receptor · Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release · Skeletal muscle · Type 2 diabetes

Abbreviations

BTS	<i>N</i> -benzyl- <i>p</i> -toluene sulphonamide
$[\text{Ca}_{\text{Tot}}]$	Total amount of released Ca^{2+} referred to the myoplasmic water volume
$d[\text{Ca}_{\text{Tot}}]/dt$	Rate of SR Ca^{2+} release
ECC	Excitation–contraction coupling
F_0	Baseline fluorescence
FDB	Flexor digitorum brevis
G_{max}	Maximum conductance
HFD	High-fat diet
HFHSD	High-fat, high-sucrose diet
k	Steepness factor
Q_{max}	Maximum charge
RYR1	Type 1 ryanodine receptor
SCD	Standard chow diet
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase
SR	Sarcoplasmic reticulum
T-tubule	Transverse tubule
$V_{0.5}$	Half-activation potential
V_{rev}	Apparent reversal potential

Introduction

Obesity and its deleterious complications, insulin resistance and type 2 diabetes mellitus, are associated with skeletal muscle dysfunction [1, 2]. Long-term systemic impairments related to the disease status such as cardiomyopathy, peripheral neuropathy and vascular disease eventually contribute but there is also evidence that the muscle tissue itself suffers from inherently reduced performance. Still, underlying mechanisms remain unclear and the situation is also complicated by concomitant processes operating to adapt muscle function to overweight-induced increased force demand. The literature related to altered muscle function in obesity and diabetes is intricate because of the diversity of experimental conditions and animal models used to tackle this issue, including a variety of genetically-modified murine models, selected murine strains, and pharmacological- or dietary-induction protocols [3, 4]. If one focuses on the most common reason for obesity and type 2 diabetes in humans, diet-induced obesity in animal models may be considered of somewhat more specific

interest. Accordingly, there is reproducible evidence that a sufficiently long period (≥ 10 weeks) of high-fat diet (HFD) induces a decrease in specific force production, as assessed *ex vivo* from mouse muscle [5–7].

Altered intracellular Ca^{2+} handling contributes to obesity-induced cardiac dysfunction [8, 9] (see for review [10, 11]). Skeletal muscle function critically depends upon stringent control of intracellular Ca^{2+} with three proteins playing a key role in this process: $\text{Ca}_v1.1$ (a voltage sensor and Ca^{2+} channel in the transverse tubule [T-tubule] membrane), type 1 ryanodine receptor (RYR1; the Ca^{2+} release channel in the sarcoplasmic reticulum [SR] membrane), and sarco/endoplasmic reticulum Ca-ATPase (SERCA; the SR Ca^{2+} ATPase), ensuring Ca^{2+} uptake and consequent cytosolic Ca^{2+} clearance. Muscle force is triggered by cytosolic Ca^{2+} increase, promoting Ca^{2+} binding to troponin C. This occurs when T-tubule depolarisation sensed by $\text{Ca}_v1.1$ is transduced into opening of RYR1 channels and consequent SR Ca^{2+} release: the excitation–contraction coupling (ECC) process [12–15]. Besides activation of force, intracellular Ca^{2+} also plays a key role in other aspects of muscle function including metabolism and signalling cascades involved in gene expression [16, 17], processes that may also be modified because of altered Ca^{2+} homeostasis. Altogether, there is thus strong interest in determining whether functional aspects of Ca^{2+} homeostasis are affected in diet-induced obesity. Surprisingly, this has been largely experimentally overlooked so far, at least at the level of intact muscle fibres under membrane voltage control, a condition made essential by the stringent command exerted by plasma membrane voltage on intracellular Ca^{2+} homeostasis. In other words, no quantitative characterisation of the functional features of Ca^{2+} handling at the physiological millisecond time range of activation of ECC is available in this disease situation. This is at odds with the fact that potential mechanisms involved in Ca^{2+} dysregulation and target mechanisms have been largely highlighted in the literature [2, 18].

We have used single muscle fibres isolated from mice fed with a high-fat, high-sucrose diet (HFHSD) generating obesity, hyperinsulinaemia, insulin resistance and glucose intolerance [19] to perform an extensive functional characterisation of intracellular Ca^{2+} signalling and ECC in that situation.

Methods

All experiments and procedures were performed according to the ethics principles of the French Department of Veterinary Services and the French Ministry for Higher Education, Research and Innovation, in accordance with the guidelines of the local animal ethics committee of the University Claude Bernard Lyon 1, the French Ministry of Agriculture (decree 87/848), and the revised European Directive 2010/63/EU. The

experimental protocol of diet-induced obesity was approved by the Animal Experimentation Committee no. C2EA-15 of the Rhône-Alpes Region. Experiments were performed at room temperature (20–22°C).

HFHSD-induced diabetic mice Four-week-old C57BL/6J01aHsd male mice were purchased from ENVIGO (Gannat, France) and housed at 22°C with a 12 h light/dark cycle. Following delivery, mice were distributed within cages and left for 1 week to adapt to the new environment. Cages were then allocated to 2 groups: one with free access to a standard chow diet (SCD) (Rod16-A, Genobios: 16.9% protein, 4.3% lipids, 55.5% carbohydrate essentially from starch with no sucrose added) and the other with free access to a pelleted HFHSD diet (260HF U8978 version 19; SAFE; 20% protein, 36% lipids, 37% carbohydrate including 14.5% starch and 17.9% sucrose) for 16 weeks as described previously [19]. For simplicity, mice, and fibres isolated from the mice in the two groups, are referred to as SCD and HFHSD. Two sets of five mice of each group were used in this study. The first set was dedicated to characterisation of T-tubule membrane architecture, voltage-activated Ca^{2+} current and intracellular Ca^{2+} transients, and spontaneous Ca^{2+} release events at rest. In the second set we measured intramembrane charge movement and spontaneous Ca^{2+} release events. In the first group, body mass and blood glucose were assessed twice a week and a GTT and ITT were performed during weeks 4, 8, 12 and 16 after the beginning of the diet, as previously described [19]. In the second group an ITT and GTT were performed during week 15. In all mice, body weight and blood glucose were assessed before euthanasia. Immediately following euthanasia, prior to the preparation of isolated muscle fibres (see next section), the gastrocnemius muscles, the heart, the liver and the white adipose tissue were removed and weighed.

Preparation of isolated muscle fibres Single fibres from the flexor digitorum brevis (FDB) and interosseus muscles were isolated as previously described [20]: mice were anaesthetised with isoflurane and killed by cervical dislocation before removal of the muscles. Muscles were incubated in Tyrode's solution containing 2 mg/ml collagenase (Sigma, type 1) for 60 min at 37°C. Single fibres were obtained by mechanical trituration within a culture μ -dish (Ibidi, Planegg/Martinsried, Germany) filled with culture medium containing 10% FBS (MI199; Eurobio, France), the bottom of which had been first coated with a thin layer of silicone. Isolated fibres settled on the silicone surface and were then embedded with additional silicone so that only a portion of the fibre extremity remained in contact with the extracellular medium. The initial silicone coating of the chamber bottom was necessary because of the hydrophobic nature of the silicone grease, which makes it very hard to adhere to a solid substrate in a liquid environment. The

silicone grease we used was SILBIONE Paste 70,428 (Elkem Silicones, Saint-Fons, France).

Electrophysiology Voltage-clamp experiments were performed on FDB muscle fibres using a micropipette filled with an intracellular-like medium (see Methods: Buffers and incubation media). The pipette tip was inserted into the silicone-insulated part of the fibre and was gently crushed against the chamber bottom to ease dialysis and reduce series resistance. Composition of the extracellular solution and of the pipette solution were adapted to the experiment type (see Methods: Buffers and incubation media). The fibre interior was dialysed for 30 min to allow for intracellular equilibration of the solution before starting measurements. The chlorided silver wire inside the pipette was connected to an RK-400 patch-clamp amplifier (Bio-Logic, Claix, France) in whole-cell configuration, in combination with an analogue–digital converter (Digidata 1440A, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) controlled by pClamp 9 software (Axon Instruments). The effective series resistance was further decreased by analogue compensation. Unless otherwise specified, the holding voltage was set to -80 mV.

$\text{Ca}_v1.1$ Ca^{2+} current was measured in response to 0.5-s-long depolarising steps. The linear leak component of the current was removed by subtracting the adequately scaled value of the current measured during a -20 mV step. This subtraction did not fully eliminate the outward current measured during pulses to values between -50 and -30 mV, below the threshold of activation of the Ca^{2+} current. In order to correct for this, the voltage-dependence of the values for the residual current was fitted by a linear function from -50 to -30 mV; the fit was extrapolated to the entire range of voltage values and fitted values were subtracted from the measured values for peak $\text{Ca}_v1.1$ current. The voltage-dependence of peak current values (normalised to the capacitance), was fitted with the following equation:

$$I(V) = G_{\max}(V - V_{\text{rev}})/(1 + \exp((V_{0.5} - V)/k))$$

with $I(V)$ the peak current density at the command voltage V , G_{\max} the maximum conductance, V_{rev} the apparent reversal potential, $V_{0.5}$ the half-activation potential (also commonly referred to as voltage of equal charge distribution) and k the steepness factor. As for the values of peak Ca^{2+} current, values for G_{\max} were also expressed normalised to the capacitance (S/F).

$\text{Ca}_v1.1$ charge movement currents were measured from a holding voltage of -100 mV and analysed as previously described [21, 22]. In brief, adequately scaled control records elicited by 25-ms-long pulses of -20 mV were subtracted from the current elicited by test depolarising pulses of the same duration to various levels [23]. The amount of charge moved during a test pulse was measured by integrating the on and off portions of the corrected test current records. The

steady-state distribution of charge (normalised to fibre capacitance) was fitted with a two-state Boltzmann function:

$$Q(V) = Q_{\max}/(1 + \exp((V_{0.5} - V)/k))$$

with Q_{\max} the maximal available charge, $V_{0.5}$ the voltage of equal charge distribution and k the steepness factor.

Confocal imaging Confocal imaging was conducted with a Zeiss LSM 5 Exciter equipped with a $\times 63$ oil immersion objective (numerical aperture 1.4). For detection of Rhod-2 and Fluo-4FF fluorescence, excitation was from the 543 nm line of a HeNe laser and from the 488 nm line of an Argon laser, respectively, and fluorescence was collected above 560 nm and above 505 nm, respectively. Rhod-2 and Fluo-4FF fluorescence changes were imaged using the line-scan mode (x, t) of the system and expressed as F/F_0 where F_0 is the baseline fluorescence. Quantification of the Ca^{2+} release flux underlying the Rhod-2 Ca^{2+} transients was performed as previously described [24]. In each fibre, the voltage-dependence of the peak rate of Ca^{2+} release was fitted with a Boltzmann function.

Di-8-ANEPPS and Fluo-4 fluorescence were collected above 505 nm with 488 nm excitation. For imaging the T-tubule network, interosseus muscle fibres were incubated for 30 min in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ Di-8-ANEPPS. The T-tubule density was estimated as described previously [24].

For Ca^{2+} sparks measurements, interosseus muscle fibres were incubated for 30 min in the presence of 10 $\mu\text{mol/l}$ Fluo-4 acetoxymethyl ester (AM). Thirty consecutive confocal frames of Fluo-4 fluorescence (102.4×102.4 μm , 989 ms per frame) were acquired in each fibre. To quantify the Ca^{2+} sparks activity, images in the stack were smoothed and the standard deviation of fluorescence intensity at each pixel position, along the stack, was calculated. The 20% largest values in the standard deviation image were removed to calculate the mean standard deviation of silent areas. The active area was then defined as pixel positions exhibiting at least $1.5 \times$ larger values of standard deviation than the mean standard deviation value from silent areas.

Buffers and incubation media Tyrode solution contained (in mmol/l) 140 NaCl, 5 KCl, 2.5 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 10 HEPES. The extracellular solution for measurements of $\text{Ca}_v1.1$ Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients contained (in mmol/l) 140 tetraethylammonium-methanesulfonate, 2.5 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , 1 4-aminopyridine, 10 HEPES and 0.002 tetrodotoxin. For measurements of Fluo-4FF Ca^{2+} transients, it also contained 0.05 *N*-benzyl-*p*-toluene sulphonamide (BTS) to block contraction. The pipette solution contained (in mmol/l) 120 K-glutamate, 5 Na_2 -ATP, 5 Na_2 -phosphocreatine, 5.5 MgCl_2 , 5 glucose, 5 HEPES. For measurements of Rhod-2 and Fluo-4FF Ca^{2+} transients it also contained 15 EGTA, 6 CaCl_2 , 0.1 Rhod-2, and 0.1 Fluo-4FF, respectively.

For measurements of $Ca_v1.1$ charge movement the extracellular solution contained (in mmol/l) 140 tetraethylammonium (TEA)-methanesulfonate, 0.1 $CaCl_2$, 3 $MgCl_2$, 1 $CdCl_2$, 0.5 $MnCl_2$, 1 4-aminopyridine, 0.5 9-anthracene-carboxylic acid, 10 HEPES and 0.002 tetrodotoxin and fibres were dialysed through the pipette with a solution containing (in mmol/l) 140 TEA-methanesulfonate, 5 Na_2 -ATP, 5 Na_2 -phosphocreatine, 5.5 $MgCl_2$, 5 glucose, 5 HEPES. BTS was purchased from Tocris Bioscience (Bio-Techne, Lille, France). All fluorescent indicators were purchased from Thermo Fisher Scientific (Illkirch, France). All solutions were adjusted to pH 7.20.

Statistics No randomisation procedure was carried out. Experimenters were not blind to group assignment and outcome assessment. Statistical analysis was performed with Origin 8.0. Data values are presented as mean \pm SEM for n fibres. Statistical significance was determined using two-tailed Student's t tests comparing the means ($*p \leq 0.05$).

With respect to results shown in Fig. 3, data from one muscle fibre in the SCD group and from one muscle fibre in the HFHSD group were excluded because in both cases the fit to the peak Ca^{2+} current versus voltage data gave non-rational values for maximal conductance (~ 10 times less than the mean value) and apparent reversal potential (more than 80 mV more positive than the mean value). Muscle fibres from one mouse initially scheduled for the SCD group could not be used because of an experimental mistake during the protocol of incubation at 37°C in the presence of collagenase.

Results

Obesity, insulin resistance and glucose intolerance in the HFHSD mice The status of our animals over the course of the diet protocol is shown in Fig. 1, as assessed from the first group of mice (see Methods: HFHSD-induced diabetic mice). At the end, the body weight of the HFHSD animals was ~ 1.7 times that of SCD ones (Fig. 1a); mean values for body weight at the end of the diet protocol for SCD and HFHSD animals were 28.6 ± 0.5 g ($n = 9$) and 50.1 ± 0.9 g ($n = 9$) ($p < 0.0001$), respectively. There was no associated change in the weight of the gastrocnemius (0.17 ± 0.01 g, $n = 9$ and 0.21 ± 0.02 g, $n = 9$; $p = 0.14$) nor of the heart (0.17 ± 0.01 g, $n = 9$ and 0.21 ± 0.02 g, $n = 9$; $p = 0.09$), whereas the weight of the liver (1.30 ± 0.04 g, $n = 9$ and 3.11 ± 0.34 g, $n = 9$; $p < 0.0001$) and of the white adipose tissue (measured as the epididymal adipose tissue: 0.51 ± 0.04 g, $n = 9$ and 2.06 ± 0.17 g, $n = 9$; $p < 0.0001$) were substantially increased in HFHSD vs SCD animals, respectively. Results from GTT and ITT performed at weeks 4, 8, 12 and 16 are shown in Fig. 1b and c, respectively: HFHSD mice maintained an elevated blood glucose level following injection of either glucose or insulin: from

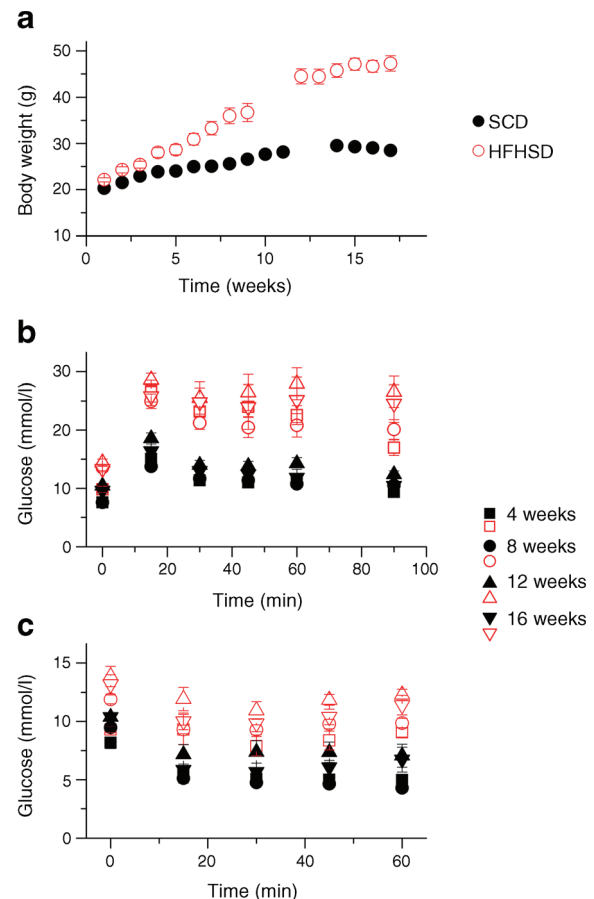


Fig. 1 Body mass, GTT and ITT in SCD and HFHSD mice. **(a)** Mean values for body weight of SCD ($n = 9$) and HFHSD mice ($n = 9$), over the course of the diet protocol. The gaps in the SCD and HFHSD data are due to a short break in data collection. **(b, c)**, Mean values for blood glucose concentration before ($t = 0$) and after intraperitoneal injection of either 2 mg/g glucose **(b)** or 0.75 U/kg insulin **(c)**. Measurements were performed at weeks 4, 8, 12 and 16 after the beginning of the diet. **(b, c)** When comparing the mean glucose level between the SCD and HFHSD groups at any given time point of the GTT protocol **(b)** using a t test, comparisons all had $p < 0.01$ (at 4, 8 and 12 weeks) and $p < 0.02$ (at 16 weeks); when comparing the mean glucose level between the SCD group and the HFHSD group at any given time point of the ITT protocol **(c)** using a t test, comparisons all had $p < 0.02$ (at 4, 12 and 16 weeks) and $p < 0.001$ (at 8 weeks). Data are mean \pm SEM

the 10 min time point following either glucose or insulin injection, the mean glucose level in HFHSD mice ranged between approximately 1.5 and 2.3 times the level in SCD mice (the difference being statistically significant between the two groups at any time point of the four sets of measurements), establishing the glucose intolerance and the systemic insulin resistance, and thus the diabetic status generated by the protocol.

T-tubule network and passive electrical properties in SCD and HFHSD muscle fibres The T-tubule membrane system plays a critical role in ECC and in glucose transport and HFD may enhance its cholesterol content [25] with potential adverse

consequences for T-tubule integrity and function [26, 27]. We labelled the plasma membrane of fibres with Di-8-ANEPPS. Corresponding *x,y* confocal images from SCD (Fig. 2a, c) and HFHSD muscle fibres (Fig. 2b, d) showed no sign of alteration of the network in the HFHSD group and the transverse profile of fluorescence showed the expected double-peak pattern characteristic of T-tubule organisation in mammalian muscle (graphs in Fig. 2c, d). Analysis of Di-8-ANEPPS images collected from 20 muscle fibres from two SCD mice and from 30 fibres from three HFHSD mice showed no change in T-tubule density (Fig. 2e), but, incidentally, the mean value for sarcomere length was slightly but significantly reduced in the HFHSD compared with the SCD group (2.04 ± 0.01 vs 2.11 ± 0.02 ; $p = 0.001$; Fig. 2f). Preservation of the T-system in the HFHSD fibres was confirmed by the passive electrical properties of the fibres: membrane current records

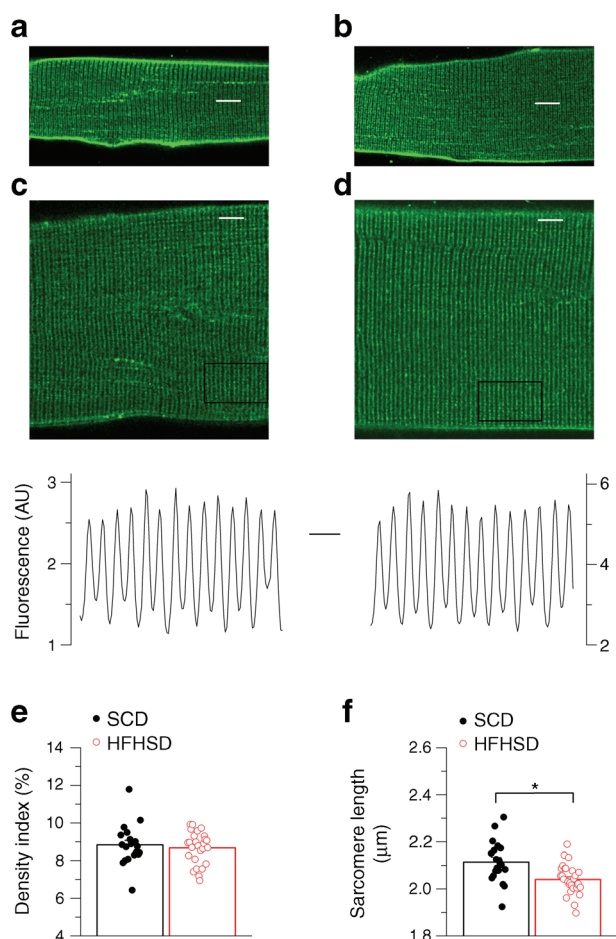


Fig. 2 T-tubule system network. (a–d) *x,y* confocal images of Di-8-ANEPPS fluorescence from separate SCD (a, c) and HFHSD muscle fibres (b, d) at two different magnifications (a, b: scale bar, 10 μm; c, d: scale bar, 5 μm). (c, d) Graphs show the transverse pattern of Di-8-ANEPPS fluorescence (scale bar, 2 μm) over the region shown with a box in the corresponding *x,y* images above. AU, arbitrary unit. (e, f) Mean values for T-tubule density index and for sarcomere length in the SCD ($n = 20$ fibres from 2 mice) and HFHSD ($n = 30$ fibres from 3 mice) groups. Data are mean \pm SEM. * $p < 0.05$

from fibres used to measure $\text{Ca}_v1.1$ Ca^{2+} current gave mean values for capacitance and input resistance of 949.0 ± 68 and 930.6 ± 61 pF, and 11.9 ± 1 and 12.5 ± 0.8 MΩ, in the SCD group ($n = 21$ fibres from four mice) and in the HFHSD group ($n = 30$ fibres from five mice), respectively. Because mean values for fibre diameter did not differ between the SCD (44.8 ± 1.4 μm) and HFHSD group (43.4 ± 1.4 μm) and assuming that a fibre portion of similar length was always under voltage-clamp, results establish that the T-tubule network is preserved in the obesity situation.

$\text{Ca}_v1.1$ Ca^{2+} current and voltage-sensing properties in SCD and HFHSD muscle fibres

$\text{Ca}_v1.1$ is the most well-identified and characterised Ca^{2+} entry pathway across the plasma/T-tubule membrane of muscle fibres. Example $\text{Ca}_v1.1$ Ca^{2+} current records from an SCD and from an HFHSD muscle fibre are shown in Fig. 3a and b, respectively; mean values for peak Ca^{2+} current vs voltage in the two groups are shown in Fig. 3c whereas mean values for the parameters obtained from fitting each individual peak current vs voltage relationship are shown in Fig. 3d–g. There was no significant change in any parameter in the HFHSD group. Mean values for maximum conductance were 196 ± 13 S/F and 234 ± 12 S/F in fibres from the SCD and from the HFHSD group, respectively.

$\text{Ca}_v1.1$ also exerts the critical function of coupling the T-tubule depolarisation to RYR1 Ca^{2+} channel activation in the SR membrane. $\text{Ca}_v1.1$ voltage-sensing function was assessed from intramembrane charge movement. Example traces of charge current from an SCD and from an HFHSD muscle fibre are shown in Fig. 4a whereas mean values for the amount of charge vs voltage are shown in Fig. 4b (data from 22 SCD fibres and 21 HFHSD fibres, each from three mice in each group). Properties of charge movement were similar in SCD and HFHSD muscle fibres (Fig. 4c–e), with mean values for maximum amount of charge of 32.9 ± 2.0 and 30.7 ± 1.6 nC/μF, respectively. This demonstrates that the amount of $\text{Ca}_v1.1$ in the plasma/T-tubule membrane and its voltage-sensing properties are preserved in this situation.

Voltage-activated SR Ca^{2+} release

Properties of RYR1 channels activity upon fibre activation were assessed from voltage-clamp-activated cytosolic Ca^{2+} transients. A family of such F/F_0 Rhod-2 transients from an SCD and an HFHSD muscle fibre are shown in Fig. 5a and b, respectively, while traces for the corresponding calculated rate of SR Ca^{2+} release are shown in Fig. 5c and d, respectively. As classically reported in this preparation, the time course of SR Ca^{2+} release exhibits an early peak followed by a decay towards a much lower level. There was no obvious qualitative feature of the Rhod-2 transients and of the rate of Ca^{2+} release that differed between SCD and HFHSD fibres. This was confirmed by the analysis showing that neither mean values for peak rate of SR Ca^{2+}

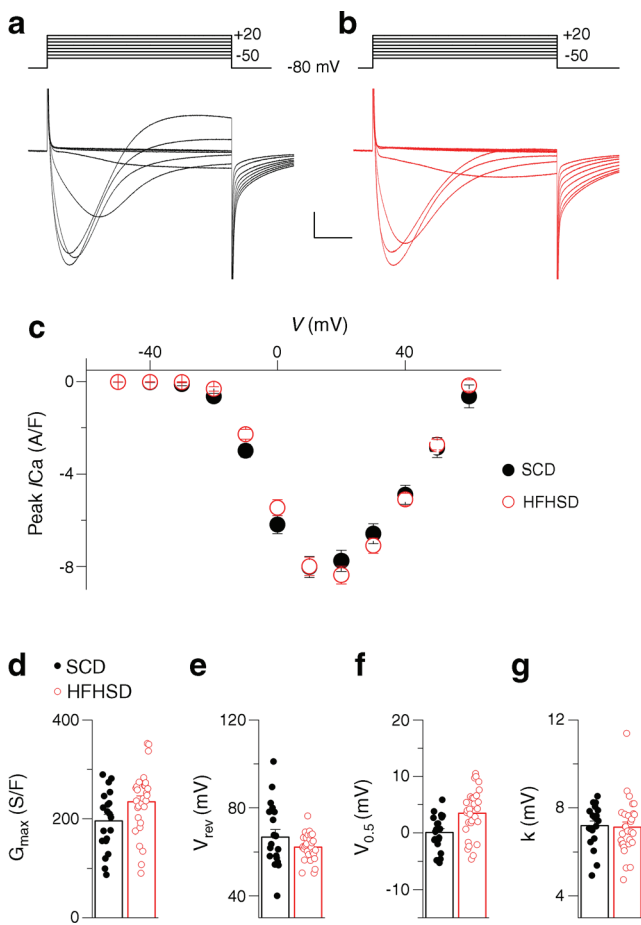


Fig. 3 $\text{Ca}_V1.1$ Ca^{2+} current. (a, b) example traces of Ca^{2+} current in an SCD (a) and in an HFHSD muscle fibre (b) in response to the voltage-clamp pulse protocol shown at the top. Horizontal axis, time (scale bar 100 ms), vertical axis, current (scale bar 2 A/F). (c) Mean values for the peak Ca^{2+} current density vs voltage in the SCD ($n=20$ fibres from 4 mice) and HFHSD ($n=29$ fibres from 5 mice) groups. (d–g) Corresponding mean values for the parameters obtained from fitting each individual peak current vs voltage relationship with the appropriate function (see Methods: Electrophysiology). Data are mean \pm SEM

release (peak $d[\text{Ca}_{\text{Tot}}]/dt$, Fig. 5e), nor for its time to peak (t_{peak} , Fig. 5g) nor for total amount of released Ca^{2+} ($[\text{Ca}_{\text{Tot}}]$ calculated from the time integral of the Ca^{2+} release trace, Fig. 5f) statistically differed between the two groups. Mean values for maximum $d[\text{Ca}_{\text{Tot}}]/dt$ assessed from fitting a Boltzmann function to the voltage dependence of the peak $d[\text{Ca}_{\text{Tot}}]/dt$ in each fibre were 76.0 ± 6.5 and $78.1 \pm 4.4 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ms}^{-1}$ in the SCD and HFHSD groups, respectively. Thus, the physiological RYR1 channel activity and the SR Ca^{2+} content are preserved in HFHSD fibres.

Cytosolic Ca^{2+} removal capabilities and response to a fatiguing stimulation protocol Functional impact of HFD-induced obesity on SERCA activity may occur because of altered SR phospholipid composition [28, 29] and/or changes in expression or efficiency of the SERCA regulator sarcolipin [30]. SERCA is the major actor of cytosolic Ca^{2+} clearance.

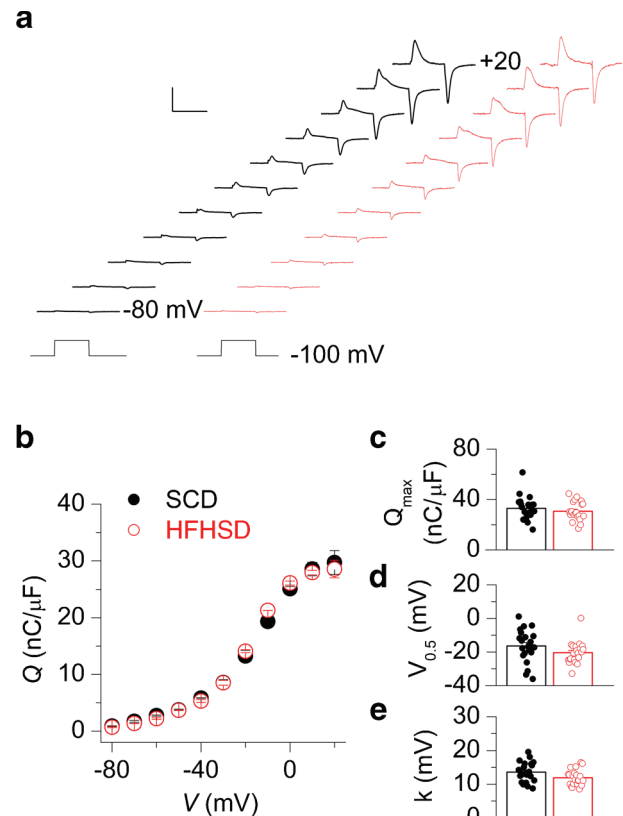


Fig. 4 $\text{Ca}_V1.1$ charge movement. (a) example traces of $\text{Ca}_V1.1$ charge movement currents in an SCD (left, black) and in an HFHSD muscle fibre (right, red) in response to voltage-clamp depolarising pulses from -100 mV to values ranging between -80 and $+20$ mV. Horizontal axis, time (scale bar 25 ms), vertical axis, current (scale bar 5 A/F). (b) Mean values for the $\text{Ca}_V1.1$ charge density vs voltage in the SCD ($n=22$ fibres from 3 mice) and HFHSD ($n=21$ fibres from 3 mice) groups. (c–e) Mean values for the parameters obtained from fitting each individual charge vs voltage relationship with the appropriate function (see Methods: Electrophysiology). Data are mean \pm SEM

We assessed the cytosolic removal capabilities of fibres by measuring the time constant of the Ca^{2+} signal decay following repolarisation-induced Ca^{2+} release termination. For this we used the intermediate affinity Ca^{2+} -sensitive dye Fluo-4FF under non-EGTA-buffering conditions of the intracellular medium (see Methods: Buffers and incubation media). Illustrative Fluo-4FF Ca^{2+} transients elicited by maximum activation of SR Ca^{2+} under these conditions are presented in Fig. 6a. In each fibre tested, a single exponential function was fitted to the declining phase of the transients. Corresponding mean values for the time constant of decay showed no sign of any trend of difference between the two groups (Fig. 6b, data from eight fibres from four SCD mice and from 13 fibres from five HFHSD mice).

Under the same conditions, we explored the response of the fibres to an exhausting stimulation protocol consisting in consecutive trains of 30, 5-ms-long, pulses from -80 mV to $+60$ mV delivered at 100 Hz. Thirty trains were applied, separated by a 0.7 s interval. This protocol produces a rapid

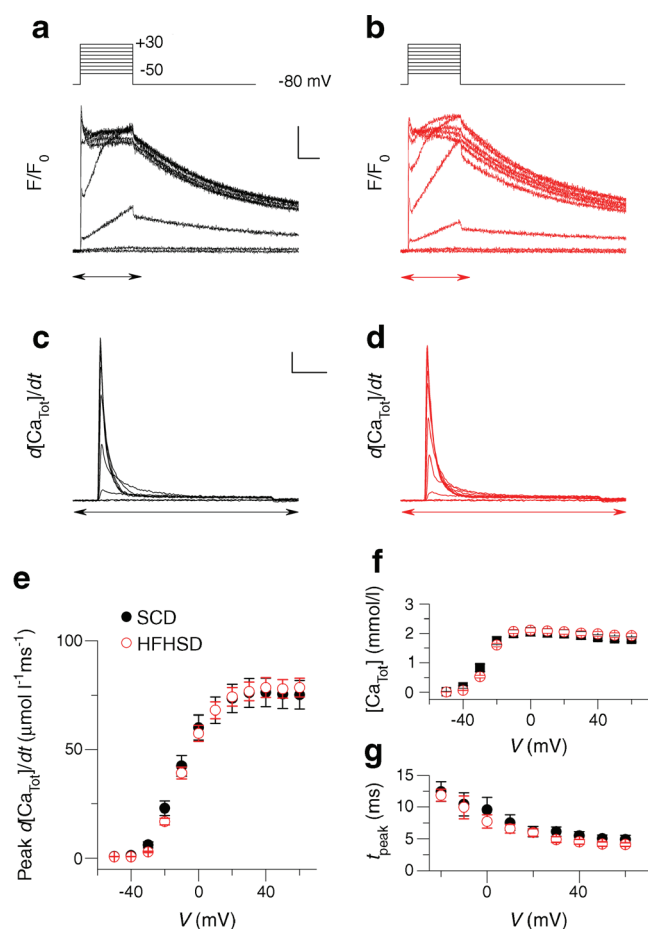


Fig. 5 Voltage-activated SR Ca^{2+} release. **(a, b)** Example traces of Rhod-2 F/F_0 Ca^{2+} transients in an SCD **(a)** and in an HFHSD muscle fibre **(b)** in response to the voltage-clamp pulse protocol shown at the top. Horizontal axis, time (scale bar 200 ms), vertical axis, fluorescence (scale bar $1 \times \text{F}_0$). **(c, d)** Rate of SR Ca^{2+} release ($d[\text{Ca}_{\text{T0t}}]/dt$) calculated from the Rhod-2 transients shown in **(a, b)**, respectively. Horizontal axis, time (scale bar 100 ms), vertical axis, rate of SR Ca^{2+} release (scale bar $10 \mu\text{mol l}^{-1} \text{ms}^{-1}$). For the sake of clarity, the rate traces are only shown throughout the portion of Rhod-2 F/F_0 traces highlighted by an arrow in **(a, b)**. **(e)** Mean values for the peak rate of SR Ca^{2+} release (peak $d[\text{Ca}_{\text{T0t}}]/dt$) vs voltage in the SCD ($n = 21$ fibres from 4 mice) and HFHSD ($n = 30$ fibres from 5 mice) groups. **(f)** Corresponding mean values for the total amount of released Ca^{2+} ($[\text{Ca}_{\text{T0t}}]$, calculated from the time integral of the rate). **(g)** Corresponding mean values for the time to peak SR Ca^{2+} release (t_{peak}). Data are mean \pm SEM

reduction of SR Ca^{2+} release as illustrated in Fig. 7a and b, which show examples of the first and last Fluo-4FF transients recorded from an SCD and from an HFHSD muscle fibre, respectively, in response to a full protocol. Figure 7c and d show the entire sequence of Fluo-4FF transients from the same two fibres over time. Such records were collected from eight fibres from four SCD mice and from 12 fibres from five HFHSD mice, respectively. Mean values for the normalised time course of decline of the peak F/F_0 transients in the two groups are presented in Fig. 7e. In each fibre, the time course was fitted by a single exponential plus constant function:

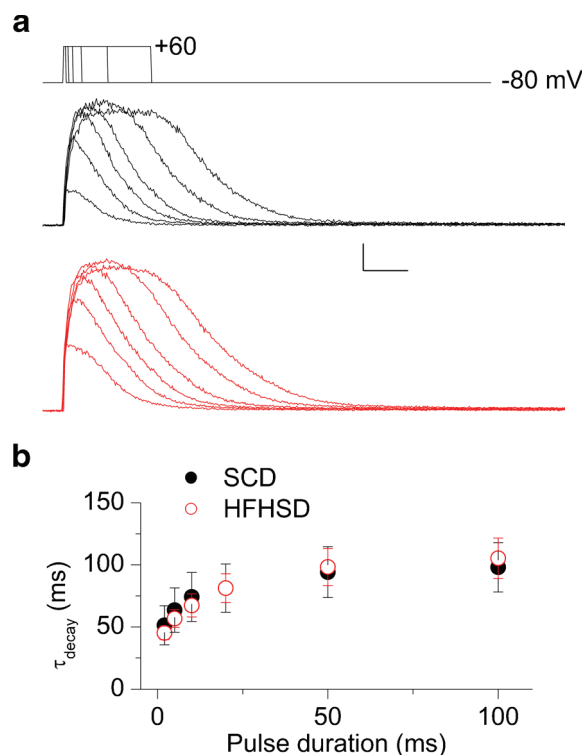


Fig. 6 Cytosolic Ca^{2+} removal. **(a)** Fluo-4FF F/F_0 Ca^{2+} transients elicited by the voltage-clamp pulse protocol shown on top in an SCD muscle fibre (top, black) and in an HFHSD muscle fibre (bottom, red). Horizontal axis, time (scale bar 50 ms), vertical axis, fluorescence (scale bar $5 \times \text{F}_0$). **(b)** Mean values for the time constant of Fluo-4FF fluorescence decay (τ_{decay}) vs pulse duration in the SCD ($n = 8$ fibres from 4 mice) and HFHSD ($n = 13$ fibres from 5 mice) groups. Data are mean \pm SEM

corresponding mean values for the time constant and final level (Fig. 7f, g) establish that there was no stringent alteration in HFHSD fibres. The time constant of decay was increased by a factor of ~ 1.25 in the HFHSD group, but the difference did not reach statistical significance ($p = 0.057$).

Spontaneous Ca^{2+} release activity at rest Spontaneous activity of RYR1 channels at rest under the form of local SR Ca^{2+} release events called Ca^{2+} sparks is a hallmark of several muscle disease situations [24, 31, 32]. We tested whether this was the case in HFHSD fibres using confocal imaging of the Ca^{2+} -sensitive dye Fluo-4: x, y images of the standard deviation of Fluo-4 fluorescence intensity along 30 consecutive confocal frames (total time of ~ 30 s) from an SCD fibre and from an HFHSD fibre are shown in Fig. 8a and b, respectively: SCD fibres were basically devoid of Ca^{2+} spark activity whereas some HFHSD fibres did exhibit a few sparks. Ca^{2+} spark activity was quantified in 28 muscle fibres from three SCD mice and from 46 fibres from five HFHSD mice, respectively. Figure 8c shows the mean value for relative fibre area exhibiting Ca^{2+} spark activity over a period of ~ 30 s (see Methods: Confocal imaging) in the two groups. Figure 8d shows the corresponding distribution of the number of fibres

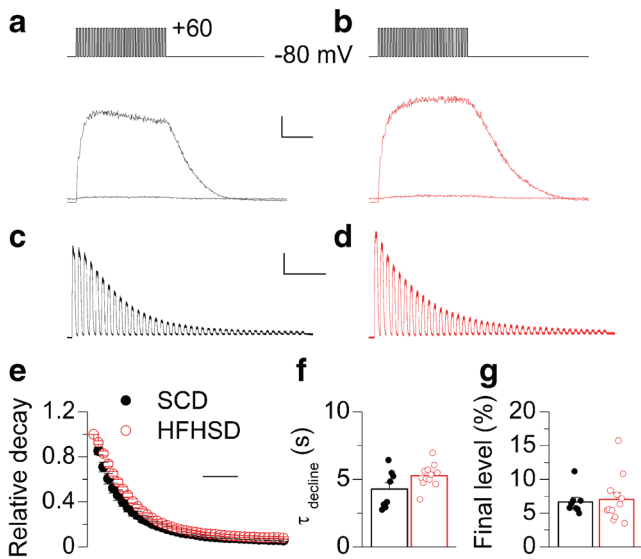


Fig. 7 Response to a fatigue protocol. (a, b) Representative Fluo-4FF fluorescence traces from an SCD (a) and from an HFHSD muscle fibre (b) challenged by the voltage-clamp depolarisation protocol shown at the top, consisting of 5-ms-long pulses from -80 mV to $+60$ mV delivered at 100 Hz. Horizontal axis, time (scale bar 100 ms), vertical axis, fluorescence (scale bar $5 \times F_0$). This protocol was repeated 30 times: the two superimposed Fluo-4FF traces correspond to the responses to the first (largest) and to the last response of each fibre. (c, d) Full time course of the Fluo-4FF fluorescence transients over the course of the entire protocol (same muscle fibres as in a and b, respectively). Horizontal axis, time (scale bar 5 s), vertical axis, fluorescence (scale bar $5 \times F_0$). (e) Mean time course of the decay of the relative peak Fluo-4FF Ca^{2+} transients over the full protocol. Horizontal axis, time (scale bar 5 s). (f, g) Mean values for the time constant of decay of the peak Fluo-4FF transients and corresponding final level, respectively, obtained from a single exponential plus constant fit to the data in each fibre ($n = 8$ fibres from 4 SCD mice and $n = 12$ fibres from 5 HFHSD mice). Data are mean \pm SEM

according to this parameter. The mean fibre area exhibiting Ca^{2+} spark activity was significantly ($p = 0.043$) increased in the HFHSD group but in a quantitatively very modest manner (0.6% of the fibre area compared with 0.4% in the SCD group), this being essentially due to four muscle fibres issued from one HFHSD mouse, exhibiting an active relative fibre area larger than 1.5%.

Discussion

Altered skeletal muscle function associated with obesity and type 2 diabetes is a major burden for patients' mobility and locomotion (e.g. [33]). In the long run, muscle-extrinsic mechanisms related to cardiac and vascular complications obviously play a role and so does muscle atrophy. However, there is also evidence that muscle-intrinsic impaired force production is involved [2] but the underlying mechanisms remain obscure. HFD-induced obesity in mice is associated with reduced specific muscle force, prompting the interest of this model to decipher the muscle-intrinsic mechanisms.

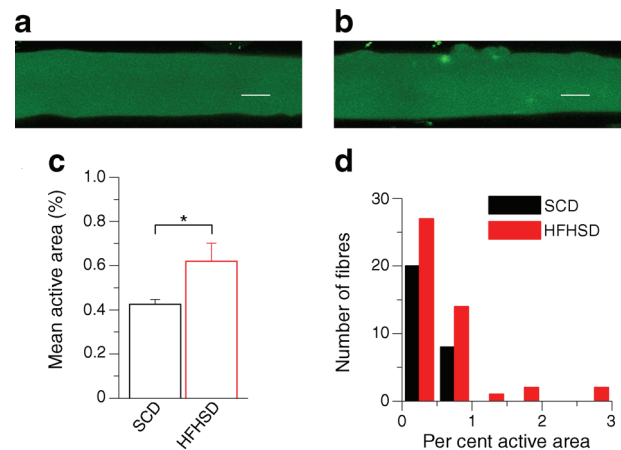


Fig. 8 Spontaneous Ca^{2+} spark activity at rest. (a, b) Images of the standard deviation of Fluo-4 fluorescence intensity in an SCD (a) and in an HFHSD muscle fibre (b) over the course of a series of 30 x,y confocal scans. Horizontal scale bar $10 \mu\text{m}$. (c) Mean values for the relative fibre area exhibiting spontaneous Ca^{2+} release in SCD and HFHSD muscle fibres. (d) Corresponding distribution of the number of muscle fibres according to the relative active area. Ca^{2+} spark activity was quantified in 28 muscle fibres from three SCD mice and from 46 fibres from five HFHSD mice, respectively. Data are mean \pm SEM. $*p < 0.05$

Intracellular Ca^{2+} plays a key role in numerous aspects of muscle function including triggering contraction. In order to ensure this particular function, intracellular Ca^{2+} concentration has to remain under tight control and, accordingly, there are numerous examples of muscle dysfunction due to altered Ca^{2+} handling and ECC (see [34–37]).

Defective Ca^{2+} regulation was previously suggested to occur in a pharmacologically induced diabetes model and in a genetically obese mouse model: specifically, accumulation of Ca^{2+} together with increased amount of $\text{Ca}_v1.1$ was shown in skeletal muscle from a rat model of streptozotocin-induced diabetes [38] and Ca^{2+} regulation was reported to be abnormal in the *ob/ob* mouse model of obesity, contributing to premature fatigue [39]. If referring specifically to HFD models, altered Ca^{2+} handling is suggested to play a role in obesity-induced muscle dysfunction through HFD-induced increased production of reactive oxygen species (ROS), which would promote SR Ca^{2+} leak through enhanced *S*-nitrosylation of RYR1 channels [40] and, possibly, also impair SERCA function [41, 42]. In addition, altered expression and/or efficiency of sarcolipin [30] could also contribute to impair cytosolic Ca^{2+} clearance, potentially with consequences for muscle metabolism and energy expenditure through activation of Ca^{2+} signalling pathways [43, 44]. Still, altogether, functional correlates for these alterations in terms of Ca^{2+} handling within the course of physiological ECC are poorly documented.

The strength of the present study is to achieve the first detailed quantitative investigation of the functional properties of intracellular Ca^{2+} handling and ECC in a diet-induced mouse model of obesity, using single isolated muscle fibres under voltage control. Our results demonstrate remarkably well preserved

Ca²⁺ handling capabilities in terms of voltage-dependent Ca²⁺ entry across the plasma membrane through Ca_v1.1, Ca_v1.1 properties as ECC voltage-sensors, voltage-activated SR Ca²⁺ release through RYR1 channels, SERCA-mediated cytosolic Ca²⁺ removal and resistance to a fatiguing stimulation protocol. Results concur with data from Eshima et al [6] suggesting that HFD elicits no change in the expression levels of calcium handling-related proteins, but they further show that the physiological operating function of these proteins during ECC is largely unaffected in that situation. They also concur with results from Bruton et al [39] showing that resting and tetanic Ca²⁺ under unfatigued conditions are similar in *ob/ob* and wild-type muscle fibres. Overall, our results do not exclude the possibility that the previously suggested, above-mentioned, alterations of Ca²⁺ handling do occur, but show that they remain very minor in terms of functional impact on the basic function of ECC and are thus not likely to be directly involved in chronic reduced muscle performance. For instance, the fact that some muscle fibres from HFHSD mice exhibit an enhanced propensity for spontaneous Ca²⁺ release at rest may be related to the presence of S-nitrosylated leaky RYR1 channels, but overall, this clearly does not compromise the SR Ca²⁺ content and proper function of the Ca²⁺ release machinery. It may then be that the reported alterations of Ca²⁺ homeostasis remain silent with regard to ECC function but relevant with regard to activation of specific Ca²⁺-dependent signalling pathways. Also of importance, the preserved Ca²⁺ handling capabilities in isolated fibres maintained under our controlled experimental conditions do not eliminate the possibility that the situation differs *in vivo*, owing to the specific environment experienced by the fibres in the diseased organism. It will thus be of high interest in the future to investigate the function of ECC and Ca²⁺ handling in isolated fibres challenged by conditions mimicking this environment, including incubation of the fibres in the presence of insulin and glucose. In line with this, for instance, it is interesting that elevated glucose was recently reported to alter T-tubule morphology of isolated muscle fibres [26].

In summary, our results demonstrate that the intrinsic function of intracellular Ca²⁺ signalling and ECC is amazingly well preserved in muscle fibres from a mouse model of obesity and type 2 diabetes.

Data availability Original datasets and datasets generated by the described analysis procedures are available from the corresponding author upon reasonable request. Critical resources supporting the results are also available upon reasonable request.

Funding FJF was the recipient of a PhD fellowship from the Chilean Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica (CONYCI). AB was supported by a research fellowship from the French Ministry of Higher Education and Research. This work was also supported by grants from CNRS, Inserm, the Université Claude Bernard-Lyon 1 to the Institut NeuroMyoGène and by the Chilean–French cooperation programme ECOS-CONICYT (#C13B01).

Authors' relationships and activities The authors declare that there are no relationships or activities that might bias, or be perceived to bias, their work.

Contribution statement VJ, JR and FJF conceived and coordinated the study. JR and AB generated the mouse model and collected metabolic data. FJF conducted the electrophysiological and fluorescence experiments. FJF, LM and VJ performed the main electrophysiological and fluorescence data analysis. All authors made critical contributions to data analysis, interpretation and discussion and to manuscript preparation, and approved the final version. VJ and JR wrote the manuscript.

VJ is the guarantor of this work and, as such, accepts full responsibility for the work and/or the conduct of the study, had access to the data, and controlled the decision to publish.

References

- Allen MD, Doherty TJ, Rice CL, Kimpinski K (2016) Physiology in medicine: neuromuscular consequences of diabetic neuropathy. *J Appl Physiol* 121(1):1–6. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00733.2015>
- Tallis J, James RS, Seebacher F (2018) The effects of obesity on skeletal muscle contractile function. *J Exp Biol* 221(13):jeb163840. <https://doi.org/10.1242/jeb.163840>
- King AJ (2012) The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol* 166(3):877–894. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01911.x>
- King A, Bowe J (2016) Animal models for diabetes: understanding the pathogenesis and finding new treatments. *Biochem Pharmacol* 99:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.08.108>
- Matsakas A, Prosdocimo DA, Mitchell R et al (2015) Investigating mechanisms underpinning the detrimental impact of a high-fat diet in the developing and adult hypermuscular myostatin null mouse. *Skelet Muscle* 5(1):38. <https://doi.org/10.1186/s13395-015-0063-5>
- Eshima H, Tamura Y, Takehi S et al (2017) Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. *Physiol Rep* 5(7):e13250. <https://doi.org/10.14814/phy2.13250>
- Tallis J, Hill C, James RS, Cox VM, Seebacher F (2017) The effect of obesity on the contractile performance of isolated mouse soleus, EDL, and diaphragm muscles. *J Appl Physiol* 122(1):170–181. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.00836.2016>
- Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Sugizaki MM et al (2011) Involvement of L-type calcium channel and SERCA2a in myocardial dysfunction induced by obesity. *J Cell Physiol* 226(11):2934–2942. <https://doi.org/10.1002/jcp.22643>
- Sánchez G, Aranedo F, Peña JP et al (2018) High-fat-diet-induced obesity produces spontaneous ventricular arrhythmias and increases the activity of ryanodine receptors in mice. *Int J Mol Sci* 19(2):533. <https://doi.org/10.3390/ijms19020533>
- Carvajal K, Balderas-Villalobos J, Bello-Sanchez MD et al (2014) Ca²⁺ mishandling and cardiac dysfunction in obesity and insulin resistance: role of oxidative stress. *Cell Calcium* 56(5):408–415. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.08.003>
- Jia G, DeMarco VG, Sowers JR (2016) Insulin resistance and hyperinsulinaemia in diabetic cardiomyopathy. *Nat Rev Endocrinol* 12(3):144–153. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2015.216>
- Melzer W, Hermann-Frank A, Lüttgau HC (1995) The role of Ca²⁺ ions in excitation–contraction coupling of skeletal muscle fibres. *Biochim Biophys Acta* 1241(1):59–116. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(94\)00014-5](https://doi.org/10.1016/0304-4157(94)00014-5)
- Rebeck RT, Karunasekara Y, Board PG, Beard NA, Casarotto MG, Dulhunty AF (2014) Skeletal muscle excitation–contraction

- coupling: who are the dancing partners? *Int J Biochem Cell Biol* 48: 28–38. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.12.001>
14. Hernández-Ochoa EO, Schneider MF (2018) Voltage sensing mechanism in skeletal muscle excitation–contraction coupling: coming of age or midlife crisis? *Skelet Muscle* 8(1):22. <https://doi.org/10.1186/s13395-018-0167-9>
 15. Ríos E (2018) Calcium-induced release of calcium in muscle: 50 years of work and the emerging consensus. *J Gen Physiol* 150(4): 521–537. <https://doi.org/10.1085/jgp.201711959>
 16. Bassel-Duby R, Olson EN (2006) Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. *Annu Rev Biochem* 75(1):19–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142622>
 17. Gehlert S, Bloch W, Suhr F (2015) Ca²⁺-dependent regulations and signaling in skeletal muscle: from electro-mechanical coupling to adaptation. *Int J Mol Sci* 16(1):1066–1095. <https://doi.org/10.3390/ijms16011066>
 18. Eshima H, Poole DC, Kano Y (2014) In vivo calcium regulation in diabetic skeletal muscle. *Cell Calcium* 56(5):381–389. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2014.08.008>
 19. Vial G, Chauvin MA, Bendridi N et al (2015) Imeglimin normalizes glucose tolerance and insulin sensitivity and improves mitochondrial function in liver of a high-fat, high-sucrose diet mice model. *Diabetes* 64(6):2254–2264. <https://doi.org/10.2337/db14-1220>
 20. Jacquemond V (1997) Indo-1 fluorescence signals elicited by membrane depolarization in enzymatically isolated mouse skeletal muscle fibers. *Biophys J* 73(2):920–928. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78124-4](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78124-4)
 21. Collet C, Csernoch L, Jacquemond V (2003) Intramembrane charge movement and L-type calcium current in skeletal muscle fibers isolated from control and mdx mice. *Biophys J* 84(1):251–265. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(03\)74846-2](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(03)74846-2)
 22. Pouvreau S, Allard B, Berthier C, Jacquemond V (2004) Control of intracellular calcium in the presence of nitric oxide donors in isolated skeletal muscle fibres from mouse. *J Physiol* 560(3):779–794. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2004.072397>
 23. Horowitz P, Schneider MF (1981) Membrane charge movement in contracting and non-contracting skeletal muscle fibres. *J Physiol* 314(1):565–593. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1981.sp013725>
 24. Kutchukian C, Szentesi P, Allard B et al (2017) Impaired excitation–contraction coupling in muscle fibres from the dynamin2R465W mouse model of centronuclear myopathy. *J Physiol* 595(24):7369–7382. <https://doi.org/10.1113/JP274990>
 25. Grice BA, Barton KJ, Covert JD et al (2019) Excess membrane cholesterol is an early contributing reversible aspect of skeletal muscle insulin resistance in C57BL/6NJ mice fed a Western-style high-fat diet. *Am J Phys* 317(2):E362–E373. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00396.2018>
 26. Hernández-Ochoa EO, Robison P, Contreras M, Shen T, Zhao Z, Schneider MF (2012) Elevated extracellular glucose and uncontrolled type 1 diabetes enhance NFAT5 signaling and disrupt the transverse tubular network in mouse skeletal muscle. *Exp Biol Med* 237(9):1068–1083. <https://doi.org/10.1258/ebm.2012.012052>
 27. Llanos P, Contreras-Ferrat A, Georgiev T et al (2015) The cholesterol-lowering agent methyl- β -cyclodextrin promotes glucose uptake via GLUT4 in adult muscle fibers and reduces insulin resistance in obese mice. *Am J Phys* 308(4):E294–E305. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00189.2014>
 28. Funai K, Song H, Yin L et al (2013) Muscle lipogenesis balances insulin sensitivity and strength through calcium signaling. *J Clin Invest* 123(3):1229–1240. <https://doi.org/10.1172/JCI65726>
 29. Funai K, Lodhi IJ, Spears LD et al (2016) Skeletal muscle phospholipid metabolism regulates insulin sensitivity and contractile function. *Diabetes* 65(2):358–370. <https://doi.org/10.2337/db15-0659>
 30. Paran CW, Verkerke AR, Heden TD et al (2015) Reduced efficiency of sarcolipin-dependent respiration in myocytes from humans with severe obesity. *Obesity* 23(7):1440–1449. <https://doi.org/10.1002/oby.21123>
 31. Kutchukian C, Szentesi P, Allard B, Buj-Bello A, Csernoch L, Jacquemond V (2019) Ca²⁺-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in myotubularin-deficient muscle fibers. *Cell Calcium* 80: 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.04.004>
 32. Lotteau S, Ivarsson N, Yang Z et al (2019) A mechanism for statin-induced susceptibility to myopathy. *JACC Basic Transl Sci* 4(4): 509–523. <https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.03.012>
 33. Bianchi L, Volpato S (2016) Muscle dysfunction in type 2 diabetes: a major threat to patient’s mobility and independence. *Acta Diabetol* 53(6):879–889. <https://doi.org/10.1007/s00592-016-0880-y>
 34. Ríos E, Figueroa L, Manno C, Kraeva N, Riazi S (2015) The couplonopathies: a comparative approach to a class of diseases of skeletal and cardiac muscle. *J Gen Physiol* 145(6):459–474. <https://doi.org/10.1085/jgp.201411321>
 35. Allard B (2018) From excitation to intracellular Ca²⁺ movements in skeletal muscle: basic aspects and related clinical disorders. *Neuromuscul Disord* 28(5):394–401. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.03.004>
 36. Avila G (2018) Disturbed Ca²⁺ homeostasis in muscle-wasting disorders. *Adv Exp Med Biol* 1088:307–326. https://doi.org/10.1007/978-981-13-1435-3_14
 37. Denniss A, Dulhunty AF, Beard NA (2018) Ryanodine receptor Ca²⁺ release channel post-translational modification: central player in cardiac and skeletal muscle disease. *Int J Biochem Cell Biol* 101: 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.05.004>
 38. Ogawa T, Kashiwagi A, Kikkawa R, Shigeta Y (1995) Increase of voltage-sensitive calcium channels and calcium accumulation in skeletal muscles of streptozocin-induced diabetic rats. *Metabolism* 44(11):1455–1461. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(95\)90146-9](https://doi.org/10.1016/0026-0495(95)90146-9)
 39. Bruton JD, Katz A, Lännergren J, Abbate F, Westerblad H (2002) Regulation of myoplasmic Ca²⁺ in genetically obese (*ob/ob*) mouse single skeletal muscle fibres. *Pflugers Arch* 444(6):692–699. <https://doi.org/10.1007/s00424-002-0882-1>
 40. Jain SS, Pagliarunga S, Vigna C et al (2014) High-fat diet-induced mitochondrial biogenesis is regulated by mitochondrial-derived reactive oxygen species activation of CaMKII. *Diabetes* 63(6): 1907–1913. <https://doi.org/10.2337/db13-0816>
 41. Matsunaga S, Inashima S, Yamada T, Watanabe H, Hazama T, Wada M (2003) Oxidation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase induced by high-intensity exercise. *Pflugers Arch* 446(3): 394–399. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1040-0>
 42. Vázquez P, Tirado-Cortés A, Álvarez R, Ronjat M, Amaya A, Ortega A (2016) Reversible oxidation of vicinal-thiols motif in sarcoplasmic reticulum calcium regulatory proteins is involved in muscle fatigue mechanism. *Cell Calcium* 60(4):245–255. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2016.06.001>
 43. Maurya SK, Bal NC, Sopariwala DH et al (2015) Sarcolipin is a key determinant of the basal metabolic rate, and its overexpression enhances energy expenditure and resistance against diet-induced obesity. *J Biol Chem* 290(17):10840–10949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.636878>
 44. Maurya SK, Herrera JL, Sahoo SK et al (2018) Sarcolipin signaling promotes mitochondrial biogenesis and oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Rep* 24(11):2919–2931. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.08.036>

Publisher’s note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Discussion

Depuis le siècle dernier, la société a connu de nombreux changements : les avancées technologiques, le bouleversement socio-économique, l'industrialisation, l'évolution des habitudes alimentaires, l'augmentation de la sédentarité, la mondialisation, autant de facteurs qui participent à la recrudescence de l'obésité, du DT2 et des NAFLDs dans le monde. Les études montrent que l'IR et la stéatose hépatique favorisent l'apparition de ces pathologies, c'est pourquoi il est nécessaire de comprendre leurs mécanismes moléculaires afin de proposer de nouvelles stratégies préventives et/ou thérapeutiques.

Dans ce contexte, notre équipe a démontré le rôle clef des MAMs dans le contrôle de l'homéostasie glucidique, avec notamment une altération de la communication entre ces organites dans le foie et le muscle squelettique de différents modèles de souris obèses et IR ^{274,323,329,370}. Depuis de nombreuses années, les MAMs sont connues pour jouer un rôle clef dans le contrôle de la signalisation et de l'homéostasie cellulaire, via la modulation des flux calciques et de phospholipides. Dorénavant, celles-ci apparaissent comme un carrefour de la signalisation de l'insuline et du glucose, régulant la flexibilité métabolique et la sensibilité à l'insuline ³²⁴. Cependant, le rôle précis des MAMs dans l'IR et la stéatose hépatique est complexe et pas nettement défini, notamment car les MAMs sont des structures dynamiques et hétérogènes, avec de nombreuses protéines résidentes ayant des effets pléiotropiques, compliquant les investigations. S'ajoute à ces difficultés, l'existence de multiples techniques d'explorations possibles, une hétérogénéité cellulaire des tissus ciblés, et une influence de l'environnement qui peuvent participer à la divergence de résultats issus de la littérature. Ainsi, des équipes ont trouvé, contrairement à nos études, une potentialisation des MAMs dans le foie ²⁶⁷ et le muscle squelettique ²⁹⁸ en situation d'obésité chronique et d'IR. Face à cette controverse, il était important pour nous de complètement réévaluer le rôle des MAMs dans l'IR et la stéatose hépatique.

Mes travaux de thèse avaient pour but d'étudier, dans le foie de souris, la dynamique des MAMs au cours du développement de l'obésité et de l'IR, et de déterminer leur rôle causal dans ces atteintes hépatiques. Pour cela, la force de notre approche a été de réaliser une analyse complète à la fois de la structure des MAMs, par une double approche de MET et d'*in situ* PLA, et de la fonction des MAMs, via la mesure du transfert calcique aux MAMs, ceci *in situ* dans de nombreux modèles murins d'obésité et d'IR. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'évolution des MAMs au cours du temps, dans le foie de souris soumises à une diète obésogène. Nos résultats montrent que l'altération structurale et fonctionnelle des MAMs dans le foie intervient de manière précoce, dès 1 semaine de diète HFHSD, et précède l'installation de l'IR et de la stéatose hépatique, qui se déclare après 12 semaines de diète obésogène (**Figure 33**). À noter que, l'altération des contacts mitochondrie-RE fut retrouvée dans le foie de souris obèses génétiquement (*ob/ob*) et de fonds génétiques différents (B/6-J, B/6-N et B/6-Ola Hsd), prouvant la robustesse de nos données (**Résultats non publiés**). Pour compléter nos travaux, l'expression à l'aide d'adénovirus, de protéines non exprimées de manière endogène et modulatrices des MAMs dans le foie de souris, nous a permis d'explorer la causalité des MAMs dans l'IR et la stéatose. L'altération des MAMs par l'expression hépatique du spacer, FATE1, est suffisante pour induire une IR

et une stéatose hépatique chez la souris saine (*Figure 34*). À l'opposé, le rapprochement des organites par un linker prévient l'apparition de l'intolérance au glucose induite par une diète HFHSD (*Figure 34*). Pour finir, nous avons montré que le retour à une diète normale durant 8 semaines, après un régime obésogène long, était suffisant pour réinstaurer les contacts mitochondrie-RE et améliorer la sensibilité à l'insuline et la stéatose hépatique (*Figure 33*).

Ces résultats dévoilent le caractère précoce, causal et réversible de l'altération des MAMs dans l'insulino-résistance et la stéatose hépatique (Article n°1) et sont illustrés dans les figures 33 (dynamique des MAMs au cours des protocoles nutritionnels) et 34 (rôle causal des MAMs).

Tout comme le foie, notre équipe a précédemment observé une altération des MAMs dans le muscle squelettique de souris HFHSD³⁷⁰. De manière intéressante, l'homéostasie calcique dans le CEC était étonnamment bien préservée dans le muscle squelettique de souris HFHSD⁵¹¹, pourtant dans le muscle cardiaque de souris HFHSD l'altération des MAMs est associée à une altération de l'homéostasie calcique³⁷¹, témoignant du caractère indépendant des mécanismes mis en jeu lors des modulations de l'homéostasie calcique lors du CEC et pour l'homéostasie métabolique.

Ces résultats dévoilent, dans le muscle squelettique de souris HFHSD, des régulations calciques dans le CEC et dans l'homéostasie métabolique qui seraient indépendantes et s'influenceraient peu.

La discussion qui va suivre se focalise sur le foie, qui constitua mon principal objet d'étude durant ma thèse.

Nos données confirment donc le rôle crucial des MAMs dans la stéatose et l'insulino-résistance dans le foie, mais ne permettent pas de déterminer l'ordre d'apparition des atteintes hépatiques. Est-ce l'amélioration de l'homéostasie lipidique qui participe à l'amélioration de la sensibilité à l'insuline ? ou est-ce l'amélioration de la sensibilité à l'insuline qui améliore la stéatose hépatique ? ou encore est-ce que les deux effets sont indépendants ?

- **Le trio infernal MAMs/insulino-résistance/stéatose**

• **MAMs et stéatose**

Comme précédemment décrit dans *III.C.(3)MAMs – stéatose hépatique*, les MAMs jouent un rôle clef dans la stéatose hépatique puisque des enzymes du métabolisme lipidique résident aux MAMs, la synthèse de PL s'effectue aux MAMs, mais aussi car les MAMs sont essentielles pour la bonne homéostasie de la mitochondrie qui s'occupe de l'oxydation des lipides. Lors de notre protocole cinétique HFHSD, nous avons constaté que la stéatose hépatique apparaissait après l'altération des MAMs. En accord avec ces données, l'altération des MAMs dans le foie par le spacer, FATE1, a

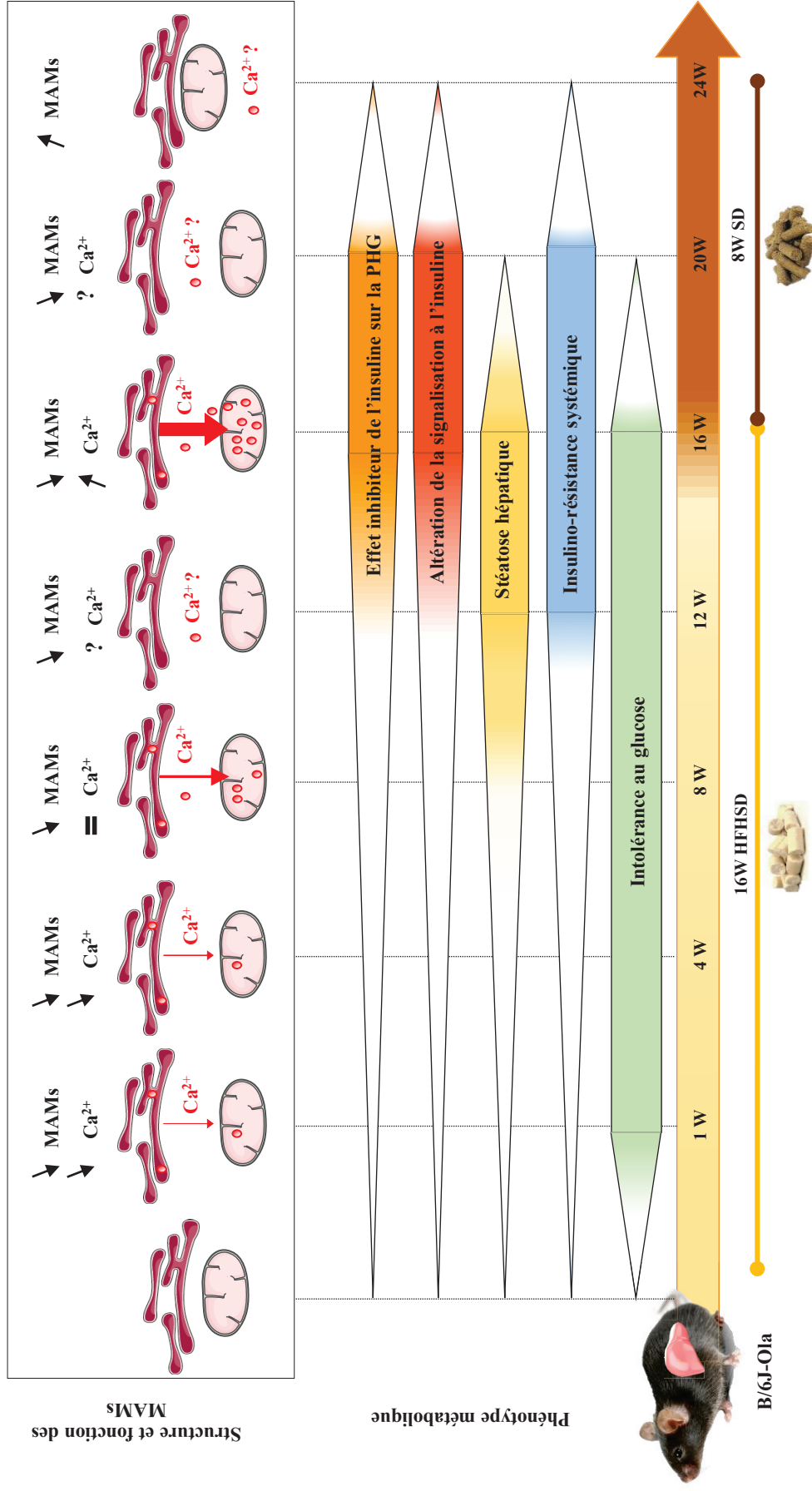


Figure 33: Schéma récapitulatif des atteintes métaboliques associées à l'altération des fonctions et structures des MAMs dans le foie au cours d'une diète obésogène.

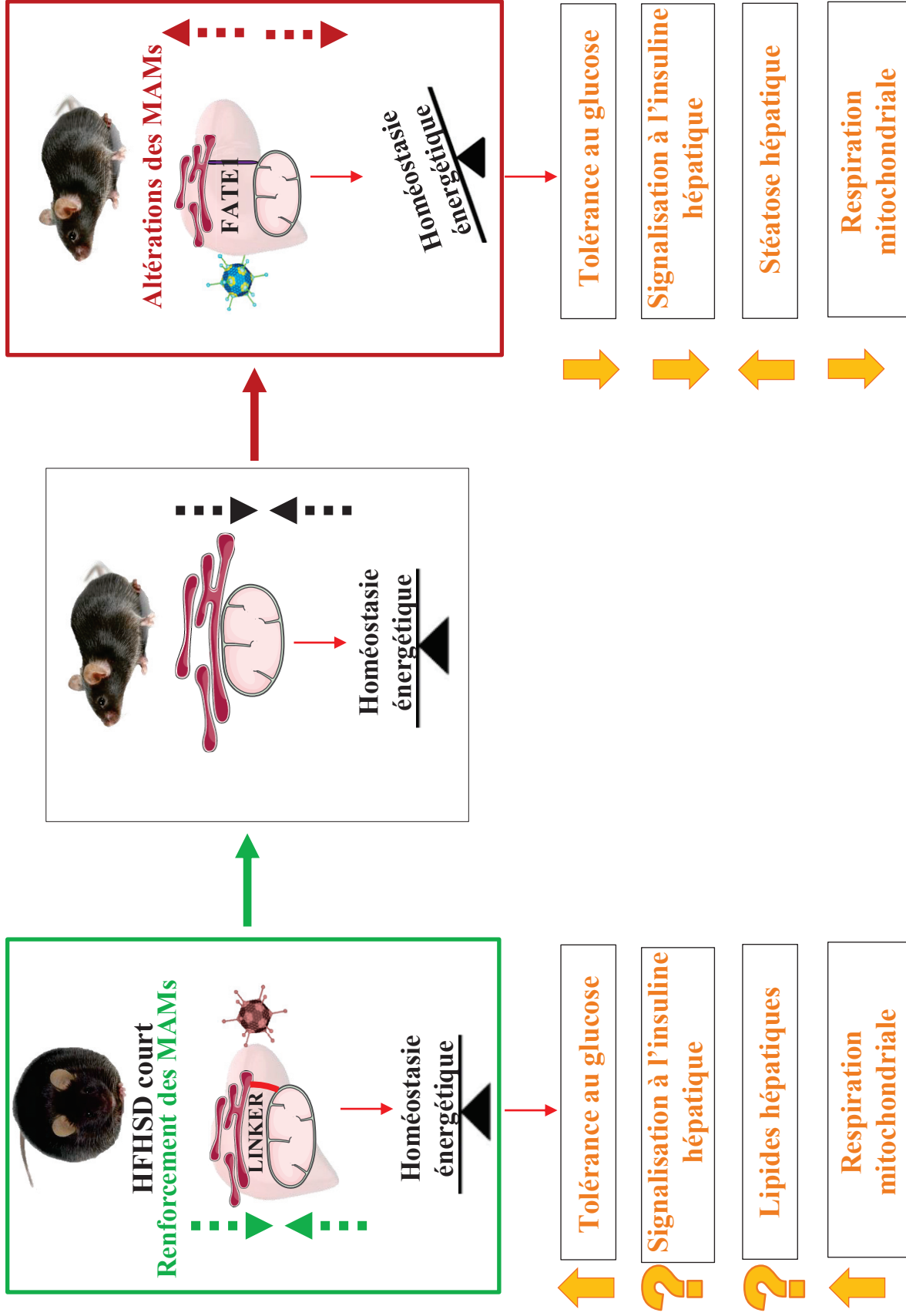


Figure 34: Impact physiologique de la modulation des MAMs via un linker et un spacer, FATEI

provoqué une stéatose hépatique aux souris, suggérant l'implication des MAMs dans la stéatose hépatique.

Lors du protocole RD, nous avons montré que l'amélioration de la stéatose précédait la restauration des MAMs et de l'IR systémique et hépatique. Il semblerait donc que les MAMs et la stéatose s'influencent réciproquement, puisque l'altération des MAMs induit une stéatose, et l'amélioration de la stéatose peut améliorer les MAMs. En revanche, rétablir les MAMs ne paraît pas nécessaire à l'amélioration de la stéatose hépatique.

L'effet pro-stéatosique de l'altération des MAMs pourrait impliquer une altération de l'oxydation des lipides dans la mitochondrie. En effet, il a précédemment été démontré qu'inhiber le transfert calcique du RE à la mitochondrie affectait la bioénergétique mitochondriale^{336,338}. Ainsi, comme FATE1 diminue les échanges Ca^{2+} entre les deux organites, l'altération de la capacité des mitochondries à oxyder les lipides pourrait conduire à leur stockage dans le foie. Nous avons donc mesuré sur hépatocytes intacts la respiration mitochondriale médiée par l'oxydation du palmitate et démontré que l'expression de FATE1 diminuait la consommation d' O_2 basale et maximale en présence de palmitate. De manière intéressante, cet effet est maintenu lorsqu'on inhibe l'oxydation des lipides par l'etomoxir, suggérant que d'autres altérations mitochondriales participent à cette dysfonction. C'est pourquoi, nous avons également mesuré sur hépatocytes perméabilisés la respiration médiée par les complexes I, II et IV. Nous confirmons que l'expression de FATE1 induit des atteintes intrinsèques des complexes II et IV d'OXPHOS, probablement indépendantes des contacts mitochondrie-RE. L'atteinte simultanée de ces complexes suggère un effet sur le transfert des électrons et/ou l'organisation des supra-complexes qui pourrait résulter d'un changement de fluidité membranaire lié à un changement des PL membranaires des mitochondries. Par conséquent, un défaut d'oxydation des lipides et une altération du fonctionnement de complexes d'OXPHOS dans la mitochondrie pourraient être à l'origine de l'accumulation importante de lipides dans le foie des souris Ad-FATE1. L'augmentation des MAMs par le linker n'a pas permis de démontrer la réciprocité, à savoir une augmentation de l'oxydation mitochondriale des lipides, néanmoins des tendances non significatives étaient présentes et associées à une diminution du nombre de gouttelettes lipidiques dans les hépatocytes des souris Ad-linker, pointant la limite de notre modèle nutritionnel trop court.

Nous avons vérifié l'expression génique des gènes impliqués dans le métabolisme lipidique hépatique :

- Pour la lipogenèse *de novo* : SREBP-1c, AcétylCoA carboxylase, acide gras synthase
- Pour l'export des VLDL : ApoB100
- Pour la lipolyse : lipase hormonosensible, adipose tryglycérade lipase

Nous n'avons constaté aucune variation de l'expression de ces gènes pas dans le foie des souris FATE1 en comparaison avec les souris contrôles (*résultats complémentaires non présentés dans ce mémoire*).

Nous nous sommes alors demandés si la stéatose des souris Ad-FATE1 provenait d'une diminution de la lipophagie, puisque l'autophagie des lipides, régulant la libération des AGL pour la mitochondrie, implique les MAMs, comme l'a démontré récemment l'étude de Bosc et al dans les cellules hématopoïétiques leucémiques⁵¹². De manière intéressante, nous avons noté une diminution du clivage de LC3 II dans le foie stéatosé des souris Ad-FATE1, illustrant une diminution de l'autophagie qui pourrait être associée à une diminution de la lipophagie (*résultats complémentaires non présentés dans ce mémoire*). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de stimuler l'autophagie dans nos modèles, puisque la lipophagie est une forme d'autophagie sélective, et d'étudier si la stéatose s'améliore ou non. Parallèlement, il serait nécessaire de mesurer par expression protéique, la conversion de LC3-I en LC3-II, qui reflète le nombre d'autophagosomes et d'explorer le marquage simultané de LC3-II par immunofluorescence et des gouttelettes lipidiques par Bodipy/Oil red OR, afin de s'assurer qu'il s'agit bien du phénomène de lipophagie. Ces stratégies pourraient permettre de fournir des preuves quant à l'implication de la lipophagie dans le développement de la stéatose après altération des MAMs.

Ainsi une altération des MAMs par FATE1 pourrait bloquer la lipophagie, d'une part en raison de l'absence de contacts mitochondrie-RE nécessaires pour jouer le rôle de plateforme d'initiation, mais aussi via la perturbation de la synthèse des PL qui ne permettent plus de fournir le PE essentiel aux autophagosomes.

Cependant, si cette hypothèse se vérifie, comment expliquer que l'amélioration de la stéatose dans le RD précède l'amélioration des MAMs ? Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle deux phénomènes, indépendants des MAMs, participeraient à la diminution de la stéatose. D'une part, la diminution rapide des apports caloriques en passant du régime HFHSD au SD et d'autre part il se peut que ceci soit la conséquence d'une amélioration des fonctions mitochondriales puisqu'une étude a montré qu'il existait une fenêtre de temps, à 16 semaines de HFD où les fonctions mitochondriales semblent boostées puis déclinent complètement après 32 semaines de HFD¹⁷⁶. Ainsi, le changement alimentaire cumulé à la potentialisation des fonctions mitochondriales pourraient participer à une diminution rapide de la stéatose.

Cependant une augmentation des fonctions mitochondriales peut-elle se faire alors que les MAMs sont altérées ? La mesure du calcium chez ces souris semble indispensable pour mieux comprendre l'implication de la mitochondrie et des MAMs dans la stéatose.

D'autres questions restent en suspens, la réversibilité des MAMs se maintient-elle pour des obésités chroniques à long terme ?

- **MAMs et IR**

En ce qui concerne la sensibilité à l'insuline, nos données démontrent que les MAMs sont systématiquement altérées dans le foie de souris obèses et IR, que ce soit dans un modèle nutritionnel (souris HFHSD) ou dans un modèle génétique (souris ob/ob) et quel que soit le fond génétique des souris. Ces données confirment nos précédentes observations dans le foie ²⁷⁴ et dans d'autres tissus comme le muscle ³⁷⁰, et le cœur ³⁷¹ et les renforcent puisque cette fois-ci i) la MET a été associée à l'*in situ* PLA, ii) les observations ont été faites *in situ* dans le foie (et non dans des hépatocytes isolés) et iii) la fonction des MAMs a également été mesurée. À l'avenir, il serait intéressant de compléter ces analyses fonctionnelles par l'analyse des échanges de PL car nos données montrent que les altérations précoces concernent les contacts très étroits (0-10nm) impliqués dans ces échanges de PL. De plus, nous avons cette fois-ci, confirmé le lien de cause à effet entre les MAMs et la sensibilité à l'insuline hépatique puisque nous démontrons que l'altération des MAMs médiée par FATE1 est suffisante pour entraîner une IR hépatique, tandis que la prévention de cette altération lors d'un HFHSD à l'aide du linker améliore l'intolérance au glucose. Enfin, nous avons montré que l'amélioration structurale des MAMs dans le foie des souris obèses lors du protocole RD s'accompagnait d'une amélioration de la sensibilité, de la signalisation et de l'action inhibitrice de l'insuline sur la production hépatique de glucose. Néanmoins, si l'altération des MAMs au cours d'une diète HFHSD est rapide (1 semaine), son amélioration par le RD est plus longue puisqu'elle nécessite 8 semaines. L'ensemble de ces résultats sont en faveur d'un lien étroit entre l'intégrité des MAMs et la sensibilité à l'insuline hépatique. Cependant, nous ne pouvons pas exclure que l'amélioration de la structure des MAMs par le RD puisse être une conséquence de l'amélioration du phénotype métabolique des souris obèses.

- **MAMs, stéatose et IR**

Même si cela reste débattu, des études mettent en évidence une indépendance entre la sensibilité à l'insuline et la stéatose ^{189,513-516}. Ainsi Monsénégo et son équipe, via la surexpression d'une forme mutée de CPT1 dans le foie de souris obèses et IR, améliorent la sensibilité à l'insuline mais sans moduler la stéatose des animaux ¹⁸⁹. Cette mutation de CPT1 bloque spécifiquement le rétrocontrôle négatif par le malonyl-CoA, ainsi le flux d'AGL exogène et endogène se redirige vers la β -oxydation ce qui explique la diminution de la quantité d'AGL retrouvée. Une diminution des céramides et des DAG a aussi été retrouvée dans le foie des souris mais sans modification du contenu en TG. Ceci est associé à une diminution de la phosphorylation des JNK en accord avec l'amélioration de la sensibilité à l'insuline. L'amélioration de la signalisation de l'insuline s'accompagne d'une amélioration des enzymes de la lipogenèse *de novo* ce qui explique le maintien du contenu en TG ¹⁸⁹. Cela est en accord avec Gao et son équipe qui montre que la surexpression de CPT1 dans les adipocytes augmente la quantité de TG et prévient l'IR induite par les AGL en diminuant les JNK1/2 ⁵¹⁷. Ainsi, la quantité de

lipide n'impacterait pas l'IR mais c'est plutôt la qualité du contenu lipidique dans le foie qui serait importante. Il s'avère que l'accumulation de TG dans le foie n'est pas forcément néfaste mais au contraire pourrait protéger le foie de l'IR, en tamponnant la toxicité de certains lipides comme les DAG qui peuvent interférer avec la signalisation à l'insuline⁵¹⁸⁻⁵²⁰. Dans ce sens, les acides gras polyinsaturés, notamment connus dans l'induction d'IR via l'activation des TLR, se trouvent complètement inertes lorsqu'ils sont intégrés aux TG, ce qui permet de protéger les cellules de leur lipotoxicité⁵²¹. En accord avec ces données, il a été montré chez des patients IR et NAFLD métaboliquement, une plus grande quantité de TG et AGL monoinsaturés et saturés ainsi que de céramides dans leur foie en comparaison avec des patients non IR et NAFLD PNPLA3 (allèle muté) qui eux présentent une grande quantité de TG polyinsaturés⁵²². Ces deux types de patients présentent une prévalence accrue à la fois pour la stéatose et le développement de NASH témoignant que les lipides bioactifs ne sont pas nécessaires au développement de la NASH mais interviendraient dans l'IR des patients⁵²².

Ces études mettent en avant l'importance des lipides bioactifs qui peuvent interférer avec notamment la voie de signalisation de l'insuline. De manière intéressante, les enzymes responsables à la fois de la synthèse des céramides et des DAG ont été retrouvées aux MAMs³¹⁵. Dans ce sens, il est possible que la modulation des MAMs impacte l'homéostasie de ces lipides bioactifs. Ainsi, l'altération des MAMs par FATE1 entrainerait de façon indépendante : d'une part, une stéatose via la diminution de l'oxydation des lipides et/ ou de la lipophagie ; et d'autre part une IR qui pourrait passer par la modulation des céramides et des DAG. Cette hypothèse pourrait expliquer l'amélioration de la tolérance au glucose des souris linker sans modulation du contenu lipidique, puisqu'il se pourrait que l'induction des MAMs passe par une amélioration de l'homéostasie des lipides bioactifs, indépendamment du contenu en lipide hépatique. Il en est de même, pour le protocole RD, il se peut que l'IR et la stéatose soient indépendantes, comme l'a montré Monsénego, avec une amélioration de la stéatose due au changement de régime et l'amélioration de l'IR qui pourrait être la conséquence de la modification du contenu en DAG et céramides suite à l'amélioration des MAMs. Il serait intéressant de creuser cette piste puisque ces lipides agissent non seulement sur la voie de l'insuline mais aussi sur l'homéostasie calcique^{419,513}. Ainsi, les lipides bioactifs pourraient constituer le lien manquant entre les MAMs et l'IR.

Dans cet optique, une analyse lipidomique des MAMs de nos différents modèles serait essentielle pour :

- Étudier les variations des lipides bioactifs pouvant intervenir dans l'IR
- Étudier les PL et notamment le ratio PE/PC, puisque ceux-ci interviennent dans la fluidité des membranes, la perméabilité des membranes aux ions, dans l'assemblage des lipoprotéines, dans l'autophagie et la lipophagie, dans la dynamique des gouttelettes lipidiques et par conséquent pourraient intervenir dans nos modèles.

Les MAMs pourraient constituer une nouvelle cible potentielle pour améliorer le métabolisme glucidique et lipidique dans les maladies métaboliques. Pour cela, il est important de définir l'origine de la controverse des MAMs dans l'obésité chronique, dans le but d'affiner les futures investigations. La partie qui suit a pour vocation de discuter de l'origine de cette controverse et des futures stratégies possibles pour progresser sur le ciblage des MAMs comme une stratégie préventive et/ou thérapeutique des maladies métaboliques.

- **D'où vient cette controverse ?**

L'ensemble de mes travaux ont tenté de replacer les MAMs dans l'IR et la stéatose hépatique, puisque les données de la littérature semblent pointer un rôle double des MAMs dans ces désordres métaboliques. De manière intéressante, cette problématique n'est pas singulière à l'IR et la stéatose hépatique, mais est retrouvée dans d'autres tissus comme le muscle ^{298,370} et de nombreuses autres pathologies impliquant les MAMs. Comme dans les maladies neurodégénératives, où l'extinction de la Mfn2 provoque une altération des MAMs ^{359,399,406}, retrouvée dans la maladie de Charcot où la Mfn2 est mutée ²⁷¹, tandis que des équipes indépendantes montrent une induction des contacts mitochondrie-RE face à l'inhibition de celle-ci ^{277,279}. La multiplication des controverses sur ce sujet pourrait refléter les nombreuses stratégies d'exploration des structures et des fonctions des contacts, car l'étude des MAMs est un sujet récent souffrant de l'absence de méthodes/techniques normées. C'est dans cette optique, face à une demande grandissante, que plusieurs spécialistes des contacts inter-organites se sont réunis afin d'établir une standardisation de la nomenclature et des approches pour définir les MAMs ⁴⁵⁶.

• **L'importance du modèle expérimental**

Notre démarche a consisté à explorer les MAMs, de la façon la plus physiologique, et en diversifiant les modèles afin de s'assurer des résultats. De ce fait, nous avons validé l'altération structurale des MAMs dans l'IR *in situ* dans le foie des souris, en accord avec nos précédentes données *ex vivo* dans les hépatocytes primaires isolés ^{274,323}. En accord avec ces données, l'altération fonctionnelle des MAMs a été retrouvée *ex vivo* dans les hépatocytes primaires. De même, pour la modulation des MAMs qui a été effectuée *ex vivo* sur hépatocytes primaires et *in vivo* dans le foie afin d'étudier l'impact sur la physiologie tout entière, ce qui nous a permis de confirmer la place centrale des MAMs dans l'homéostasie glucidique et la sensibilité à l'insuline. Une approche semblable a été effectuée par les équipes de Thoudam et Arruda, avec l'étude des MAMs *in situ* dans le foie et le muscle, et l'exploration des fonctions *ex vivo* à l'aide d'isolement de myotubes et d'hépatocytes primaires, où ils ont validé l'induction des MAMs dans l'obésité et l'IR ^{267,298}. Ainsi, la combinaison de modèles, *in situ* et *ex vivo*, assure la fiabilité des résultats et montre que la controverse proviendrait d'une autre variable.

Nous nous sommes ensuite demandés si l'utilisation de souris, de fonds génétiques différents, pouvait influencer la dynamique des MAMs dans l'IR et l'obésité. Le génotypage de la mutation *nnt*, à partir de l'ADN extrait de la queue de souris utilisées par notre équipe et les équipes outre-Atlantique, a confirmé la présence de la forme mutée du gène *nnt* (essentiel dans l'équilibre redox de la mitochondrie) dans les modèles de souris B/6J et *ob/ob*_{Jax} (Jackson Laboratory) tandis que la forme sauvage a été retrouvée dans nos modèles B/6J-Ola et *ob/ob*_{Ola} (Envigo) semblables au B/6N (résultats non publiés). En revanche, la mutation de *nnt*, ne semble pas influencer les MAMs dans l'obésité nutritionnelle (*HFHSD*) ou génétique (*ob/ob*) puisque nous avons retrouvé une altération structurale des MAMs dans le foie de tous nos modèles possédant le gène *nnt* muté et sauvage (***résultats non publiés***). Ces données ont confirmé, que dans l'obésité et l'IR, l'altération structurale des MAMs était un phénomène constant et indépendant du fond génétique, écartant cette hypothèse pour expliquer les discordances des MAMs dans l'IR et l'obésité.

Mais si les modèles expérimentaux sont similaires, et que le fond génétique n'explique pas ces différences, d'autres variables peuvent y participer :

Le statut nutritionnel des animaux, lors des expérimentations, diffère entre nos équipes. En effet, les équipes d'Arruda et Thoudam investiguent sur des animaux nourris tandis que notre équipe travaille sur des souris à jeun pendant une nuit. Or ceci constitue un fait notable puisque notre équipe a montré que les MAMs dans le foie étaient régulées durant les transitions nutritionnelles, avec une potentialisation des MAMs à jeun et une diminution en condition nourrie³²³. Ainsi, le statut nutritionnel des animaux pourrait avoir une incidence sur les résultats trouvés.

Une autre composante, qui est la zonation biochimique du foie, pourrait intervenir dans la controverse. En effet, on ne peut pas exclure que les MAMs, qui répondent aux variations nutritionnelles, soient régulées différemment au sein du foie et surtout des acini en fonction de l'exposition aux nutriments. Cependant, l'isolation d'hépatocyte primaire permet de travailler sur un pool de cellules issues de différentes zones du foie, offrant une vision globale des MAMs, contrairement à la MET qui s'effectue sur une zone restreinte. Même si nous avons retrouvé l'altération des MAMs dans le foie et dans les hépatocytes, d'autres preuves et explorations, *in situ* dans différentes zones du foie seraient nécessaires pour écarter cette hypothèse.

- **La pertinence des techniques**

- ***Exploration structurale***

Le choix d'une technique singulière pour définir la dynamique des MAMs, constitue une des premières limites, puisqu'il est indispensable de croiser différentes approches pour s'affranchir des artefacts. Tout d'abord, il est important de comprendre ce que sont des points de contacts mitochondrie-RE. Ces derniers, ne se définissent pas simplement par une distance intermembranaire, mais également

par la présence de points d'accroches et de ponts protéiques traduisant des attachements physiques entre les deux organites. La MET, considérée comme le « gold standard » de l'exploration des MAMs ⁴⁵⁶, si elle est utilisée seule, ne suffit pas pour évaluer les MAMs. En effet, celle-ci n'explore qu'un plan focal donné et ne permet pas de s'assurer que les contacts visualisés et quantifiés sont bien des MAMs fonctionnelles et pas seulement une proximité géographique entre les deux organites. D'où la nécessité de la coupler à une autre technique, c'est pourquoi tout le long de notre étude nous l'avons associée à l'*in situ* PLA qui permet la visualisation du canal calcique VDAC1-Grp75-IP3R1. Cette démarche constitue une force et renforce la solidité de nos données, puisque nous avons retrouvé l'altération des MAMs dans le foie en condition d'IR par ces deux approches.

De plus, trop peu d'études utilisant la MET, détaillent la répartition des MAMs selon la largeur des contacts, pourtant associée à des fonctions spécifiques ²⁵⁷. Ainsi, il a été suggéré que le type de contact mitochondrie-RE étudié (étroit ou large) pouvait expliquer la controverse sur le rôle de tether ou de spacer de la Mfn2, puisque l'inactivation de la Mfn2 augmente les contacts étroits et inhibe les contacts plus larges ²⁸⁰. Dans l'**article n°1**, nous démontrons également une régulation spécifique de certains contacts mitochondrie-RE dans les stades précoces de l'obésité puisque seuls les contacts étroits 0-10nm sont altérés après 1 semaine de diète HFHSD, alors que tous les types de contact sont altérés après 16 semaines de diète HFHSD. Ainsi, une analyse simple des contacts totaux (entre 0 et 50nm) n'aurait pas mis en évidence cette subtile altération dans les étapes précoces de l'obésité. Cet exemple, montre que l'analyse des MAMs, en fonction de la largeur des contacts, permettrait de pondérer et préciser certaines conclusions, qui se trouvent trop souvent limitées à un système ON/OFF d'absence ou de présence de MAMs.

L'altération des MAMs dans le foie pendant l'IR a été validée en MET et par *in situ* PLA (article n°1), tout comme Thoudam et son équipe qui trouvent, par MET et *in situ* PLA, une augmentation des contacts mitochondrie-RE dans le muscle ²⁹⁸. Étant donné que cette équipe a également validé par une double approche l'augmentation des contacts mitochondrie-RE dans le muscle en situation d'IR, il est donc peu probable que cette composante participe à la controverse.

Les recherches se tournent de plus en plus vers des stratégies se rapprochant au plus près de la physiologie et notamment mesurer les MAMs dans les cellules vivantes, sans passer par de nombreuses étapes de fixation et de préparation d'échantillons. C'est le cas du biosenseur SPLICS (split-GFP-based contact site sensor), élaboré par Cieri et son équipe, basé sur un système simple : la protéine GFP scindée en 2 parties non fluorescentes l'une adressée au RE, l'autre à la mitochondrie, qui fluorescence lorsque la protéine est assemblée. De plus, cette équipe a produit deux tailles de SPLICS un court (8-10nm) et un long (40-50nm) ce qui permet d'examiner le type de MAM impliquée. Cette technique a l'avantage de visualiser les contacts sur cellules vivantes et de quantifier différents types de MAMs.

○ *Exploration fonctionnelle*

Les MAMs sont des structures dynamiques et sensibles à leur environnement ce qui complexifie leur exploration fonctionnelle et demande une grande rigueur d'exécution.

Comme évoqué précédemment, nous avons démontré que le fond génétique n'avait pas de répercussion sur la structure des MAMs. Il n'en est pas moins important de garder en tête l'implication potentielle de cette mutation *nnt* lors des approches fonctionnelles des MAMs sur les souris B/6J et ob/ob_{Jax}. En effet, nos données sur les flux de Ca²⁺ aux MAMs, montrent que les souris mutées obèses (nutritionnellement et génétiquement) ont une augmentation du flux de Ca²⁺ et ceci malgré l'altération structurale des MAMs. Ainsi, le déséquilibre redox, des souris mutées, pourrait modifier l'activité de MCU et induire une augmentation de l'entrée de Ca²⁺ dans la mitochondrie³³⁴, expliquant l'obtention de résultats contre-intuitifs. De ce fait, des mesures de changements de Ca²⁺ mitochondrial chez les souris mutées obèses, ne seront pas nécessairement la conséquence d'un changement structurel des MAMs.

De plus, nos explorations fonctionnelles des MAMs ont dévoilé une limite importante de nos modèles d'obésité chronique puisque l'expression adénovirale de la sonde calcique mitochondriale dans des hépatocytes perturbe complètement la structure des MAMs (*article n°1*). Les MAMs, qui étaient retrouvées altérées dans le foie des souris HFHSD_{16W}, étaient induites dans les hépatocytes isolés de ces souris après expression de la sonde calcique. Ceci pourrait expliquer l'augmentation du transfert Ca²⁺ que nous avons trouvé dans les hépatocytes isolés HFHSD_{16W}, malgré l'altération des MAMs dans le foie de ces souris. Comme ce phénomène n'est pas retrouvé à des temps courts, 1 et 4 semaines de diète HFHSD, nous suggérons que la surexpression adénovirale d'une sonde calcique, dans des mitochondries déjà dysfonctionnelles, amène un stress supplémentaire qui bouleverse complètement la dynamique des MAMs⁵²³. De la même façon Arruda et al, ont infecté des hépatocytes de souris ob/ob_{Jax} dans le but d'exprimer la sonde 4mtD3CPV pour la mesure des flux Ca²⁺ aux MAMs. De façon similaire à notre équipe, Arruda et al ont dû faire face à ce problème, ainsi il est possible que l'augmentation des flux calciques, mesurée dans cette étude soit uniquement la conséquence de ce phénomène²⁶⁷.

Ces données bousculent la façon dont les explorations, sur les modèles d'obésités sévères, doivent être construites et amènent à différents questionnements :

➤ *À partir de quel moment ces dysfonctions peuvent interférer avec l'exploration ?*

La comparaison de nos protocoles génétiques et cinétiques, dévoile une évolution dynamique de la fonction des MAMs au cours du temps lors d'une diète obésogène. En effet, chez nos souris (non mutées, B/6J-Ola), le transfert Ca²⁺ aux MAMs à 1 et 4 semaines diminue, à 8 semaines n'est pas modulé et à 16 semaines de HFHSD est potentialisé (*article n°1* et résultats non publiés), tandis que l'altération

structurale des MAMs est constante dans le foie. Deux hypothèses sont possibles pour expliquer ces modulations différentielles structure/fonction :

- Soit il existe réellement une régulation différentielle de la structure et de la fonction des MAMs (**Figure 33**) qui opèrerait vers 8 semaines de HFHSD pour contrebalancer l'altération structurale des MAMs en accord avec les données d'Arruda et al qui montrent une augmentation du transfert calcique dans le foie après une obésité chronique ²⁶⁷.
- Soit à 8 semaines de HFHSD, les mitochondries accumulent déjà des dysfonctions, et nous faisons donc face au même phénomène que dans les hépatocytes HFHSD_{16w}. L'expression de la sonde calcique perturbe les MAMs.

Dans le cas de la première hypothèse, il serait nécessaire d'étendre nos mesures afin d'étudier le Ca²⁺ parallèlement dans la mitochondrie, le RE et le cytoplasme. En effet, des fortes augmentations du Ca²⁺ dans le RE (via la sonde erGAP1) et/ou le cytoplasme (Fura2-AM) pourraient être à l'origine d'une augmentation de l'entrée de Ca²⁺ dans la mitochondrie due à une stimulation de MCU ³²⁶.

Pour répondre à la seconde hypothèse, il serait important de comprendre à partir de combien de temps de diète obésogène, les mitochondries accumulent trop de dysfonctions pour supporter un stress extérieur (adénovirus et sonde calcique). Actuellement, seulement quelques études, utilisant des modèles d'obésité génétique, se sont intéressées à l'évolution des fonctions mitochondriales et ont montré l'absence de dysfonctions dans les phases précoces de la surnutrition ¹⁷⁷ mais aucune à ma connaissance ne s'est penchée sur les modèles d'obésité nutritionnelle à court terme. Comprendre à partir de quel moment les mitochondries deviennent dysfonctionnelles lors d'un régime obésogène, nous permettrait de définir une zone d'intervention dans laquelle l'expression de la sonde calcique n'altère pas la dynamique des MAMs.

➤ *Face à cette contrainte, quelle alternative est possible pour explorer les fonctions des MAMs dans une obésité chronique ?*

Actuellement, il existe 2 stratégies alternatives pour explorer les flux Ca²⁺ dans des modèles d'obésité chronique, l'utilisation :

- D'une sonde calcique mitochondriale le N33D1cpv ⁴⁶⁵
- De souris transgéniques qui surexpriment la sonde 4mtD3CPV ⁵²⁴.

Tout d'abord, Giacomello et son équipe ont mis au point la sonde N33D1cpv, similaire au 4mtD3CPV, basée sur une protéine caméléon et un signal FRET, permettant de mesurer les « hot spot » de Ca²⁺ spécifiquement à la membrane de la mitochondrie ⁴⁶⁵. Cet outil se compose de 2 fluorochromes (YFP et le CFP) reliés entre eux par le D1cpv, une protéine caméléon sensible au Ca²⁺ qui contient spécifiquement le site d'ancrage de TOM20 à l'OMM côté cytosolique (33^{ème} acide aminé de la chaîne N-Terminale de TOM20). Partant du principe que l'absorption de Ca²⁺ par la mitochondrie se fait grâce

à la création du micro-domaine riche en Ca^{2+} par le RE, cette sonde permettrait de capter ces micro-domaines de Ca^{2+} aux MAMs. L'avantage de cette sonde est son expression spécifique du côté cytosolique de la mitochondrie, ce qui nous permettrait de nous affranchir de l'expression d'une protéine dans la matrice des mitochondries. Également, celle-ci permet de détecter de façon plus directe les flux de Ca^{2+} arrivant du RE, donc les flux aux MAMs, contrairement au 4mtD3CPV qui détecte l'absorption Ca^{2+} mitochondriale. Cette sonde pourrait constituer une stratégie alternative, au 4mtD3CPV, dans les modèles d'obésité chronique. Cependant, des validations quant à la dynamique des MAMs seront nécessaires, car on ne peut pas exclure que l'ancrage à l'OMM n'induisse pas un stress équivalent au 4mtD3CPV.

Un autre moyen de s'affranchir des limites précédemment décrites serait l'utilisation de souris transgéniques, qui expriment la sonde calcique de manière constitutive, ce qui permettrait d'explorer la fonction des MAMs sans intervention invasive. Cette perspective d'exploration est, depuis peu, possible grâce à la création des toutes premières souris transgéniques, exprimant de manière inductible la sonde calcique 4mtD3CPV, dans différents tissus, grâce au système d'expression *Cre-LoxP*⁵²⁴. Le croisement de ces souris avec des souris Cre-tissu spécifique permettra ainsi d'exprimer cette sonde dans un tissu d'intérêt et d'étudier les transferts calciques à distance de cette expression. Dans notre cas, l'expression hépatique de cette sonde en croisant ces souris femelles ROSA26-mt-Cam avec des souris Cre sous promoteur hépatique, B6.FVB(129)-Tg(Alb1-cre)1Dlr/J, permettrait d'exprimer la sonde calcique dans le foie. Placer ensuite ces souris sous SD et HFHSD pendant 8 à 24 semaines nous permettrait d'étudier la fonction des MAMs dans des modèles d'obésité chronique. De même, nous pourrions alors étudier les effets du RD sur la fonction des MAMs. Cependant, il sera important de s'assurer au préalable que la même dynamique des MAMs est retrouvée dans ces modèles, puisqu'on ne peut exclure que des adaptations apparaissent suite à l'expression de la sonde 4mtD3CPV.

Toutes ces données mettent en avant l'importance du choix du modèle dans l'étude fonctionnelle des MAMs et prouvent qu'il est indispensable d'explorer conjointement la structure et la fonction des MAMs. Les avancées technologiques majeures devront nous permettre pour les explorations futures de définir plus précisément les fonctions et structures des MAMs au cours des pathologies.

- **Stratégie de la modulation des MAMs**
 - *Protéines endogènes*

L'une des stratégies récurrentes dans l'étude des MAMs est la modulation dynamique des contacts pour attester de leur rôle physiopathologique. Au fil des années, un nombre grandissant de protéines tether des MAMs⁵²⁵ a été découvert, entraînant une multiplication des investigations qui ont tenté de moduler les MAMs via l'invalidation ou la surexpression de ces protéines tether. Cependant, avec l'évolution des connaissances des MAMs, il apparaît que cette stratégie a des limites puisque l'on sait maintenant que la plupart des contacts reposent sur plusieurs points d'attaches ; ainsi invalider une protéine ne permet pas d'abolir tous les contacts⁴⁵⁶. De plus, il n'existe pas de protéines spécifiques aux

MAMs ayant strictement un rôle de tether, chaque protéine possède d'autres fonctions aux MAMs et/ou pleiotropiques ⁴⁵⁶ :

- Par exemple PDZ8 et la synaptogamine qui jouent à la fois un rôle de tether des contacts mitochondrie-RE et qui régulent aux MAMs, respectivement les flux calciques ⁴⁶¹ et le transfert de lipides ⁵²⁶.
- Aussi, Grp75 est impliqué dans le maintien du canal Ca²⁺ VDAC-IP3R aux MAMs et intervient aussi dans la régulation du potentiel de membrane de la mitochondrie, le transport intracellulaire, le stress oxydatif, la prolifération cellulaire, l'apoptose ou encore en tant que chaperonne ⁵²⁷.

Au-delà de ça, il ne faut pas oublier que ces tethers des MAMs agissent également dans d'autres contacts inter-organites (ER-membrane plasmique, ER golgi...), leur modulation peut impacter un nombre large de contacts inter-organites et modifier l'homéostasie cellulaire.

En conséquence, les variations physiologiques mesurées, lors de ces stratégies, ne seront pas nécessairement un effet direct de la modulation des MAMs, mais possiblement une conséquence de l'invalidation d'une autre fonction intracellulaire de la protéine. Dans ce sens, la modulation de p53 présent aux MAMs n'impacte pas de façon directe les MAMs, mais modifie l'état rédox des protéines régulant le Ca²⁺, modifiant ainsi les contacts mitochondrie-RE ³⁶². En accord avec ces données, la modulation de protéines endogènes aux MAMs a abouti à des phénotypes métaboliques différents, puisque l'invalidation de la CypD ³²⁹ ou de la Mfn2 ³⁷⁴ induit une IR et une stéatose hépatique, tandis qu'une invalidation d'IP3R1 ou de PACS2 induit une intolérance au glucose chez les souris obèses ²⁶⁷. Chacune de ces études module des protéines ayant de multiples fonctions cellulaires, ainsi il n'est pas possible de conclure de manière certaine sur le rôle des MAMs dans l'IR.

○ *Protéines exogènes*

Toutes ces raisons nous ont amené à repenser les stratégies classiques de modulation des MAMs pour s'affranchir des effets pléiotropiques des protéines endogènes grâce à l'utilisation de protéines non-exprimées de manière endogène : un linker artificiel et un spacer FATE1 non présent dans notre tissu d'intérêt. Ainsi, FATE1 apparait comme le seul spacer connu des MAMs, ayant comme particularité de s'exprimer uniquement dans les cellules du testicule ⁴⁶⁸, nous permettant de le surexprimer dans le foie pour moduler spécifiquement les MAMs. Notre équipe a démontré que la surexpression de FATE1 dans le muscle altérait les MAMs ce qui provoquait une IR ³⁷⁰. Dans l'article 1, nous confirmons *ex-vivo* et *in vivo* que l'expression de FATE1 permet de diminuer les interactions et les échanges de Ca²⁺ entre le RE et la mitochondrie et que cette altération des MAMs est suffisante pour induire une IR et une stéatose, prouvant le rôle causal des MAMs dans l'IR et la stéatose.

De la même façon, nous avons utilisé un linker artificiel, ayant des sites d'ancrages à la fois à la mitochondrie et au RE, nous permettant de renforcer les MAMs et ainsi de prévenir l'altération des MAMs et l'intolérance au glucose induit par 4 semaines de diète HFHSD. Qu'il s'agisse de FATE1 ou du linker, le point fort de ces stratégies est la modulation directe des MAMs par ces protéines exogènes. Cependant, FATE1, contrairement au linker, n'est pas une protéine artificielle, on ne peut donc pas exclure que celle-ci puisse posséder d'autres fonctions, pour l'instant méconnues, que celle de spacer. Aussi, la capacité de FATE1 à séparer les 2 organites, qui pour rappel est une petite protéine 21kDa, proviendrait de son interaction dans un macro-complexe, impliquant notamment la mitofilin côté mitochondrie et l'emerin du côté du RE ⁴⁶⁸. Il est également possible que les interactions de FATE1 avec ces protéines aient des conséquences indirectes sur la mitochondrie qui pourraient ensuite influencer les MAMs. En effet, la mitofilin intervient à la fois dans le maintien des crêtes mitochondriales et dans le transport de protéines dans l'espace intermembranaire ce qui peut influencer la bioénergétique mitochondriale ⁵²⁸.

La modulation des MAMs, par FATE1 et le linker (**Figure 34**), reste une stratégie qui nous a permis de prouver la causalité des MAMs dans l'IR et la stéatose hépatique, même si ces approches ne constituent pas des modèles physiologiques, puisque dans les 2 cas les MAMs se retrouvent figées. Or la modulation dynamique des MAMs est importante pour la physiologie cellulaire, puisque les MAMs régulent de nombreuses voies de signalisation. C'est pourquoi, lors du renforcement des MAMs par le linker, nous avons porté une attention toute particulière quant à la stratégie préventive ou curative à adopter. Étant donné que la modulation adénovirale dans un environnement où les mitochondries sont déjà altérées pourrait être délétère, nous avons préféré étudier l'effet préventif de la modulation des MAMs. C'est pourquoi, nous avons exprimé le linker avant de commencer la diète HFHSD. Une limite de cette approche reste néanmoins le caractère transitoire de la surexpression adénovirale, c'est pourquoi nous avons choisi d'effectuer une surnutrition de 4 semaines, qui nous a permis de maintenir l'expression du linker tout en étant suffisante pour induire une intolérance au glucose. Néanmoins, cela n'a pas été suffisant pour induire une IR systémique et hépatique et une stéatose du foie. Par conséquent, d'autres approches plus pérennes de renforcement des contacts seraient nécessaires pour étudier l'impact sur ces paramètres métaboliques. Cette stratégie nous a néanmoins permis de mettre en évidence des effets préventifs du linker sur l'intolérance au glucose induite par la diète HFHSD, ce qui contraste avec l'étude d'Arruda et al qui montre une altération du phénotype métabolique HFD_{4w} après l'expression du linker dans le foie ²⁶⁷. Ceci, pourrait s'expliquer par leur stratégie qui consiste à surexprimer le linker, durant 1 semaine, dans le foie de souris ayant déjà reçu 3 semaines de HFD.

L'aggravation du phénotype, prouve que forcer les contacts, dans un contexte déjà fragilisé par la surnutrition, peut s'avérer délétère et induire une augmentation du transfert Ca²⁺ du RE vers les mitochondries, en réponse probablement à l'activation des voies de stress cellulaire et d'apoptose.

Perspectives :

Il est maintenant essentiel d'identifier les mécanismes responsables des altérations des MAMs dans l'IR et la stéatose hépatique, pour cela de nombreuses investigations seront nécessaires :

- Existe-t-il des protéines spécifiques responsables de la diminution des MAMs dans l'obésité ?

Notre équipe a précédemment identifié une hyperactivation de PP2A dans le foie de souris obèse et montré qu'une inhibition de PP2A prévient les altérations des MAMs induites par le glucose ³²³. Aussi, la diminution des MAMs retrouvée lors des phases de transitions nutritionnelles à jeun-nourri pourrait passer par l'hyperactivation de PP2A ³²⁴. Actuellement, moduler PP2A ne constitue pas une stratégie envisageable, celui-ci étant un suppresseur de tumeur, les répercussions de sa modulation seraient trop importantes. En revanche, PP2A étant une phosphatase il serait intéressant d'identifier, les cibles de PP2A aux MAMs afin d'établir une liste de protéines candidates à la modulation des MAMs. Des analyses protéomiques de la fraction MAMs de souris nourries et à jeun, en se concentrant sur les protéines phosphorylées, constitueraient une première étape pour identifier les cibles de PP2A. Plus largement, une étude protéomique des MAMs issues de souris HFHSD et SD de courte et longue durée permettrait de déterminer les protéines dysrégulées pouvant participer aux altérations des MAMs. Un autre exemple de nouvelles protéines des MAMs pouvant jouer un rôle dans les altérations des MAMs est la cyclophiline D. En effet, celle-ci est impliquée dans les interactions et le transfert de Ca²⁺ dans le foie et le cœur ^{274,275}, son invalidation entraîne une IR et une stéatose hépatique ²⁷⁴. Néanmoins, il n'est pas possible de la cibler comme approche thérapeutique puisque celle-ci est impliquée dans l'ouverture du mPTP ⁵²⁹. De plus, nous ne savons pas comment son expression évolue aux MAMs au cours de régimes SD/HFHSD.

- Cibler les MAMs pour améliorer l'homéostasie glucidique ?

L'hyperglycémie chronique, comprenant l'hyperglycémie à jeun et post prandiale, constitue un facteur de risque aux complications du DT2. Les patients DT2 et IR, peuvent mettre jusqu'à 6h après un repas pour revenir à une normoglycémie, à raison de 3 repas par jour, les patients passent environ 50% de leur temps en hyperglycémie post-prandiale ⁵³⁰. Les MAMs étant des senseurs nutritionnels, il serait intéressant d'intervenir durant ces périodes critiques. Nous pourrions envisager des interventions « aiguës » avec une induction des MAMs durant les phases post-prandiales dans l'optique soit de prévenir les excursions glycémiques soit d'accélérer le retour à une normoglycémie des patients IR. Pour cela, il serait nécessaire d'identifier des nutriments et/ou des molécules pharmacologiques capables de moduler les MAMs. L'utilisation du biosenseur, SPLICS, constituerait une force pour un repérage

rapide de l'induction des MAMs face à différents nutriments/molécules candidats. C'est dans cette optique que notre équipe collabore avec plusieurs industries agroalimentaires et/ou pharmaceutiques, afin d'identifier des composés végétaux et/ou nouvelles molécules capables d'augmenter les MAMs en période post-prandiale afin d'améliorer l'homéostasie glucidique des patients diabétiques.

Bibliographie

1. Ciaccio O, Castaing D. Le foie et les voies biliaires: Anatomie. <https://www.centre-hepatobiliaire.org/maladies-foie/anatomie-foie.html>. Published 2015.
2. Fontana J, Šajdíková M, Maďa P. Gastrointestinal tract- Part 4 Liver and Biotransformation of xenobiotics. 2014. <http://fblt.cz/en/skripta/ix-travici-soustava/5-jatra-a-biotransformace-xenobiotik/>.
3. Le foie et les voies biliaires. Université Pierre et Marie Curie. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/foie.html>.
4. Jungermann K, Sasse D. Heterogeneity of liver parenchymal cells. *Trends Biochem Sci*. 1978;3(3):198-202. doi:10.1016/S0968-0004(78)91764-4
5. Lamers WH, Hilberts A, Furt E, et al. Hepatic enzymic zonation: A re-evaluation of the concept of the liver acinus. *Acta Morphol Neerl Scand*. 1989;27(3-4):217.
6. Gebhardt R. Metabolic zonation of the liver: Regulation and implications for liver function. *Pharmacol Ther*. 1992;53(3):275-354. doi:10.1016/0163-7258(92)90055-5
7. Jungermann K. Metabolic zonation of liver parenchyma: Significance for the regulation of glycogen metabolism, gluconeogenesis, and glycolysis. *Diabetes Metab Rev*. 1987;3(1):269-293. doi:10.1002/dmr.5610030112
8. Hijmans BS, Grefhorst A, Oosterveer MH, Groen AK. Zonation of glucose and fatty acid metabolism in the liver: Mechanism and metabolic consequences. *Biochimie*. 2014;96(1):121-129. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.007
9. Birchmeier W. Orchestrating Wnt signalling for metabolic liver zonation. *Nat Publ Gr*. 2016. doi:10.1016/j.bbali.2016.01.016
10. Planas-Paz L, Orsini V, Boulter L, et al. The RSPO-LGR4/5-ZNRF3/RNF43 module controls liver zonation and size. *Nat Cell Biol*. 2016;18(5):467-479. doi:10.1038/ncb3337
11. Droin C, Kholtei J El, Bahar Halpern K, et al. Space-time logic of liver gene expression at sublobular scale. *Nat Metab*. 2021;3(1):43-58. doi:10.1038/s42255-020-00323-1
12. Annunziato S, Tchorz JS. Liver zonation—a journey through space and time. *Nat Metab*. 2021;3(1):7-8. doi:10.1038/s42255-020-00333-z
13. Hecketsweiler B, Hecketsweiler P. *Voyage En Biochimie*. n°3. (ELSEVIER, ed.). <https://www.elsevier-masson.fr/voyage-en-biochimie-9782842995478.html>. Accessed February 8, 2021.
14. Grant DM. Detoxification Pathways in the Liver. *J Inherit Metab Disease*. 1991;14:421-430.
15. Poupon R, Chignard N, Rosmorduc O, Barbu V, Housset C. La fonction biliaire et sa régulation. *Medecine/Sciences*. 2004;20(12):1096-1099. doi:10.1051/medsci/200420121096
16. Besnard P, Landrier J-F, Grober J, Niot I. Le gène codant pour l'I-BABP est-il impliqué dans l'homéostasie du cholestérol? *medecine/sciences*. 2004;20(1):73-77. doi:10.1051/medsci/200420173
17. Nutrition C des E de. Les oligo-éléments. *Univ Numérique Fraconphone des Sci la Santé du Sport*. 2001;(397):22-23. doi:10.1016/b978-2-294-76846-0.00012-8
18. Tomkins GM, Chaikoff IL. CHOLESTEROL SYNTHESIS BY LIVER. *J Biol Chem*. 1952;196(2):569-573. doi:10.1016/S0021-9258(19)52391-2
19. Reinke H, Asher G. Circadian Clock Control of Liver Metabolic Functions. *Gastroenterology*. 2016;150(3):574-580. doi:10.1053/j.gastro.2015.11.043
20. Röder P V., Wu B, Liu Y, Han W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp Mol Med*.

- 2016;48(3):e219-e219. doi:10.1038/emm.2016.6
21. Fédération Internationale du Diabète. *L'atlas Du Diabète de La FID: 9ème Édition.*; 2019.
 22. Thorens B. GLUT2, glucose sensing and glucose homeostasis. *Diabetologia*. 2015;58(2):221-232. doi:10.1007/s00125-014-3451-1
 23. Rorsman P, Renström E. Insulin granule dynamics in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46(8):1029-1045. doi:10.1007/s00125-003-1153-1
 24. Tubbs E. Importance of intracellular Mitochondria-Associated endoplasmic reticulum Membranes (MAM) in insulin-resistance. 2014.
 25. Petersen MC, Shulman GI. Mechanisms of Insulin Action and Insulin Resistance. *Physiol Rev*. 2018;98(4):2133-2223. doi:10.1152/physrev.00063.2017
 26. Baron AD, Brechtel G, Wallace P, Edelman S V. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am J Physiol Metab*. 1988;255(6):E769-E774. doi:10.1152/ajpendo.1988.255.6.E769
 27. Perley MJ, Kipnis DM. Plasma Insulin Responses to Oral and Intravenous Glucose: Studies in Normal and Diabetic Subjects*. *J Clin Invest*. 1967;46(12):1954-1962. doi:10.1172/JCI105685
 28. Rambold AS, Pearce EL. Mitochondrial Dynamics at the Interface of Immune Cell Metabolism and Function. *Trends Immunol*. 2018;39(1):6-18. doi:10.1016/j.it.2017.08.006
 29. Kamer KJ, Mootha VK. The molecular era of the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(9):545-553. doi:10.1038/nrm4039
 30. De Pinto V, Guarino F, Guarnera A, et al. Characterization of human VDAC isoforms: A peculiar function for VDAC3? *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2010;1797(6-7):1268-1275. doi:10.1016/j.bbabi.2010.01.031
 31. Stier A, Romestaing C, Schull Q, et al. How to measure mitochondrial function in birds using red blood cells: a case study in the king penguin and perspectives in ecology and evolution. Davey M, ed. *Methods Ecol Evol*. 2017;8(10):1172-1182. doi:10.1111/2041-210X.12724
 32. Prasun P, Ginevic I, Oishi K. Mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease and alcohol related liver disease. *Transl Gastroenterol Hepatol*. 2021;6:4-4. doi:10.21037/tgh-20-125
 33. Seki E, Brenner DA, Karin M. A Liver Full of JNK: Signaling in Regulation of Cell Function and Disease Pathogenesis, and Clinical Approaches. *Gastroenterology*. 2012;143(2):307-320. doi:10.1053/j.gastro.2012.06.004
 34. Frank M, Duvezin-Caubet S, Koob S, et al. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2012;1823(12):2297-2310. doi:10.1016/j.bbamcr.2012.08.007
 35. Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J Cell Biol*. 2016;212(4):379-387. doi:10.1083/jcb.201511036
 36. Gomes LC, Benedetto G Di, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol*. 2011;13(5):589-598. doi:10.1038/ncb2220
 37. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science (80-)*. 2011;334(6054):358-362. doi:10.1126/science.1207385
 38. Smirnova E, Griparic L, Shurland D-L, van der Blik AM. Dynamin-related Protein Drp1 Is

- Required for Mitochondrial Division in Mammalian Cells. Pollard TD, ed. *Mol Biol Cell*. 2001;12(8):2245-2256. doi:10.1091/mbc.12.8.2245
39. Arasaki K, Shimizu H, Mogari H, et al. A Role for the ancient SNARE syntaxin 17 in regulating mitochondrial division. *Dev Cell*. 2015;32(3):304-317. doi:10.1016/j.devcel.2014.12.011
 40. Lee JE, Westrate LM, Wu H, Page C, Voeltz GK. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature*. 2016;540(7631):139-143. doi:10.1038/nature20555
 41. Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. Newmeyer DD, ed. *Mol Biol Cell*. 2013;24(5):659-667. doi:10.1091/mbc.e12-10-0721
 42. Otera H, Wang C, Cleland MM, et al. Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol*. 2010;191(6):1141-1158. doi:10.1083/jcb.201007152
 43. Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT. MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep*. 2011;12:565-573. doi:10.1038/embor.2011.54
 44. Zhao J, Liu T, Jin S, et al. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J*. 2011;30(14):2762-2778. doi:10.1038/emboj.2011.198
 45. Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The Mitochondrial Protein hFis1 Regulates Mitochondrial Fission in Mammalian Cells through an Interaction with the Dynamin-Like Protein DLP1. *Mol Cell Biol*. 2003;23(15):5409-5420. doi:10.1128/mcb.23.15.5409-5420.2003
 46. Huang P, Galloway CA, Yoon Y. Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PLoS One*. 2011;6(5). doi:10.1371/journal.pone.0020655
 47. Santel A, Fuller MT. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. 2001;114(5):867-874.
 48. Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*. 2003;160(2):189-200. doi:10.1083/jcb.200211046
 49. Mattie S, Riemer J, Wideman JG, McBride HM. A new mitofusin topology places the redox-regulated C terminus in the mitochondrial intermembrane space. *J Cell Biol*. 2018;217(2):507-515. doi:10.1083/jcb.201611194
 50. Anand R, Wai T, Baker MJ, et al. The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J Cell Biol*. 2014;204(6):919-929. doi:10.1083/jcb.201308006
 51. Ban T, Ishihara T, Kohno H, et al. Molecular basis of selective mitochondrial fusion by heterotypic action between OPA1 and cardiolipin. *Nat Cell Biol*. 2017;19(7):856-863. doi:10.1038/ncb3560
 52. Vance JE. Phospholipid Synthesis and Transport in Mammalian Cells. *Traffic*. 2015;16(1):1-18. doi:10.1111/tra.12230
 53. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: Overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*. 2018;62(3):341-360. doi:10.1042/EBC20170104
 54. Fransson Å, Ruusala A, Aspenström P. The atypical Rho GTPases Miro-1 and Miro-2 have essential roles in mitochondrial trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;344(2):500-510. doi:10.1016/j.bbrc.2006.03.163

55. Saotome M, Safiulina D, Szabadkai G, et al. Bidirectional Ca²⁺-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(52):20728-20733. doi:10.1073/pnas.0808953105
56. Rizzuto R, De Stefani D, Raffaello A, Mammucari C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012;13(9):566-578. doi:10.1038/nrm3412
57. Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS. Ca²⁺ activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F₀/F₁-ATPase. *Am J Physiol Physiol*. 2000;278(2):C423-C435. doi:10.1152/ajpcell.2000.278.2.C423
58. Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, et al. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science (80-)*. 1998;280(5370):1763-1766. doi:10.1126/science.280.5370.1763
59. Mallilankaraman K, Cárdenas C, Doonan PJ, et al. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca²⁺ uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol*. 2012;14(12):1336-1343. doi:10.1038/ncb2622
60. Csordás G, Golenár T, Seifert EL, et al. MICU1 Controls Both the Threshold and Cooperative Activation of the Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter. *Cell Metab*. 2013;17(6):976-987. doi:10.1016/j.cmet.2013.04.020
61. Boehning D, Patterson RL, Sedaghat L, Glebova NO, Kurosaki T, Snyder SH. Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) trisphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat Cell Biol*. 2003;5(12):1051-1061. doi:10.1038/ncb1063
62. Alberts B, Johnson A, Lewis J. The endoplasmic reticulum. In: *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Science. 4th editio. ; 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26841/>.
63. Walter P, Ron D. The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science (80-)*. 2011;334(6059):1081-1086. doi:10.1126/science.1209038
64. Hetz C, Papa FR. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol Cell*. 2018;69(2):169-181. doi:10.1016/j.molcel.2017.06.017
65. Bagur R, Hajnóczky G. Intracellular Ca²⁺ Sensing: Its Role in Calcium Homeostasis and Signaling. *Mol Cell*. 2017;66(6):780-788. doi:10.1016/j.molcel.2017.05.028
66. Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol*. 2006;175(6):901-911. doi:10.1083/jcb.200608073
67. Peng T-I, Jou M-J. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1201(1):183-188. doi:10.1111/j.1749-6632.2010.05634.x
68. Fosse-Edorh Sandrine, Mandereau-Bruno Laurence PC. Le poids du diabète en France en 2016. Synthèse épidémiologique. *Santé publique Fr*. 2018;8. doi:Fosse-Edorh S., Mandereau-Bruno L., Piffaretti C. Le poids du diabète en France en 2016. Synthèse épidémiologique. Saint-Maurice : Santé publique France ; 2018. 8 p.
69. Diabète de type 1 | Inserm - La science pour la santé. INSERM. [https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-1#:~:text=Le diabète de type 1 \(DT1\) est causé par le,patient%2C et à les éliminer.](https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-1#:~:text=Le diabète de type 1 (DT1) est causé par le,patient%2C et à les éliminer.) Published 2019.
70. Diabète de type 2 | Inserm - La science pour la santé. INSERM. <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/diabete-type-2>. Accessed April 5, 2021.
71. Agarwal MM, Dhatt GS, Shah SM. Gestational diabetes mellitus: Simplifying the international

- association of diabetes and pregnancy diagnostic algorithm using fasting plasma glucose. *Diabetes Care*. 2010;33(9):2018-2020. doi:10.2337/dc10-0572
72. Rigaud D. 100 idées pour accompagner votre enfant diabétique. In: *TomPousse*. ; 2016. <https://tompousse.fr/une-histoire-du-diabete/>.
 73. Wu B. Diabetes: Past treatments, new discoveries. MedicalNewsToday. <https://www.medicalnewstoday.com/articles/317484#early-science>. Published 2019.
 74. Origine du mot “diabète.” Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales. <https://www.cnrtl.fr/etymologie/diabete>.
 75. Bernard C. *Leçons Sur Le Diabète et La Glycogénèse Animale*.; 1877.
 76. Sinding C. Découverte de l’insuline. Encyclopaedia Universalis. <https://www.universalis.fr/encyclopedie/decouverte-de-l-insuline/>.
 77. Brogard JM, Blickle JF. Histoire des contributions rhénanes et alsaciennes à la compréhension du diabète. *Hist Sci Med*. 2004;38(4):421-432.
 78. Origine du mot “Insuline.” Centre National de Ressources Textuelles et Lexicales. <https://www.cnrtl.fr/etymologie/insuline>.
 79. Das AK, Shah S. History of Diabetes: From Ants to Analogs. *J Assoc Phys India*. 2011;59:6-7. doi:10.1353/thr.2013.0063
 80. Les chiffres du Diabète en France. Fédération Française des Diabétiques. <https://www.federationdesdiabetiques.org/information/diabete/chiffres-france>.
 81. Silva Rosa SC, Nayak N, Caymo AM, Gordon JW. Mechanisms of muscle insulin resistance and the cross-talk with liver and adipose tissue. *Physiol Rep*. 2020;8(19):1-24. doi:10.14814/phy2.14607
 82. Québec E de professionnels de la santé de D. Les urgences Hyperglycémiques. <https://www.diabete.qc.ca/fr/vivre-avec-le-diabete/soins-et-traitements/hypoglycemie-et-hyperglycemie/les-urgences-hyperglycemiques/>. Published 2014.
 83. National Cardiovascular Intelligence Network. *NHS Diabetes Prevention Programme (NHS DPP) Non-Diabetic Hyperglycaemia Produced by: National Cardiovascular Intelligence Network (NCVIN)*.; 2015. www.gov.uk/pheTwitter:@PHE_ukFacebook:www.facebook.com/PublicHealthEngland. Accessed April 15, 2020.
 84. Richter B, Hemmingsen B, Metzendorf MI, Takwoingi Y. Development of type 2 diabetes mellitus in people with intermediate hyperglycaemia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2018;2018(10). doi:10.1002/14651858.CD012661.pub2
 85. Tabák AG, Brunner EJ, Kivimäki M, et al. Diabetes 1 Prediabetes: a high-risk state for diabetes development. *Lancet*. 2012;379:2279-2290. doi:10.1016/S0140
 86. Heianza Y, Hara S, Arase Y, et al. HbA1c 5·7-6·4 and impaired fasting plasma glucose for diagnosis of prediabetes and risk of progression to diabetes in Japan (TOPICS 3): A longitudinal cohort study. *Lancet*. 2011;378(9786):147-155. doi:10.1016/S0140-6736(11)60472-8
 87. Corona E, Chen R, Sikora M, et al. Analysis of the Genetic Basis of Disease in the Context of Worldwide Human Relationships and Migration. *PLoS Genet*. 2013;9(5):1003447. doi:10.1371/journal.pgen.1003447
 88. Kodama K, Tojjar D, Yamada S, Toda K, Patel CJ, Butte AJ. Ethnic Differences in the Relationship Between Insulin Sensitivity and Insulin Response A systematic review and meta-analysis. 2013. doi:10.2337/dc12-1235

89. Mayer-Davis EJ, Lawrence JM, Dabelea D, et al. Incidence trends of type 1 and type 2 diabetes among youths, 2002-2012. *N Engl J Med.* 2017;376(15):1419-1429. doi:10.1056/NEJMoa1610187
90. Gariani K, Philippe J, Jornayvaz FR. Diabète et stéatose hépatique non alcoolique : DIABETE. *Rev Med Suisse.* 2012;8(344):1211-1214.
91. Petit JM. Stéatose et diabète de type 2. *Mced.* 2016;80:37-42. www.mced.fr.
92. Wright LAC, Hirsch IB. Metrics beyond hemoglobin A1C in diabetes management: Time in range, hypoglycemia, and other parameters. *Diabetes Technol Ther.* 2017;19(S2):S16-S26. doi:10.1089/dia.2017.0029
93. Hirsch IB. Glycemic variability and diabetes complications: Does it matter? Of course it does! *Diabetes Care.* 2015;38(8):1610-1614. doi:10.2337/dc14-2898
94. Monnier L, Colette C, Owens D. La variabilité glycémique : l' évaluation de son impact passe par des index de mesure et des recommandations simples. *Médecine des Mal Métaboliques.* 2018;12(3):268-278. doi:10.1016/S1957-2557(18)30058-0
95. Metformine : substance active à effet thérapeutique - VIDAL. <https://www.vidal.fr/medicaments/substances/metformine-2339.html>. Accessed April 5, 2021.
96. Sulfamides hypoglycémiants. <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/sulfamides-hypoglycemiants>. Accessed April 5, 2021.
97. Inhibiteurs des alpha-glucosidases. <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/inhibiteurs-des-alpha-glucosidases>. Accessed April 5, 2021.
98. Incrétinomimétiques. <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/incretinomimetiques>. Accessed April 5, 2021.
99. Inhibiteurs des SGLT2. <https://pharmacomedicale.org/medicaments/par-specialites/item/inhibiteurs-des-sglt2>. Accessed April 5, 2021.
100. Galgani JE, Fernández-Verdejo R. Pathophysiological role of metabolic flexibility on metabolic health. *Obes Rev.* 2020;(June):1-14. doi:10.1111/obr.13131
101. Smith RL, Soeters MR, Wüst RCI, Houtkooper RH. Metabolic Flexibility as an Adaptation to Energy Resources and Requirements in Health and Disease. *Endocr Rev.* 2018;39(4):489-517. doi:10.1210/er.2017-00211
102. Samra JS, Clark ML, Humphreys SM, Macdonald IA, Frayn KN. Regulation of lipid metabolism in adipose tissue during early starvation. *Am J Physiol Metab.* 1996;271(3):E541-E546. doi:10.1152/ajpendo.1996.271.3.E541
103. Galgani JE, Gómez C, Mizgier ML, et al. Assessment of the Role of Metabolic Determinants on the Relationship between Insulin Sensitivity and Secretion. Johannsen NM, ed. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168352. doi:10.1371/journal.pone.0168352
104. Kelley DE, Goodpaster B, Wing RR, Simoneau J-A. Skeletal muscle fatty acid metabolism in association with insulin resistance, obesity, and weight loss. *Am J Physiol Metab.* 1999;277(6):E1130-E1141. doi:10.1152/ajpendo.1999.277.6.E1130
105. Prior SJ, Ryan AS, Stevenson TG, Goldberg AP. Metabolic inflexibility during submaximal aerobic exercise is associated with glucose intolerance in obese older adults. *Obesity.* 2014;22(2):451-457. doi:10.1002/oby.20609
106. Lee S, Rivera-Vega M, Alsayed HMAA, Boesch C, Libman I. Metabolic inflexibility and insulin resistance in obese adolescents with non-alcoholic fatty liver disease. *Pediatr Diabetes.* 2015;16(3):211-218. doi:10.1111/pedi.12141

107. Ukropcova B, Sereda O, de Jonge L, et al. Family History of Diabetes Links Impaired Substrate Switching and Reduced Mitochondrial Content in Skeletal Muscle. *Diabetes*. 2007;56(3):720-727. doi:10.2337/db06-0521
108. Muoio DM. Metabolic inflexibility: When mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell*. 2014;159(6):1253-1262. doi:10.1016/j.cell.2014.11.034
109. Flamment M, Hajduch E, Ferré P, Foufelle F. New insights into ER stress-induced insulin resistance. *Trends Endocrinol Metab*. 2012;23(8):381-390. doi:10.1016/j.tem.2012.06.003
110. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2009;296(4):581-591. doi:10.1152/ajpendo.90437.2008
111. Solinas G, Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. *Mol Metab*. 2017;6(2):174-184. doi:10.1016/j.molmet.2016.12.001
112. Boden G, She P, Mozzoli M, et al. *Free Fatty Acids Produce Insulin Resistance and Activate the Proinflammatory Nuclear Factor- κ B Pathway in Rat Liver*. Vol 54.; 2005.
113. DeFronzo RA, Ferrannini E, Simonson DC. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: Contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. *Metabolism*. 1989;38(4):387-395. doi:10.1016/0026-0495(89)90129-7
114. Otero YF, Stafford JM, McGuinness OP. Pathway-selective Insulin Resistance and Metabolic Disease: The Importance of Nutrient Flux. *J Biol Chem*. 2014;289(30):20462-20469. doi:10.1074/jbc.R114.576355
115. ter Horst KW, Vatner DF, Zhang D, et al. Hepatic Insulin Resistance Is Not Pathway Selective in Humans With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Diabetes Care*. 2021;44(2):489-498. doi:10.2337/dc20-1644
116. Karin M, Gallagher E. From JNK to pay dirt: Jun kinases, their biochemistry, physiology and clinical importance. *IUBMB Life*. 2005;57(4-5):283-295. doi:10.1080/15216540500097111
117. Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*. 2001;410(6824):37-40. doi:10.1038/35065000
118. Solinas G, Karin M. JNK1 and IKK β : molecular links between obesity and metabolic dysfunction. *FASEB J*. 2010;24(8):2596-2611. doi:10.1096/fj.09-151340
119. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev*. 1993;7(11):2135-2148. doi:10.1101/gad.7.11.2135
120. Aguirre V, Uchida T, Yenush L, Davis R, White MF. The c-Jun NH2-terminal Kinase Promotes Insulin Resistance during Association with Insulin Receptor Substrate-1 and Phosphorylation of Ser307. *J Biol Chem*. 2000;275(12):9047-9054. doi:10.1074/jbc.275.12.9047
121. Aguirre V, Werner ED, Giraud J, Lee YH, Shoelson SE, White MF. Phosphorylation of Ser307 in Insulin Receptor Substrate-1 Blocks Interactions with the Insulin Receptor and Inhibits Insulin Action. *J Biol Chem*. 2002;277(2):1531-1537. doi:10.1074/jbc.M101521200
122. Yuan M. Reversal of Obesity- and Diet-Induced Insulin Resistance with Salicylates or Targeted Disruption of Ikkbeta. *Science (80-)*. 2001;293(5535):1673-1677. doi:10.1126/science.1061620
123. Zhenghui G, Simon C, Zemin Y. Lipoprotein metabolism in nonalcoholic fatty liver disease. *J Biomed Res*. 2013;27(1):1. doi:10.7555/JBR.27.20120077
124. Portillo-Sanchez P, Bril F, Maximos M, et al. High Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Patients With Type 2 Diabetes Mellitus and Normal Plasma Aminotransferase Levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(6):2231-2238. doi:10.1210/jc.2015-1966

125. Boutayeb A, Mehdad S, Mokhtar N, Aguentaou H. Obesity and Diabetes. In: Boutayeb A, Mehdad S, Mokhtar N, Aguentaou H, eds. *Social Determinants, Health Equity And Human Development*. Vol 23. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS; 2012:50-55. doi:10.2174/978160805066610901010050
126. Huang S, Rutkowsky JM, Snodgrass RG, et al. Saturated fatty acids activate TLR-mediated proinflammatory signaling pathways. *J Lipid Res*. 2012;53(9):2002-2013. doi:10.1194/jlr.D029546
127. Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 Deficiency Selectively Protects Against Obesity Induced by Diets High in Saturated Fat. *Obesity*. 2008;16(6):1248-1255. doi:10.1038/oby.2008.210
128. Weisberg SP, McCann D, Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest*. 2003;112(12):1796-1808. doi:10.1172/JCI200319246
129. Hotamisligil G, Shargill N, Spiegelman B. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science (80-)*. 1993;259(5091):87-91. doi:10.1126/science.7678183
130. Popko K, Gorska E, Stelmazczyk-Emmel A, et al. Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res*. 2010;15(S2):120. doi:10.1186/2047-783X-15-S2-120
131. Burska AN, Sakthiswary R, Sattar N. Effects of Tumour Necrosis Factor Antagonists on Insulin Sensitivity/Resistance in Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nurmohamed M, ed. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128889. doi:10.1371/journal.pone.0128889
132. Larsen CM, Faulenbach M, Vaag A, et al. Interleukin-1–Receptor Antagonist in Type 2 Diabetes Mellitus. *N Engl J Med*. 2007;356(15):1517-1526. doi:10.1056/NEJMoa065213
133. Herder C, Dalmas E, Böni-Schnetzler M, Donath MY. The IL-1 Pathway in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Complications. *Trends Endocrinol Metab*. 2015;26(10):551-563. doi:10.1016/j.tem.2015.08.001
134. Donath MY. Targeting inflammation in the treatment of type 2 diabetes: time to start. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(6):465-476. doi:10.1038/nrd4275
135. Hotamisligil GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*. 2017;542(7640):177-185. doi:10.1038/nature21363
136. Nonogaki K, Fuller GM, Fuentes NL, et al. Interleukin-6 stimulates hepatic triglyceride secretion in rats. *Endocrinology*. 1995;136(5):2143-2149. doi:10.1210/endo.136.5.7720663
137. Loria P, Lonardo A, Anania F. Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatol Res*. 2013;43:51-64. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01031.x
138. Zheng T, Wang Q, Dong Y, et al. High Glucose-Aggravated Hepatic Insulin Resistance: Role of the NLRP3 Inflammasome in Kupffer Cells. *Obesity*. 2020;28(7):1270-1282. doi:10.1002/oby.22821
139. Tencerova M, Aouadi M, Vangala P, et al. Activated Kupffer cells inhibit insulin sensitivity in obese mice. *FASEB J*. 2015;29(7):2959-2969. doi:10.1096/fj.15-270496
140. Lanthier N. Targeting Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: Why and how? *World J Hepatol*. 2015;7(19):2184. doi:10.4254/wjh.v7.i19.2184
141. Leite NC, Salles GF, Araujo ALE, Villela-Nogueira CA, Cardoso CRL. Prevalence and associated factors of non-alcoholic fatty liver disease in patients with type-2 diabetes mellitus. *Liver Int*. 2009;29(1):113-119. doi:10.1111/j.1478-3231.2008.01718.x

142. Targher G, Bertolini L, Padovani R, et al. Prevalence of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Its Association With Cardiovascular Disease Among Type 2 Diabetic Patients. *Diabetes Care*. 2007;30(5):1212-1218. doi:10.2337/dc06-2247
143. Petersen MC, Madiraju AK, Gassaway BM, et al. Insulin receptor Thr1160 phosphorylation mediates lipid-induced hepatic insulin resistance. *J Clin Invest*. 2016;126(11):4361-4371. doi:10.1172/JCI86013
144. ter Horst KW, Gilijamse PW, Versteeg RI, et al. Hepatic Diacylglycerol-Associated Protein Kinase C ϵ Translocation Links Hepatic Steatosis to Hepatic Insulin Resistance in Humans. *Cell Rep*. 2017;19(10):1997-2004. doi:10.1016/j.celrep.2017.05.035
145. Régnier M, Polizzi A, Guillou H, Loiseau N. Sphingolipid metabolism in non-alcoholic fatty liver diseases. *Biochimie*. 2019;159:9-22. doi:10.1016/j.biochi.2018.07.021
146. Petersen MC, Shulman GI. Roles of Diacylglycerols and Ceramides in Hepatic Insulin Resistance. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(7):649-665. doi:10.1016/j.tips.2017.04.004
147. Lam TKT, Van de Werve G, Giacca A. Free fatty acids increase basal hepatic glucose production and induce hepatic insulin resistance at different sites. *Am J Physiol Metab*. 2003;284(2):E281-E290. doi:10.1152/ajpendo.00332.2002
148. Magnan C. Lipotoxicité et insulino-résistance. *Nutr Clin Métabolisme*. 2006;20(2):108-113. doi:10.1016/j.nupar.2006.04.006
149. Perry RJ, Camporez JPG, Kursawe R, et al. Hepatic acetyl CoA links adipose tissue inflammation to hepatic insulin resistance and type 2 diabetes. *Cell*. 2015;160(4):745-758. doi:10.1016/j.cell.2015.01.012
150. Berg AH, Combs TP, Du X, Brownlee M, Scherer PE. The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*. 2001;7(8):947-953. doi:10.1038/90992
151. Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, et al. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*. 2002;8(11):1288-1295. doi:10.1038/nm788
152. Özcan U, Cao Q, Yilmaz E, et al. Endoplasmic reticulum stress links obesity, insulin action, and type 2 diabetes. *Science (80-)*. 2004;306(5695):457-461. doi:10.1126/science.1103160
153. Zhang X, Zhang G, Zhang H, Karin M, Bai H, Cai D. Hypothalamic IKK β /NF- κ B and ER Stress Link Overnutrition to Energy Imbalance and Obesity. *Cell*. 2008;135(1):61-73. doi:10.1016/j.cell.2008.07.043
154. Yang L, Li P, Fu S, Calay ES, Hotamisligil GS. Defective Hepatic Autophagy in Obesity Promotes ER Stress and Causes Insulin Resistance. *Cell Metab*. 2010;11(6):467-478. doi:10.1016/j.cmet.2010.04.005
155. Özcan U, Yilmaz E, Özcan L, et al. Chemical Chaperones Reduce ER Stress and Restore Glucose Homeostasis in a Mouse Model of Type 2 Diabetes. *Science (80-)*. 2006;313(5790):1137-1140. doi:10.1126/science.1128294
156. Li H, Min Q, Ouyang C, et al. AMPK activation prevents excess nutrient-induced hepatic lipid accumulation by inhibiting mTORC1 signaling and endoplasmic reticulum stress response. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2014;1842(9):1844-1854. doi:10.1016/j.bbadis.2014.07.002
157. Kammoun HL, Chabanon H, Hainault I, et al. GRP78 expression inhibits insulin and ER stress-induced SREBP-1c activation and reduces hepatic steatosis in mice. *J Clin Invest*. 2009;119(5):1201-1215. doi:10.1172/JCI37007
158. Ozcan L, Wong CCL, Li G, et al. Calcium Signaling through CaMKII Regulates Hepatic Glucose

- Production in Fasting and Obesity. *Cell Metab.* 2012;15(5):739-751. doi:10.1016/j.cmet.2012.03.002
159. Jang YJ, Ryu HJ, Choi YO, Kim C, Leem CH, Park CS. Improvement of insulin sensitivity by chelation of intracellular Ca²⁺ in high-fat fed rats. *Metabolism.* 2002;51(7):912-918. doi:10.1053/meta.2002.33351
160. Ozcan L, Cristina de Souza J, Harari AA, Backs J, Olson EN, Tabas I. Activation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase II in Obesity Mediates Suppression of Hepatic Insulin Signaling. *Cell Metab.* 2013;18(6):803-815. doi:10.1016/j.cmet.2013.10.011
161. Anderson KA, Lin F, Ribar TJ, et al. Deletion of CaMKK2 from the Liver Lowers Blood Glucose and Improves Whole-Body Glucose Tolerance in the Mouse. *Mol Endocrinol.* 2012;26(2):281-291. doi:10.1210/me.2011-1299
162. Park SW, Zhou Y, Lee J, Lee J, Ozcan U. Sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 2b is a major regulator of endoplasmic reticulum stress and glucose homeostasis in obesity. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(45):19320-19325. doi:10.1073/pnas.1012044107
163. Fu S, Yang L, Li P, et al. Aberrant lipid metabolism disrupts calcium homeostasis causing liver endoplasmic reticulum stress in obesity. *Nature.* 2011;473(7348):528-531. doi:10.1038/nature09968
164. Wang Y, Li G, Goode J, et al. Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor regulates hepatic gluconeogenesis in fasting and diabetes. *Nature.* 2012;485(7396):128-132. doi:10.1038/nature10988
165. Lei L, Zhu Y, Gao W, et al. Alpha-lipoic acid attenuates endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance by improving mitochondrial function in HepG2 cells. *Cell Signal.* 2016;28(10):1441-1450. doi:10.1016/j.cellsig.2016.06.024
166. Muñoz JP, Ivanova S, Sánchez-Wandelmer J, et al. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J.* 2013;32(17):2348-2361. doi:10.1038/emboj.2013.168
167. Wang CH, Wei YH. Role of mitochondrial dysfunction and dysregulation of Ca²⁺ homeostasis in the pathophysiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *J Biomed Sci.* 2017;24(1):70. doi:10.1186/s12929-017-0375-3
168. Sangwung P, Petersen KF, Shulman GI, Knowles JW. Mitochondrial Dysfunction, Insulin Resistance, and Potential Genetic Implications. *Endocrinology.* 2020;161(4):1-10. doi:10.1210/endo/bqaa017
169. Mogensen M, Sahlin K, Fernstrom M, et al. Mitochondrial Respiration Is Decreased in Skeletal Muscle of Patients With Type 2 Diabetes. *Diabetes.* 2007;56(6):1592-1599. doi:10.2337/db06-0981
170. Mercader JM, Puiggros M, Segrè A V, Planet E, Sorianoello E. Identification of Novel Type 2 Diabetes Candidate Genes Involved in the Crosstalk between the Mitochondrial and the Insulin Signaling Systems. *PLoS Genet.* 2012;8(12):1003046. doi:10.1371/journal.pgen.1003046
171. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired Mitochondrial Activity in the Insulin-Resistant Offspring of Patients with Type 2 Diabetes. *New Engl J Med.* 2004;7:664-671. doi:10.1056/NEJMoa031314
172. Cheng Z, Guo S, Copps K, et al. Foxo1 integrates insulin signaling with mitochondrial function in the liver. *Nat Med.* 2009;15(11):1307-1311. doi:10.1038/nm.2049
173. Misu H, Takamura T, Matsuzawa N, et al. Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes.

Diabetologia. 2007;50(2):268-277. doi:10.1007/s00125-006-0489-8

174. Koliaki C, Roden M. Hepatic energy metabolism in human diabetes mellitus, obesity and non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;379(1-2):35-42. doi:10.1016/j.mce.2013.06.002
175. Martin SD, Morrison S, Konstantopoulos N, McGee SL. Mitochondrial dysfunction has divergent, cell type-dependent effects on insulin action. *Mol Metab*. 2014;3(4):408-418. doi:10.1016/j.molmet.2014.02.001
176. Satapati S, Sunny NE, Kucejova B, et al. Elevated TCA cycle function in the pathology of diet-induced hepatic insulin resistance and fatty liver. *J Lipid Res*. 2012;53(6):1080-1092. doi:10.1194/jlr.M023382
177. Garcia J, Decker CW, Sanchez SJ, Ouk JM, Siu KM, Han D. Obesity and steatosis promotes mitochondrial remodeling that enhances respiratory capacity in the liver of ob/ob mice. *FEBS Lett*. 2018;592(6):916-927. doi:10.1002/1873-3468.13005
178. Finocchietto P V., Holod S, Barreyro F, et al. Defective Leptin–AMP-Dependent Kinase Pathway Induces Nitric Oxide Release and Contributes to Mitochondrial Dysfunction and Obesity in ob/ob Mice. *Antioxid Redox Signal*. 2011;15(9):2395-2406. doi:10.1089/ars.2010.3857
179. García-Ruiz I, Rodríguez-Juan C, Díaz-Sanjuán T, Martínez MÁ, Muñoz-Yagüe T, Solís-Herruzo JA. Effects of rosiglitazone on the liver histology and mitochondrial function in ob/ob mice. *Hepatology*. 2007;46(2):414-423. doi:10.1002/hep.21687
180. Grundy SM, Mok HYI, Zech L, Steinberg D, Berman M. Transport of Very Low Density Lipoprotein Triglycerides in Varying Degrees of Obesity and Hypertriglyceridemia. *J Clin Invest*. 1979;63(6):1274-1283. doi:10.1172/JCI109422
181. Sunny NE, Parks EJ, Browning JD, Burgess SC. Excessive Hepatic Mitochondrial TCA Cycle and Gluconeogenesis in Humans with Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab*. 2011;14(6):804-810. doi:10.1016/j.cmet.2011.11.004
182. Szendroedi J, Chmelik M, Schmid AI, et al. Abnormal hepatic energy homeostasis in type 2 diabetes. *Hepatology*. 2009;50(4):1079-1086. doi:10.1002/hep.23093
183. Alves TC, Befroy DE, Kibbey RG, et al. Regulation of hepatic fat and glucose oxidation in rats with lipid-induced hepatic insulin resistance. *Hepatology*. 2011;53(4):1175-1181. doi:10.1002/hep.24170
184. Go Y, Jeong JY, Jeoung NH, et al. Inhibition of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 2 Protects Against Hepatic Steatosis Through Modulation of Tricarboxylic Acid Cycle Anaplerosis and Ketogenesis. *Diabetes*. 2016;65(10):2876-2887. doi:10.2337/db16-0223
185. Carabelli J, Burgueño AL, Rosselli MS, et al. High fat diet-induced liver steatosis promotes an increase in liver mitochondrial biogenesis in response to hypoxia. *J Cell Mol Med*. 2011;15(6):1329-1338. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01128.x
186. Koliaki C, Szendroedi J, Kaul K, et al. Adaptation of Hepatic Mitochondrial Function in Humans with Non-Alcoholic Fatty Liver Is Lost in Steatohepatitis. *Cell Metab*. 2015;21(5):739-746. doi:10.1016/j.cmet.2015.04.004
187. Wang L, Liu X, Nie J, et al. ALCAT1 controls mitochondrial etiology of fatty liver diseases, linking defective mitophagy to steatosis. *Hepatology*. 2015;61(2):486-496. doi:10.1002/hep.27420
188. Orellana-Gavalda JM, Herrero L, Malandrino MI, et al. Molecular Therapy for Obesity and Diabetes Based on a Long-Term Increase in Hepatic Fatty-Acid Oxidation ` , 1. *Hepatology*.

- 2011:821-832. doi:10.1002/hep.24140
189. Monsénégo J, Mansouri A, Akkaoui M, et al. Enhancing liver mitochondrial fatty acid oxidation capacity in obese mice improves insulin sensitivity independently of hepatic steatosis. *J Hepatol.* 2012;56. doi:10.1016/j.jhep.2011.10.008
 190. Arruda AP, Hotamisligil GS. Calcium Homeostasis and Organelle Function in the Pathogenesis of Obesity and Diabetes. *Cell Metab.* 2015;22(3):381-397. doi:10.1016/j.cmet.2015.06.010
 191. Liu JC, Liu J, Holmström KM, et al. MICU1 Serves as a Molecular Gatekeeper to Prevent In Vivo Mitochondrial Calcium Overload. *Cell Rep.* 2016;16(6):1561-1573. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.011
 192. Antony AN, Paillard M, Moffat C, et al. MICU1 regulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake dictates survival and tissue regeneration. *Nat Commun.* 2016;7(1):10955. doi:10.1038/ncomms10955
 193. Egnatchik RA, Leamy AK, Jacobson DA, Shiota M, Young JD. ER calcium release promotes mitochondrial dysfunction and hepatic cell lipotoxicity in response to palmitate overload. *Mol Metab.* 2014;3(5):544-553. doi:10.1016/j.molmet.2014.05.004
 194. Lee J, Cho H-K, Kwon YH. Palmitate induces insulin resistance without significant intracellular triglyceride accumulation in HepG2 cells. *Metabolism.* 2010;59(7):927-934. doi:10.1016/j.metabol.2009.10.012
 195. Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, Tan MH. Spectrum of Liver Disease in Type 2 Diabetes and Management of Patients With Diabetes and Liver Disease. *Diabetes Care.* 2007;30(3):734-743. doi:10.2337/dc06-1539
 196. Kumashiro N, Erion DM, Zhang D, et al. Cellular mechanism of insulin resistance in nonalcoholic fatty liver disease. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(39):16381-16385. doi:10.1073/pnas.1113359108
 197. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, et al. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am J Med.* 1999;107(5):450-455. doi:10.1016/S0002-9343(99)00271-5
 198. Fabbrini E, Magkos F, Mohammed BS, et al. Intrahepatic fat, not visceral fat, is linked with metabolic complications of obesity. *Proc Natl Acad Sci.* 2009;106(36):15430-15435. doi:10.1073/pnas.0904944106
 199. Magkos F, Fabbrini E, Mohammed BS, Patterson BW, Klein S. Increased Whole-Body Adiposity Without a Concomitant Increase in Liver Fat is Not Associated With Augmented Metabolic Dysfunction. *Obesity.* 2010;18(8):1510-1515. doi:10.1038/oby.2010.90
 200. Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ. Sources of fatty acids stored in liver and secreted via lipoproteins in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2005;115(5):1343-1351. doi:10.1172/JCI23621
 201. Koliaki C, Roden M. Alterations of Mitochondrial Function and Insulin Sensitivity in Human Obesity and Diabetes Mellitus. *Annu Rev Nutr.* 2016;36(1):337-367. doi:10.1146/annurev-nutr-071715-050656
 202. Miele L, Grieco A, Armuzzi A, et al. Hepatic mitochondrial beta-oxidation in patients with nonalcoholic steatohepatitis assessed by ¹³C-octanoate breath test. *Am J Gastroenterol.* 2003;98(10):2335-2336. doi:10.1111/j.1572-0241.2003.07725.x
 203. Croci I, Byrne NM, Choquette S, et al. Whole-body substrate metabolism is associated with disease severity in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *Gut.* 2013;62(11):1625-1633. doi:10.1136/gutjnl-2012-302789
 204. Leclercq IA, Farrell GC, Field J, Bell DR, Gonzalez FJ, Robertson GR. CYP2E1 and CYP4A as

- microsomal catalysts of lipid peroxides in murine nonalcoholic steatohepatitis. *J Clin Invest.* 2000;105(8):1067-1075. doi:10.1172/JCI8814
205. Wang K, Tan W, Liu X, et al. New insight and potential therapy for NAFLD: CYP2E1 and flavonoids. *Biomed Pharmacother.* 2021;137(January):111326. doi:10.1016/j.biopha.2021.111326
 206. Weltman MD, Farrell GC, Hall P, Ingelman-Sundberg M, Liddle C. Hepatic cytochrome P450 2E1 is increased in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 1998;27(1):128-133. doi:10.1002/hep.510270121
 207. Crespo J. Gene expression of tumor necrosis factor [alpha] and TNF-receptors, p55 and p75, in nonalcoholic steatohepatitis patients. *Hepatology.* 2001;34(6):1158-1163. doi:10.1053/jhep.2001.29628
 208. Feldstein AE. Novel insights into the pathophysiology of nonalcoholic fatty liver disease. *Semin Liver Dis.* 2010;30(4):391-401. doi:10.1055/s-0030-1267539
 209. Sookoian S, Flichman D, Scian R, et al. Mitochondrial genome architecture in non-alcoholic fatty liver disease. *J Pathol.* 2016;240(4):437-449. doi:10.1002/path.4803
 210. Pirola CJ, Garaycoechea M, Flichman D, Castaño GO, Sookoian S. Liver mitochondrial DNA damage and genetic variability of Cytochrome b – a key component of the respirasome – drive the severity of fatty liver disease. *J Intern Med.* 2021;289(1):84-96. doi:10.1111/joim.13147
 211. Ma X, McKeen T, Zhang J, Ding W-X. Role and Mechanisms of Mitophagy in Liver Diseases. *Cells.* 2020;8. doi:10.3390/cells9040837
 212. Jones JG. Hepatic glucose and lipid metabolism. *Diabetologia.* 2016;59(6):1098-1103. doi:10.1007/s00125-016-3940-5
 213. McCommis KS, Finck BN. Treating Hepatic Steatosis and Fibrosis by Modulating Mitochondrial Pyruvate Metabolism. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2019;7(2):275-284. doi:10.1016/j.jcmgh.2018.09.017
 214. Tan M, Mosaoa R, Graham GT, et al. Inhibition of the mitochondrial citrate carrier, Slc25a1, reverts steatosis, glucose intolerance, and inflammation in preclinical models of NAFLD/NASH. *Cell Death Differ.* 2020;27(7):2143-2157. doi:10.1038/s41418-020-0491-6
 215. Kim CW, Addy C, Kusunoki J, et al. Acetyl CoA Carboxylase Inhibition Reduces Hepatic Steatosis but Elevates Plasma Triglycerides in Mice and Humans: A Bedside to Bench Investigation. *Cell Metab.* 2017;26(2):394-406.e6. doi:10.1016/j.cmet.2017.07.009
 216. Chakravarthy M V., Pan Z, Zhu Y, et al. “New” hepatic fat activates PPAR α to maintain glucose, lipid, and cholesterol homeostasis. *Cell Metab.* 2005;1(5):309-322. doi:10.1016/j.cmet.2005.04.002
 217. Honma M, Sawada S, Ueno Y, et al. Selective insulin resistance with differential expressions of IRS-1 and IRS-2 in human NAFLD livers. *Int J Obes.* 2018;42(9):1544-1555. doi:10.1038/s41366-018-0062-9
 218. Kohjima M, Higuchi N, Kato M, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2008;21(4):507-511. doi:10.3892/ijmm.21.4.507
 219. Kubota N, Kubota T, Kajiwara E, et al. Differential hepatic distribution of insulin receptor substrates causes selective insulin resistance in diabetes and obesity. *Nat Commun.* 2016;7:1-16. doi:10.1038/ncomms12977
 220. Smith GI, Shankaran M, Yoshino M, et al. Insulin resistance drives hepatic de novo lipogenesis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Clin Invest.* 2020;130(3):1453-1460.

doi:10.1172/JCI134165

221. Min H, Kapoor A, Fuchs M, et al. Increased Hepatic Synthesis and Dysregulation of Cholesterol Metabolism Is Associated with the Severity of Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Cell Metab.* 2012;15(5):665-674. doi:10.1016/j.cmet.2012.04.004
222. Caballero F, Fernández A, De Lacy AM, Fernández-Checa JC, Caballería J, García-Ruiz C. Enhanced free cholesterol, SREBP-2 and StAR expression in human NASH. *J Hepatol.* 2009;50(4):789-796. doi:10.1016/j.jhep.2008.12.016
223. Yasutake K, Nakamuta M, Shima Y, et al. Nutritional investigation of non-obese patients with non-alcoholic fatty liver disease: The significance of dietary cholesterol. *Scand J Gastroenterol.* 2009;44(4):471-477. doi:10.1080/00365520802588133
224. van der Veen JN, Kennelly JP, Wan S, Vance JE, Vance DE, Jacobs RL. The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2017;1859(9):1558-1572. doi:10.1016/j.bbamem.2017.04.006
225. Jacobs RL, Devlin C, Tabas I, Vance DE. Targeted Deletion of Hepatic CTP:phosphocholine Cytidylyltransferase α in Mice Decreases Plasma High Density and Very Low Density Lipoproteins. *J Biol Chem.* 2004;279(45):47402-47410. doi:10.1074/jbc.M404027200
226. Hernández-Alvarez MI, Sebastián D, Vives S, et al. Deficient Endoplasmic Reticulum-Mitochondrial Phosphatidylserine Transfer Causes Liver Disease. *Cell.* 2019;177(4):881-895.e17. doi:10.1016/j.cell.2019.04.010
227. Steiner G, Haynes FJ, Yoshino G, Vranic M. Hyperinsulinemia and in vivo very-low-density lipoprotein-triglyceride kinetics. *Am J Physiol Metab.* 1984;246(2):E187-E192. doi:10.1152/ajpendo.1984.246.2.E187
228. Poulsen MK, Nellemann B, Stødkilde-Jørgensen H, Pedersen SB, Grønbaek H, Nielsen S. Impaired Insulin Suppression of VLDL-Triglyceride Kinetics in Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(4):1637-1646. doi:10.1210/jc.2015-3476
229. Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism (supplementary data). *Nature.* 2009;458(7242):1131-1135. doi:10.1038/nature07976
230. Singh R, Kaushik S, Wang Y, et al. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* 2009;458(7242):1131-1135. doi:10.1038/nature07976
231. Carotti S, Aquilano K, Zalfa F, et al. Lipophagy Impairment Is Associated With Disease Progression in NAFLD. *Front Physiol.* 2020;11(July):1-12. doi:10.3389/fphys.2020.00850
232. Kolodziejczyk AA, Zheng D, Shibolet O, Elinav E. The role of the microbiome in NAFLD and NASH. *EMBO Mol Med.* 2019;11(2):1-13. doi:10.15252/emmm.201809302
233. Zhu L, Baker SS, Gill C, et al. Characterization of gut microbiomes in nonalcoholic steatohepatitis (NASH) patients: A connection between endogenous alcohol and NASH. *Hepatology.* 2013;57(2):601-609. doi:10.1002/hep.26093
234. Albhaisi SAM, Bajaj JS. The Influence of the Microbiome on NAFLD and NASH. *Clin Liver Dis.* 2021;17(1):15-18. doi:10.1002/cld.1010
235. Le Roy T, Llopis M, Lepage P, et al. Intestinal microbiota determines development of non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Gut.* 2013;62(12):1787-1794. doi:10.1136/gutjnl-2012-303816
236. Rabot S, Membrez M, Bruneau A, et al. Germ-free C57BL/6J mice are resistant to high-fat-diet-induced insulin resistance and have altered cholesterol metabolism. *FASEB J.* 2010;24(12):4948-4959. doi:10.1096/fj.10-164921

237. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809. doi:10.1038/nri2653
238. Luther J, Garber JJ, Khalili H, et al. Hepatic Injury in Nonalcoholic Steatohepatitis Contributes to Altered Intestinal Permeability. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):222-232.e2. doi:10.1016/j.jcmgh.2015.01.001
239. Miele L, Valenza V, La Torre G, et al. Increased intestinal permeability and tight junction alterations in nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2009;49(6):1877-1887. doi:10.1002/hep.22848
240. Harte AL, da Silva NF, Creely SJ, et al. Elevated endotoxin levels in non-alcoholic fatty liver disease. *J Inflamm*. 2010;7(1):15. doi:10.1186/1476-9255-7-15
241. Petrick HL, Foley KP, Zlitni S, et al. Adipose Tissue Inflammation Is Directly Linked to Obesity-Induced Insulin Resistance, while Gut Dysbiosis and Mitochondrial Dysfunction Are Not Required. *Function*. 2020;1(2):1-15. doi:10.1093/function/zqaa013
242. Kimura I, Ozawa K, Inoue D, et al. The gut microbiota suppresses insulin-mediated fat accumulation via the short-chain fatty acid receptor GPR43. *Nat Commun*. 2013;4(1):1829. doi:10.1038/ncomms2852
243. Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43. *Nature*. 2009;461(7268):1282-1286. doi:10.1038/nature08530
244. De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Goncalves D, et al. Microbiota-Generated Metabolites Promote Metabolic Benefits via Gut-Brain Neural Circuits. *Cell*. 2014;156(1-2):84-96. doi:10.1016/j.cell.2013.12.016
245. Blumberg H, McCollum E V. THE PREVENTION BY CHOLINE OF LIVER CIRRHOSIS IN RATS ON HIGH FAT, LOW PROTEIN DIETS. *Science (80-)*. 1941;93(2425):598-599. doi:10.1126/science.93.2425.598
246. Bernhard W, Haguenu F, Gautier A, Oberling C. La structure submicroscopique des elements basophiles cytoplasmiques dans le foie, le pancreas et les glandes salivaires - Etude de coupes ultrafines au microscope électronique. *Zeitschrift für Zellforsch und Mikroskopische Anat*. 1952;37(3):281-300. doi:10.1007/BF00343816
247. Vance JE. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 1990;265(13):7248-7256.
248. Morré DJ, Merritt WD, Lembi CA. Connections between mitochondria and endoplasmic reticulum in rat liver and onion stem. *Protoplasma*. 1971;73(1):43-49. doi:10.1007/BF01286410
249. Bracker CE, Grove SN. Continuity between Cytoplasmic Endomembranes and Outer Mitochondrial Membranes in Fungi include close physical association, contact, thread-like continuity, and direct luminal continuity. Membranes are smooth surfaced in. *Protoplasma*. 1971;73:15-34.
250. Hertig AT, Adams EC. Studies on the human oocyte and its follicle. I. Ultrastructural and histochemical observations on the primordial follicle stage. *J Cell Biol*. 1967;34(2):647-675. doi:10.1083/jcb.34.2.647
251. Vance JE. Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 1991;266(1):89-97.
252. Biden TJ, Wollheim CB, Schlegel W. Inositol 1,4,5-trisphosphate and intracellular Ca²⁺ homeostasis in clonal pituitary cells (GH3). Translocation of Ca²⁺ into mitochondria from a

- functionally discrete portion of the nonmitochondrial store. *J Biol Chem.* 1986;261(16):7223-7229.
253. Herrera-Cruz MS, Simmen T. Over six decades of discovery and characterization of the architecture at mitochondria-associated membranes (MAMs). *Springer.* 2017;997:49-67. doi:10.1007/978-981-10-4567-7
 254. Moltedo O, Remondelli P, Amodio G. The mitochondria–endoplasmic reticulum contacts and their critical role in aging and age-associated diseases. *Front Cell Dev Biol.* 2019;7(August):1-13. doi:10.3389/fcell.2019.00172
 255. Gordaliza-Alaguero I, Cantó C, Zorzano A. Metabolic implications of organelle–mitochondria communication. *EMBO Rep.* 2019;20(9):1-27. doi:10.15252/embr.201947928
 256. Kornmann B, Currie E, Collins SR, et al. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science (80-).* 2009;325(5939):477-481. doi:10.1126/science.1175088
 257. Giacomello M, Pellegrini L. The coming of age of the mitochondria–ER contact: a matter of thickness. *Cell Death Differ.* 2016;23(10):1417-1427. doi:10.1038/cdd.2016.52
 258. Poston CN, Krishnan SC, Bazemore-Walker CR. In-depth proteomic analysis of mammalian mitochondria-associated membranes (MAM). *J Proteomics.* 2013;79:219-230. doi:10.1016/j.jprot.2012.12.018
 259. Zhang A, Williamson CD, Wong DS, et al. Quantitative proteomic analyses of human cytomegalovirus-induced restructuring of endoplasmic reticulum-mitochondrial contacts at late times of infection. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(10). doi:10.1074/mcp.M111.009936
 260. Sala-Vila A, Navarro-Lérida I, Sánchez-Alvarez M, et al. Interplay between hepatic mitochondria-Associated membranes, lipid metabolism and caveolin-1 in mice. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep27351
 261. Horner SM, Wilkins C, Badil S, Iskarpatyoti J, Gale M. Proteomic analysis of mitochondrial-associated ER membranes (MAM) during RNA virus infection reveals dynamic changes in protein and organelle trafficking. *PLoS One.* 2015;10(3):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0117963
 262. Wang X, Wen Y, Dong J, Cao C, Yuan S. Systematic In-Depth Proteomic Analysis of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes in Mouse and Human Testes. *Proteomics.* 2018;18(14):1-12. doi:10.1002/pmic.201700478
 263. Liu Z, Du X, Deng J, et al. The interactions between mitochondria and sarcoplasmic reticulum and the proteome characterization of mitochondrion-associated membrane from rabbit skeletal muscle. *Proteomics.* 2015;15(15):2701-2704. doi:10.1002/pmic.201400493
 264. Westermann B. The mitochondria-plasma membrane contact site. *Curr Opin Cell Biol.* 2015;35:1-6. doi:10.1016/j.ceb.2015.03.001
 265. Köttgen M, Benzing T, Simmen T, et al. Trafficking of TRPP2 by PACS proteins represents a novel mechanism of ion channel regulation. *EMBO J.* 2005;24(4):705-716. doi:10.1038/sj.emboj.7600566
 266. Simmen T, Aslan JE, Blagoveshchenskaya AD, et al. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* 2005;24(4):717-729. doi:10.1038/sj.emboj.7600559
 267. Arruda AP, Pers BM, Parlakgöl G, Güney E, Inouye K, Hotamisligil GS. Chronic enrichment of hepatic endoplasmic reticulum-mitochondria contact leads to mitochondrial dysfunction in obesity. *Nat Med.* 2014;20(12):1427-1435. doi:10.1038/nm.3735
 268. Aslan JE, You H, Williamson DM, et al. Akt and 14-3-3 Control a PACS-2 Homeostatic Switch

- that Integrates Membrane Traffic with TRAIL-Induced Apoptosis. *Mol Cell*. 2009;34(4):497-509. doi:10.1016/j.molcel.2009.04.011
269. Myhill N, Lynes EM, Nanji JA, et al. The subcellular distribution of calnexin is mediated by PACS-2. Linstedt A, ed. *Mol Biol Cell*. 2008;19(7):2777-2788. doi:10.1091/mbc.E07-10-0995
270. Ishihara N, Eura Y, Mihara K. Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci*. 2004;117(26):6535-6546. doi:10.1242/jcs.01565
271. de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 2008;456(7222):605-610. doi:10.1038/nature07534
272. Naon D, Zaninello M, Giacomello M, et al. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113(40):11249-11254. doi:10.1073/pnas.1606786113
273. McLelland G-L, Goiran T, Yi W, et al. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *Elife*. 2018;7. doi:10.7554/eLife.32866
274. Tubbs E, Theurey P, Vial G, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) integrity is required for insulin signaling and is implicated in hepatic insulin resistance. *Diabetes*. 2014;63(10):3279-3294. doi:10.2337/db13-1751
275. Paillard M, Tubbs E, Thiebaut PA, et al. Depressing mitochondria-reticulum interactions protects cardiomyocytes from lethal hypoxia-reoxygenation injury. *Circulation*. 2013;128(14):1555-1565. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001225
276. Ainbinder A, Boncompagni S, Protasi F, Dirksen RT. Role of Mitofusin-2 in mitochondrial localization and calcium uptake in skeletal muscle. *Cell Calcium*. 2015;57(1):14-24. doi:10.1016/j.ceca.2014.11.002
277. Filadi R, Greotti E, Turacchio G, Luini A, Pozzan T, Pizzo P. Mitofusin 2 ablation increases endoplasmic reticulum-mitochondria coupling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(17):E2174-E2181. doi:10.1073/pnas.1504880112
278. Leal NS, Schreiner B, Pinho CM, et al. Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid β -peptide production. *J Cell Mol Med*. 2016;20(9):1686-1695. doi:10.1111/jcmm.12863
279. Cosson P, Marchetti A, Ravazzola M, Orci L. Mitofusin-2 Independent Juxtaposition of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria: An Ultrastructural Study. *PLoS One*. 2012;7(9):46293. doi:10.1371/journal.pone.0046293
280. Cieri D, Vicario M, Giacomello M, et al. SPLICS: A split green fluorescent protein-based contact site sensor for narrow and wide heterotypic organelle juxtaposition. *Cell Death Differ*. 2018;25(6):1131-1145. doi:10.1038/s41418-017-0033-z
281. Basso V, Marchesan E, Peggion C, et al. Regulation of ER-mitochondria contacts by Parkin via Mfn2. *Pharmacol Res*. 2018;138(March):43-56. doi:10.1016/j.phrs.2018.09.006
282. De vos KJ, Mórotz GM, Stoica R, et al. VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum Mol Genet*. 2012;21(6):1299-1311. doi:10.1093/hmg/ddr559
283. Stoica R, De Vos KJ, Paillusson S, et al. ER-mitochondria associations are regulated by the VAPB-PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat Commun*. 2014;5(1):3996. doi:10.1038/ncomms4996
284. Gómez-Suaga P, Pérez-Nievas BG, Glennon EB, et al. The VAPB-PTPIP51 endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins are present in neuronal synapses and regulate synaptic

- activity. *Acta Neuropathol Commun.* 2019;7(1):35. doi:10.1186/s40478-019-0688-4
285. Qiao X, Jia S, Ye J, et al. PTPIP51 regulates mouse cardiac ischemia/reperfusion through mediating the mitochondria-SR junction. *Sci Rep.* 2017;7. doi:10.1038/srep45379
 286. Gomez-Suaga P, Paillusson S, Stoica R, Noble W, Hanger DP, Miller CCJ. The ER-Mitochondria Tethering Complex VAPB-PTPIP51 Regulates Autophagy. *Curr Biol.* 2017;27(3):371-385. doi:10.1016/j.cub.2016.12.038
 287. Di Mattia T, Wilhelm LP, Ikhlef S, et al. Identification of MOSPD2, a novel scaffold for endoplasmic reticulum membrane contact sites. *EMBO Rep.* 2018;19(7). doi:10.15252/embr.201745453
 288. Bartok A, Weaver D, Golenár T, et al. IP3 receptor isoforms differently regulate ER-mitochondrial contacts and local calcium transfer. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11646-3
 289. Sakakura C, Hagiwara A, Fukuda K, et al. Possible involvement of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 3 (IP3R3) in the peritoneal dissemination of gastric cancers. *Anticancer Res.* 2003;23(5A):3691-3697. <https://europepmc.org/article/med/14666665>. Accessed April 8, 2021.
 290. Ramos-Franco J, Fill M, Mignery GA. Isoform-specific function of single inositol 1,4,5-trisphosphate receptor channels. *Biophys J.* 1998;75(2):834-839. doi:10.1016/S0006-3495(98)77572-1
 291. Jungermann K, Keitzmann T. Zonation of Parenchymal and Nonparenchymal Metabolism in Liver. *Annu Rev Nutr.* 1996;16(1):179-203. doi:10.1146/annurev.nu.16.070196.001143
 292. Nicou A, Serrière V, Hilly M, et al. Remodelling of calcium signalling during liver regeneration in the rat. *J Hepatol.* 2007;46(2):247-256. doi:10.1016/j.jhep.2006.08.014
 293. Messina A, Reina S, Guarino F, De Pinto V. VDAC isoforms in mammals. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2012;1818(6):1466-1476. doi:10.1016/j.bbamem.2011.10.005
 294. Yamamoto T, Yamada A, Watanabe M, et al. VDAC1, having a shorter N-terminus than VDAC2 but showing the same migration in an SDS-polyacrylamide gel, is the predominant form expressed in mitochondria of various tissues. *J Proteome Res.* 2006;5(12):3336-3344. doi:10.1021/pr060291w
 295. Honrath B, Metz I, Bendridi N, Rieusset J, Culmsee C, Dolga AM. Glucose-regulated protein 75 determines ER-mitochondrial coupling and sensitivity to oxidative stress in neuronal cells. *Cell Death Discov.* 2017;3(1). doi:10.1038/cddiscovery.2017.76
 296. Ferioli CN, Gustavo Oliveira A, Guerra MT, et al. Hepatic inositol 1,4,5 trisphosphate receptor type 1 mediates fatty liver. *Hepatol Commun.* 2017;1(1):23-35. doi:10.1002/hep4.1012
 297. Csordás G, Renken C, Várnai P, et al. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol.* 2006;174(7):915-921. doi:10.1083/jcb.200604016
 298. Thoudam T, Ha CM, Leem J, et al. PDK4 augments ER-mitochondria contact to dampen skeletal muscle insulin signaling during obesity. *Diabetes.* 2019;68(3):571-586. doi:10.2337/db18-0363
 299. D'Eletto M, Rossin F, Occhigrossi L, et al. Transglutaminase Type 2 Regulates ER-Mitochondria Contact Sites by Interacting with GRP75. *Cell Rep.* 2018;25(13):3573-3581.e4. doi:10.1016/j.celrep.2018.11.094
 300. Sood A, Jeyaraju DV, Prudent J, et al. A Mitofusin-2-dependent inactivating cleavage of Opal links changes in mitochondria cristae and ER contacts in the postprandial liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(45):16017-16022. doi:10.1073/pnas.1408061111

301. Cui Z, Vance JE, Chen MH, Voelker DR, Vance DE. Cloning and expression of a novel phosphatidylethanolamine N- methyltransferase. A specific biochemical and cytological marker for a unique membrane fraction in rat liver. *J Biol Chem*. 1993;268(22):16655-16663.
302. Stone SJ, Vance JE. Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J Biol Chem*. 2000;275(44):34534-34540. doi:10.1074/jbc.M002865200
303. Vance JE. MAM (mitochondria-associated membranes) in mammalian cells: Lipids and beyond. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. 2014;1841(4):595-609. doi:10.1016/j.bbalip.2013.11.014
304. Ardail D, Lerme F, Louisots P. *Involvement of Contact Sites in Phosphatidylserine Import into Liver Mitochondria**. Vol 266.; 1991.
305. Voelker DR. *Phosphatidylserine Functions as the Major Precursor of Phosphatidylethanolamine in Cultured BHK-21 Cells (Membranes/Phospholipids/Metabolism/Mitochondria)*. Vol 81.; 1984.
306. Maeda K, Anand K, Chiapparino A, et al. Interactome map uncovers phosphatidylserine transport by oxysterol-binding proteins. 2013. doi:10.1038/nature12430
307. Bobrovnikova-Marjon E, Pytel D, Riese MJ, et al. PERK Utilizes Intrinsic Lipid Kinase Activity To Generate Phosphatidic Acid, Mediate Akt Activation, and Promote Adipocyte Differentiation. *Mol Cell Biol*. 2012;32(12):2268-2278. doi:10.1128/mcb.00063-12
308. Lewin TM, Kim JH, Granger DA, Vance JE, Coleman RA. Acyl-CoA Synthetase Isoforms 1, 4, and 5 are Present in Different Subcellular Membranes in Rat Liver and Can Be Inhibited Independently. *J Biol Chem*. 2001;276(27):24674-24679. doi:10.1074/jbc.M102036200
309. Stone SJ, Levin MC, Zhou P, Han J, Walther TC, Farese R V. The endoplasmic reticulum enzyme DGAT2 is found in mitochondria-associated membranes and has a mitochondrial targeting signal that promotes its association with mitochondria. *J Biol Chem*. 2009;284(8):5352-5361. doi:10.1074/jbc.M805768200
310. Rusiñol AE, Cui Z, Chen MH, Vance JE. A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J Biol Chem*. 1994;269(44):27494-27502.
311. Gjorgjieva M, Mithieux G, Rajas F, et al. The role of cholesterol in the association of endoplasmic reticulum membranes with mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;417(1):635-639. doi:10.1016/j.bbrc.2011.12.022
312. Prasad M, Kaur J, Pawlak KJ, Bose M, Whittal RM, Bose HS. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) regulates steroidogenic activity via steroidogenic acute regulatory protein (StAR)-voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2) interaction. *J Biol Chem*. 2015;290(5):2604-2616. doi:10.1074/jbc.M114.605808
313. Issop L, Fan J, Lee S, et al. Mitochondria-Associated membrane formation in hormone-stimulated leydig cell steroidogenesis: Role of ATAD3. *Endocrinology*. 2015;156(1):334-345. doi:10.1210/en.2014-1503
314. Desai R, Frazier AE, Durigon R, et al. ATAD3 gene cluster deletions cause cerebellar dysfunction associated with altered mitochondrial DNA and cholesterol metabolism. *Brain*. 2017;140(6):1595-1610. doi:10.1093/brain/awx094
315. Wu BX, Rajagopalan V, Roddy PL, Clarke CJ, Hannun YA. Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J Biol Chem*. 2010;285(23):17993-18002. doi:10.1074/jbc.M110.102988

316. Sano R, Annunziata I, Patterson A, et al. GM1-Ganglioside Accumulation at the Mitochondria-Associated ER Membranes Links ER Stress to Ca²⁺-Dependent Mitochondrial Apoptosis. *Mol Cell*. 2009;36(3):500-511. doi:10.1016/j.molcel.2009.10.021
317. Lewis SC, Uchiyama LF, Nunnari J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with Mitochondrial division in human cells. *Science (80-)*. 2016;353(6296):aaf5549. doi:10.1126/science.aaf5549
318. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science (80-)*. 2013;339(6118):464-467. doi:10.1126/science.1228360
319. Chakrabarti R, Ji WK, Stan R V., Sanz J de J, Ryan TA, Higgs HN. INF2-mediated actin polymerization at the ER stimulates mitochondrial calcium uptake, inner membrane constriction, and division. *J Cell Biol*. 2018;217(1):251-268. doi:10.1083/jcb.201709111
320. Adachi Y, Kato T, Yamada T, et al. Drp1 Tubulates the ER in a GTPase-Independent Manner. *Mol Cell*. 2020;80:1-12. doi:10.1016/j.molcel.2020.10.013
321. Kameoka S, Adachi Y, Okamoto K, Iijima M, Sesaki H. Phosphatidic Acid and Cardiolipin Coordinate Mitochondrial Dynamics. *Trends Cell Biol*. 2018;28(1):67-76. doi:10.1016/j.tcb.2017.08.011
322. Cho B, Cho HM, Jo Y, et al. Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nat Commun*. 2017;8(1). doi:10.1038/ncomms15754
323. Theurey P, Tubbs E, Vial G, et al. Mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes allow adaptation of mitochondrial metabolism to glucose availability in the liver. *J Mol Cell Biol*. 2016;8(2):129-143. doi:10.1093/jmcb/mjw004
324. Theurey P, Rieusset J. Mitochondria-Associated Membranes Response to Nutrient Availability and Role in Metabolic Diseases. *Trends Endocrinol Metab*. 2017;28(1):32-45. doi:10.1016/j.tem.2016.09.002
325. Rizzuto R, Pozzan T. Microdomains of intracellular Ca²⁺: Molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev*. 2006;86(1):369-408. doi:10.1152/physrev.00004.2005
326. Csordás G, Várnai P, Golenár T, et al. Imaging Interorganelle Contacts and Local Calcium Dynamics at the ER-Mitochondrial Interface. *Mol Cell*. 2010;39(1):121-132. doi:10.1016/j.molcel.2010.06.029
327. Filadi R, Leal NS, Schreiner B, et al. TOM70 Sustains Cell Bioenergetics by Promoting IP3R3-Mediated ER to Mitochondria Ca²⁺ Transfer. *Curr Biol*. 2018;28(3):369-382.e6. doi:10.1016/j.cub.2017.12.047
328. Hayashi T, Su TP. Sigma-1 Receptor Chaperones at the ER- Mitochondrion Interface Regulate Ca²⁺ Signaling and Cell Survival. *Cell*. 2007;131(3):596-610. doi:10.1016/j.cell.2007.08.036
329. Rieusset J, Fauconnier J, Paillard M, et al. Disruption of calcium transfer from ER to mitochondria links alterations of mitochondria-associated ER membrane integrity to hepatic insulin resistance. *Diabetologia*. 2016;59(3):614-623. doi:10.1007/s00125-015-3829-8
330. Giorgi C, Ito K, Lin H-K, et al. PML Regulates Apoptosis at Endoplasmic Reticulum by Modulating Calcium Release. *Science (80-)*. 2010;330(6008):1247-1251. doi:10.1126/science.1189157
331. Booth DM, Enyedi B, Geiszt M, Várnai P, Hajnóczky G. Redox Nanodomains Are Induced by and Control Calcium Signaling at the ER-Mitochondrial Interface. *Mol Cell*. 2016;63(2):240-248. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.040
332. Bánsághi S, Golenár T, Madesh M, et al. Isoform- and Species-specific Control of Inositol 1,4,5-

- Trisphosphate (IP₃) Receptors by Reactive Oxygen Species. *J Biol Chem.* 2014;289(12):8170-8181. doi:10.1074/jbc.M113.504159
333. Tagaya M, Simmen T. *Organelle Contact Sites*. Vol 997. (Tagaya M, Simmen T, eds.). Singapore: Springer Nature Singapore; 2017. doi:10.1007/978-981-10-4567-7
334. Dong Z, Shanmughapriya S, Tomar D, et al. Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. *Mol Cell.* 2017;65(6):1014-1028.e7. doi:10.1016/j.molcel.2017.01.032
335. Baumgartner HK, Gerasimenko J V., Thorne C, et al. Calcium elevation in mitochondria is the main Ca²⁺ requirement for mitochondrial permeability transition pore (mPTP) opening. *J Biol Chem.* 2009;284(31):20796-20803. doi:10.1074/jbc.M109.025353
336. Cárdenas C, Miller RA, Smith I, et al. Essential Regulation of Cell Bioenergetics by Constitutive InsP₃ Receptor Ca²⁺ Transfer to Mitochondria. *Cell.* 2010;142(2):270-283. doi:10.1016/j.cell.2010.06.007
337. Bravo R, Parra V, Gatica D, et al. Endoplasmic Reticulum and the Unfolded Protein Response. Dynamics and Metabolic Integration. In: *International Review of Cell and Molecular Biology*. Vol 301. Elsevier Inc.; 2013:215-290. doi:10.1016/B978-0-12-407704-1.00005-1
338. Bravo R, Vicencio JM, Parra V, et al. Increased ER-mitochondrial coupling promotes mitochondrial respiration and bioenergetics during early phases of ER stress. *J Cell Sci.* 2011;124(14):2511. doi:10.1242/jcs.095455
339. Ngoh GA, Papanicolaou KN, Walsh K. Loss of mitofusin 2 promotes endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem.* 2012;287(24):20321-20332. doi:10.1074/jbc.M112.359174
340. Verfaillie T, Rubio N, Garg AD, et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* 2012;19(11):1880-1891. doi:10.1038/cdd.2012.74
341. Lebeau J, Saunders JM, Moraes VWR, et al. The PERK Arm of the Unfolded Protein Response Regulates Mitochondrial Morphology during Acute Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Rep.* 2018;22(11):2827-2836. doi:10.1016/j.celrep.2018.02.055
342. Carreras-Sureda A, Jaña F, Urra H, et al. Non-canonical function of IRE1 α determines mitochondria-associated endoplasmic reticulum composition to control calcium transfer and bioenergetics. *Nat Cell Biol.* 2019. doi:10.1038/s41556-019-0329-y
343. Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, et al. CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* 2004;18(24):3066-3077. doi:10.1101/gad.1250704
344. Wei MC. Proapoptotic BAX and BAK: A Requisite Gateway to Mitochondrial Dysfunction and Death. *Science (80-)*. 2001;292(5517):727-730. doi:10.1126/science.1059108
345. Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, et al. The Role of Dynamin-Related Protein 1, a Mediator of Mitochondrial Fission, in Apoptosis. *Dev Cell.* 2001;1(4):515-525. doi:10.1016/S1534-5807(01)00055-7
346. Hoppins S, Nunnari J. Mitochondrial Dynamics and Apoptosis--the ER Connection. *Science (80-)*. 2012;337(6098):1052-1054. doi:10.1126/science.1224709
347. Iwasawa R, Mahul-Mellier AL, Datler C, Pazarentzos E, Grimm S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* 2011;30(3):556-568. doi:10.1038/emboj.2010.346
348. Fan Y, Simmen T. Mechanistic Connections between Endoplasmic Reticulum (ER) Redox Control and Mitochondrial Metabolism. *Cells.* 2019;8(9):1-21. doi:10.3390/cells8091071

349. Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol.* 2003;160(7):1115-1127. doi:10.1083/jcb.200212059
350. Hoppins S, Edlich F, Cleland MM, et al. The Soluble Form of Bax Regulates Mitochondrial Fusion via MFN2 Homotypic Complexes. *Mol Cell.* 2011;41(2):150-160. doi:10.1016/j.molcel.2010.11.030
351. Perrone M, Carocchia N, Genovese I, et al. The role of mitochondria-associated membranes in cellular homeostasis and diseases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2020;350. doi:10.1016/bs.ircmb.2019.11.002
352. Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca²⁺-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium.* 2011;50(3):222-233. doi:10.1016/j.ceca.2011.04.007
353. Akl H, Vervloessem T, Kiviluoto S, et al. A dual role for the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer: Mitochondria versus endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2014;1843(10):2240-2252. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.04.017
354. Foyouzi-Youssefi R, Arnaudeau S, Borner C, et al. Bcl-2 decreases the free Ca²⁺ concentration within the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(11):5723-5728. doi:10.1073/pnas.97.11.5723
355. Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, et al. Reduced loading of intracellular Ca²⁺ stores and downregulation of capacitative Ca²⁺ influx in Bcl-2-overexpressing cells. *J Cell Biol.* 2000;148(5):857-862. doi:10.1083/jcb.148.5.857
356. Wollert T. Autophagy. *Curr Biol.* 2019;29(14):R671-R677. doi:10.1016/j.cub.2019.06.014
357. Bootman MD, Chehab T, Bultynck G, Parys JB, Rietdorf K. The regulation of autophagy by calcium signals: Do we have a consensus? *Cell Calcium.* 2018;70(August):32-46. doi:10.1016/j.ceca.2017.08.005
358. Criollo A, Maiuri MC, Tasdemir E, et al. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell Death Differ.* 2007;14(5):1029-1039. doi:10.1038/sj.cdd.4402099
359. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, et al. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature.* 2013;495(7441):389-393. doi:10.1038/nature11910
360. Garofalo T, Matarrese P, Manganelli V, et al. Evidence for the involvement of lipid rafts localized at the ER-mitochondria associated membranes in autophagosome formation. *Autophagy.* 2016;12(6):917-935. doi:10.1080/15548627.2016.1160971
361. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, et al. Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell.* 2010;141(4):656-667. doi:10.1016/j.cell.2010.04.009
362. Giorgi C, Bonora M, Sorrentino G, et al. p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca²⁺-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci.* 2015;112(6):1779-1784. doi:10.1073/pnas.1410723112
363. Missiroli S, Bonora M, Patergnani S, et al. PML at Mitochondria-Associated Membranes Is Critical for the Repression of Autophagy and Cancer Development. *Cell Rep.* 2016:2415-2427. doi:10.1016/j.celrep.2016.07.082
364. Betz C, Stracka D, Prescianotto-Baschong C, Frieden M, Demaurex N, Hall MN. MTOR complex 2-Akt signaling at mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) regulates mitochondrial physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110(31):12526-12534. doi:10.1073/pnas.1302455110

365. Bononi A, Bonora M, Marchi S, et al. Identification of PTEN at the ER and MAMs and its regulation of Ca²⁺ signaling and apoptosis in a protein phosphatase-dependent manner. *Cell Death Differ.* 2013;20(12):1631-1643. doi:10.1038/cdd.2013.77
366. Gomez L, Thiebaut P-A, Paillard M, et al. The SR/ER-mitochondria calcium crosstalk is regulated by GSK3 β during reperfusion injury. *Cell Death Differ.* 2016;23(2):313-322. doi:10.1038/cdd.2015.101
367. Szado T, Vanderheyden V, Parys JB, et al. Phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors by protein kinase B/Akt inhibits Ca²⁺ release and apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(7):2427-2432. doi:10.1073/pnas.0711324105
368. Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N. Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase. *Genes Dev.* 2001;15(11):1406-1418. doi:10.1101/gad.889901
369. Chen CH, Shaikenov T, Peterson TR, et al. ER stress inhibits mTORC2 and Akt signaling through GSK-3 β -mediated phosphorylation of rictor. *Sci Signal.* 2011;4(161). doi:10.1126/scisignal.2001731
370. Tubbs E, Chanon S, Robert M, et al. Disruption of Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Membranes (MAMs) Integrity Contributes to Muscle Insulin Resistance in Mice and Humans. *Diabetes.* 2018;33(0):1-44. doi:10.2337/db17-0316
371. Dia M, Gomez L, Thibault H, et al. Reduced reticulum-mitochondria Ca²⁺ transfer is an early and reversible trigger of mitochondrial dysfunctions in diabetic cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol.* 2020;115(6):74. doi:10.1007/s00395-020-00835-7
372. Gutiérrez T, Parra V, Troncoso R, et al. Alteration in mitochondrial Ca²⁺ uptake disrupts insulin signaling in hypertrophic cardiomyocytes. *Cell Commun Signal.* 2014;12(1):1-14. doi:10.1186/s12964-014-0068-4
373. Lamming DW, Ye L, Katajisto P, et al. Rapamycin-induced insulin resistance is mediated by mTORC2 loss and uncoupled from longevity. *Science (80-).* 2012;335(6076):1638-1643. doi:10.1126/science.1215135
374. Sebastián D, Hernández-Alvarez MI, Segalés J, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(14):5523-5528. doi:10.1073/pnas.1108220109
375. Gan KX, Wang C, Chen JH, Zhu CJ, Song GY. Mitofusin-2 ameliorates high-fat diet-induced insulin resistance in liver of rats. *World J Gastroenterol.* 2013;19(10):1572-1581. doi:10.3748/wjg.v19.i10.1572
376. Bassot A, Chauvin M, Bendridi N, et al. Regulation of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) by NO / sGC / PKG Participates in the Control of Hepatic Insulin Response. *Cells.* 2019;8:1319. doi:10.3390/cells8111319
377. Patergnani S, Suski JM, Agnoletto C, et al. Calcium signaling around Mitochondria Associated Membranes (MAMs). *Cell Commun Signal.* 2011;9. doi:10.1186/1478-811X-9-19
378. Rutter GA, Pullen TJ, Hodson DJ, Martinez-Sanchez A. Pancreatic β -cell identity, glucose sensing and the control of insulin secretion. *Biochem J.* 2015;466:203-218. doi:10.1042/BJ20141384
379. Tarasov AI, Semplici F, Ravier MA, et al. The Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter MCU Is Essential for Glucose-Induced ATP Increases in Pancreatic β -Cells. *PLoS One.* 2012;7(7):1-12. doi:10.1371/journal.pone.0039722
380. Rutter GA, Georgiadou E, Martinez-Sanchez A, Pullen TJ. Metabolic and functional

- specialisations of the pancreatic beta cell : gene disallowance , mitochondrial metabolism and intercellular connectivity. *Diabetologia*. 2020;63:1990-1998. doi:<https://doi.org/10.1007/s00125-020-05205-5>
381. Rizwan Alam M, Groschner LN, Parichatikanond W, et al. Mitochondrial Ca²⁺ Uptake 1 (MICU1) and Mitochondrial Ca²⁺ Uniporter (MCU) Contribute to Metabolism-Secretion Coupling in Clonal Pancreatic-Cells. *J Biol Chem*. 2012;287(41):34445-34454. doi:10.1074/jbc.M112.392084
 382. De La Fuente S, Fernandez-Sanz C, Vail C, et al. Strategic Positioning and Biased Activity of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Cardiac Muscle. *J Biol Chem*. 2016;291(44):23343-23362. doi:10.1074/jbc.M116.755496
 383. Luciani DS, White SA, Widenmaier SB, et al. Bcl-2 and Bcl-xL suppress glucose signaling in pancreatic β -cells. *Diabetes*. 2013;62(1):170-182. doi:10.2337/db11-1464
 384. Dingreville F, Panthu B, Thivolet C, et al. Differential effect of glucose on ER-mitochondria Ca²⁺ exchange participates in insulin secretion and glucotoxicity-mediated dysfunction of β -cells. *Diabetes*. 2019;68(9):1778-1794. doi:10.2337/db18-1112
 385. He X, Bi X, Lu X, et al. Reduction of Mitochondria–Endoplasmic Reticulum Interactions by Acetylcholine Protects Human Umbilical Vein Endothelial Cells From Hypoxia/Reoxygenation Injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(7):1623-1634. doi:10.1161/ATVBAHA.115.305469
 386. Cybulski N, Hall MN. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci*. 2009;34(12):620-627. doi:10.1016/j.tibs.2009.09.004
 387. Pinton P, Rimessi A, Marchi S, et al. Protein Kinase C and Prolyl Isomerase 1 Regulate Mitochondrial Effects of the Life-Span Determinant p66Shc. *Science (80-)*. 2007;315(5812):659-663. doi:10.1126/science.1135380
 388. Giorgio M, Migliaccio E, Orsini F, et al. Electron Transfer between Cytochrome c and p66Shc Generates Reactive Oxygen Species that Trigger Mitochondrial Apoptosis. *Cell*. 2005;122(2):221-233. doi:10.1016/j.cell.2005.05.011
 389. Lebedzinska M, Duszyński J, Rizzuto R, Pinton P, Wieckowski MR. Age-related changes in levels of p66Shc and serine 36-phosphorylated p66Shc in organs and mouse tissues. *Arch Biochem Biophys*. 2009;486(1):73-80. doi:10.1016/j.abb.2009.03.007
 390. Mandl J, Mészáros T, Bánhegyi G, Hunyady L, Csala M. Endoplasmic reticulum: nutrient sensor in physiology and pathology. *Trends Endocrinol Metab*. 2009;20(4):194-201. doi:10.1016/j.tem.2009.01.003
 391. Wai T, Langer T. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol Metab*. 2016;27(2):105-117. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001>
 392. Gao AW, Cantó C, Houtkooper RH. Mitochondrial response to nutrient availability and its role in metabolic disease. *EMBO Mol Med*. 2014;6(5):580-589. doi:10.1002/emmm.201303782
 393. Bernhard W, Rouiller C. CLOSE TOPOGRAPHICAL RELATIONSHIP BETWEEN MITOCHONDRIA AND ERGASTOPLASM OF LIVER CELLS IN A DEFINITE PHASE OF CELLULAR ACTIVITY. *J Biophys Biochem Cytol*. 1956;2(4):73-78. doi:10.1083/jcb.2.4.73
 394. Ma JH, Shen S, Wang JJ, et al. Comparative Proteomic Analysis of the Mitochondria-associated ER Membrane (MAM) in a Long-term Type 2 Diabetic Rodent Model. *Sci Rep*. 2017;7(1):2062. doi:10.1038/s41598-017-02213-1
 395. Báez-ruiz A, Cázares-gómez K, Vázquez-martínez O, Aguilar-roblero R, Díaz-muñoz M. Diurnal and nutritional adjustments of intracellular Ca²⁺ release channels and Ca²⁺ ATPases

- associated with restricted feeding schedules in the rat liver. *J Circadian Rythm*. 2013;1-17. doi:10.1186/1740-3391-11-8
396. Scrima R, Cela O, Agriesti F, et al. Mitochondrial calcium drives clock gene-dependent activation of pyruvate dehydrogenase and of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2020;1867(11):118815. doi:10.1016/j.bbamcr.2020.118815
 397. Calì T, Ottolini D, Negro A, Brini M. α -Synuclein Controls Mitochondrial Calcium Homeostasis by Enhancing Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Interactions. *J Biol Chem*. 2012;287(22):17914-17929. doi:10.1074/jbc.M111.302794
 398. Calì T, Ottolini D, Negro A, Brini M. Enhanced parkin levels favor ER-mitochondria crosstalk and guarantee Ca²⁺ transfer to sustain cell bioenergetics. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis*. 2013;1832(4):495-508. doi:10.1016/j.bbadis.2013.01.004
 399. Area-Gomez E, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J*. 2012;31(21):4106-4123. doi:10.1038/emboj.2012.202
 400. Zampese E, Fasolato C, Kipanyula MJ, Bortolozzi M, Pozzan T, Pizzo P. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(7):2777-2782. doi:10.1073/pnas.1100735108
 401. Area-Gomez E, De Groof AJC, Boldogh I, et al. Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am J Pathol*. 2009;175(5):1810-1816. doi:10.2353/ajpath.2009.090219
 402. Guardia-Laguarta C, Area-Gomez E, Rub C, et al. α -Synuclein Is Localized to Mitochondria-Associated ER Membranes. *J Neurosci*. 2014;34(1):249-259. doi:10.1523/JNEUROSCI.2507-13.2014
 403. LaFerla FM. Calcium dyshomeostasis and intracellular signalling in alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*. 2002;3(11):862-872. doi:10.1038/nrn960
 404. Hedskog L, Pinho CM, Filadi R, et al. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc Natl Acad Sci*. 2013;110(19):7916-7921. doi:10.1073/pnas.1300677110
 405. Rocha EM, De Miranda B, Sanders LH. Alpha-synuclein: Pathology, mitochondrial dysfunction and neuroinflammation in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*. 2018;109:249-257. doi:10.1016/j.nbd.2017.04.004
 406. Ottolini D, Calì T, Negro A, Brini M. The Parkinson disease-related protein DJ-1 counteracts mitochondrial impairment induced by the tumour suppressor protein p53 by enhancing endoplasmic reticulum-mitochondria tethering. *Hum Mol Genet*. 2013;22(11):2152-2168. doi:10.1093/hmg/ddt068
 407. Stoica R, Paillusson S, Gomez-Suaga P, et al. ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3 β to disrupt the VAPB-PTPIP51 interaction and ER-mitochondria associations. *EMBO Rep*. 2016;17(9):1326-1342. doi:10.15252/embr.201541726
 408. WHO. Le Cancer. *Cancer*. 2018;1. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>.
 409. Malthièry Y, Savagner F. Métabolisme énergétique de la cellule cancéreuse: exemple des tumeurs endocrines riches en mitochondries. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2006;67(3):205-213. doi:10.1016/S0003-4266(06)72588-4
 410. Shinohara Y, Yamamoto K, Kogure K, Ichihara J, Terada H. Steady state transcript levels of the type II hexokinase and type I glucose transporter in human tumor cell lines. *Cancer Lett*. 1994;82(1):27-32. doi:10.1016/0304-3835(94)90142-2

411. Patra KC, Wang Q, Bhaskar PT, et al. Hexokinase 2 Is Required for Tumor Initiation and Maintenance and Its Systemic Deletion Is Therapeutic in Mouse Models of Cancer. *Cancer Cell*. 2013;24(2):213-228. doi:10.1016/j.ccr.2013.06.014
412. Morciano G, Marchi S, Morganti C, et al. Role of Mitochondria-Associated ER Membranes in Calcium Regulation in Cancer-Specific Settings. *Neoplasia*. 2018;20(5):510-523. doi:10.1016/j.neo.2018.03.005
413. Razungles J, Cavaillès V, Jalaguier S, Teyssier C. L'effet Warburg. *médecine/sciences*. 2013;29(11):1026-1033. doi:10.1051/medsci/20132911020
414. Wallach DF. Cellular membranes and tumor behavior: a new hypothesis. *Proc Natl Acad Sci*. 1968;61(3):868-874. doi:10.1073/pnas.61.3.868
415. Cárdenas C, Müller M, McNeal A, et al. Selective Vulnerability of Cancer Cells by Inhibition of Ca²⁺ Transfer from Endoplasmic Reticulum to Mitochondria. *Cell Rep*. 2016;14(10):2313-2324. doi:10.1016/j.celrep.2016.02.030
416. Gueguinou M, Crottès D, Chantôme A, et al. The SigmaR1 chaperone drives breast and colorectal cancer cell migration by tuning SK3-dependent Ca²⁺ homeostasis. *Oncogene*. 2017;36(25):3640-3647. doi:10.1038/onc.2016.501
417. Teng Y, Ren X, Li H, Shull A, Kim J, Cowell JK. Mitochondrial ATAD3A combines with GRP78 to regulate the WASF3 metastasis-promoting protein. *Oncogene*. 2016;35(3):333-343. doi:10.1038/onc.2015.86
418. Aydar E, Onganer P, Perrett R, Djamgoz MB, Palmer CP. The expression and functional characterization of sigma (σ) 1 receptors in breast cancer cell lines. *Cancer Lett*. 2006;242(2):245-257. doi:10.1016/j.canlet.2005.11.011
419. Pinton P. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J*. 2001;20(11):2690-2701. doi:10.1093/emboj/20.11.2690
420. Giorgi C, Bonora M, Missiroli S, et al. Alterations in Mitochondrial and Endoplasmic Reticulum Signaling by p53 Mutants. *Front Oncol*. 2016;6(FEB):1-7. doi:10.3389/fonc.2016.00042
421. Bittremieux M, Bultynck G. p53 and Ca²⁺ signaling from the endoplasmic reticulum: Partners in anti-cancer therapies. *Oncoscience*. 2015;2(3):233-238. doi:10.18632/oncoscience.139
422. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-310. doi:10.1038/35042675
423. Bernardi R, Scaglioni PP, Bergmann S, Horn HF, Vousden KH, Pandolfi PP. PML regulates p53 stability by sequestering Mdm2 to the nucleolus. *Nat Cell Biol*. 2004;6(7):665-672. doi:10.1038/ncb1147
424. Gurrieri C, Capodiecì P, Bernardi R, et al. Loss of the Tumor Suppressor PML in Human Cancers of Multiple Histologic Origins. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):269-279. doi:10.1093/jnci/djh043
425. Khan MT, Wagner L, Yule DI, Bhanumathy C, Joseph SK. Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem*. 2006;281(6):3731-3737. doi:10.1074/jbc.M509262200
426. Marchi S, Marinello M, Bononi A, et al. Selective modulation of subtype III IP3R by Akt regulates ER Ca²⁺ release and apoptosis. *Cell Death Dis*. 2012;3(5):e304-e304. doi:10.1038/cddis.2012.45
427. Ivanova H, Kerkhofs M, La Rovere RM, Bultynck G. Endoplasmic Reticulum–Mitochondrial Ca²⁺ Fluxes Underlying Cancer Cell Survival. *Front Oncol*. 2017;7(MAY).

doi:10.3389/fonc.2017.00070

428. Rimessi A, Pedriali G, Vezzani B, et al. Interorganellar calcium signaling in the regulation of cell metabolism: A cancer perspective. *Semin Cell Dev Biol.* 2020;98(May 2019):167-180. doi:10.1016/j.semcdb.2019.05.015
429. Singh A, Chagtoo M, Tiwari S, et al. Inhibition of Inositol 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor Induce Breast Cancer Cell Death Through Deregulated Autophagy and Cellular Bioenergetics. *J Cell Biochem.* 2017;118(8):2333-2346. doi:10.1002/jcb.25891
430. Nicco C, Laurent A, Chereau C, Weill B, Batteux F. Differential modulation of normal and tumor cell proliferation by reactive oxygen species. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(4):169-174. doi:10.1016/j.biopha.2005.03.009
431. Batteux F, Cerles O, Nicco C. Cancer, formes réactives de l'oxygène et neuropathies périphériques chimio-induites. *médecine/sciences.* 2014;30(12):1078-1080. doi:10.1051/medsci/20143012008
432. Anelli T, Bergamelli L, Margittai E, et al. Ero1 α regulates Ca²⁺ fluxes at the endoplasmic reticulum-mitochondria interface (MAM). *Antioxidants Redox Signal.* 2012;16(10):1077-1087. doi:10.1089/ars.2011.4004
433. Kakihana T, Nagata K, Sitia R. Peroxides and Peroxidases in the Endoplasmic Reticulum: Integrating Redox Homeostasis and Oxidative Folding. *Antioxid Redox Signal.* 2012;16(8):763-771. doi:10.1089/ars.2011.4238
434. Morciano G, Giorgi C, Balestra D, et al. Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. Newmeyer DD, ed. *Mol Biol Cell.* 2016;27(1):20-34. doi:10.1091/mbc.E15-01-0028
435. Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009;122(4):437-441. doi:10.1242/jcs.031682
436. Davids MS, Letai A. Targeting the B-Cell Lymphoma/Leukemia 2 Family in Cancer. *J Clin Oncol.* 2012;30(25):3127-3135. doi:10.1200/JCO.2011.37.0981
437. Arbel N, Shoshan-Barmatz V. Voltage-dependent Anion Channel 1-based Peptides Interact with Bcl-2 to Prevent Antiapoptotic Activity. *J Biol Chem.* 2010;285(9):6053-6062. doi:10.1074/jbc.M109.082990
438. Chami M, Prandini A, Campanella M, et al. Bcl-2 and Bax Exert Opposing Effects on Ca²⁺ Signaling, Which Do Not Depend on Their Putative Pore-forming Region. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54581-54589. doi:10.1074/jbc.M409663200
439. Huang H, Hu X, Eno CO, Zhao G, Li C, White C. An Interaction between Bcl-x L and the Voltage-dependent Anion Channel (VDAC) Promotes Mitochondrial Ca²⁺ Uptake. *J Biol Chem.* 2013;288(27):19870-19881. doi:10.1074/jbc.M112.448290
440. White C, Li C, Yang J, et al. The endoplasmic reticulum gateway to apoptosis by Bcl-XL modulation of the InsP3R. *Nat Cell Biol.* 2005;7(10):1021-1028. doi:10.1038/ncb1302
441. Missiroli S, Patergnani S, Caroccia N, et al. Mitochondria-associated membranes (MAMs) and inflammation. *Cell Death Dis.* 2018;9(3). doi:10.1038/s41419-017-0027-2
442. Jamilloux Y, Henry T. Les inflammasomes. *médecine/sciences.* 2013;29(11):975-984. doi:10.1051/medsci/20132911013
443. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011;469(7329):221-225. doi:10.1038/nature09663
444. Wu J, Li X, Zhu G, Zhang Y, He M, Zhang J. The role of Resveratrol-induced

- mitophagy/autophagy in peritoneal mesothelial cells inflammatory injury via NLRP3 inflammasome activation triggered by mitochondrial ROS. *Exp Cell Res.* 2016;341(1):42-53. doi:10.1016/j.yexcr.2016.01.014
445. Horng T. Calcium signaling and mitochondrial destabilization in the triggering of the NLRP3 inflammasome. *Trends Immunol.* 2014;35(6):253-261. doi:10.1016/j.it.2014.02.007
446. Zhou R, Tardivel A, Thorens B, Choi I, Tschopp J. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation. *Nat Immunol.* 2010;11(2):136-140. doi:10.1038/ni.1831
447. Zhou Y, Tong Z, Jiang S, Zheng W, Zhao J, Zhou X. The Roles of Endoplasmic Reticulum in NLRP3 Inflammasome Activation. *Cells.* 2020;9(5):1219. doi:10.3390/cells9051219
448. Subramanian N, Natarajan K, Clatworthy MR, Wang Z, Germain RN. The Adaptor MAVS Promotes NLRP3 Mitochondrial Localization and Inflammasome Activation. *Cell.* 2013;153(2):348-361. doi:10.1016/j.cell.2013.02.054
449. Horner SM, Liu HM, Park HS, Briley J, Gale M. Mitochondrial-associated endoplasmic reticulum membranes (MAM) form innate immune synapses and are targeted by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci.* 2011;108(35):14590-14595. doi:10.1073/pnas.1110133108
450. Bender S, Reuter A, Eberle F, Einhorn E, Binder M, Bartenschlager R. Activation of Type I and III Interferon Response by Mitochondrial and Peroxisomal MAVS and Inhibition by Hepatitis C Virus. Randall G, ed. *PLOS Pathog.* 2015;11(11):e1005264. doi:10.1371/journal.ppat.1005264
451. Huang C-Y, Chiang S-F, Lin T-Y, Chiou S-H, Chow K-C. HIV-1 Vpr Triggers Mitochondrial Destruction by Impairing Mfn2-Mediated ER-Mitochondria Interaction. Kim B, ed. *PLoS One.* 2012;7(3):e33657. doi:10.1371/journal.pone.0033657
452. Tramutola A, Lanzillotta C, Perluigi M, Butterfield DA. Oxidative stress, protein modification and Alzheimer disease. *Brain Res Bull.* 2017;133:88-96. doi:10.1016/j.brainresbull.2016.06.005
453. Halle A, Hornung V, Petzold GC, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid- β . *Nat Immunol.* 2008;9(8):857-865. doi:10.1038/ni.1636
454. Galmes R, Houcine A, Vliet AR, Agostinis P, Jackson CL, Giordano F. ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum-mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep.* 2016;17(6):800-810. doi:10.15252/embr.201541108
455. Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, et al. PI(4,5)P₂-Dependent and Ca²⁺-Regulated ER-PM Interactions Mediated by the Extended Synaptotagmins. *Cell.* 2013;153(7):1494-1509. doi:10.1016/j.cell.2013.05.026
456. Scorrano L, De Matteis MA, Emr S, et al. Coming together to define membrane contact sites. *Nat Commun.* 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-09253-3
457. Wieckowski MR, Giorgi C, Lebiedzinska M, Duszynski J, Pinton P. Isolation of mitochondria-associated membranes and mitochondria from animal tissues and cells. *Nat Protoc.* 2009;4(11):1582-1590. doi:10.1038/nprot.2009.151
458. Tubbs E, Rieusset J. Study of Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Interactions by *In Situ* Proximity Ligation Assay in Fixed Cells. *J Vis Exp.* 2016;2016(118). doi:10.3791/54899
459. Giamogante F, Barazzuol L, Brini M, Cali T. ER-Mitochondria Contact Sites Reporters: Strengths and Weaknesses of the Available Approaches. *Int J Mol Sci.* 2020;21(21):8157. doi:10.3390/ijms21218157
460. Dong D, Huang X, Li L, et al. Super-resolution fluorescence-assisted diffraction computational tomography reveals the three-dimensional landscape of the cellular organelle interactome. *Light*

Sci Appl. 2020;9(1):11. doi:10.1038/s41377-020-0249-4

461. Hirabayashi Y, Kwon SK, Paek H, et al. ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons. *Science* (80-). 2017;358(6363):623-630. doi:10.1126/science.aan6009
462. Neumann D, Bückers J, Kastrup L, Hell SW, Jakobs S. Two-color STED microscopy reveals different degrees of colocalization between hexokinase-I and the three human VDAC isoforms. *PMC Biophys.* 2010;3(1):4. doi:10.1186/1757-5036-3-4
463. Vance JE. Inter-organelle membrane contact sites: implications for lipid metabolism. *Biol Direct.* 2020;15(1). doi:10.1186/s13062-020-00279-y
464. Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, et al. Ca²⁺ Indicators Based on Computationally Redesigned Calmodulin-Peptide Pairs. *Chem Biol.* 2006;13(5):521-530. doi:10.1016/j.chembiol.2006.03.007
465. Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, et al. Ca²⁺ Hot Spots on the Mitochondrial Surface Are Generated by Ca²⁺ Mobilization from Stores, but Not by Activation of Store-Operated Ca²⁺ Channels. *Mol Cell.* 2010;38(2):280-290. doi:10.1016/j.molcel.2010.04.003
466. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: Channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev.* 1999;79(4):1127-1155. doi:10.1152/physrev.1999.79.4.1127
467. Green DR. The Pathophysiology of Mitochondrial Cell Death. *Science* (80-). 2004;305(5684):626-629. doi:10.1126/science.1099320
468. Doghman-Bouguerra M, Granatiero V, Sbiera S, et al. FATE1 antagonizes calcium- and drug-induced apoptosis by uncoupling ER and mitochondria. *EMBO Rep.* 2016;17(9):1264-1280. doi:10.15252/embr.201541504
469. Thivolet C, Vial G, Cassel R, Rieusset J, Madec A-M. Reduction of endoplasmic reticulum-mitochondria interactions in beta cells from patients with type 2 diabetes. Fiorina P, ed. *PLoS One.* 2017;12(7):e0182027. doi:10.1371/journal.pone.0182027
470. Levine B. Eating Oneself and Uninvited Guests. *Cell.* 2005;120(2):159-162. doi:10.1016/j.cell.2005.01.005
471. Bach D, Pich S, Soriano FX, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism: A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem.* 2003;278(19):17190-17197. doi:10.1074/jbc.M212754200
472. Mingrone G, Manco M, Calvani M, Castagneto M, Naon D, Zorzano A. Could the low level of expression of the gene encoding skeletal muscle mitofusin-2 account for the metabolic inflexibility of obesity? *Diabetologia.* 2005;48:2108-2114. doi:10.1007/s00125-005-1918-9
473. Park B-Y, Jeon J-H, Go Y, et al. PDK4 Deficiency Suppresses Hepatic Glucagon Signaling by Decreasing cAMP Levels. *Diabetes.* 2018;67(10):2054-2068. doi:10.2337/db17-1529
474. Kulkarni SS, Salehzadeh F, Fritz T, Zierath JR, Krook A, Osler ME. Mitochondrial regulators of fatty acid metabolism reflect metabolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 2012;61(2):175-185. doi:10.1016/j.metabol.2011.06.014
475. Wu P, Blair P V., Sato J, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA. Starvation increases the amount of pyruvate dehydrogenase kinase in several mammalian tissues. *Arch Biochem Biophys.* 2000;381(1):1-7. doi:10.1006/abbi.2000.1946
476. WU P, SATO J, ZHAO Y, JASKIEWICZ J, POPOV MK, HARRIS AR. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochem J.* 1998;329(1):197-201. doi:10.1042/bj3290197

477. Shannon CE, Ragavan M, Palavicini JP, et al. Insulin resistance is mechanistically linked to hepatic mitochondrial remodeling in non-alcoholic fatty liver disease. *Mol Metab.* 2021;45(December 2020):101154. doi:10.1016/j.molmet.2020.101154
478. Lee I-K. The Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase in Diabetes and Obesity. *Diabetes Metab J.* 2014;38(3):181. doi:10.4093/dmj.2014.38.3.181
479. Yaribeygi H, Farrokhi FR, Butler AE, Sahebkar A. Insulin resistance: Review of the underlying molecular mechanisms. *J Cell Physiol.* 2019;234(6):8152-8161. doi:10.1002/jcp.27603
480. Montgomery MK, Turner N. Mitochondrial dysfunction and insulin resistance: an update. *Endocr Connect.* 2015;4(1):R1-R15. doi:10.1530/EC-14-0092
481. Shinjo S, Jiang S, Nameta M, et al. Disruption of the mitochondria-associated ER membrane (MAM) plays a central role in palmitic acid-induced insulin resistance. *Exp Cell Res.* 2017;359(1):86-93. doi:10.1016/j.yexcr.2017.08.006
482. Tubbs E, Axelsson AS, Vial G, Wollheim CB, Rieusset J, Rosengren AH. Sulforaphane improves disrupted ER-mitochondria interactions and suppresses exaggerated hepatic glucose production. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;461:205-214. doi:10.1016/j.mce.2017.09.016
483. Krzysiak TC, Thomas L, Choi YJ, et al. An Insulin-Responsive Sensor in the SIRT1 Disordered Region Binds DBC1 and PACS-2 to Control Enzyme Activity. *Mol Cell.* 2018;72(6):985-998.e7. doi:10.1016/j.molcel.2018.10.007
484. Kharitonov A, Shiyanova TL, Koester A, et al. FGF-21 as a novel metabolic regulator. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1627-1635. doi:10.1172/JCI23606
485. Tagaya M, Arasaki K. Regulation of Mitochondrial Dynamics and Autophagy by the Mitochondria-Associated Membrane. *Springer.* 2017;997:33-47. doi:10.1007/978-981-10-4567-7
486. Fu T, Xu Z, Liu L, et al. Mitophagy Directs Muscle-Adipose Crosstalk to Alleviate Dietary Obesity. *Cell Rep.* 2018;23(5):1357-1372. doi:10.1016/j.celrep.2018.03.127
487. Dia M, Paccalet A, Pillot B, et al. Myocardial Ischemia-Reperfusion and Diabetes: Lessons Learned From Bedside to Bench. *Front Cardiovasc Med.* 2021;8:660698. doi:10.3389/fcvm.2021.660698
488. Hernández-Alvarez MI, Chiellini C, Manco M, et al. Genes involved in mitochondrial biogenesis/function are induced in response to bilio-pancreatic diversion in morbidly obese individuals with normal glucose tolerance but not in type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2009;52(8):1618-1627. doi:10.1007/s00125-009-1403-y
489. Schneeberger M, Dietrich MO, Sebastián D, et al. Mitofusin 2 in POMC Neurons Connects ER Stress with Leptin Resistance and Energy Imbalance. *Cell.* 2013;155(1):172-187. doi:10.1016/j.cell.2013.09.003
490. Yang M, Zhao L, Gao P, et al. DsbA-L ameliorates high glucose induced tubular damage through maintaining MAM integrity. *EBioMedicine.* 2019;43:607-619. doi:10.1016/j.ebiom.2019.04.044
491. Zhao L, Lu T, Gao L, Fu X, Zhu S, Hou Y. Enriched endoplasmic reticulum-mitochondria interactions result in mitochondrial dysfunction and apoptosis in oocytes from obese mice. *J Anim Sci Biotechnol.* 2017;8(1):62. doi:10.1186/s40104-017-0195-z
492. DeFronzo RA, Tripathy D. Skeletal muscle insulin resistance is the primary defect in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2009;32 Suppl 2. doi:10.2337/dc09-S302
493. Xiao F, Zhang J, Zhang C, An W. Hepatic stimulator substance inhibits calcium overflow through the mitochondria-associated membrane compartment during nonalcoholic steatohepatitis. *Lab Invest.* 2017;97(3):289-301. doi:10.1038/labinvest.2016.139

494. Wang J, He W, Tsai P, et al. Mutual interaction between endoplasmic reticulum and mitochondria in nonalcoholic fatty liver disease. *Lipids Health Dis.* 2020;19(1):72. doi:10.1186/s12944-020-01210-0
495. Sharma RS, Harrison DJ, Kisielewski D, et al. Experimental Nonalcoholic Steatohepatitis and Liver Fibrosis Are Ameliorated by Pharmacologic Activation of Nrf2 (NF-E2 p45-Related Factor 2). *Cell Mol Gastroenterol Hepatol.* 2018;5(3):367-398. doi:10.1016/j.jcmgh.2017.11.016
496. Camara AKS, Zhou Y, Wen P-C, Tajkhorshid E, Kwok W-M. Mitochondrial VDAC1: A Key Gatekeeper as Potential Therapeutic Target. *Front Physiol.* 2017;8(JUN):1-18. doi:10.3389/fphys.2017.00460
497. Martel C, Allouche M, Esposti DD, et al. Glycogen synthase kinase 3-mediated voltage-dependent anion channel phosphorylation controls outer mitochondrial membrane permeability during lipid accumulation. *Hepatology.* 2013;57(1):93-102. doi:10.1002/hep.25967
498. Martel C, Wang Z, Brenner C. VDAC phosphorylation, a lipid sensor influencing the cell fate. *Mitochondrion.* 2014;19(Part A):69-77. doi:10.1016/j.mito.2014.07.009
499. Ali ES, Rychkov GY, Barritt GJ. Deranged hepatocyte intracellular Ca²⁺ homeostasis and the progression of non-alcoholic fatty liver disease to hepatocellular carcinoma. *Cell Calcium.* 2019;82(June):102057. doi:10.1016/j.ceca.2019.102057
500. Chung J, Torta F, Masai K, et al. PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science (80-).* 2015;349(6246):428-432. doi:10.1126/science.aab1370
501. Rieusset J. Mitochondria-associated membranes (MAMs): An emerging platform connecting energy and immune sensing to metabolic flexibility. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;500(1):35-44. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.097
502. Toye AA, Lippiat JD, Proks P, et al. A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia.* 2005;48(4):675-686. doi:10.1007/s00125-005-1680-z
503. Hoek JB, Rydström J. Physiological roles of nicotinamide nucleotide transhydrogenase. *Biochem J.* 1988;254(1):1-10. doi:10.1042/bj2540001
504. Fisher-Wellman KH, Ryan TE, Smith CD, et al. A Direct Comparison of Metabolic Responses to High-Fat Diet in C57BL/6J and C57BL/6NJ Mice. *Diabetes.* 2016;65(11):3249-3261. doi:10.2337/db16-0291
505. Fergusson G, Éthier M, Guévremont M, et al. Defective insulin secretory response to intravenous glucose in C57Bl/6J compared to C57Bl/6N mice. *Mol Metab.* 2014;3(9):848-854. doi:10.1016/j.molmet.2014.09.006
506. Nicholson A, Reifsnyder PC, Malcolm RD, et al. Diet-induced Obesity in Two C57BL/6 Substrains With Intact or Mutant Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Nnt) Gene. *Obesity.* 2010;18(10):1902-1905. doi:10.1038/oby.2009.477
507. Navarro CDC, Figueira TR, Francisco A, et al. Redox imbalance due to the loss of mitochondrial NAD(P)-transhydrogenase markedly aggravates high fat diet-induced fatty liver disease in mice. *Free Radic Biol Med.* 2017;113(September):190-202. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2017.09.026
508. Tallis J, James RS, Seebacher F. The effects of obesity on skeletal muscle contractile function. *J Exp Biol.* 2018;221(13). doi:10.1242/jeb.163840
509. Eshima H, Tamura Y, Kakehi S, et al. Long-term, but not short-term high-fat diet induces fiber composition changes and impaired contractile force in mouse fast-twitch skeletal muscle. *Physiol*

Rep. 2017;5(7):e13250. doi:10.14814/phy2.13250

510. Tallis J, Hill C, James RS, Cox VM, Seebacher F. The effect of obesity on the contractile performance of isolated mouse soleus, EDL, and diaphragm muscles. *J Appl Physiol.* 2017;122(1):170-181. doi:10.1152/jappphysiol.00836.2016
511. Jaque-Fernandez F, Beaulant A, Berthier C, et al. Preserved Ca²⁺ handling and excitation–contraction coupling in muscle fibres from diet-induced obese mice. *Diabetologia.* 2020;63(11):2471-2481. doi:10.1007/s00125-020-05256-8
512. Bosc C, Broin N, Fanjul M, et al. Autophagy regulates fatty acid availability for oxidative phosphorylation through mitochondria-endoplasmic reticulum contact sites. *Nat Commun.* 2020;11(1):4056. doi:10.1038/s41467-020-17882-2
513. Stiban J, Caputo L, Colombini M. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *J Lipid Res.* 2008;49(3):625-634. doi:10.1194/jlr.M700480-JLR200
514. Yu XX, Murray SF, Pandey SK, et al. Antisense oligonucleotide reduction of DGAT2 expression improves hepatic steatosis and hyperlipidemia in obese mice. *Hepatology.* 2005;42(2):362-371. doi:10.1002/hep.20783
515. Matsuzaka T, Shimano H, Yahagi N, et al. Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat Med.* 2007;13(10):1193-1202. doi:10.1038/nm1662
516. Monetti M, Levin MC, Watt MJ, et al. Dissociation of Hepatic Steatosis and Insulin Resistance in Mice Overexpressing DGAT in the Liver. *Cell Metab.* 2007;6(1):69-78. doi:10.1016/j.cmet.2007.05.005
517. Gao X, Li K, Hui X, et al. Carnitine palmitoyltransferase 1A prevents fatty acid-induced adipocyte dysfunction through suppression of c-Jun N-terminal kinase. *Biochem J.* 2011;435(3):723-732. doi:10.1042/BJ20101680
518. Listenberger LL, Han X, Lewis SE, et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(6):3077-3082. doi:10.1073/pnas.0630588100
519. Alkhouiri N, Dixon LJ, Feldstein AE. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009;3(4):445-451. doi:10.1586/egh.09.32
520. Yamaguchi K, Yang L, McCall S, et al. Inhibiting triglyceride synthesis improves hepatic steatosis but exacerbates liver damage and fibrosis in obese mice with nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology.* 2007;45(6):1366-1374. doi:10.1002/hep.21655
521. Cheon H, Cho Y. Protection of palmitic acid-mediated lipotoxicity by arachidonic acid via channeling of palmitic acid into triglycerides in C2C12. *J Biomed Sci.* 2014;21(1):13. doi:10.1186/1423-0127-21-13
522. Luukkonen PK, Zhou Y, Sädevirta S, et al. Hepatic ceramides dissociate steatosis and insulin resistance in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2016;64(5):1167-1175. doi:10.1016/j.jhep.2016.01.002
523. Vial G, Chauvin M-A, Bendridi N, et al. Imeglimin Normalizes Glucose Tolerance and Insulin Sensitivity and Improves Mitochondrial Function in Liver of a High-Fat, High-Sucrose Diet Mice Model. *Diabetes.* 2015;64(6):2254-2264. doi:10.2337/db14-1220
524. Redolfi N, Greotti E, Zanetti G, et al. A New Transgenic Mouse Line for Imaging Mitochondrial Calcium Signals. *Function.* 2021;2(3). doi:10.1093/function/zqab012

525. Eisenberg-Bord M, Shai N, Schuldiner M, Bohnert M. A Tether Is a Tether Is a Tether: Tethering at Membrane Contact Sites. *Dev Cell*. 2016;39(4):395-409. doi:10.1016/j.devcel.2016.10.022
526. Schauder CM, Wu X, Saheki Y, et al. Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer. *Nature*. 2014;510(7506):552-555. doi:10.1038/nature13269
527. Kaul SC, Deocaris CC, Wadhwa R. Three faces of mortalin: A housekeeper, guardian and killer. *Exp Gerontol*. 2007;42(4):263-274. doi:10.1016/j.exger.2006.10.020
528. von der Malsburg K, Müller JM, Bohnert M, et al. Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis. *Dev Cell*. 2011;21(4):694-707. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.026
529. Lisa F Di, Canton M, Menabò R, Kaludercic N, Bernardi P. Mitochondria and cardioprotection. *Heart Fail Rev*. 2007;12(3-4):249-260. doi:10.1007/s10741-007-9028-z
530. Variations de la glycémie sur 24 heures | Diabete.fr. <https://www.diabete.fr/comprendre-le-diabete/hyperglycemie/variations-de-la-glycemie-sur-24-heures>. Accessed May 16, 2021.