

# 6<sup>e</sup> Congrès *meet* *chondrie*

**cnrs**

**GDR 3159**



*Soustons (Landes)  
26-29 septembre 2012*









# 6<sup>e</sup> Colloque MeetOchondrie

Soustons 26-29 Septembre 2012

## 26 septembre

- 19h00 Accueil  
*Apéritif - Dîner*
- 21h00 Conférence plénière : **The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death**  
Paolo Bernardi

## 27 septembre

- 8h30 **Table ronde : "OXPHOS pairs: complexes II, IV"**  
Modérateur : Frédéric Bouillaud
- Gènes SDH et prédisposition au cancer**  
Judith Favier
- La cytochrome c oxydase : questions actuelles**  
Animé par Francis Haraux
- Déshydrogénases et oxydases alternes**  
David Macherel
- 10h00 *Pause*
- 10h30 **Table ronde : "Autres rôles du potentiel de membranaire, transhydrogénases"**  
Modérateur : Francis Haraux
- La H<sup>+</sup>-transhydrogénase**  
Tania Bizouarn
- Potentiel et import des protéines mitochondriales**  
Bernard Guiard
- Autres rôles du potentiel membranaire**  
Eric Fontaine
- 12h00 *Repas*
- 14h00 **Session Affiches et pause café**
- 16h00 **Table ronde méthodologique : "Oxymétrie"**  
Modérateur : David Macherel
- Techniques d'oxygraphie**  
David Macherel
- Oxygraphie à haute résolution**  
N. Gueguen
- Système "Seahorse"**  
F. Bouillaud, R. Rossignol
- 17h30 Conférence : **"Immunité antivirale et mitochondrie"**  
Damien Arnoult
- 19h00 **Parole aux Associations**
- 20h00 *Dîner Meli-melo*
- 21h00 **Session Affiches**

## 28 septembre

- 8h30 **Table ronde : "Mitochondrie et 3 I"**  
Modératrice : Carina Prip-Buus
- UCP2 et immunité**  
Clotilde Alves-Guerra
- Asthme et mitochondrie**  
Thomas Trian
- Inflammation hépatique et mitochondrie**  
Abdellah Mansouri
- 10h00 *Pause*
- 10h30 **Table ronde : "Mitochondrie et vieillissement"**  
Modératrice : Anne-Laure Bulteau
- Introduction** : Anne-Laure Bulteau
- Le point de vue du nématode**  
Laurent Mouchiroud
- Adaptation au froid et vieillissement**  
Pierre Bize
- Réseau mitochondrial et vieillissement de la peau**  
Emmanuelle Leblanc-Noblesse
- 12h00 *Repas*
- 14h00 **Bioénergétique pratique**
- 17h00 *Pause café*
- 17h30 Conférence : **"Maladies métaboliques et mitochondrie"**  
Hubert Vidal
- 18h30 Assemblée générale
- 19h30 *Apéritif*
- 20h00 *Dîner Gala*
- ## 29 septembre
- 8h30 **Table ronde : "Actualités du diagnostic des maladies mitochondriales"**  
Modératrice : Anne Lombès
- Introduction** : Anne Lombès
- Nouvelles méthodes de diagnostic génétique**  
Agnès Rötig
- Place de l'ADN mitochondrial en pathologie humaine**  
Vincent Procaccio
- Déficits secondaires de la chaîne respiratoire**  
Marlène Rio
- 10h00 *Pause*
- 10h30 **Table ronde : "Dysmétabolisme mitochondrial"**  
Modérateurs : Béatrice Morio Bernard Fromenty
- Introduction** : Béatrice Morio et Bernard Fromenty
- Dynamique mitochondriale et métabolisme musculaire**  
Frédéric Joubert
- Rôle de la mitochondrie dans l'obésité et l'insulinorésistance**  
Valentin Barquissau
- Diabète et maladies mitochondriales héréditaires**  
Véronique Paquis
- 12h00 *Repas*
- 12h30/15h Départ des navettes pour la gare et l'aéroport



*meet* *chondrie*

# **6<sup>e</sup> Colloque MeetOchondrie**

## **Abstracts book**



## Table of contents

Computational identification of transcriptionally co-regulated genes, validation with the four ANT isoform genes	4
Proline catabolism in plant mitochondria and water Stress	5
Linking endothermy and mitochondrial proton leak to variation in the pace of life of mammals and birds	6
Contrôle de l'assemblage du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale via la protéine AAA, Bcs1.	7
Atypical mitochondrial fission upon <i>Listeria</i> infection	8
A plant mitochondrial carrier involved in photorespiration	9
How to inhibit bc1 complex with antimycin A?	10
Mesure in situ de la respiration mitochondriale de neurones primaires issus de modèles animaux des maladies de Huntington et de Parkinson	11
Involvement of mitochondrial NAD <sup>+</sup> -dependent deacetylase Sirt3 in the regulation of myoblast differentiation.	12
The <i>Drosophila</i> inner-membrane protein PMI controls cristae biogenesis and mitochondrial diameter	13
Dynamics of the mitochondrial DNA processing in single cells reveal correlation with the cell cycle and resistance to stress	14
FUNDC2 : a novel mitochondrial protein	15
Loss of OPA1 induces perturbation of oxidative metabolism and antioxidant defenses activation	16
An in silico approach to model the assembly pathway of protein complexes III and IV in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	18
Étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les mitochondries cardiaques subsarcolemmales et interfibrillaires par résonance paramagnétique électronique.	20
The TOM machinery is a new actor in PINK1/Parkin-dependent mitochondrial clearance	21
The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse	22
Les paramètres cinétiques des déshydrogénases déterminent les mécanismes de compétition pour l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire.	23
Drug screening of human mtDNA instability diseases using <i>Saccharomyces cerevisiae</i> and <i>Caenorhabditis elegans</i> as model organisms	24
La protéine UCP2 contrôle la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses	25
Resveratrol prevents hypertension-induced oxidative stress, CaMKII phosphorylation and mitochondrial biogenesis in aorta	26
The cardioprotective effect of TRO40303 might be due to inhibiting respiration in stressed cells	27



Le Losartan protège les îlots de Langerhans humains du stress mitochondrial induit par le glucose	28
Polychlorobiphényles et fonction mitochondriale hépatique	29
Interrelation entre les altérations mitochondriales et le stress du réticulum endoplasmique dans la cellule bêta pancréatique en situation de lipotoxicité.	31
Stratégie de thérapie antigénomique de maladies mitochondriales humaines utilisant la voie d'import des ARN dans les mitochondries	32
In situ detection of mitochondria-endoplasmic reticulum interactions by proximity ligation assay: potential role of altered organelle interactions in hepatic insulin resistance.	33
Rôle d'OPA1 dans l'adaptation du muscle squelettique à un exercice chronique	34
Ontogenèse des processus bioénergétiques musculaires chez le poussin manchot Adélie ( <i>Pygoscelis adeliae</i> )	35
Decreasing Mitochondria-Endoplasmic Reticulum interactions induces hepatic ER stress and alter insulin signaling.	36
TRMU gene mutations in three cases of neonatal mitochondrial hepatopathy	37
Différence de cardiotoxicité induite par les anthracyclines : pourquoi les mâles sont plus sensibles que les femelles ?	39
A study of human respiratory complex III defects	40
Functional mitochondria in avian erythrocytes: Perspectives for ageing & evolutionary studies	42
Prediction of Liver Injury induced by chemicals in Human with a Multiparametric Assay on Isolated Mouse Liver Mitochondria	44
Mutation in the rieske iron sulfur protein triggers caspase-independent neurodegeneration in <i>Drosophila</i>	45
Characterisation of proteins targeting a yeast tRNA and its derivaives into human mitochondria	47
Construction d'une lignée cellulaire contenant des quantités variables d'ADNmt via l'extinction de l'expression de TFAM	48
Inactivation of the hif-1 $\alpha$ /pdk3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants	49
Rôle de SIRT1 dans la régulation de la réponse au stress du réticulum endoplasmique et de l'apoptose dans les cellules cardiaques H9c2	50
Mitochondria and stem cells: new in vivo models to explore the impact of mtDNA alterations on development and aging.	51
PTP inhibitors prevent ethanol-induced neurotoxicity	52
Rôle de Msp1 dans la dynamique mitochondriale et le maintien du génome mitochondrial chez la levure <i>S. pombe</i>	53
Sub-mitochondrial distribution of human aminoacyl-tRNA synthetases (mt-aaRSs)	54
High conservation of 3D structural networks in metazoan mitochondrial tRNAs	55
Experimental determination of organelle targeting peptide cleavage sites using transient expression of GFP translational fusions	56
Oligomerization of ATP synthase and mitochondrial morphology from yeast to human cells	57

## Computational identification of transcriptionally co-regulated genes, validation with the four ANT isoform genes

### Affiliation :

INRA, UMR 1019, Unité de Nutrition Humaine, F-63122 St Genès-Champanelle, Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, BP 10448, F-63000 Clermont-Ferrand

### Résumé :

The analysis of gene promoters is essential to understand the mechanisms of transcriptional regulation required under the effects of physiological processes, nutritional intake or pathologies. In higher eukaryotes, transcriptional regulation implies the recruitment of a set of regulatory proteins that bind on combinations of nucleotide motifs. We developed a computational analysis of promoter nucleotide sequences to identify co-regulated genes by combining several programs that allowed us to build regulatory models and perform a crossed analysis on several databases. This strategy was tested on a set of four human genes encoding isoforms 1 to 4 of the mitochondrial ADP/ATP carrier ANT. Each isoform has a specific tissue expression profile linked to its role in cellular bioenergetics. From their promoter sequence and from the phylogenetic evolution of these ANT genes in mammals, we constructed combinations of specific regulatory elements. These models were screened using the full human genome and databases of promoter sequences from human and several other mammalian species. For each of transcriptionally regulated ANT1, 2 and 4 genes, a set of co-regulated genes was identified and their over-expression was verified in microarray databases. Most of the identified genes encode proteins with a cellular function and specificity in agreement with those of the corresponding ANT isoform. The tissue specific gene expression is mainly driven by promoter regulatory sequences located up to about a thousand base pairs upstream the transcription start site. This study should provide, along with transcriptomics and metabolomics, assistance in developing cellular metabolic networks and their regulatory pathways.

Primary authors : Dr. STEPIEN, Georges (INRA)

Co-authors : Dr. DUPONT, Pierre - Yves (Université d'Auvergne)

Presenter : Dr. STEPIEN, Georges (INRA)



## Proline catabolism in plant mitochondria and water Stress

### Affiliation :

Université Pierre et Marie Curie (Paris 6), UR5 CNRS-UPMC

### Résumé :

Proline is a proteinogenic iminoacid known to play an essential role in redox homeostasis, osmotic adjustment, protection against stress and signalling in many organisms (Servet et al., 2010). In response to water stress, plants usually accumulate proline. In plants, proline synthesis in response to stress occurs both in the cytosol and chloroplasts. Proline degradation upon stress recovery occurs mainly in mitochondria. We are studying proline utilization by plant mitochondria during water stress recovery. The two-step oxidation of proline is performed by two enzymes. Proline dehydrogenase (ProDH), also known as proline oxidase (POX), catalyzes the first step. ProDH activity is FAD-dependent and produces delta1-pyrroline-5-carboxylate (P5C), which forms a non-enzymatic equilibrium with glutamate semialdehyde (GSA). P5C dehydrogenase (P5CDH) then oxidizes GSA to glutamate. We show here that proline can be used by purified mitochondria from leaf tissues as a respiratory substrate under stress recovery. Using various stress conditions and Arabidopsis mutants for the two genes encoding ProDH, we identify which gene encodes the functional mitochondrial ProDH enzymes. Servet C, Ghelis T, Richard L, Zilberstein A, Savoure A. (2012) Proline dehydrogenase: a key enzyme in controlling cellular homeostasis Front Biosci. (17) :607-20.

Primary authors : Dr. CABASSA, Cécile (Université Pierre et Marie Curie Paris 6, UR5 CNRS-UPMC)

Co-authors : Dr. PLANCHAIS, Séverine (Université Pierre et Marie Curie Paris 6, UR5 CNRS-UPMC) ; Prof. CAROL, Pierre (Université Pierre et Marie Curie Paris 6, UR5 CNRS-UPMC) ; Prof. SAVOURÉ, Arnould (Université Pierre et Marie Curie Paris 6, UR) ; Dr. ABROUS-BELBACHIR, Ouzna (Equipe de Physiologie Végétale Laboratoire de Biologie et Physiologie des Organismes Faculté des Sciences Biologiques USTHB Alger)

Presenter : Dr. CABASSA, Cécile (Université Pierre et Marie Curie Paris 6, UR5 CNRS-UPMC)



## Linking endothermy and mitochondrial proton leak to variation in the pace of life of mammals and birds

### Affiliation :

Pierre Bize 1, Mikko Lehto 1, François Criscuolo 2 1. Department of Ecology & Evolution, University of Lausanne, Switzerland 2.Département Ecologie, Physiologie et Ethologie, IPHC, CNRS-UDS, Strasbourg, France

### Résumé :

Endothermy is at the heart of the evolutionary success of mammals and birds, allowing them to become adapted to a very broad range of ecological conditions. The endogenous production of heat, even at rest and in the absence of muscular contraction, is tightly linked to mitochondrial proton leak which favours the conversion of food into heat at the expense of ATP production, and by extension of reproduction and growth. Beside its important role in energy balance, mitochondrial proton leak appears also to limit mitochondrial ROS production at the benefit of long term health and survival. Because mitochondrial proton leak is enhanced in response to cold exposure, we propose the novel 'rate-of-heating hypothesis' suggesting that in endotherms adaptation to the cold selects for greater (basal and induced) mitochondrial proton leak, resulting in lower mitochondrial efficiency and production of ROS, that in turn favour the evolution of the frequently reported slower life-history trajectories in organisms at higher altitudes and closer to the poles. We report results from a common garden experiment on common voles showing that high altitude individuals have evolved toward a slower pace of life, and that this shift in life history covaries with changes in induced mitochondrial proton leak measured as nonshivering thermogenesis.

Primary authors : Dr. BIZE, Pierre (Université de Lausanne)

Co-authors : Mr. LEHTO, Mikko (Universtié de Lausanne) ; Dr. CRISCUOLO, François (CNRS Strasbourg)

Presenter : Dr. BIZE, Pierre (Université de Lausanne)



## Contrôle de l'assemblage du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale via la protéine AAA, Bcs1.

### Affiliation :

Jelena Ostojic 1, Cristina Panozzo 1, Cécile Nouet 1, Jean-Paul Lasserre 2, Florence Courtin 2, Jean-Paul di Rago 2, Geneviève Dujardin 1 1 Centre de Génétique Moléculaire, Université Paris-Sud, 1 avenue de la Terrasse, 91198-Gif sur Yvette cedex,

### Résumé :

Bcs1p est une protéine mitochondriale conservée de la levure à l'homme, appartenant à la famille des protéines AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities). Elle est nécessaire à l'assemblage du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Bcs1 est ancrée à la membrane mitochondriale interne via un segment transmembranaire et expose son domaine AAA du côté matriciel. Le substrat de Bcs1 est la sous-unité catalytique Rip1 du complexe III qui est synthétisée dans le cytoplasme et ensuite importée dans la matrice mitochondriale où elle s'associe avec un cluster fer-soufre. Dans les mutants bcs1, des intermédiaires tardifs et inactifs de l'assemblage du complexe III s'accumulent. Chez l'homme, des mutations ponctuelles dans le gène BCS1L sont responsables de diverses pathologies plus ou moins graves qui vont du syndrome de Bjornstad au syndrome léthal GRACILE. Pour mieux comprendre le rôle des différents domaines de Bcs1, nous avons construit une collection de mutants ponctuels dans BCS1 et isolé des mutations extragéniques capables de compenser la déficience respiratoire de ces mutants. Nous avons étudié les mécanismes moléculaires responsables de ces compensations qui apportent de nouvelles données sur la régulation de l'assemblage du complexe III et les interactions entre les différents complexes de la chaîne respiratoire.

Primary authors : Ms. OSTOJIC, Jelena (Centre de Génétique Moléculaire (CGM), CNRS, Gif sur Yvette. Equipe Dujardin)

Co-authors :

Presenter : Ms. OSTOJIC, Jelena (Centre de Génétique Moléculaire (CGM), CNRS, Gif sur Yvette. Equipe Dujardin)



## Atypical mitochondrial fission upon *Listeria* infection

**Affiliation :**

Fabrizia Stavru and Pascale Cossart Unité des Interactions Bactéries-Cellules, Institut Pasteur; U604, Inserm; USC2020, INRA; 25-28 rue du Dr Roux, 75015 Paris, France.

**Résumé :**

We have recently shown that infection by *Listeria monocytogenes* causes fragmentation of the mitochondrial network through the secreted pore-forming toxin listeriolysin O (LLO). Here, we examine mechanistic aspects of this fragmentation and find that, surprisingly, it does not depend on the key mitochondrial dynamics factors Drp1 and Opa1. LLO-induced mitochondrial fragmentation therefore seems atypical and differs drastically from uncoupler-induced mitochondrial fragmentation. Furthermore, Drp1 appears to dissociate from mitochondria upon LLO-induced fragmentation due to degradation of its recently described receptor Mff. Collectively, our data shows a new mode of regulation for the mitochondrial fission protein Drp1 by pore-forming toxins.

Primary authors : Dr. STAVRU, Fabrizia (Institut Pasteur) ; Prof. COSSART, Pascale (Institut Pasteur)

Co-authors :

Presenter : Dr. STAVRU, Fabrizia (Institut Pasteur)



## A plant mitochondrial carrier involved in photorespiration

### Affiliation :

UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)

### Résumé :

BOU (A BOUT DE SOUFFLE) is a plant mitochondrial carrier family (MCF) protein, which was first described as a putative acyl carnitine carrier, although its genuine transport function is still unknown (Lawand et al., 2002). Here we show that BOU is required for photorespiration and necessary for meristem growth in Arabidopsis seedlings at the transition from heterotrophy to autotrophy. When BOU function is loss in a recessive bou mutant, cells do not divide in shoot and roots. Meristematic growth can be restored by the addition of external sugar. bou accumulates high levels of amino acids, particularly glycine, an intermediate in the photorespiration pathway. When bou is grown at a high CO<sub>2</sub> concentration, meristem cells divide and glycine is less abundant, indicating that photorespiration is defective in bou. Compared to the wild-type transcriptome, 6% of the bou seedling transcriptome is altered with downregulation of genes for DNA replication, photosynthesis, and carbon metabolism. BOU-dependent transport to the mitochondria is therefore essential for photorespiration that apportions metabolites essential for cell division and growth before autotrophy is established in the C<sub>3</sub> plant Arabidopsis. Lawand et al., (2002) The Plant Cell 14(9):2161-73

Primary authors : Dr. PLANCHAIS, Severine (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6))

Co-authors : Dr. CABASSA, Cécile (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)) ; Dr. GUIVARC'H, Anne (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6)) ; Dr. CAROL, Pierre (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6))

Presenter : Dr. PLANCHAIS, Severine (UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS 6))



## How to inhibit bcl complex with antimycin A?

### Affiliation :

Université Bordeaux Segalen - Laboratoire de métabolisme énergétique cellulaire - IBGC/CNRS - 1 rue Camille Saint-Saëns - 33077 Bordeaux cedex

### Résumé :

Using a stochastic simulation without any other hypotheses, we have demonstrated the natural emergence of the Mitchell Q-cycle in the functioning of the bcl complex, with few short-circuits and a very low occupancy of the reactive semiquinone species in the Qo site [1]. However, this simple model fails to explain both the inhibition by antimycin of the bcl complex and the accompanying increase in ROS production. To obtain inhibition of electron transfer to the high potential chain in the presence of antimycin, it is necessary to block the electron transfer from the reduced haem bL to the semiquinone in the Qo site (short-circuit or bypass of type 2) [2]. Incorporating this constraint in our stochastic model, we obtain a sigmoid inhibition curve due to the fact that when only one antimycin is bound per bcl dimer, the electron of the inhibited monomer systematically crosses the dimer interface to reduce a quinone or a semiquinone species in the other (free) Qi site (bL - bL path). Because this step is not limiting, the activity is unchanged (compared to the activity of the free dimer). Interestingly, this bL - bL pathway is almost exclusively taken in this half-bound antimycin dimer. In the free dimer, the natural faster pathway is bL - bH on the same monomer (at least in the absence of  $\Delta\mu\text{H}^+$ ). The addition of the assumption of half-of-the-sites reactivity to the previous hypothesis leads to a transient activation in the antimycin titration curve preceding a quasi-complete inhibition at antimycin saturation. In accordance with the chemistry of quinone, we have examined the possibility that the return of the electron from the reduced haem bL to the semiquinone in Qo could be blocked if we take into account the protons transfer and release from the Qo site accompanying the electron transfer. However preliminary simulations show that it not sufficient to completely block this bypass. We are currently trying to define more precisely the steps necessarily or possibly involved in the antimycin inhibition of bcl complex and their chemical/physical basis [3]. [1] Ransac S, Parisey N and Mazat J-P (2008) The loneliness of electrons in the bcl complex. *Biochim Biophys Acta* 1777:1053-9. [2] Ransac S, Mazat J-P (2010) How antimycin inhibits the bcl complex? A part-time twin. *Biochim Biophys Acta* 1797:1849-1857. [3] Springett R et al. Slip and Leak in the bcl complex.

Primary authors : Dr. RANSAC, Stéphane (Université Bordeaux Segalen - CNRS/IBGC)

Co-authors : SPRINGETT, Roger (2- Dartmouth Medical School) ; Prof. MAZAT, Jean- Pierre (Université Bordeaux Segalen - CNRS/IBGC)

Presenter : Dr. RANSAC, Stéphane (Université Bordeaux Segalen - CNRS/IBGC)



## Mesure in situ de la respiration mitochondriale de neurones primaires issus de modèles animaux des maladies de Huntington et de Parkinson

### Affiliation :

(1) Trophos, Parc Scientifique de Luminy, Luminy Biotech Entreprises, Case 931, Marseille, France (2) Dept. of Medical Genetics, University of Tuebingen, Germany.

### Résumé :

Les maladies neurodégénératives constituent un groupe de pathologies progressives liées à un dysfonctionnement métabolique au niveau du système nerveux central, conduisant à la mort des neurones. Aujourd'hui, les causes précises de cette mort ne sont pas clairement établies mais de plus en plus de travaux orientent vers un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, des défauts mitochondriaux, notamment dans la capacité de stockage du calcium, dans la dynamique mitochondriale et la mitophagie ainsi que dans le fonctionnement de la chaîne respiratoire ont été mis en évidence chez des patients et dans des modèles cellulaires et animaux de ces maladies. Cependant, ces résultats sont parfois contradictoires d'un modèle à l'autre et sont encore sujets à discussion. Dans cette étude nous avons mesuré la capacité énergétique des mitochondries dans des cultures primaires de neurones embryonnaires. La majorité des études sur le sujet ont été réalisées sur des mitochondries isolées de cerveaux ce qui ne permet pas d'étudier la fonction énergétique dans son contexte cellulaire, et ce qui ne permet pas non plus d'étudier spécifiquement les mitochondries des différents sous types cellulaires présents dans le cerveau (neurones, astrocytes, microglie et oligodendrocytes). L'étude de la respiration mitochondriale dans les neurones primaires a été très largement facilitée par le développement d'une nouvelle technologie de mesure de respiration in situ à l'aide de l'analyseur XF24 de Seahorse Bioscience. Cet appareil permet de mesurer la respiration cellulaire directement dans la plaque de culture sans détacher les neurones de la surface de la plaque préservant ainsi l'ensemble de leurs prolongements dendritiques, une région très dense en mitochondries et probablement fortement impliquée dans la neurodégénérescence. A l'aide de cet instrument, nous avons mesuré les différents stades de respiration de neurones primaires en présence de différents substrats. Nous avons observé que bien que le glucose ait longtemps été considéré comme le principal, voir le seul substrat du cerveau, les neurones primaires utilisent aussi efficacement le pyruvate, le lactate ou les corps cétoniques (Beta-hydroxybutyrate). Dans ce poster, nous présentons la capacité des neurones corticaux et striataux provenant d'un modèle de la maladie de Huntington (le rat BAC-HD transgénique pour une forme mutante de huntingtine) et d'un modèle de la maladie de Parkinson (la souris invalidée pour le gène Parkin) à utiliser ces différents substrats.

Primary authors : Ms. GOUARNE, Caroline (TROPHOS)

Co-authors : Mr. GIRAUDON PAOLI, Marc (TROPHOS)

Presenter : Ms. GOUARNE, Caroline (TROPHOS) ; Mr. GIRAUDON PAOLI, Marc (TROPHOS)



## Involvement of mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase Sirt3 in the regulation of myoblast differentiation.

### Affiliation :

INRA, UMR 866 - Dynamique Musculaire et Métabolisme, Montpellier, France

### Résumé :

Sirt3, one of the seven mammalian sirtuins, is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>)-dependent deacetylase, and has been shown to control multiple key metabolic pathways. Sirt3 deacetylates and activates a large number of mitochondrial enzymes implicated in the activity of respiratory chain and ATP production, TCA and Urea cycles. We have previously shown that mitochondrial activity is importantly involved in the regulation of myoblast differentiation. Since sirt3 modulates mitochondrial activity, we have investigated its influence on myoblast differentiation. In this purpose, we have first evaluated endogen sirt3 expression during C2C12 myoblast differentiation and then we examined the effect of its overexpression or inhibition on the differentiation processes and on mitochondrial activity. We have shown that sirt3 protein expression increased after the induction of myoblast differentiation. A transient sirt3 overexpression in C2C12 myoblasts induced the expression of Myogenin and p21 even in proliferative conditions (10% of Fetal Bovine Serum). On the other hand, stable inhibition of sirt3 expression, using short hairpin sirt3 (sh sirt3) in C2C12 myoblasts resulted in: 1) abrogation of terminal differentiation reflected by a sharp decrease of the fusion index and a significant decrease of Myogenin, MyoD and Troponin T protein expression; 2) a decrease in mitochondrial density and activity reflected by alterations in PGC1- $\alpha$ , VDAC and citrate synthase expression, and a decrease in respiratory chain complexes activity and myoblast maximal respiration. These data suggest that sirt3 plays an important role in the regulation of myoblast differentiation through its influence on mitochondrial activity.

Primary authors : Ms. ABDEL KHALEK, Waed (UMR866 INRA)

Co-authors :

Presenter : Ms. ABDEL KHALEK, Waed (UMR866 INRA)



## The Drosophila inner-membrane protein PMI controls cristae biogenesis and mitochondrial diameter

### Affiliation :

Institut de Biologie du Développement de Marseille-Luminy (IBDML) CNRS UMR 7288 / Aix-Marseille Université, Campus de Luminy Case 907, F-13288 MARSEILLE cedex 9, France

### Résumé :

Cristae are mitochondrial inner-membrane structures which concentrate respiratory chains complexes and therefore regulate ATP production. Mechanisms controlling cristae morphogenesis are poorly understood and only few cristae determinants have been identified. Among them are the Mitofilin that are required to establish cristae junctions and ATP-synthase subunits that bend membrane at cristae tips. We report here that the *in vivo* inactivation of the inner-membrane associated protein PMI dramatically alters cristae biogenesis and organization. We show that mitochondria of Drosophila PMI mutant contain highly elongated and disorganized cristae. These cristae defaults are associated with impaired respiratory chain activity and increase in ROS release. At the organism scale, these mitochondrial alterations cause synaptic defects and premature death of the adult fly. Since PMI and its human ortholog TMEM11 have been shown to regulate mitochondria morphogenesis, we propose that by controlling cristae elongation, PMI influences mitochondria diameter and shape.

Primary authors : Dr. RIVAL, Thomas (INSTITUT DE BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DE MARSEILLE LUMINY)

Co-authors : Mr. MACCHI, Marc (INSTITUT DE BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DE MARSEILLE LUMINY) ; Prof. ROYET, Julien (INSTITUT DE BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DE MARSEILLE LUMINY)

Presenter : Dr. RIVAL, Thomas (INSTITUT DE BIOLOGIE DU DEVELOPPEMENT DE MARSEILLE LUMINY)



## Dynamics of the mitochondrial DNA processing in single cells reveal correlation with the cell cycle and resistance to stress

### Affiliation :

Laurent Chatre and Miria Ricchetti Institut Pasteur, Unité de Génétique Moléculaire des Levures, CNRS URM 3525, Team Stability of Nuclear and Mitochondrial DNA, 25 rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

### Résumé :

Mitochondria are implicated in a variety of cellular functions and mitochondrial dysfunctions are associated with a large number of diseases in humans which include myopathies, and neurodegenerative and metabolic disorders. Mitochondria carry their own genome (mtDNA) and have independent DNA replication and transcription apparatus. Yet, mtDNA transcription and replication are poorly investigated as indicators of the mitochondrial function, at least at the single-cell level. To gain insight into the mitochondrial morpho-dynamics and physiology in mammalian cells, we use a combination of molecular biology, biochemistry and cell biology approaches, and a novel imaging procedure (mitochondrial transcription and replication initiation protocol, mTRIP) that we developed. mTRIP is based on FISH coupled to immunofluorescence and on the identification of a specific sequence in the regulatory D-loop, that allow the simultaneous 3D tracking of mtDNA initiation of replication and transcription, and also of proteins in single cells. Fluorescence quantification estimates the proportion of transcript-rich and replication-active mitochondria in single cells. We observe at least three classes of mitochondrial structures in human cells: i) replication initiation active and transcript-positive ii) replication initiation silent and transcript-positive, and iii) replication initiation silent and transcript-negative. Thus, individual mitochondria are quantitatively heterogeneous within single cells. These mitochondrial populations are highly dynamic and they vary when physiological and pathological parameters are altered, making mTRIP a powerful tool for mitochondrial analysis. We aim to elucidate how mitochondrial sub-populations dynamics contribute to cell fitness and survival under physiological and pathological conditions. We found that, contrary to the current view, mtDNA transcription and replication initiation are prevalently correlated with the cell cycle. This coordination is achieved by modulating the fraction of mitochondrial structures that initiate mtDNA synthesis and/or contain transcript at a given time. Thus, although replication of the mitochondrial genome is active through the entire cell cycle, but in a limited fraction of mitochondrial structures, peaks of these activities are synchronized with nuclear DNA synthesis. Finally, we investigated mitochondrial dynamics in adult muscle stem cells, which sustain tissue homeostasis and tissue regeneration after injury, and we found that mitochondria contribute, through a still unknown mechanism, to the extraordinary survival of these cells several days post-mortem (Latil et al. 2012, Nature Communications 3:903).

Primary authors : Dr. CHATRE, Laurent (CNRS CR2)

Co-authors : Dr. RICCHETTI, Miria (Institut Pasteur, Paris, France)

Presenter : Dr. CHATRE, Laurent (CNRS CR2)



## FUNDC2 : a novel mitochondrial protein

### Affiliation :

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, 31400 Toulouse

### Résumé :

Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA-1) is a common cause of inherited visual failure affecting at least 1 in 50 000 of the general population. OPA1 mutations are the main genetic cause of ADOA-1, driving to bilateral symmetrical optic atrophy due to specific loss of retinal ganglion cells. Although optic nerve degeneration remains the hallmark of ADOA-1, a syndromic form of the pathology called "ADOA-1 plus", including deafness, ataxia, myopathy, peripheral neuropathy and progressive external ophthalmoplegia, was recently reported to affect up to 20% of all mutations carriers. More than 200 mutations have been listed, the major part are truncations therefore supporting haploinsufficiency that we mimicked using a siRNA strategy to down-regulate OPA1 expression in human cells. In this context, we found a 50% increase of a protein predicted to be a novel mitochondrial protein: FUNDC2 (Fun Domain Containing 2). The coding gene FUNDC2 is localised on Xq28 and its function is actually unknown. This gene was found deleted in a patient with haemophilia (Sheen et al., 2007) or mutated in a patient with myopia (Ratnamala et al., 2011) but none of these phenotypes is dependent on FUNDC2. Global approaches as proteinpedia suggested FUNDC2 is a mitochondrial protein (Simpson et al., 2000). In silico analysis predict a mitochondrial localization and MIS sequence in the first 26 aminoacids (target P <http://www.cbs.dtu.dk> and [mitoprot http://ihg.gsf.de/cgi-bin/](http://ihg.gsf.de/cgi-bin/)). A very recent paper revealed that FUNDC1 (another member of the FUNDC family) is an integral mitochondrial outer-membrane protein and a receptor for hypoxia-induced mitophagy (Liu et al., 2012). Then, we focused our attention on the localisation of endogenous FUNDC2 but also on GFP fusion proteins to circumvent intra-cellular localisation of FUNDC2. We confirmed this mitochondrial localization by cell imaging in control and transfected GFP-tagged-FUNDC2 in mitotracker labelled mitochondria and by immunoblots on mitochondrial enrichments from HeLa cells. Last results will be presented on the poster. Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., et al. (2012). Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nature cell biology* 14, 177-185. Ratnamala, U., Lyle, R., Rawal, R., Singh, R., Vishnupriya, S., Himabindu, P., Rao, V., Aggarwal, S., Paluru, P., Bartoloni, L., et al. (2011). Refinement of the X-linked nonsyndromic high-grade myopia locus MYP1 on Xq28 and exclusion of 13 known positional candidate genes by direct sequencing. *Investigative ophthalmology & visual science* 52, 6814-6819. Sheen, C.R., Jewell, U.R., Morris, C.M., Brennan, S.O., Ferec, C., George, P.M., Smith, M.P., and Chen, J.M. (2007). Double complex mutations involving F8 and FUNDC2 caused by distinct break-induced replication. *Human mutation* 28, 1198-1206. Simpson, J.C., Wellenreuther, R., Poustka, A., Pepperkok, R., and Wiemann, S. (2000). Systematic subcellular localization of novel proteins identified by large-scale cDNA sequencing. *EMBO reports* 1, 287-292.

Primary authors : Mrs. MILLET, Aurélie ((1) Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse)

Co-authors : Mrs. DASTOR, Margaux (1) ; Dr. MILS, Valérie (1) ; Dr. BELENGUER, Pascale (1) ; Dr. DAVEZAC, Noémie (1)

Presenter : Dr. DAVEZAC, Noémie (1)



## Loss of OPA1 induces perturbation of oxidative metabolism and antioxidant defenses activation

### Affiliation :

Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse

### Résumé :

Autosomal Dominant Optic Atrophy (ADOA-1) is a common cause of inherited visual failure affecting at least 1 in 50 000 of the general population. OPA1 mutations are the main genetic cause of ADOA-1, causing bilateral symmetrical optic atrophy due to specific loss of retinal ganglion cells. Although optic nerve degeneration remains the hallmark of ADOA-1, a syndromic form called "ADOA-1 plus", including deafness, ataxia, myopathy, peripheral neuropathy and progressive external ophthalmoplegia, was recently reported to affect up to 20% of all mutations carriers. More than 200 mutations have been listed, the major part are truncations therefore supporting haploinsufficiency as the major pathogenic mechanism of ADOA-1. However, an increased rate of missens mutations were detected in the syndromic form of the disease suggesting an alternate dominant negative mechanism. To assess the consequences of OPA1 mutations on energetic metabolism and redox states, two supposed pathological mechanisms leading to ADOA-1, we mimicked haploinsufficiency phenomenon, using a siRNA strategy to down-regulate OPA1 expression in human cells and in embryonic rat neurons in primary culture. The existence of energetic defects in ADOA-1 patients are indeed controversial: (i) defective muscle mitochondrial oxidative metabolism was described in vivo (ii) coupling defect of oxidative phosphorylation and reduction of complex I or IV activities were observed in skin fibroblasts (iii) while no perturbation occurred in lymphoblastoid cells. On the other hand, while mutations in invertebrate OPA1 orthologs were shown to increase ROS levels and to lead to exogenous ROS hypersensitivity, nothing was demonstrated in mammals. In this work, we showed that expression levels and enzymatic activities of some proteins belonging to the citrate cycle were significantly decreased in HeLa cells treated with siOPA1 when compared to cells treated with a siRNA control. Expression levels of some subunits of the first four respiratory chain complexes were also decreased, while ATP synthase was not affected. Enzymatic activities of the respiratory complexes and respiratory levels in OPA1 depleted cells are under investigation. However, neither total NAD<sup>+</sup>/NADH nor ATP levels were affected by down-regulation of OPA1 expression. On the other hand, we observed a nuclear translocation of the Nuclear factor erythroid-2-Related Factor 2 (NRF2), a major antioxidant transcription factor, in OPA1 down-regulated HeLa cells. We detected increased protein expression or enzymatic activities levels of some NRF2 targets such as superoxide dismutase, catalase and GSTP1 in OPA1 down-regulated HeLa cells or neurons. Then, we observed a 35% inhibition of aconitase activity, without diminution in its quantity, in both model. To extend the physiological significance of these findings, we are now performing similar analysis in ADOA-1 patients' fibroblasts. Preliminary results showed an heterogeneity of nuclear NRF2 translocation with patients who are able to activate NRF2 pathway and others who can't. In the same way, two "ADOA-1 plus" patients present no detectable expression of superoxide dismutase 1 and 2. Altogether, these results suggest that OPA1 down-regulation or mutations induce a pro-oxidative state involving the NRF2 signalling pathway and that some patients seem to present very low antioxidant defenses, thus opening a novel way of reading ADOA-1 pathogenesis. To complete this approach, we identified the interactome of OPA1 in neurons. This identification clearly highlights co-actors for OPA1 functions

Primary authors : Mrs. MILLET, Aurélie (Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse)

Co-authors : Dr. BERTHOLET, Ambre (Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse) ; Mrs. DALOYAU, Marlene (Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse) ; Dr. AGIER, Virginie (Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle, UMR 7225, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris) ; Dr. LOMBES, Anne (Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle, UMR 7225, Hôpital de la Pitié Salpêtrière, 47-83 boulevard de l'Hôpital, 75651 Paris) ; Dr. GALINIER, Anne (STROMALab, UMR 5273, CHU Toulouse-Hôpital de Rangueil - bat. L1 - RDC bas - 1 Avenue Jean Poulhès, 31432 Toulouse) ; Dr. CHEVROLLIER, Arnaud (U694 INSERM, CRNH Angers, UFR Sciences médicales, Rue Haute de Reculée, 49045 Angers) ; Dr. REYNIER, Pascal (U694 INSERM, CRNH Angers, UFR Sciences médicales, Rue Haute de Reculée, 49045 Angers) ; Dr. BELENGUER, Pascale (Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse) ; Dr. DAVEZAC, Noélie (Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse)

Presenter : Mrs. MILLET, Aurélie (Centre de Biologie du Développement, UMR 5547, Bâtiment IVR3b1 Université Toulouse III, 118 route de Narbonne, Toulouse)

## An in silico approach to model the assembly pathway of protein complexes III and IV in *Saccharomyces cerevisiae*.

### Affiliation :

(1) CNRS, Centre de Génétique Moléculaire, UPR3404, Gif-sur-Yvette, F-91198 (2) LIGM, UMR8049, 5 bd Descartes, 77454 Champs sur Marne (3) Université Pierre et Marie Curie- Paris 6, Paris, F-75005

### Résumé :

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is a model for the analysis of the complexes of the oxidative phosphorylation chain. While the structure and the catalytic mechanisms of the complexes are well established, their biogenesis is far from being fully understood. In a previous study we demonstrated how an in silico study of protein-protein interaction (PPI) networks can help to identify new factors involved in the biogenesis of the respiratory complexes. This approach allowed us to identify a protein interacting with the complex III subunits, located within the mitochondria and involved in the biogenesis of the respiratory complexes III and IV [1]. It has also highlighted the strong connections between subunits and assembly factors of the complexes III and IV. Now we are developing methods to model the succession of events leading to the formation of the complexes. Using the APID and BioGRID databases we collect all the PPI concerning the subunits of the studied complex. As PPI can be identified by several different experiments we eliminate the redundancy to construct a network composed of unique PPI. This is represented by a graph where every node corresponds to a protein and every edge to an interaction. We then weighted the edges between the subunits of the complex. The weight of an edge between two nodes (two subunits) is computed as the relative number of nodes of the sub-network resulting from the intersection of the direct neighbourhoods of each subunit. To identify assembly modules, the subunits of the complex were clustered by a method based on modularity TFitW [2]. Finally, we applied a hierarchical clustering based on the weights between the subunits to find the order of assembly of each subunit leading to the assembly modules. For the complex III we obtained two assembly modules: one with Cor1p, Qcr2p and Cyt1p, and the other with Qcr6p, Qcr7p, Qcr8p, Qcr10p, Cobp and Rip1p, they cannot be divided further. Qcr9p is absent because experimental PPI results are missing for this protein. Our data can be compared with assembly models obtained by other methods [3]. For the complex IV, we obtained two communities: the first is composed of six proteins and can be divided in two modules, one includes Cox1p, Cox2p and Cox3p, and the second Cox4p, Cox5Ap and Cox6p. The second community is composed of Cox7p, Cox8p, Cox9p, Cox12p, Cox13p and Cox5Bp, and cannot be divided further. Our approach is also well adapted to study the formation of the super-complexes III IV. We obtained two communities displaying strong connections between both complexes. The first includes 12 proteins and can be divided in four modules of three proteins: Cor1p, Qcr2p and Cyt1p, and Qcr6p, Cobp and Rip1p which are part of complex III; Cox1p, Cox2p and Cox3p, and Cox4p, Cox5Ap and Cox6p, which are part of complex IV. The second community is composed of ten proteins, it can be divided in two modules one with Cox8p, Cox9p, Cox12p, Cox13p and Cox5Bp and the second with Qcr7p, Qcr8p, Qcr9p, Qcr10p and Cox7p. These results must be confirmed by biological experiments, but we can construct hypotheses about the assembly pathway of the complexes. [1] A. Glatigny et al. BMC Syst Biol (2011) 5, 173. [2] P. Gambette & Alain Guenoche RAIRO - Operations Research (2011) 45, 339-352. [3] V. Zara et al. Biochim Biophys Acta (2009) 1793, 89-96.

Primary authors : Mrs. GLATIGNY, Annie (1)

Co-authors : Mr. TRAN, Viet- Dung (Université Paris 11) ; Mr. GAMBETTE, Philippe (2) ; Mrs. MUCCHIELLI-GIORGI, Marie- Hélène (3)

**Presenter : Mrs. GLATIGNY, Annie (1)**

## Étude de la production d'espèces réactives de l'oxygène par les mitochondries cardiaques subsarcolemmales et interfibrillaires par résonance paramagnétique électronique.

### Affiliation :

EA 4651 ABTE-ToxEMAC, UFR Médecine Pharmacie, Rouen, France

### Résumé :

Un rôle important de la mitochondrie réside dans sa capacité à produire des espèces réactives de l'oxygène, en particulier au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Au niveau du tissu cardiaque, les mitochondries représentent une source majeure d'EROs, impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques. Pour autant, l'interprétation du rôle exact joué par ces EROs reste délicate étant donné leur fugacité qui rend difficile leur mise en évidence, ainsi que la présence de deux populations différentes de mitochondries, les mitochondries subsarcolemmales (SSM) et les interfibrillaires (IFM). Si des différences morphologiques et fonctionnelles ont été observées entre ces deux populations, les mécanismes de production d'EROs demeurent pour l'instant mal connus. Par conséquent l'objectif de ce travail a été de caractériser la production d'EROs par ces deux populations mitochondriales en utilisant la résonance paramagnétique électronique, après isolement de mitochondries cardiaques de rats Wistar. Les mitochondries fraîchement isolées ont été incubées en présence de glutamate/malate ou de succinate avec et sans inhibiteur (roténone, antimycine A) et un « spin probe » qui permet de piéger spécifiquement et rapidement les anions superoxydes formés. Deux spin-probes différents ont été utilisés, un connu comme étant perméable à la membrane interne mitochondriale (CMH) et un autre, imperméable (CPH) afin d'établir la topologie de la production. Nos résultats montrent que les deux populations ne présentent pas les mêmes caractéristiques en terme de production d'O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: Les SSM produisent plus d'EROs lorsqu'elles respirent avec les substrats du complexe I qu'avec le succinate, alors que le phénomène inverse est observé dans les IFM. Dans les deux populations, les EROs générées par le complexe I de la chaîne respiratoire sont produites préférentiellement vers la matrice mitochondriale alors que les EROs générées par le complexe III se retrouvent à la fois dans la matrice mitochondriale et dans l'espace intermembranaire. Enfin, la production d'EROs dans les SSM sous succinate est inhibée par la roténone (inhibiteur du complexe I), témoignant de la présence d'un flux reverse d'électrons du complexe II vers le complexe I et produit vers la matrice mitochondriale, flux reverse qui ne se vérifie pas pour les IFM. Nos résultats ont permis de voir que les deux populations de mitochondrie présentent des caractéristiques différentes, justifiant le fait de les étudier séparément afin de mettre en évidence un effet différentiel éventuel.

Primary authors : Mr. CROCHEMORE, Clement (EA 4651 ABTE-ToxEMAC, UFR Médecine Pharmacie, Rouen, France)

Co-authors : Ms. DUVAL, Mélanie (EA 4651 ABTE-ToxEMAC, UFR Médecine Pharmacie, Rouen, France) ; Ms. VENDEVILLE, Cathie (EA 4651 ABTE-ToxEMAC, UFR Médecine Pharmacie, Rouen, France) ; Mr. MORIN, Jean-paul (EA 4651 ABTE-ToxEMAC, UFR Médecine Pharmacie, Rouen, France) ; Ms. MONTEIL, Christelle (EA 4651 ABTE-ToxEMAC, UFR Médecine Pharmacie, Rouen, France)

Presenter : Mr. CROCHEMORE, Clement (EA 4651 ABTE-ToxEMAC, UFR Médecine Pharmacie, Rouen, France)



## The TOM machinery is a new actor in PINK1/Parkin-dependent mitochondrial clearance

### Affiliation :

CRICM, INSERM UMR\_S975, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

### Résumé :

Parkinson's disease (PD) is a common neurodegenerative disorder of unknown etiology. Nearly 10% of PD cases are of autosomal dominant or recessive inheritance. Mutations in the Park2 and Park6 genes - encoding the cytosolic E3 ubiquitin- protein ligase Parkin and the mitochondrial serine/threonine kinase PINK1 - cause early onset, autosomal-recessive PD. Studies in *Drosophila* demonstrated that parkin and PINK1 cooperate within a pathway, leading to severe mitochondrial phenotypes when altered. Recent reports in mammalian cells revealed a role for the PINK1/Parkin pathway in the clearance of dysfunctional mitochondria: after dissipation of the mitochondrial membrane potential (DPsi) triggered by the protonophore carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP), Parkin is recruited to the depolarized organelles in a PINK1/dependent manner, leading to their degradation by the proteasome and autophagy pathways. Since mitochondrial protein import is dependent on DPsi, we addressed the possibility that the mitochondrial recruitment of Parkin is due to alteration of import efficacy. Co-localisation analyses in cells demonstrated that Parkin is recruited to the mitochondrion in different paradigms of mitochondrial import block, including CCCP treatment. FRET (Förster's Resonance Energy Transfer) and FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) analyses in cells and isolated mitochondria revealed physical proximity between Parkin and the TOM (Translocase of Outer Membrane) machinery. These interactions were abolished in the absence of PINK1 or by PD-causing Park2 mutations. Furthermore, the moderate, siRNA-mediated down-regulation of specific TOM subunits was sufficient to trigger the clearance of outer mitochondrial membrane (OMM) and intermembrane space markers (VDAC1, cytochrome c) in cells treated with CCCP, in the absence of PINK1 and Parkin. However, Parkin was indispensable for whole organelle clearance, as evaluated by the disappearance of mitochondrial matrix markers (MPP, HSD10). Altogether, our results indicate that mitochondrial import impairment leads to the PINK1-dependent recruitment of Parkin to the mitochondrion, where it interacts with the TOM machinery to trigger mitochondrial clearance. Thus, we propose that the TOM machinery is a multi-functional platform within the PINK1/Parkin pathway, coupling mitochondrial protein import efficacy to organelle disposal; this role may be of relevance to the pathophysiology of PD

Primary authors : Ms. BERTOLIN, Giulia (CRicm UMR\_S975)

Co-authors : Mrs. FERRANDO-MIGUEL, Rosa (CRicm UMR\_S975) ; Dr. DAUPHIN, Aurélien (CRicm UMR\_S975) ; Dr. WAHARTE, François (UMR 144) ; Mr. GRENIER, Karl (McGill University) ; Dr. LOMBÈS, Anne (Inserm UR1016) ; Dr. BULTEAU, Anne- Laure (CRicm UMR\_S975) ; Dr. FON, Edward (McGill University) ; Prof. BRICE, Alexis (CRicm UMR\_S975) ; Dr. CORTI, Olga (CRicm UMR\_S975)

Presenter : Ms. BERTOLIN, Giulia (CRicm UMR\_S975)



## The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse

### Affiliation :

E Sarzi, C Angebault, M Seveno, N Gueguen, B Chaix, G Bielicki, N Boddaert, A-L Mausset-Bonnefont, C Cazevieille, V Rigau, J-P Renou, J Wang, C Delettre, P Brabet, J-L Puel, C P Hamel, P Reynier, G Lenaers

### Résumé :

Dominant Optic Atrophy (DOA) is a rare inherited optic nerve degeneration caused by mutations in the mitochondrial fusion gene OPA1. Recently, the clinical spectrum of DOA has been extended to frequent syndromic forms, exhibiting various degrees of neurological and muscle impairments frequently found in mitochondrial diseases. Although characterized by a specific loss of retinal ganglion cells, the DOA pathophysiology is still poorly understood. We generated an Opa1 mouse model carrying the recurrent OpaldelTTAG mutation, found in 30% of all DOA patients. We show that this mouse displays multi-systemic poly-degenerative phenotype, with a presentation associating signs of visual failure, deafness, encephalomyopathy, peripheral neuropathy, ataxia and cardiopathy. Moreover, we found premature age-related axonal and myelin degenerations, increased autophagy and mitophagy, and mitochondrial supercomplex instability, preceding degeneration and cell death. Thus, these results support the concept that Opa1 protects against neuronal degeneration and open new perspectives for the exploration and the treatment of mitochondrial diseases.

Primary authors : Mrs. SARZI, Emmanuelle (Inserm U1051)

Co-authors : Mrs. ANGEBAULT, Claire (Inserm U1051) ; Ms. SEVENO, Marie (Inserm U1051) ; Mrs. GUEGUEN, Naïg (Inserm U1083) ; Mr. CHAIX, Benjamin (Inserm U1051) ; Mr. BIELICKI, Guy (Inra UR370) ; Dr. BODDAERT, Nathalie (Service de Radiologie Pédiatrique Hôpital Necker Enfants Malades) ; Mrs. MAUSSET-BONNEFONT, Anne- Laure (Inserm U844) ; Mrs. CAZEVIEILLE, Chantal (6Centre de Recherche en Imagerie Cellulaire de Montpellier) ; Dr. RIGAU, Valérie (Service d'Anatomie et Cytologie Pathologique, CHU Guy de Chauliac, Montpellier) ; Mr. RENOUE, Jean- Pierre (Inra UR370) ; Mrs. WANG, Jing (Inserm U1051) ; Mrs. DELETTRE, Cécile (Inserm U1051) ; Mr. BRABET, Philippe (Inserm U1051) ; Prof. PUEL, Jean-Luc (Inserm U1051) ; Prof. HAMEL, Christian (Inserm U1051) ; Prof. REYNIER, Pascal (Inserm U1083) ; Mr. LENAERS, Guy (Inserm U1051)

Presenter : Mrs. SARZI, Emmanuelle (Inserm U1051)



## Les paramètres cinétiques des déshydrogénases déterminent les mécanismes de compétition pour l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire.

### Affiliation :

L. Kaiser, M. Heiske, N. Avéret, A. Mourier, O. Bunoust, S. Ransac, J.P. Mazat, A. Devin et M. Rigoulet IBGC, CNRS-UMR 5095, 1 rue Camille Saint-Saëns, 33077 Bordeaux cedex ; Université Bordeaux Segalen, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux cedex.

### Résumé :

Chez *S. cerevisiae*, les plus importants systèmes contrôlant l'excès de NADH cytosolique sont les NADH déshydrogénases externes mitochondriales (Nde1p et Nde2p) et la navette glycérol-3-phosphate déshydrogénase. Dans ce dernier système, le NADH est oxydé en NAD<sup>+</sup> et la dihydroxyacétone phosphate est réduite en glycérol-3-phosphate (G3P) par la glycérol-3-phosphate déshydrogénase cytosolique (Gpd1p). Le G3P donne alors ses électrons à la chaîne respiratoire via la glycérol-3-phosphate déshydrogénase mitochondriale (Gut2p). Nous avons montré que (1) : - à des concentrations saturantes en NADH, l'activation des NADH déshydrogénases externes inhibe complètement l'oxydation du G3P. Cette inhibition est due à une compétition pour l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. - grâce à l'utilisation des simples mutants de délétion de Nde1p ou Nde2p, nous avons montré que l'oxydation du G3P via la Gut2p est totalement inhibée quand le NADH est oxydé via la Nde1p, alors qu'elle est inhibée seulement à 50% quand la Nde2p oxyde le NADH. - les électrons provenant de Nde1p sont prioritaires sur ceux provenant de la NADH déshydrogénase interne (Ndi1p). - les électrons provenant soit de Nde1p soit de Nde2p et de la succinodéshydrogénase, sont utilisés par la chaîne respiratoire de façon comparable. Ces résultats suggèrent une compétition spécifique pour l'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire, qui n'est pas due à l'organisation supramoléculaire de cette dernière (2). Une telle compétition favorise la réoxydation du NADH cytosolique. Par la détermination des paramètres cinétiques des différentes déshydrogénases externes et par l'utilisation d'un modèle stochastique de fonctionnement du complexe I, nous avons montré que les différentes modalités de compétition des électrons, observés sur plusieurs souches de levure, pourraient être dues aux paramètres cinétiques propres aux déshydrogénases concernées. Références : (1) O. Bunoust, A. Devin, N. Avéret, N. Camougrand and M. Rigoulet. Competition of electrons to enter the respiratory chain : a new regulatory mechanism of oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 3407-3413. (2) M. Rigoulet, A. Mourier, A. Galinier, L. Casteilla and A. Devin. Electron competition process in respiratory chain : Regulatory mechanisms and physiological functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1797 (2010) 671-677.

Primary authors : Mr. KAISER, Laurent (Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires du CNRS)

Co-authors : Dr. AVERET, Nicole (IBGC, CNRS-UMR 5095) ; Dr. RANSAC, Stephane (IBGC, CNRS-UMR 5095)

Presenter : Dr. AVERET, Nicole (IBGC, CNRS-UMR 5095) ; Dr. RANSAC, Stephane (IBGC, CNRS-UMR 5095)



## Drug screening of human mtDNA instability diseases using *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* as model organisms

### Affiliation :

UMR 8621, Laboratoire de Fonctions et Dysfonctions des Mitochondries, Université Paris-Sud XI, Orsay, France

### Résumé :

The instability of mitochondrial DNA (mtDNA) in form of mtDNA depletion or large deletion is one of the most common cause of mitochondrial diseases. Two genes responsible for human mtDNA stability, POLG and OPA1 genes are exploited in this study. POLG gene codes for human mitochondrial polymerase gamma, while OPA1 gene codes for a dynamin-like protein that plays role in mitochondrial network fusion. In human, mutations in POLG gene lead to Progressive External Ophthalmoplegia (PEO), Alper's syndrome, and ataxia-neurodegenerative disorders. On the other hand, OPA1 mutation is the cause of human Dominant Optic Atrophy disorder. Currently, there is no effective and disease-specific cure for these diseases. The aim of our study is to identify active molecules to counteract mtDNA instability using two model organisms : *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans*. We have obtained six active compounds from the screening of 1500 pharmaceutically tested molecules on POLG mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, mip1G651S and mip1C261R that correspond to human POLG mutation G848S and S305R respectively. The confirmation of drug activity was done by examining yeast growth on respiratory substrate at non-permissive temperature with the presence of drug. Our preliminary results showed that two compounds were able to reduce mtDNA instability (petite colonies) in mip1G651S mutant. In *C. elegans* strain VC1224, a POLG haploinsufficient worm with egg laying deficiency that likely correlated to mtDNA instability, have been treated by one of the two compounds and present an increase in the number of viable egg produced. In other mutant of *C. elegans* strain DA631 (homozygote mutant of eat-3 gene, OPA1 homolog) we have also tested several other drugs that have been proven effective in yeast mutant of OPA1 gene, (Tribouillard-Tanvier, D. et Blondel, M. ; personal communication). DA631 animals are currently treated and under observation. Subsequently, the study will be focused on drug mechanism of phenotype improvement in both models and their cross activity between POLG and OPA1 models. The drugs will be also tested on fibroblasts of patient, in order to understand their effect on human system. The ensemble of our preliminary results shows *S. cerevisiae* and *C. elegans* as promising pharmacological tools in drug development for mitochondrial diseases.

Primary authors : Ms. PITAYU, Laras (Laboratoire Fonctions et Dysfonctions des Mitochondries, IGM, Orsay)

Co-authors : Dr. BARUFFINI, Enrico (Facoltà di Science, Università Degli Studi di Parma, Italie) ; Dr. LODI, Tiziana (Facoltà di Science, Università Degli Studi di Parma, Italie) ; Dr. DELAHODDE, Agnès (Laboratoire Fonctions et Dysfonctions des Mitochondries, IGM, Orsay)

Presenter : Ms. PITAYU, Laras (Laboratoire Fonctions et Dysfonctions des Mitochondries, IGM, Orsay)



## La protéine UCP2 contrôle la reprogrammation métabolique des cellules cancéreuses

### Affiliation :

Institut Cochin, INSERM U1016 - CNRS UMR 8104 - Université Paris V Faculté de médecine Cochin, Département Endocrinologie, Cancer et Métabolisme 24 rue du Faubourg Saint- Jacques, 75014 PARIS

### Résumé :

La mitochondrie est au centre de la régulation du métabolisme énergétique et toutes modifications ou anomalies du fonctionnement mitochondrial jouent un rôle dans le développement tumoral. Au sein du laboratoire nous étudions le rôle encore mal connu de la protéine mitochondriale UCP2. Cette protéine intervient dans différentes maladies inflammatoires en participant au contrôle de la production des espèces réactives de l'oxygène. De plus, les fibroblastes embryonnaires *ucp2*<sup>-/-</sup> prolifèrent plus et utilisent la voie glycolytique au détriment de l'oxydation des acides gras. Notre projet a pour but de déterminer si UCP2, en régulant la production des espèces réactives de l'oxygène et/ou le métabolisme des cellules, pourrait jouer un rôle dans le développement tumoral. Dans notre étude, nous avons choisi d'exprimer de manière stable différents niveaux de la protéine UCP2 dans plusieurs types de lignées cancéreuses. UCP2 entraîne une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses. En effet, nous avons mis en évidence une corrélation négative entre le niveau d'expression d'UCP2 et la prolifération des cellules cancéreuses. Cet effet anti-prolifératif ne résulte pas d'une augmentation du niveau d'apoptose ni d'une toxicité liée à la surexpression de la protéine. En revanche, elle est associée à la diminution de l'activation de plusieurs voies impliquées dans la régulation de la prolifération cellulaire. Au niveau de la fonction mitochondriale, les cellules qui surexpriment UCP2 ont une réserve respiratoire augmentée sans modification de leur respiration mitochondriale basale. Cette capacité respiratoire est associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de certains complexes OXPHOS. Les cellules surexprimant UCP2 ont un flux entrant de pyruvate vers le cycle de Krebs plus important. Donc, les cellules cancéreuses surexprimant UCP2 développent un switch métabolique en faveur d'une oxydation mitochondriale plus importante. Ces résultats montrent qu'UCP2 est capable de reprogrammer des cellules cancéreuses prolifératives vers un état plus différencié.

Primary authors : ESTEVES, Pauline (Institut Cochin) ; RANSY, Céline (Institut Cochin) ; ESNOUS, Catherine (Institut Cochin) ; BULTEAU, Anne- Laure (Institut Cochin) ; LOMBES, Anne (Institut Cochin) ; BOUILLAUD, Frédéric (Institut Cochin) ; PRIP-BUUSS, Carina (Institut Cochin) ; RICQUIER, Daniel (Institut Cochin) ; ALVES-GUERRA, Marie- Clotilde (Institut Cochin)

Co-authors :

Presenter : ESTEVES, Pauline (Institut Cochin)



## Resveratrol prevents hypertension-induced oxidative stress, CaMKII phosphorylation and mitochondrial biogenesis in aorta

### Affiliation :

INSERM, U-769, Univ Paris-Sud F-92296 Châtenay-Malabry, France; Univ Paris-Sud, IFR 141,

### Résumé :

**Aim:** Hypertension is commonly accompanied by ROS production leading to a high oxidative stress in blood vessels. ROS are known to activate PGC-1 $\alpha$ , a master regulator of mitochondrial biogenesis. However, how mitochondrial biogenesis is controlled in response to oxidative stress in vascular smooth muscle cells remains unknown. The aim of this study was to investigate the regulation of mitochondrial biogenesis in hypertension and in response to oxidative stress, as well as the mechanisms of the protective effect of resveratrol known to have metabolic and anti-oxidant properties. **Results:** Hypertension led to a large increase in oxidative stress and mitochondrial biogenesis in aorta of Dahl salt-sensitive rats. This increase was mimicked in vitro in rat vascular smooth muscle cells (VSMCs) by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, an oxidative stressor. These effects were associated with CaMKII activation both in vivo and in vitro studies. Reducing oxidative stress by resveratrol treatment in our animal model (20 mg/kg/d) or in VSMCs (20 $\mu$ M) decreased oxidative stress, mitochondrial biogenesis induction and CaMKII phosphorylation. Moreover, the inhibition of CaMKII by KN93 (10  $\mu$ M) in VSMCs blunted the oxidative stress-induced mitochondrial biogenesis, suggesting a key role of CaMKII in the ROS regulation of vascular mitochondrial biogenesis. **Innovation and conclusion:** We provide first evidence that hypertension leads to an increase in vascular mitochondrial biogenesis mediated by oxidative stress-dependent CaMKII activation. Resveratrol, by its anti-oxidant properties, reduces CaMKII phosphorylation and consequently vascular mitochondrial biogenesis. Reducing ROS level or CaMKII activity could be a promising therapeutic approach to improve vascular function in hypertension.

**Primary authors :** Mr. RUIZ, Matthieu (Inserm U769)

**Co-authors :** Dr. RIMBAUD, Stéphanie (Inserm U769) ; Mrs. ZURLO, Giada (Inserm U769) ; Ms. FORTIN, Dominique (Inserm U769) ; Mr. HUBERT, Fabien (Inserm U769) ; Prof. VEKSLER, Vladimir (Inserm U769) ; Dr. VENTURA-CLAPIER, Renée (Inserm U769) ; Dr. GARNIER, Anne (Inserm U769)

**Presenter :** Mr. RUIZ, Matthieu (Inserm U769)



## The cardioprotective effect of TRO40303 might be due to inhibiting respiration in stressed cells

### Affiliation :

Trophos S.A., Luminy Biotech Entreprise, Marseille, Fr.

### Résumé :

**Purpose:** TRO40303 is a new cardioprotective compound that reduces infarct size and promotes recovery of heart function in rodent models of myocardial infarction. This compound binds to the outer mitochondrial membrane protein TSPO 18 kDa, reduces oxidative stress and calcium overload in primary cardiomyocytes, inhibits mitochondrial permeability transition and reduces release of apoptotic factors from the mitochondria (1). We hypothesized that the reduction of ROS production might be related to an inhibition of the respiratory chain. In order to explore this hypothesis, the effect of TRO40303 on cellular respiration was investigated. **Methods:** Primary neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells were treated for 24h with various concentrations of TRO40303 (from 3 to 30  $\mu\text{M}$ ) and compared to cells treated with vehicle (DMSO 0.1%). Cellular respiration was measured using the Seahorse XF analyzer. The oxygen consumption rate (OCR) was measured under basal conditions then following successive additions of oligomycin (inhibitor of ATP synthase), FCCP (uncoupling agent) and rotenone, malonate or antimycin A (respectively inhibitors of complexes 1, 2 and 3). Cell survival was verified after respiration measurements using calcein AM staining. Additionally, respiratory complex activities of complexes I, II and IV (respectively NADH dehydrogenase, succinate dehydrogenase and cytochrome c oxidase) were measured in cellular extracts of primary neonatal rat cardiomyocytes by spectrophotometry. Primary neonatal rat cardiomyocytes were treated for 24h with TRO40303 at 3  $\mu\text{M}$  before cell extraction. **Results:** Pre-treatment with TRO40303 for 24h had no significant effect on basal OCR of primary neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 cells. By contrast, the maximal respiration rate induced by FCCP was reduced by TRO40303 in a dose response relationship in both cell types with a significant reduction at 3 and 10  $\mu\text{M}$  for primary neonatal rat cardiomyocytes, and at 15  $\mu\text{M}$  for H9c2 cells. No inhibition of cell survival was detected in these cells up to 10 and 15  $\mu\text{M}$  in primary neonatal rat cardiomyocytes and H9c2 respectively. No inhibition of the complexes activity was detected in cellular extracts of primary neonatal rat cardiomyocytes treated for 24h with TRO40303 at 3  $\mu\text{M}$ . **Conclusion:** these results show that 24h treatment with TRO40303 is able to inhibit maximal respiration in primary neonatal rat cardiomyocytes (at 3 and 10  $\mu\text{M}$ ) and H9c2 cells (at 15  $\mu\text{M}$ ) but does not inhibit directly respiratory chain complex activities. As respiration-driven oxidative phosphorylation is the mechanism for both ATP and ROS production by mitochondria, the mechanism by which TRO40303 is cytoprotective might be related to an inhibition of ROS production as a result of transient inhibition of cellular respiration in stressed cells allowing time for mitochondrial membrane potential to be restored. 1: Schaller S, Paradis S, Ngoh GA, Assaly R, Buisson B, Drouot C, et al. TRO40303, a new cardioprotective compound, inhibits mitochondrial permeability transition. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Jun;333(3):696-706.

**Primary authors :** Mr. ARNOUX, Thomas (Private society)

**Co-authors :** Dr. DE PAULIS, Damien (Private society) ; Dr. GOUARNÉ, Caroline (Private society) ; Ms. CLEMANÇON, Isabel (Private society) ; Ms. GABRIAC, Mélanie (Private society) ; Dr. PRUSS, Rebecca (Private society) ; Dr. SCHALLER, Sophie (Private society)

**Presenter :** Mr. ARNOUX, Thomas (Private society)



## Le Losartan protège les îlots de Langerhans humains du stress mitochondrial induit par le glucose

### Affiliation :

Inserm U1060 CarMeN Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon-Sud 69921 Oullins Cedex France

### Résumé :

**Introduction :** La glucotoxicité entraîne à long-terme une dysfonction Bêta cellulaire des îlots de Langerhans, qui conduit à un défaut de sécrétion d'insuline en réponse au glucose, et l'apparition du diabète de type 2 (DT2). Une analyse prospective récente a montré que les inhibiteurs du récepteur de type 1 à l'angiotensine 2 (AT1R), diminuaient de 25% l'incidence du DT2 (The Navigator Study Group, NEJM, 2010) chez des patients à risque atteints d'un syndrome métabolique. Nous avons donc analysé au niveau mitochondrial dans des îlots de Langerhans humains, les effets délétères d'un traitement chronique de glucose à concentration élevée telle que rencontrée dans le DT2. Le système rénine-angiotensine (SRA) ayant été mis en évidence dans les cellules Bêta pancréatiques, nous avons aussi étudié les possibles effets bénéfiques du Losartan, inhibiteur spécifique de l'AT1R, dans ces conditions. **Matériel et méthodes :** 4 préparations d'îlots de Langerhans humains (ECIT, Genève; UMTT Grenoble) ont été cultivées en DMEM 5,5 mM ou 16,7 mM de glucose et 5% SVF durant 96h avec ou sans Losartan (5µM) les 48h dernières heures. Nous avons mesuré la sécrétion d'insuline en réponse aiguë au glucose (GSIS), et le taux d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) intracellulaires. Nous avons analysé la structure des mitochondries par microscopie électronique, mesuré par oxygraphie la respiration mitochondriale des îlots en réponse aiguë au glucose (20mM), et dosé les OxPhos (protéines des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale) par Western-Blot (OxPhos Cocktail, Mitosciences), et l'expression génique d'ATP5B par RT-qPCR. **Résultats :** Le traitement chronique des îlots humains par du glucose 16,7 mM entraîne une réduction de la GSIS ( $p < 0.01$ ), ainsi qu'une structure altérée et une augmentation de taille des mitochondries ( $173 \pm 20\%$  vs.  $100 \pm 25\%$ ,  $p < 0.001$ ). Ce traitement entraîne une production accrue d'ERO ( $p < 0.01$ ), la baisse de la capacité respiratoire mitochondriale ( $p < 0.02$ ), ainsi qu'une diminution du niveau protéique des complexes I ( $p < 0.01$ ), III ( $p < 0.05$ ), et V ( $p < 0.05$ ) de la chaîne respiratoire, comparé aux îlots contrôles (5,5 mM glucose). L'addition de Losartan prévient l'ensemble de ces effets : il restaure la fonction Bêta pancréatique ( $p = NS$ ), la surface ( $113 \pm 31\%$ ;  $p = NS$ ) et la fonction mitochondriale ( $p = NS$ ), les niveaux d'OxPhos (I et V:  $p = NS$ ), et réduit le taux d'ERO de moitié, comparé aux îlots contrôles. **Conclusion :** un traitement chronique au glucose entraîne une dysfonction Bêta cellulaire pancréatique. Cet effet est médié par l'activation de processus délétères qui altère la fonction mitochondriale. Le Losartan, inhibiteur du système rénine-angiotensine (SRA), prévient l'ensemble de ces processus et restaure la sécrétion d'insuline. L'inhibition du SRA apparaît comme une clef de la prévention du diabète de type 2, et se révèle prometteur dans l'amélioration de la survie des îlots au cours de greffes.

**Primary authors :** Mr. CASSEL, Roméo (Inserm U1060 CarMeN)

**Co-authors :**

**Presenter :** Mr. CASSEL, Roméo (Inserm U1060 CarMeN)



## Polychlorobiphényles et fonction mitochondriale hépatique

### Affiliation :

(1) Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U1055, UJF, Grenoble, France; (2) Laboratoire Cœur et Nutrition, TIMC-IMAG CNRS UMR 5525, Fac. Méd., UJF, Grenoble, France; (3) Université de Lorraine, INRA, UR AFPA, Nancy, France

### Résumé :

Les PolyChloroBiphényles (PCB) désignent la famille de composés de synthèse organochlorés d'origine anthropique. Ces composés peuvent contaminer la chaîne alimentaire et ainsi présenter des risques pour la santé humaine. Plus de 90% de l'exposition totale aux PCB est issue de la consommation des produits animaux tels que les poissons gras, la viande et les produits laitiers. Des travaux sur les rongeurs ont montré l'effet délétère des PCB. En effet, les PCB administrés à fortes doses ( $\geq 1 \mu\text{g}/\text{kg PV}$ ) entraînent une augmentation de la mort cellulaire et du stress oxydant dans le foie et le cerveau. De plus, il a été montré que, à fortes doses, les dioxines, molécules chimiquement proches des PCB, induisent des altérations de la fonction mitochondriale. Ces études sont menées, le plus souvent, avec une seule molécule, à forte toxicité, à forte dose et en aigue. Elles ne reflètent donc pas une exposition réaliste, caractérisée par une ingestion chronique à faible dose d'un mélange de PCB. Afin d'approcher les conditions réelles d'exposition, nous avons soumis un groupe de rats ( $n=7$ ) à un gavage avec du lait contaminé aux PCB, pendant une période de huit semaines. En parallèle, un autre groupe de rats témoins a été gavé avec du lait non contaminé. La dose en PCB administrée représentait cinq fois la Dose Journalière Acceptable soit  $50 \text{ ng}/\text{kg PV}/\text{j}$ . Le foie étant un tissu-cible privilégié des toxiques comme les PCB, nous avons analysé les perturbations de la fonction mitochondriale dans ce tissu à travers l'étude de la respiration, de la production mitochondriale de  $\text{H}_2\text{O}_2$  et de l'ouverture du pore de transition de perméabilité. Les premiers résultats de cette étude montrent que, même à faible dose, les PCB réduisent la respiration des mitochondries du foie de rat en conditions phosphorylantes (état 3) et ce, quel que soit le substrat de respiration. L'inhibition est de 21 % en présence de glutamate/malate (GM) ( $p<0,01$ ) et de 29 % en présence du succinate (Suc) ( $p<0,05$ ). De plus, une réduction de la respiration mitochondriale de 6,8% est observée en présence du Suc seul (état 2) ( $p<0,05$ ). Enfin, la consommation d'oxygène en présence de TMPD/Ascorbate en condition DNP est également réduite de 34% ( $p<0,05$ ). Les mitochondries des rats traités aux PCB n'ont présenté une production de ROS plus faible qu'en présence du Suc ( $p<0,05$ ). Les investigations menées sur la capacité de rétention calcique (CRC) des mitochondries de rats traités ne montrent aucune différence par rapport aux témoins en condition GM et Suc. Cependant, la capacité de rétention calcique est augmentée de 25% lorsque le Suc est associé à la cyclosporine A ( $p<0,01$ ). Il apparaît à travers ces résultats que les PCB apportés à faible dose perturbent de manière significative la fonction mitochondriale. Ces résultats suggèrent que les PCB pourraient agir à la fois sur l'ATP synthase comme déjà démontré dans la littérature mais aussi sur le complexe II de la chaîne respiratoire. Cette inhibition du complexe II pourrait être responsable d'une diminution du flux reverse expliquant la diminution de la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$  par la mitochondrie en présence de Suc. Ces données montrent pour la première fois que des doses faibles répétées d'un mélange de PCB sont à l'origine de perturbations multiples et significatives. Des investigations complémentaires sur le stress oxydant, les défenses antioxydantes et l'apoptose (immuno-marquages avec des anticorps anti-caspases) au niveau hépatique sont actuellement en cours.

Primary authors : Dr. OUNNAS, Fayçal (1 et 2)

Co-authors : Dr. LAMARCHE, Frédéric (1) ; Dr. HININGER, Isabelle (1) ; Mrs. OSMAN, Mireille (1) ; Mrs. CONTRERAS, Marion (1) ; Dr. PRIVE, Florence (1 et 2) ; Dr. SALEN, Patricia (2) ; Prof. DE LORGERIL, Michel (2) ; Prof. FEIDT, Cyril (3) ; Prof. FONTAINE, Eric (1) ; Dr. DEMEILLIERS, Christine (1)

Presenter : Dr. OUNNAS, Fayçal (1 et 2)

## Interrelation entre les altérations mitochondriales et le stress du réticulum endoplasmique dans la cellule bêta pancréatique en situation de lipotoxicité.

### Affiliation :

INSERM U.1060 - Laboratoire CarMeN "Laboratoire de recherche en Cardiovasculaire, Métabolisme, Diabétologie et Nutrition" de l'Université de Lyon

### Résumé :

Introduction: L'incapacité des cellules pancréatiques à sécréter de l'insuline en réponse à une stimulation glucidique est un des défauts majeurs associés au diabète de type 2 (DT2). L'environnement nutritionnel, notamment lipidique, joue un rôle important dans les altérations fonctionnelles du pancréas, principalement en altérant les mitochondries et le réticulum endoplasmique (RE), deux organites essentiels au maintien de l'homéostasie énergétique cellulaire et qui sont fortement associés au DT2. Néanmoins, les mécanismes à l'origine des altérations des mitochondries et du RE sont encore mal connus et se pose ainsi la question de l'existence d'une inter-relation entre ces défauts. L'objectif de notre étude a consisté à analyser in vivo et in vitro les effets du palmitate sur l'intégrité et le fonctionnement des mitochondries et du réticulum endoplasmique des cellules bêta, et de déterminer si leurs altérations en situation de lipotoxicité étaient inter-reliées. Méthodes : Des cellules bêta-pancréatiques en culture (MIN6B1) ont été exposées durant 24h à 200 ou 500  $\mu$ M de palmitate. Des îlots ont été extraits à partir de pancréas de souris ayant suivi soit un régime standard soit un régime enrichi en huile de palme (20%) pendant 8 semaines. Dans les deux cas, nous avons mesuré la respiration mitochondriale par oxygraphie, évalué l'état de stress du RE par RT-PCR et mesuré la sécrétion d'insuline en réponse à une stimulation glucose. L'implication du stress du RE dans les altérations mitochondriales induites par le palmitate a été déterminée en inhibant le stress du RE par une chaperone chimique, le 4-PBA. Résultats : Les analyses de RT-PCR ont révélé la présence d'un stress du réticulum dans les cellules MIN6B1 dès 200 $\mu$ M de palmitate. Cette altération est associée à une diminution de 75% de la sécrétion d'insuline et de 40% de la respiration cellulaire consécutive à une stimulation glucose. Celles-ci sont en partie restaurées par l'utilisation de 10mM de 4-PBA, suggérant que le stress du RE participe aux altérations mitochondriales induite par le palmitate. In vivo, des souris soumises à un régime enrichi en huile de palme pendant 8 semaines présentent une intolérance au glucose et une diminution de la sensibilité à l'insuline. Leurs îlots pancréatiques sont incapables d'augmenter leur production basale d'insuline suite à une stimulation glucose et présentent un défaut de respiration cellulaire associé à un stress du réticulum endoplasmique. Des études complémentaires sont en cours pour déterminer le rôle du stress du RE dans ces altérations. Conclusion : Nos résultats démontrent qu'une exposition à de faible concentration de palmitate suffit à induire des altérations majeures au niveau du RE et des mitochondries pancréatiques. Le stress du RE pourrait précéder et participer aux altérations mitochondriales en situation de lipotoxicité.

Primary authors : Dr. VIAL, Guillaume ((1) Inserm U1060)

Co-authors : Mr. CASSEL, Roméo (1) ; Dr. MADEC, Anne-Marie (1) ; Mrs. CHAUVIN, Marie-Agnès (1) ; Ms. TUBBS, Emily (1) ; Dr. VIDAL, Hubert (1) ; Prof. THIVOLET, Charles (1) ; Dr. RIEUSSET, Jennifer (1)

Presenter : Dr. VIAL, Guillaume ((1) Inserm U1060)



## Stratégie de thérapie antigénomique de maladies mitochondriales humaines utilisant la voie d'import des ARN dans les mitochondries

### Affiliation :

(1) UMR 7156 Uds/CNRS, 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France. (2) Institut de Biologie Chimique et Fondamentale, Novossibirsk, Russie. (3) Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moëlle (CRICM), Paris, France.

### Résumé :

Un nombre important de pathologies neuromusculaires humaines sont provoquées par des mutations dans l'ADN mitochondrial (ADNmt). La majorité de ces mutations sont dites hétéroplasmiques : les molécules d'ADNmt mutées coexistent au sein de la même cellule avec des molécules d'ADNmt sauvages. Les symptômes n'apparaissent qu'à partir d'un certain seuil et leur sévérité dépend du taux d'hétéroplasmie. Notre but est de développer une stratégie de thérapie de maladies humaines à hérédité mitochondriale en utilisant la voie d'importation des ARN dans les mitochondries pour réduire le taux d'hétéroplasmie des mutations pathogéniques, l'approche est dite anti-génomique. Pour mettre au point une telle stratégie, nous exploitons les propriétés de l'ARNr 5S humain naturellement importé dans la mitochondrie, et de l'ARNtLys de levure qui peut y être adressé d'une manière artificielle. En introduisant un insert complémentaire au fragment du gène mitochondrial portant la mutation pathogénique, ces ARN peuvent être utilisés comme vecteurs afin de diminuer la quantité d'ADNmt muté en défavorisant la réplication de l'ADNmt muté. L'importation mitochondriale de ces ARN transgéniques ainsi que leur capacité à inhiber sélectivement la réplication de l'ADNmt muté ont été démontrés in vitro et in vivo. Cet effet anti-répliatif a été obtenu dans des cellules cybrides porteuses d'une large délétion associée à un cas pathologique (syndrome de Kearns Sayre, KSS) et d'une mutation ponctuelle A13514>G dans le gène ND5 (syndrome de type MELAS). Pour confirmer l'effet anti-répliatif d'un point de vue phénotypique, nous avons analysé l'organisation du réseau mitochondrial par microscopie. Après avoir quantifié le nombre de mitochondries par cellule et la proportion de celles ayant un potentiel membranaire élevé, nous avons ainsi pu voir que la morphologie du réseau mitochondrial différait entre les cellules sauvages et les cellules mutantes. L'étude de l'effet de l'expression d'ARN transgéniques sur la morphologie du réseau mitochondrial est actuellement en cours et sera discutée. Des études sont également en cours pour analyser l'efficacité de la transfection grâce à des ARN marqués par des groupes fluorescents permettant de suivre leur progression au sein de la cellule transfectée. Ce travail est soutenu par la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), l'Université de Strasbourg, le CNRS, le réseau international SupraChem et par le programme "Investissements Avenir" (Labex "MitoCross")

Primary authors : Mrs. HECKEL, Anne- Marie (1)

Co-authors : Mr. TONIN, Yann (1) ; Dr. COMTE, Caroline (1) ; Mrs. DOVYDENKO, Ilya (2) ; Dr. LOMBES, Anne (3) ; Dr. MARTIN, Robert (1) ; Dr. ENTELIS, Nina (1) ; Dr. TARASSOV, Ivan (1)

Presenter : Mrs. HECKEL, Anne- Marie (1)



## In situ detection of mitochondria-endoplasmic reticulum interactions by proximity ligation assay: potential role of altered organelle interactions in hepatic insulin resistance.

### Affiliation :

INSERM U1060 - INRA 1235 Laboratoire CarMeN Faculté de médecine Lyon Sud 165, Chemin du Grand Revoyet 69600 Oullins France

### Résumé :

In situ detection of mitochondria-endoplasmic reticulum interactions by proximity ligation assay: potential role of altered organelle interactions in hepatic insulin resistance. Emily Tubbs 1 , Pierre Theurey 1 , Fabien Zoulim 2 , Michel Ovize 1 , Hubert Vidal 1 and Jennifer Rieusset 1 1 INSERM U1060, Laboratoire CarMeN, Lyon, France 2 INSERM U1042, Lyon, France Introduction: Mitochondria and endoplasmic reticulum (ER) are interconnected organelles. Their close contacts, known as mitochondria-associated membranes (MAM), play a pivotal role in Ca<sup>2+</sup> signalling and energy metabolism. Particularly, Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria involves the VDAC/Grp75/IP3R1 complex. Whereas the ER-mitochondria crosstalk determines the fate of cells, its role in pathological contexts is unknown due to limited quantitative detection of ER-mitochondria interactions. The aim of the study was to validate the in situ detection of ER- mitochondria interactions by proximity ligation assay (PLA), and investigate their role in hepatic insulin resistance (HIR). Methods: We used in situ PLA to visualize and quantify the proximity between ER and mitochondrial proteins within the VDAC/Grp75/IP3R1 complex, reflecting ER- mitochondria interactions. We validated the method in HuH7 cells by measuring VDAC1/IP3R1 or Grp75/IP3R1 interaction, following perturbation of ER-mitochondria interaction by modulating the expression of MAM proteins (silencing and/or transient overexpression of VDAC1 and Grp75). We investigated the role of organelle interactions in HIR by inhibiting cyclophilin D (a new mitochondrial protein of MAM interface) with NIM811, in primary human hepatocytes (PHH). Results: We demonstrated that the VDAC/Grp75/IP3R1 complex could be visualized by in situ PLA in HuH7 cells. Down-regulation of VDAC1 or Grp75 expression by siRNA (25 nM, 48hours) reduced VDAC1/IP3R1 (-100% and -50%, respectively, p<0,05) and Grp75/IP3R1 (-40% and -60%, respectively, p<0,05) interactions, whereas transient overexpression of Grp75 (2µg plasmid, 48hours) increased them (+63% for VDAC1/IP3R1 and +77% for Grp75/IP3R1, p<0,05) in HuH7 cells. Lastly, we demonstrated that NIM811 treatment reduced cypD/IP3R1 and VDAC1/IP3R1 interactions (-52% and -35%, respectively, p<0,05) and altered insulin-stimulated PKB phosphorylation (-31%, p<0,05) in PHH. Conclusion: Our data indicate that in situ PLA is an efficient method: to visualize the VDAC/Grp75/IP3R1 complex and to quantify (easily) ER-mitochondria interactions in cells, and suggest a potential role of MAM in hepatic insulin resistance.

Primary authors : Ms. TUBBS, Emily (INSERM 1060- Laboratoire CarMeN)

Co-authors : Mrs. RIEUSSET, Jennifer (INSERM 1060- Laboratoire CarMeN)

Presenter : Ms. TUBBS, Emily (INSERM 1060- Laboratoire CarMeN)



## Rôle d'OPA1 dans l'adaptation du muscle squelettique à un exercice chronique

### Affiliation :

(1) Inserm UMR-S769, Université Paris-Sud 11, Chatenay-Malabry, France; (2) Académie Slovaque des Sciences, Bratislava, Slovaquie; (3) Johannes Gutenberg, Université du Mainz, Mainz, Allemagne; (4) EA 3544, Université Paris-Sud 11, Chatenay-Malabry

### Résumé :

Notre projet repose sur l'étude de l'impact du déficit en expression d'OPA1 (Atrophie Optique Dominante de type 1), une GTPase-dynamine ubiquitaire localisée dans l'espace intermembranaire des mitochondries. Les propriétés de cette protéine lui permettent de réguler la fusion et l'organisation des membranes internes des mitochondries. Dans cette étude, notre hypothèse est que la dynamique mitochondriale joue un rôle dans l'adaptation du muscle squelettique à un exercice chronique, une situation dans laquelle la biogénèse mitochondriale est activée. Cette étude est menée sur des souris hétérozygotes pour le gène *Opal* (OPA1+/-) ayant une diminution de 50% de la protéine OPA1. Les capacités maximales des animaux ont été estimées par activité forcée sur tapis roulant. Leur adaptation à un exercice chronique volontaire a été étudiée avec des roues d'activité. Les données ont été collectées pendant 8 semaines. A la fin de l'entraînement, les animaux ont été sacrifiés, puis caractérisés anatomiquement, et les capacités oxydatives des différents muscles squelettiques mesurées par biochimie et polarographie. Nos résultats montrent que les souris sédentaires OPA1+/+ et OPA1+/- possèdent les mêmes capacités physiques lors d'un exercice forcé. Elles atteignent la même vitesse et parcourent la même distance avant épuisement. Elles n'ont aucune différence dans leurs compétences à s'adapter à un entraînement volontaire (distance parcourue par activation, nombre d'accès à la roue). Cependant, si les capacités physique de ces animaux sont réévaluées après entraînement, paradoxalement on observe chez les OPA1+/- une amélioration de leur endurance à un effort forcé, beaucoup plus forte que chez les souris contrôles. D'un point de vue anatomique, les muscles squelettiques des souris OPA1+/- développent une hypertrophie moindre que les contrôles. De plus dans le muscle rapide (gastrocnémien), même si les gènes impliqués dans la biogénèse mitochondriale sont activés de la même manière chez les 2 souches de souris, nous avons observé une diminution significative de l'activité de certaines enzymes mitochondriales lors d'un effort. De manière intéressante, dans les OPA1+/-, ces changements s'accompagnent d'un remodelage métabolique : une utilisation plus forte des Acides Gras. En conclusion, nos résultats montrent que l'adaptation des souris OPA1+/- à l'entraînement, s'effectue par un remodelage métabolique, vraisemblablement pour contrer un défaut d'adaptation de la biogénèse mitochondriale.

Primary authors : Mrs. CAFFIN, Fanny (1)

Co-authors : Mr. PROLA, Alexandre (Inserm UMR-S 769, Université Paris-Sud 11, Chatenay-Malabry, France) ; Ms. FORTIN, Dominique (1) ; Dr. NOVOTOVA, Marta (2) ; Dr. ALAVI, Marcel (3) ; Dr. DAVID, Denis (EA 3544, Université Paris-Sud 11, Chatenay-Malabry, France) ; Dr. GARNIER, Anne (4) ; Prof. VEKSLER, Vladimir (1) ; Dr. VENTURA-CLAPIER, Renée (1) ; Dr. JOUBERT, Frédéric (1)

Presenter : Mrs. CAFFIN, Fanny (1)



## Ontogénèse des processus bioénergétiques musculaires chez le poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*)

### Affiliation :

Laboratoire d'Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, CNRS- Université de Lyon

### Résumé :

Confronté à la rigueur du court été antarctique, le poussin manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*) doit résoudre un défi énergétique majeur puisqu'il doit assurer une croissance rapide en milieu polaire. Le développement rapide de processus bioénergétiques performants peut constituer un élément clé de la capacité de ces oiseaux à surmonter ce challenge énergétique en particulier dans le muscle squelettique, le tissu thermogène majeur de ces jeunes endothermes. L'ontogénèse des processus oxydatifs et la mise en place des réseaux mitochondriaux ont donc été étudiées dans le muscle pectoral de poussins manchots Adélie. Des groupes de manchots Adélie de différents âges (7 jours, 15 jours, 30 jours et adultes) ont subi des biopsies de muscle pectoral sous anesthésie générale (fluothane). Les fibres musculaires ont été rapidement dissociées puis perméabilisées à la saponine pour étudier leur activité respiratoire (Oroboros®) en présence de substrats énergétiques carbonylés (Pyruvate/Malate) ou lipidiques (Palmitoyl-carnitine). Les protéines musculaires ont été extraites pour caractériser par western blot l'expression de deux protéines de fusion mitochondriale, Mfn2 (Mitofusine 2) et OPA1 (Optic Atrophy 1). Nos résultats montrent que l'activité mitochondriale était fortement augmentée au cours de la croissance. En effet, avec des substrats carbonylés la respiration en pmol d'O<sub>2</sub>/min/mg de pectoral passait de 807±104 chez les poussins de 7 jours à 2402±261 chez ceux de 30 jours pour atteindre 3338±140 chez les adultes. Avec un substrat lipidique, la respiration mitochondriale était 2 fois plus faible qu'avec des substrats carbonylés ( $p < 0,05$ ) mais augmentait aussi fortement avec l'âge. L'expression des protéines de fusion mitochondriale était détectée dès le plus jeune âge. L'abondance de la protéine Mfn2 augmentait significativement chez les poussins de 30 jours puis chez les adultes par comparaison avec les poussins de 7 jours (respectivement + 200% et + 288%  $p < 0,05$ ). L'abondance de la protéine OPA1 était également fortement augmentée mais seulement chez les adultes par comparaison avec les poussins de 7 jours (+185%  $p < 0,05$ ). Ces résultats indiquent qu'au cours de la croissance, la capacité respiratoire des mitochondries est fortement accrue dans le muscle pectoral des jeunes manchots Adélie. L'accroissement des processus bioénergétiques est relativement tardif en cohérence avec une possible stratégie d'allocation séquentielle des ressources alimentaires tout d'abord à la croissance et l'isolation thermique puis au développement des processus thermogènes indispensables au passage en mer après la croissance terrestre. La forte augmentation de l'abondance des protéines de fusion Mfn2 et OPA suggère un remaniement des réseaux mitochondriaux lors des contraintes énergétiques liées à la croissance à terre puis à la vie en milieu marin des adultes. La plasticité bioénergétique du muscle squelettique des poussins manchots Adélie peut être un atout pour minimiser l'effort parental de nourrissage et pour assurer la survie des poussins à terre puis en mer.

Primary authors : Ms. FONGY, Anaïs (UMR5023 LEHNA)

Co-authors : ROMESTAING, Caroline (UMR5023 LEHNA) ; BLANC, Coralie (UMR5023 LEHNA) ; LACOSTE-GARANGER, Nicolas (UMR5023 LEHNA) ; ROUANET, Jean- Louis (UMR5023 LEHNA) ; RACCURT, Mireille (UMR5023 LEHNA) ; DUCHAMP, Claude (UMR5023 LEHNA)

Presenter : Ms. FONGY, Anaïs (UMR5023 LEHNA)



## Decreasing Mitochondria-Endoplasmic Reticulum interactions induces hepatic ER stress and alter insulin signaling.

### Affiliation :

Laboratoire CarMeN, unité Inserm U1060

### Résumé :

**Introduction:** Hepatic Insulin Resistance (HIR) is associated with mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum (ER) stress. However, it is not clear whether these alterations represent independent factors or they are mechanistically linked. These two organelles are tightly link through contact points, known as Mitochondria Associated Membranes (MAM), which plays a pivotal role in Ca<sup>2+</sup> signaling and energy metabolism. Ca<sup>2+</sup> transfer from the ER to mitochondria involves the VDAC/Grp75/IP3R1 complex. The aim of the study was to determine whether reduced ER-mitochondria interaction through the IP3R-Grp75-VDAC complex might play a role in hepatic ER stress and insulin resistance. **Methods:** Using cell fractionation, we quantified MAM amount in liver of ob/ob mice, a model of hepatic ER stress and insulin resistance. In addition, we measured the repercussion of both pharmacological and genetic inhibition of the IP3R-Grp75-VDAC complex, on organelle interaction (by in situ proximity ligation assay), ER stress and insulin signaling in HuH7 cells. **Results:** We demonstrated a reduction of MAM amount in the liver of ob/ob mice (-50%, p<0,05), associated with ER stress and HIR. Inhibition of IP3R by either 2-Aminoethoxydiphenyl borate (2-APB, 50µM) or XestospongineC (XestoC, 1nM) reduced VDAC/IP3R1 interaction (-50% and -40%, respectively, p<0,05), as observed by in situ proximity ligation assay. In both cases, these treatments are associated with an induction of ER stress and an alteration of insulin stimulated phosphorylation of PKB (-25% and -45%, respectively, p<0,05). Downregulation of Grp75 (siGrp75, 48h) also led to a reduction of ER-mitochondria interaction (-50%, p<0,05), an induction of ER stress and an alteration of insulin signalling (-30%, p<0,05) in HuH7 cells. **Conclusion:** Our data point to a new role of ER-mitochondria interaction in the development of hepatic ER stress and insulin resistance. The role of altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis, as a mechanistic link, need to be further investigated.

**Primary authors :** Mr. THEUREY, Pierre (CarMeN laboratory, U1060)

**Co-authors :** Ms. TUBBS, Emily (CarMeN laboratory, U1060) ; Dr. VIDAL, Hubert (CarMeN laboratory, U1060) ; Dr. RIEUSSET, Jennifer (CarMeN laboratory, U1060)

**Presenter :** Mr. THEUREY, Pierre (CarMeN laboratory, U1060)



## TRMU gene mutations in three cases of neonatal mitochondrial hepatopathy

### Affiliation :

Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, AP-HP : Service de biochimie Hôpital Bicêtre ; Service d'hépatologie pédiatrique Hôpital Bicêtre ; Service de pédiatrie Hôpital Antoine-Béclère

### Résumé :

**Objective:** reporting the clinical, biochemical and molecular findings of three children suffering from mitochondrial hepatopathy. The patients P1 and P2 were born at term from healthy unrelated parents. The third patient P3 is the third child of consanguineous Egyptian parents and was born prematurely at 34 weeks of gestation. Hepatomegaly associated or not with splenomegaly was detected for the three patients between three and four months of age. P1 had also axial and peripheral hypotonia with myelination anomaly whereas clinical examination did not reveal muscular or neurological injuries for P2 and P3. The three patients presented the same biological characteristics: cytolysis and cholestasis with conjugated bilirubin; normal factor V; recurrent hypoglycaemia associated with hyperlactatemia. Persistent hyperlactatemia and high lactate/pyruvate ratios between 30 and 50 directed the diagnosis towards respiratory chain defect. Liver biopsies of all the patients disclosed a combined deficiency of complexes I and IV of the respiratory chain (RC). To elucidate the molecular basis of these combined deficiencies, we sequenced the complete mitochondrial genome and the principal nuclear genes involved in neonatal hepatopathy with mitochondrial DNA (mtDNA) instability (DGUOK, POLG and MPV17). This sequencing did not reveal any pathogenic mutations and, moreover, the mitochondrial copy number was normal for all patients. That's why a mitochondrial translation defect was considered. The TRMU gene was a serious candidate gene: it is a nuclear gene that encodes a mitochondrial enzyme responsible for 2-thiolation of mitochondrial tRNA, necessary to correct translation. In 2009, TRMU mutations were described in infantile mitochondrial hepatopathy with combined RC deficiencies without mtDNA depletion. Pathogenic mutations of TRMU gene were found on all these three patients: c.835G>A/c.248+1G>A (P1); c.835G>A/c.649G>A (P2); c.697C>T/c.697C>T (P3). The c. 835G>A (p.Val279Met) and c. 697C>T (p. Leu233Phe) mutations were previously identified. We report two new mutations : a mutation in the splice site of the intron 2 (c.248+1G>A) leading to the exon 3 skipping, confirmed by cDNA analysis on cultured fibroblasts from P1, and the missense c.649G>A mutation inducing the switch of a glutamine 217 to lysine, in a conserved domain of t-RNA methyl transferase family. Although clinical and biochemical features of the three patients were closed, their outcomes were radically different: patient P1 died of liver failure aggravation at six months whereas hepatomegaly and biological liver impairments had regressed spontaneously for P2 and P3 (two and four years old now). As a correlation between genotype and phenotype does not seem to emerge after the molecular analysis, other factors might play a role in disease development. In conclusion, involvement of TRMU gene mutations in infantile hepatopathy is now patent and the clinical phenotype is notably constant in the eighteen cases described to date in our knowledge. The most discriminating analysis orienting the diagnosis towards a TRMU defect is the liver biopsy that shows a combined deficiency of complexes I and IV. Now, the crucial issue is a better understanding of factors that may influence disease prognosis.

**Primary authors :** Dr. GAINARD, Pauline (CHU Bicêtre, service de biochimie)

**Co-authors :** Dr. ACKERMANN, Oanez (CHU Bicêtre, service d'hépatologie pédiatrique) ; Prof. BERNARD, Olivier (CHU Bicêtre, service d'hépatologie pédiatrique) ; Ms. CORREIA, Isabelle

(CHU Bicêtre, service de biochimie) ; Prof. JACQUEMIN, Emmanuel (CHU Bicêtre, service d'hépatologie pédiatrique) ; Dr. LABRUNE, Philippe (CHU Antoine-Béclère, service de pédiatrie) ; Prof. THEROND, Patrice (CHU Bicêtre, service de biochimie) ; Dr. SLAMA, Abdelhamid (CHU Bicêtre, service de biochimie)

Presenter : Dr. GAINARD, Pauline (CHU Bicêtre, service de biochimie)

## Différence de cardiotoxicité induite par les anthracyclines : pourquoi les mâles sont plus sensibles que les femelles ?

### Affiliation :

INSERM UMR-S 769, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, Université de Paris-Sud, Châtenay-Malabry, France

### Résumé :

Les maladies cardiovasculaires sont une des premières causes de mortalité dans le monde à la fois chez les hommes et les femmes. De plus, les données épidémiologiques montrent qu'avant la ménopause le taux de pathologies cardiaques est beaucoup plus faible chez les femmes. Par ailleurs, certains agents anticancéreux tels que les anthracyclines sont responsables de cardiotoxicité ce qui limite leur utilisation malgré leur bonne efficacité. Peu de données existent sur les effets différentiels cardiotoxiques des anthracyclines entre les hommes et les femmes. Nous avons étudié la toxicité cardiaque induite par la doxorubicine (anthracycline de référence) chez des rats Wistar mâles et femelles adultes. Après injection hebdomadaire de doxorubicine à raison de 2 mg/kg pendant 7 semaines, nous avons pu montrer que la fonction cardiaque, déterminée par échocardiographie-Doppler, est altérée dès la 4ème semaine de traitement uniquement chez les mâles. De plus, les mâles perdent significativement du poids dès la 4ème semaine de traitement, alors que le poids des femelles reste stable. Les données échocardiographiques et le taux de mortalité montrent une plus grande résistance des femelles. Les propriétés du pore de transition de perméabilité mitochondrial sont différentes sur cellules cardiaques perméabilisées à partir de mâles ou de femelles. Par ailleurs, le niveau de l'AMPK (régulateur clé du métabolisme énergétique) est fortement diminué chez les mâles traités. Ces résultats suggèrent que les mitochondries et le métabolisme seraient impliqués dans les différences mâle/femelle de sensibilité cardiaque à la doxorubicine.

Primary authors : Dr. MOULIN, Maryline (U769 Univ. Paris Sud)

Co-authors : Mr. MATEO, Philippe (U769 Univ. Paris Sud) ; Mrs. FORTIN, Dominique (U769 Univ. Paris Sud) ; Mrs. LEFEBVRE, Florence (U769 Univ. Paris Sud) ; Prof. VEKSLER, Vladimir (U769 Univ. Paris Sud) ; Dr. GARNIER, Anne (U769 Univ. Paris Sud) ; Dr. VENTURA-CLAPIER, Renée (U769 Univ. Paris Sud) ; Dr. BRENNER, Catherine (U769 Univ. Paris Sud)

Presenter : Dr. MOULIN, Maryline (U769 Univ. Paris Sud)



## A study of human respiratory complex III defects

### Affiliation :

Institut Cochin, INSERM U1016 - CNRS UMR 8104 - Département Endocrinologie, Cancer et Métabolisme 24 rue du Faubourg Saint- Jacques, 75014 PARIS Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Laboratoire Biochimie, 47/83 bd de l'hôpital 75651 Paris Cedex 13

### Résumé :

Complex III has been thoroughly studied at the biochemical level. It plays a central role in the mitochondrial respiratory chain: converging point of electrons from multiple sources and major source of reactive oxygen species by the Q cycle. In contrast to its extensive biochemical characterization, complex III physiological role has been relatively poorly established. Its role in the different tissues may be different, in particular with respect to its dual function in energetics and oxidative stress. Spontaneous human complex III defects thus represent unique opportunities to evaluate complex III function in the different tissues. From a cohort of more than 2000 patients for whom mitochondrial respiratory chain activities have been studied at the Pitié-Salpêtrière hospital, we selected patients with complex III defects below the fifth centile. Among these patients only 13 patients had fibroblasts expressing the defect; the genetic cause of these complex III defects was only known in two cases (both due to BCSL1 mutations). Two supplementary fibroblasts lines with known cause of complex III defect (due to UQCRB mutations in one case, and to MT-CYB mutation in the other one) were kindly given by Drs A Slama and A Boutron, Bicêtre hospital. The 15 fibroblasts are now analyzed in parallel, four of which with known genetic cause. Using recently improved spectrophotometric assays for complex III activity, the defects have been re-evaluated revealing three categories: isolated complex III defects, combined complexes III and IV defects and apparently isolated complex IV defects (including one of the fibroblasts with BCSL1 mutations). Analysis of the impact on respiration fluxes showed that only defect with residual activity below 10% limited the basal respiration rate whereas residual activity below 60% limited the maximal respiration rate. The search for the cause of the defect is currently under progress by sequencing the genes encoding complex III subunits. Cytochrome c1 gene has to-date been found mutated in one of the cells (result obtained by Dr A Slama) but in none other. Iron sulfur protein gene was normal in all cells. MT-CYB sequence disclosed many variants, two of which will be evaluated after their transfer into cybrids. To address the expected impact on reactive oxygen species production, we have used MitoSOX, a fluorescent probe specific of superoxyde anion, and observed an increased production in complex III defective cells. Further analyses will address the composition of complex III, the supramolecular organization of the respiratory chain, and, among cellular responses, the cellular propensity to apoptosis. At the end of this project we hope to be able to assess the link between the disease phenotype and the molecular and cellular characteristics of the defect.

Primary authors : Dr. GILLERON, Mylène (Institut Cochin, INSERM U1016 - CNRS UMR 8104 - Département Endocrinologie, Cancer et Métabolisme 24 rue du Faubourg Saint- Jacques, 75014 PARIS Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Laboratoire Biochimie, 47/83 bd de l'hôpital) ; Mrs. L'HERMITTE-STEAD, Caroline (Institut Cochin, INSERM U1016 - CNRS UMR 8104 - Département Endocrinologie, Cancer et Métabolisme 24 rue du Faubourg Saint- Jacques, 75014 PARIS)

Co-authors : Dr. JARDEL, Claude (Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Laboratoire Biochimie B, Service du Pr Bonnefont-Rousselot) ; Dr. LOMBES, Anne (Institut Cochin, INSERM U1016 - CNRS UMR 8104 - Département Endocrinologie, Cancer et Métabolisme 24 rue du Faubourg Saint- Jacques,

75014 PARIS)

Presenter : Dr. GILLERON, Mylène (Institut Cochin, INSERM U1016 - CNRS UMR 8104 - Département Endocrinologie, Cancer et Métabolisme 24 rue du Faubourg Saint- Jacques, 75014 PARIS Groupe hospitalier Pitié-Salpêtrière, Laboratoire Biochimie, 47/83 bd de l'hôpital) ; Mrs. L'HERMITTE-STEAD, Caroline (Institut Cochin, INSERM U1016 - CNRS UMR 8104 - Département Endocrinologie, Cancer et Métabolisme 24 rue du Faubourg Saint- Jacques, 75014 PARIS)

## Functional mitochondria in avian erythrocytes: Perspectives for ageing & evolutionary studies

### Affiliation :

IPHC, Département d'Ecologie Physiologie et Ethologie, CNRS & University of Strasbourg; Faculty of Medicine EA 3072, University of Strasbourg; Department of Ecology and Evolution, University of Lausanne, Biophore.

### Résumé :

Mitochondria are essential for the production of energy via OXPHOS (Oxidative Phosphorylation) in eukaryotic cells of aerobic organisms. In contrast to mammalian erythrocytes, which have lost their nucleus and mitochondria during the course of evolution, erythrocytes of fish, reptiles and birds are still nucleated, but little is known about the presence and functionality of mitochondria in these cells. Because mitochondria are consuming oxygen, but also producing potentially deleterious by-products such as ROS (Reactive Oxygen Species), one hypothesis is that mammalian erythrocytes have lost their nucleus and functional mitochondria to avoid oxygen consumption which is in conflict with their role as oxygen carrier, but also to avoid the deleterious production of ROS, and therefore to maximize their own longevity. Following this hypothesis, it has also been suggested that mitochondria and nucleus in non-mammalian erythrocyte are inactivated. As a first step to address evolutionary questions about mitochondria presence in non-mammalian erythrocytes, we want to determine the presence and the functionality of mitochondria in avian erythrocytes. Moreover, we want to investigate the consequences of this mitochondrial presence in terms of oxidative stress. We evaluated the presence of mitochondria using Transmission Electronic Microscopy (TEM) images of erythrocytes with or without a saponin treatment to remove haemoglobin interferences. We tested the functionality of mitochondria by comparing respiration rates of blood cells from a mammal, the mouse (negative control) and a bird, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). Finally, we compared mitochondrial superoxyde production between those two species, and we addressed consequences of functional mitochondria in terms of oxidative stress by comparing plasmatic oxidative damage and antioxidant defences between mice and zebra finches. Standard TEM preparation did not reveal any cytoplasmic organites except the nucleus in zebra finch erythrocytes, but mitochondria are clearly apparent after removing haemoglobin interferences. Mitochondrial respiration rate from avian blood cells was clearly higher ( $p < 0.001$ ) than for mammalian blood cells, and was inhibited after amytal addition ( $p < 0.001$ ). In addition, amytal inhibition was reversed following succinate addition ( $p < 0.001$ ). Mitochondrial superoxyde production from avian blood cells was clearly higher ( $p < 0.001$ ) than for mouse (negative control), and was enhanced by antimycin A treatment ( $p < 0.001$ ). Plasmatic oxidative damage levels were higher for mouse when compared to zebra finch ( $p < 0.001$ ) despite a higher antioxidant capacity of mouse plasma ( $p < 0.001$ ). Therefore, our study shows that avian erythrocytes possess functional mitochondria, which are an oxygen consumer but also consequently a source of ROS production. Despite the presence of functional mitochondria in avian erythrocytes, plasmatic oxidative stress is lower for zebra finches compared to an equivalent size mammal, the laboratory mouse. Therefore, functional mitochondria in erythrocytes do not seem to be a major issue in terms of oxidative stress, and thus ROS production might not act as an evolutionary leverage responsible for the loss of mitochondria in erythrocytes. The existence of functional mitochondria in avian erythrocytes could open novel perspectives to investigate mitochondrial role in ageing processes by providing a way to repeat mitochondrial measurements on the same animal over the course of its life via simple blood sampling.

Primary authors : Mr. STIER, Antoine (IPHC-DEPE, CNRS & University of Strasbourg) ; Dr. CRISCUOLO, François (IPHC-DEPE, CNRS & University of Strasbourg)

Co-authors : Mr. SCHULL, Quentin (IPHC-DEPE, CNRS & University of Strasbourg) ; Dr. ZOLL, Joffrey (Faculty of Medicine, EA3072, University of Strasbourg) ; Dr. BIZE, Pierre (Department of Ecology and Evolution, University of Lausanne)

Presenter : Dr. CRISCUOLO, François (IPHC-DEPE, CNRS & University of Strasbourg)

## Prediction of Liver Injury induced by chemicals in Human with a Multiparametric Assay on Isolated Mouse Liver Mitochondria

### Affiliation :

Mathieu Porceddu (1), Nelly Buron (1), Célestin Roussel (1), Bernard Fromenty (2) and Annie Borgne-Sanchez (1); (1) MITOLOGICS S.A.S. Hôp. R. Debré, 75019 Paris, Fr. (2) INSERM U991, Fac. de Pharmacie, 35043 Rennes, Fr. aborgne.sanchez@mitologics.com

### Résumé :

Drug-induced liver injury (DILI) is difficult to predict using classical in vitro cytotoxicity screening and regulatory animal studies. Proof of this are the number of compounds stopped during clinical trials or withdrawn from the market for hepatotoxicity reasons [1,2]. It is of main importance to improve early prediction of DILI in man. This could be done by investigation of drug-induced mitochondrial dysfunction which appears as a major mechanism of DILI [1,3]. To achieve this detection, we designed a high-throughput screening assay using isolated mouse liver mitochondria to measure several parameters related to mitochondrial function and integrity. Indeed, this multiparametric assay measures in isolated mouse liver mitochondria: 1) global mitochondrial membrane permeabilization (swelling), 2) transmembrane potential, 3) outer membrane permeabilization (cytochrome c release) and 4) oxygen consumption driven by succinate or malate/glutamate. A pool of 124 drugs was selected, including 87 with documented DILI and 37 without reported clinical hepatotoxicity. Our screening assay revealed an excellent sensitivity for clinical outcome of DILI (94 or 92% depending on cut-off) and a high positive predictive value (89 or 82%). A highly significant relationship between drug-induced mitochondrial toxicity and DILI occurrence in patients was calculated ( $P < 0.001$ ) [4]. Moreover, our study disclosed for the first time the identification of several drugs triggering mitochondrial toxicity. Investigation of drug-induced loss of mitochondrial integrity and function with this multiparametric assay should be considered for integration into basic screening processes at early stage to select drug candidates with lower risk of DILI in human. This assay is also a valuable tool for assessing the mitochondrial toxicity profile and investigating the mechanism of action of new compounds and marketed drugs. [1] Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 2008; 22: 335-53. [2] Holt M, Ju C. Drug-induced liver injury. *Handb. Exp. Pharmacol.* 2010; 196: 3-27. [3] Begriche K, Massart J, Robin MA, Borgne-Sanchez A, Fromenty B. Drug-induced toxicity on mitochondria and lipid metabolism: Mechanistic diversity and deleterious consequences for the liver. *J. Hepatol.* 2011; 54: 773-94. [4] Porceddu M, Buron N, Roussel C, Labbe G, Fromenty B, Borgne-Sanchez A. Prediction of Liver Injury Induced by Chemicals in Human with a Multiparametric Assay on Isolated Mouse Liver Mitochondria. *Toxicol Sci.* 2012, Jun 7.

Primary authors : Mr. PORCEDDU, Mathieu (Mitologics)

Co-authors : Dr. BURON, Nelly (Mitologics) ; Mr. ROUSSEL, Celestin (Mitologics) ; Dr. FROMENTY, Bernard (INSERM U991) ; Dr. BORGNE-SANCHEZ, Annie (Mitologics)

Presenter : Mr. PORCEDDU, Mathieu (Mitologics)



## Mutation in the rieske iron sulfur protein triggers caspase-independent neurodegeneration in *Drosophila*

### Affiliation :

LBMC - Laboratoire de Biologie Moléculaire de la Cellule CNRS UMR5239, Ecole Normale Supérieure de Lyon

### Résumé :

Human degenerative pathologies involve multiple cell death pathways, including apoptosis and necrosis. Caspase-dependent apoptosis has been extensively studied, and we recently provided crucial insights in the protective effect of autophagy towards apoptotic cell death (Fouillet A. et al., 2012). Necrotic cell death does not require caspase proteases. However necrosis pathways and their interaction with apoptosis, and with neuroprotective mechanisms such as autophagy, are largely unknown, due to the current lack of specific models. Cell homeostasis is particularly important in the adult Central Nervous System, where differentiated neurons activate specific survival mechanisms lasting the organism lifetime, and mitochondrial dysfunctions have been proposed as primary events leading to necrosis in neurodegenerative diseases. In a live imaging-based screen for factors controlling *Drosophila* photoreceptor neurons survival, we showed that mutation in the RISP gene (rieske iron sulfur protein) leads to caspase-independent cell death (Gambis A. et al., 2011). RISP is an essential catalytic subunit of the complex III in the mitochondrial respiratory chain, and has been associated with mitochondrial permeability transition (a hallmark of necrosis), and human encephalomyopathies. We have characterized the *Drosophila* RISP mutant to establish a model of necrosis and to dissect the underlying pathways, by genetic and biochemical approaches. Our histological and morphological analysis showed that RISP mutant photoreceptors undergo non-apoptotic progressive degeneration, with no apparent developmental defect. Strikingly, inhibition of caspases enhances the degeneration of RISP mutant photoreceptors, suggesting that basal caspase activities antagonize non-apoptotic cell death. Consistently, an antagonistic interaction has been shown between caspase-8 and TNF-induced necrosis in mammals. This suggests the existence of conserved necrotic pathways. Our observations indicate that RISP is required for post-mitotic neuron homeostasis, and that necrosis is a candidate process in the degeneration of RISP mutant photoreceptors. Currently, we are performing: (I) a biochemical characterization of mitochondrial functions and necrotic hallmarks in a cellular model based on the RISP mutant, through an RNAi approach; (II) live imaging- based genetic interactions and reporter assays, to identify the molecular pathways underlying RISP mutant photoreceptor degeneration, through candidate and unbiased approaches; (III) genetic epistasis analysis to dissect the relationship of degenerative pathways in the RISP mutant with apoptosis and autophagy. Our study will shed light on the genetic regulation underlying the multiplicity of cell death mechanisms, paving the way to the identification of new potential therapeutical targets for human degenerative diseases. References: Fouillet A., Levet C., Virgone A., Robin M., Dourlen P., Rieusset J., Belaidi E., Ovize M., Touret M., Nataf S., & Mollereau B. (2012) ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8. Gambis A., Dourlen P., Steller H. & Mollereau B. (2011) Two-color in vivo imaging of photoreceptor apoptosis and development in *Drosophila*. *Dev. Biol.* 351:128-34.

Primary authors : Dr. NAPOLETANO, Francesco (LBMC - Ecole Normale Supérieure de Lyon)

Co-authors : Prof. MOLLEREAU, Bertrand (LBMC - Ecole Normale Supérieure de Lyon) ; Mr. CHATELAIN, Gilles (LBMC - Ecole Normale Supérieure de Lyon)

Presenter : Dr. NAPOLETANO, Francesco (LBMC - Ecole Normale Supérieure de Lyon)



## Characterisation of proteins targeting a yeast tRNA and its derivaives into human mitochondria

### Affiliation :

UMR 7156 ULP/CNRS, 21Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.  
University of California in Los Angeles (UCLA), USA

### Résumé :

Mitochondria of most eukaryotic species import RNAs from the cytoplasm. Previously, it was shown that synthetic transcripts of yeast tRNA<sup>Lys</sup>CUU (tRK1) and its smaller derivatives could be specifically internalized by human mitochondria. To understand the molecular mechanism of import, we unravel the protein factors involved in targeting of these RNAs towards the mitochondrial surface and translocating through the inner mitochondrial membrane. Here, we show that the cytosolic precursor of human mitochondrial lysyl-tRNA synthetase (PreKARS2) can interact with tRK1 and small artificial RNAs containing import determinants and facilitates their internalization by isolated human mitochondria. Furthermore, this import was found to increase upon addition of yeast enolase, previously found to be an active actor of the yeast RNA import machinery (Entelis et al., 2006). The preKARS2 dependency of RNA import was then verified using an in vivo RNA import assay in combination with RNA interference or overexpression of preKARS2. In contrast with tRK1 and the most of its derivatives, the import of some small recombinant RNAs was found possible only in the presence of crude cell fractions and was independent on preKARS2, which suggests participation of other protein factor(s). Mammalian polynucleotide phosphorylase (PNPase) localizes in the mitochondrial intermembrane space and was previously shown as RNA import factor (Wang et al., 2010). We found that PNPase indeed affects the import of tRK1, small artificial RNA, 5S rRNA and MRP RNA into the mitochondrial matrix. These findings, together with previous results of RNA import in yeast, suggest that the requirement for mitochondrial import directing protein factors might be a conserved feature of mitochondrial RNA import in all systems.

Primary authors : Mr. GOWHER, Ali (PhD student) ; Dr. TEITELL, Michael (University of California in Los Angeles (UCLA), USA) ; Dr. ENTELIS, Nina (UMR 7156 ULP/CNRS, 21Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.) ; Dr. TARASSOV, Ivan (UMR 7156 ULP/CNRS, 21Rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France.)

Co-authors :

Presenter : Mr. GOWHER, Ali (PhD student)



## Construction d'une lignée cellulaire contenant des quantités variables d'ADNmt via l'extinction de l'expression de TFAM

### Affiliation :

(1) CNRS UMR 5095 Métabolisme Energétique Cellulaire, Université Bordeaux Segalen  
(2) Institute of Neurology, department of Clinical Neurosciences, University College London

### Résumé :

L'une des nombreuses causes des pathologies mitochondriales est une diminution en ADN mitochondrial (ADNmt), dite déplétion. Cette diminution conduit à une des complexes enzymatiques des phosphorylations oxydatives, résultant en une diminution de la synthèse d'ATP. Ce déficit d'ATP entrainera un dysfonctionnement de la cellule qui pourra, finalement, aboutir à la mort de la cellule. Le but de ce projet est d'analyser l'incidence du déficit en ADNmt sur le métabolisme énergétique mitochondrial par la construction d'un modèle cellulaire de neurones humains. Nous avons utilisé la lignée cellulaire SHSY-5Y, dans laquelle le nombre de copie d'ADNmt a été modulé. Pour faire varier le nombre de copie d'ADNmt, nous avons agis directement sur la protéine d'empaquetage de l'ADNmt et facteur de transcription : TFAM. Ceci par l'expression ectopique d'un ARN en simple épingle à cheveux ciblant l'ARN message de TFAM, grâce au plasmide pSingle-tTS-shARN, contenant un système d'activation d'expression doxycycline dose-dépendante. Cela a permis de générer une sélection de lignées cellulaires stables avec une quantité en TFAM décroissante. Nous avons alors caractérisé les différentes cellules et sélectionné celles montrant des déplétions d'ADNmt les plus importants par la mise en place d'un protocole de qPCR en duplex. Puis nous réaliserons une étude biochimique sur ces cellules.

Primary authors : Ms. BÖRLIN, Marine (Université Bordeaux Segalen)

Co-authors : Mr. ROCHER, Christophe (Université Bordeaux Segalen) ; Mr. TAANMAN, Jan- Willem (Institute of Neurology, University College London)

Presenter : Ms. BÖRLIN, Marine (Université Bordeaux Segalen)



## Inactivation of the hif-1 $\alpha$ /pdk3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants

### Affiliation :

INSERM U837 (Lille)

### Résumé :

Cancer cells can undergo a metabolic reprogramming from oxidative phosphorylation to glycolysis that allows them to adapt to nutrient-poor microenvironments, thereby imposing a selection for aggressive variants. However, the mechanisms underlying this reprogramming are not fully understood. Using complementary approaches in validated cell lines and freshly obtained human specimens, we report here that mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation are slowed in metastatic melanomas, even under normoxic conditions, due to persistence of a high nuclear expression of HIF-1 $\alpha$ . Pharmacological or genetic blockades of the HIF-1 $\alpha$  pathway decreased glycolysis and promoted mitochondrial respiration via specific reduction in the expression of pyruvate dehydrogenase kinase-3 (PDK3). Inhibiting PDK3 activity by dichloroacetate (DCA) or siRNA-mediated attenuation was sufficient to increase pyruvate dehydrogenase activity, oxidative phosphorylation and mitochondrial ROS generation. Notably, DCA potentiated the antitumor effects of elesclomol, a pro-oxidative drug currently in clinical development, both by limiting cell proliferation and promoting cell death. Interestingly, this combination was also effective against BRAFV600E-mutant melanoma cells that were resistant to the BRAF inhibitor vemurafenib. Co-treatment of melanomas with DCA and elesclomol in vivo achieved a more durable response than single agent alone. Our findings offer a preclinical validation of the HIF-1/PDK3 bioenergetic pathway as a new target for therapeutic intervention in metastatic melanoma, opening the door to innovative combinations that might eradicate this disease

Primary authors : Dr. KLUZA, Jerome (INSERM U837)

Co-authors : Ms. CORAZAO ROZAS, Paola (INSERM U837) ; Dr. TOUIL, Yasmine (INSERM U837) ; Ms. JENDOUBI, Manel (INSERM U837) ; Dr. MAIRE, Cyril (CHRU Lille) ; Dr. GUERRESCHI, Pierre (INSERM U837) ; Ms. JONNEAUX, Aurelie (INSERM U837) ; Dr. BALLOT, Caroline (INSERM U837) ; Dr. BALLAYSSAC, Stephane (Université Paul Sabatier Toulouse) ; Dr. VALABLE, Samuel (CNRS (Caen)) ; Mr. CORROYER-DULMONT, Aurélien (CNRS (Caen)) ; Prof. BERNAUDIN, Myriam (CNRS (Caen)) ; Prof. MALET-MARTINO, Myriam (Université Paul Sabatier Toulouse) ; Dr. MARTIN DELASALLE, Elizabeth (CHRU Lille) ; Dr. MABOUDOU, Patrice (CHRU Lille) ; Prof. FORMSTECHE, Pierre (INSERM U837) ; Dr. POLAKOWSKA, Renata (INSERM U837) ; Prof. MORTIER, Laurent (CHRU Lille) ; Prof. MARCHETTI, Philippe (INSERM U837)

Presenter : Dr. KLUZA, Jerome (INSERM U837)



## Rôle de SIRT1 dans la régulation de la réponse au stress du reticulum endoplasmique et de l'apoptose dans les cellules cardiaques H9c2

### Affiliation :

INSERM U769, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud, Chatenay-Malabry, France  
Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines, Versailles, France

### Résumé :

L'insuffisance cardiaque est caractérisée, entre autre, par une perte progressive des cardiomyocytes. Récemment, plusieurs études ont proposé qu'un stress du Réticulum Endoplasmique (RE) conduisant à un déclenchement du processus apoptotique participerait au développement de l'insuffisance cardiaque. Une thérapie prometteuse pour lutter contre ce type de pathologie consisterait donc à réguler la réponse au stress RE afin d'inhiber l'apoptose des cellules cardiaques. La protéine SIRT1, membre fondateur de la famille des sirtuines, est une déacétylase activée en réponse au stress cardiaque qui régule l'activité de nombreux substrats pour permettre de rétablir l'homéostasie cellulaire et favoriser la survie. Dans ce travail, nous avons étudié le rôle de SIRT1 en réponse au stress RE dans le tissu cardiaque. Pour cela, nous avons traité les cellules H9c2 (cardiomyoblastes embryonnaires de rat) avec deux agents reconnus comme inducteurs de stress RE : la thapsigargine (TG) qui inhibe la pompe SERCA et perturbe l'homéostasie calcique, et la tunicamycine (TN), un inhibiteur de la N-glycosylation des protéines qui provoque l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE. Dans notre modèle, nous avons mis en évidence par RT-PCRq et western blot que TG et TN activent de manière précoce (3h) l'expression des gènes de la réponse UPR (Unfolded Protein Response), caractéristique d'un stress RE, tel que GRP78, ATF4, ATF3, XBP1s et CHOP. Une étude par cytométrie en flux nous a permis de démontrer que cette activation de la réponse UPR aboutie à une mort cellulaire importante. En utilisant différentes sondes fluorescentes nous avons montré que cette mort est caractérisée par une activation de la voie mitochondriale de l'apoptose et de la cascade protéolytique des caspases. Pour étudier l'implication de SIRT1 dans ce processus, nous avons utilisé un inhibiteur pharmacologique spécifique de cette sirtuine: l'EX-527. En réponse à TG et TN, l'inhibition de SIRT1 augmente significativement l'expression de CHOP, un facteur pro-apoptotique induit lors d'un stress RE. De plus, l'EX-527 potentialise les effets de TG et TN en augmentant la chute de potentiel de membrane mitochondriale et l'activation de la caspase 3, indiquant que l'inhibition de SIRT1 augmente le processus apoptotique induit lors d'un stress RE. Nos résultats montrent donc pour la première fois que SIRT1 est impliquée dans la réponse au stress RE et peut moduler la réponse UPR et l'apoptose pour favoriser la survie des cellules. SIRT1 apparaît donc comme une cible thérapeutique intéressante pour prévenir l'apoptose dans les pathologies cardiaques liées au stress RE.

Primary authors : Mr. PROLA, Alexandre (INSERM U769, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud)

Co-authors : Dr. VENTURA-CLAPIER, Renée (INSERM U769, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud) ;  
Dr. LEMAIRE, Christophe (INSERM U769, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud ; Université de Versailles Saint Quentin en Yvelines)

Presenter : Mr. PROLA, Alexandre (INSERM U769, LabEx LERMIT, Université Paris-Sud)



## Mitochondria and stem cells: new in vivo models to explore the impact of mtDNA alterations on development and aging.

### Affiliation :

Institute for Vegetative Physiology, University of Cologne, Germany

### Résumé :

Dysfunction of tissue stem cells importantly contributes to organ aging. The reason for the loss of stem cells or loss of stem cell function is certainly multifactorial. Accumulation of mitochondrial DNA (mtDNA) alterations such as deletions, which is commonly observed during aging and results in mitochondrial dysfunction, may contribute to this process. Therefore, it is generally believed that tissue stem cells have a low oxidative capacity in order to avoid damage by mitochondrially-derived reactive oxygen species (ROS), but this assumption has been inferred from in vitro experiments. Thus, the development of in vivo models appears as crucial to firmly conclude on the metabolic orientations of stem cells, and determine whether the accumulation of mtDNA deletions in stem cells is in any way involved in the aging process. To unequivocally show that stem cells are not relying on mitochondrial respiration, we selectively ablated the electron transport chain in the basal layer of mouse epidermis, including the epidermal progenitor/stem cells (EPSCs) compartment, by knocking out the mitochondrial transcription factor A (Tfam) gene. These animals had a profound depletion of mtDNA and respiratory chain complexes were absent. Despite a short lifespan due to lactic acidosis, epidermal development and skin barrier function were not impaired. In contrast, mice with an epidermal ablation of prohibitin-2 (PHB2), a scaffold protein in the inner mitochondrial membrane, displayed a dramatic phenotype observable already in utero, with severely impaired skin architecture and barrier function, ultimately causing death from dehydration shortly after birth. Thus, we demonstrate that stem cells are likely to be independent of mitochondrial oxidative metabolism but require a functional dynamic mitochondrial compartment. To further explore the influence of mitochondria on stem cells, and in particular the impact of mtDNA deletions on their functions and aging, we have generated a mouse model, which allows the expression of a severe dominant negative mutant of the TWINKLE protein, a mitochondrial helicase, in a cell-specific manner. Patients harboring mutations of the twinkle gene accumulate mtDNA deletions in post mitotic tissues. This new mouse model allows targeting stem cells populations with this TWINKLE mutant (e.g. EPSCs, muscle satellite cells), and increasing their rate of accumulation of mtDNA deletions. Thus, it enables us to determine the influence of mtDNA deletions on tissue regeneration, a process frequently impaired in aging, or whether they are involved in aging-related disorders such as tissue inflammation. These mice should prove useful to better understand the link between mitochondrial dysfunction and aging.

Primary authors : Dr. BARIS, Olivier (Institute for Vegetative Physiology, University of Cologne, Germany)

Co-authors : WEILAND, Daniela (Institute for Vegetative Physiology, University of Cologne, Germany) ;  
NEUHAUS, Johannes (Institute for Vegetative Physiology, University of Cologne, Germany) ; Prof.  
WIESNER, Rudolf (Institute for Vegetative Physiology, University of Cologne, Germany)

Presenter : Dr. BARIS, Olivier (Institute for Vegetative Physiology, University of Cologne, Germany)



## PTP inhibitors prevent ethanol-induced neurotoxicity

### Affiliation :

Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée, INSERM U1055-UJF, Grenoble

### Résumé :

Developing brain is particularly sensitive to ethanol-induced neurotoxicity. Mitochondria play a key role in cell death processes, notably through the permeability transition pore (PTP) opening. PTP opening is involved in hepatic ethanol-induced cell death, but has not yet been proved in brain. Here, we report that PTP opening mediates brain cells death in vivo and in vitro. In mice cultured astrocytes, a chronic low dose of ethanol (20 mM, 3 days) induced transient PTP opening but did not affect cell viability. In mice cultured neurones, the same exposure led to a permanent PTP opening and subsequent cell death. Cyclosporin A and nortriptyline, two PTP inhibitors, partially counteracted these damaging effects. In a Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD) mice model (two doses of 2 g/kg ethanol, 2 hours apart), we observed a widespread pattern of caspase-3 activation, that did not exist in the control group (two doses of saline) and that was dramatically reduced by pre-treatment of animals with CSA (20mg/kg) or nortriptyline (2 mg/kg). This result also demonstrated the capability of both inhibitors to cross the developing blood brain barrier to protect cells from ethanol-induced lethal effects. Finally, by using behavioral tests, we showed that ethanol-induced neuronal loss was associated with cognitive dysfunctions and somatosensory impairments that were counteracted by pre-treatment with PTP inhibitors. This study demonstrates for the first time that PTP opening is involved in ethanol-induced neurotoxicity. The proof of PTP involvement in ethanol-induced cerebral death would provide not only some strategies to prevent or to restrain the progression of FASD, but would also allow to a better understanding of the development and the progression of others neurodegenerative diseases in which mitochondria dysfunctions and PTP opening might be involved.

Primary authors : Dr. LAMARCHE, Frederic (INSERM-UJF)

Co-authors : Dr. CARCENAC, Carole (INSERM-UJF) ; Dr. GONTHIER, Brigitte (INSERM-UJF) ; Mrs. COTTET-ROUSSELLE, Cécile (INSERM-UJF) ; Dr. CHAUVIN, Christiane (INSERM-UJF) ; Prof. BARRET, Luc (CHU-UJF) ; Dr. SAVASTA, Marc (INSERM-UJF) ; Prof. FONTAINE, Eric (INSERM-UJF)

Presenter : Dr. LAMARCHE, Frederic (INSERM-UJF)



## Rôle de Msp1 dans la dynamique mitochondriale et le maintien du génome mitochondrial chez la levure *S. pombe*

### Affiliation :

(1) Université de Toulouse, Centre de Biologie du Développement, UMR5547 CNRS-Univ. Paul Sabatier, Toulouse, France. (2) Centre de Génétique Moléculaire du CNRS, UPR 3404, FRC3115, Gif-sur-Yvette Cedex, France. (3) INSERM U613; Univ. de Brest, France

### Résumé :

Les mitochondries, organites à double membrane contenant leur propre génome, apparaissent dans le cytoplasme comme un réseau filamenteux ou sous forme de vésicules éparses. Cette morphologie, qui varie selon le type de cellule et son état physiologique, résulte d'un équilibre dynamique entre des événements de fission ou de fusion orchestrés par des acteurs conservés de la levure à l'homme. Dnm1 et Fzo1 sont responsables respectivement de la fission et de la fusion de membrane externe et Mgm1/Msp1 est impliquée dans la fusion de la membrane interne. Les travaux que nous avons menés, chez *S. pombe*, montrent que l'inactivation de Msp1 conduit à la fragmentation des mitochondries et à la perte de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Cette situation provoque la mort de ces levures, qui petites négatives sont incapables de tolérer la perte d'ADNmt. Afin de caractériser les fonctions de Msp1 nous avons isolé des suppresseurs de la létalité induite par la délétion de son gène. Les suppresseurs génétiques correspondent à des gènes (*atp2*, *atp3*) ou à des loci encore non identifiés (*ptp1*, *ptp2*) dont les mutations permettent à *S. pombe* de vivre sans ADNmt. La viabilité des souches, délétées pour *msp1* et porteuses de ces gènes/loci mutés, en condition respiratoire, la quantité d'ADNmt et la morphologie mitochondriale sont en cours d'analyse. L'allèle muté *ptp2-1* supprime à la fois la fragmentation des mitochondries et la perte d'ADNmt. La suppression par *ptp2-1* de la létalité induite par la perte de Msp1 est utilisée pour cloner le gène *ptp2* par complémentation fonctionnelle. L'allèle muté de *atp2* supprime la perte d'ADNmt induite par la délétion de *msp1*, contrairement à l'allèle muté de *atp3*. *atp2* et *atp3* codent des sous unités de l'ATP synthase. Leur mutation n'affecte pas la capacité de l'enzyme à synthétiser ou à hydrolyser l'ATP. Leur mécanisme d'action vis à vis de la perte d'ADNmt ou de leur capacité à rendre *S. pombe* petite positive seront étudiés. Le criblage de chimiothèques, a permis d'isoler une dizaine de composés capables de supprimer la létalité induite par l'inactivation de Msp1. Nous testons l'effet de ces molécules sur la morphologie des mitochondries et le maintien de l'ADNmt. Ces travaux devraient contribuer à la caractérisation des mécanismes reliant la dynamique mitochondriale et le maintien de l'ADNmt et aider à mieux comprendre la physiopathologie de la neuropathie optique provoquée par les mutations d'OPA1, l'homologue humain de Msp1.

Primary authors : Mr. DELERUE, Thomas (Université Toulouse3 (1))

Co-authors : Mrs. DALOYAU, Marlène (Université Toulouse3 (1)) ; Mrs. BONNEFOY, Nathalie (Université Toulouse3 (1)) ; Ms. TRIBOULLIARD, Deborah (Université Toulouse3 (1)) ; Mr. BLONDEL, Marc (Université Toulouse3 (1)) ; Mr. EMORINE, Laurent (Université Toulouse3 (1)) ; Mrs. ARNAUNÉ, Laeticia (Université Toulouse3 (1)) ; Mrs. BELENGUER, Pascale (Université Toulouse3 (1))

Presenter : Mr. DELERUE, Thomas (Université Toulouse3 (1))



## Sub-mitochondrial distribution of human aminoacyl-tRNA synthetases (mt-aaRSs)

### Affiliation :

Architecture et Réactivité de l'ARN, CNRS, Université de Strasbourg, IBMC, 15 rue René Descartes, 67084 Strasbourg Cedex, France

### Résumé :

Mitochondria are implicated in major cellular functions such as energy production and metabolite synthesis and their dysfunction is frequently associated with neurodegenerative and muscular diseases. Mitochondria have their own translation machinery, dedicated to the synthesis of 13 of the sub-units of the respiratory chain complexes. While the 22 tRNAs and 2 rRNAs are also encoded by the mitochondrial (mt) genome, all other requested macromolecules, among which the mt-aaRSs, are encoded by the nuclear genome and imported thanks to a mt-targeting sequence. Present-day knowledge on aaRSs sub-mitochondrial distribution remains unclear but is of interest considering the presence of mt-ribosome [1] and mt-EF-Tu [2] at the close vicinity of inner membranes where mt-translation is likely to occur. In the present work, mitochondrial purification and fractionation were performed in both natural (human cells) and engineered systems (expression of recombinant protein in hamster cells) and the mt-aaRSs detected by western blot. Results reveal the striking double distribution (matrix and along the membranes) of most of the aaRS. This new picture opens numerous perspectives towards the deciphering of possible i) regulation of the availability of functional mt-aaRSs, ii) correlation between alternate location and alternate function (as demonstrated for cytosolic aaRSs [3]), and iii) influence of pathology-related mutations [4] on the sub-mitochondrial location of aaRS. [1]. Liu M. and Spremulli L. (2000) JBC, 275, 29400-6. [2]. Suzuki H. et al. (2007) JBC, 282, 4076-84. [3]. Kim S. et al. (2011) Nat. Rev. Cancer, 11, 708-18. [4]. Suzuki T et al. (2011) Nat. Rev. Genet. 45, 299-329.

Primary authors : Dr. SISSLER, Marie (CNRS)

Co-authors : Mr. SCHWENZER, Hagen (CNRS) ; Dr. JESTER, Brian (CNRS) ; Dr. MESSMER, Marie (CNRS) ; Ms. GAUDRY, Agnès (CNRS) ; Dr. MARECHAL-DROUARD, Laurence (CNRS) ; Prof. FLORENTZ, Catherine (CNRS -UdS)

Presenter : Dr. SISSLER, Marie (CNRS)



## High conservation of 3D structural networks in metazoan mitochondrial tRNAs

### Affiliation :

(1) Architecture et Réactivité de l'ARN, Université de Strasbourg, CNRS, IBMC 15 rue René Descartes, F-67084 Strasbourg, France; (2) Bioinformatics group, University of Leipzig, Härtelstrasse 16-18, D-04107 Leipzig, Germany

### Résumé :

Transfer RNAs, the key molecules in translation, are highly structured small RNAs interacting with numerous partner macromolecules. Their L-shaped 3D folds, positioning the two functional domains -amino acid binding CCA end and anticodon at the two extremities-, are based on long-distance tertiary interactions between nucleotides. These sets of well-defined nucleotide positions in the core domain and within the elbow are characteristic of the vast majority of tRNAs from the three kingdoms of life. Variability in the network has also been reported. Mitochondrial tRNAs from metazoan substantially deviate from classical tRNAs at their 2D structures. Knowledge on 3D folds and on tertiary interaction networks remains scarce. Herein, the possibility of tertiary networks to form the 3D core domain is evaluated in mitochondrial tRNA gene sequences from mammalian and fish species. Co- variations and substitutions that satisfy Leontis-Westhof isostericity rules of nucleotide interactions were analyzed as means of inferring evolutionarily conserved and hence presumably functional 3D core contacts. As major outcome it is observed that with only few exceptions all sequences fall into clusters showing fully conserved classical core interaction patterns. Further, several tRNA families also fall into clusters suitable with variable 3D core networks. Accordingly, despite non- classical primary and secondary structures, metazoan mitochondrial tRNAs are predicated to fold into L-shaped 3D structures based on the classical sets of core interactions. Comparing 3D core networks in fishes and mammals lead to the same global patterns, in favor of strong evolutionary conservation of 3D signatures among metazoan mitochondrial tRNAs.

Primary authors : Prof. FLORENTZ, Catherine (Université de Strasbourg-IBMC du CNRS)

Co-authors : Mr. JÜHLING, Frank (Université de Strasbourg-IBMC du CNRS) ; PÜTZ, Joern (Université de Strasbourg-IBMC du CNRS) ; STADLER, Peter (Bioinformatics group, University of Leipzig)

Presenter : Prof. FLORENTZ, Catherine (Université de Strasbourg-IBMC du CNRS)



## Experimental determination of organelle targeting peptide cleavage sites using transient expression of GFP translational fusions

### Affiliation :

(1) UMR 1345 IRHS, INRA / Université d'Angers / Agrocampus Ouest, Angers. (2) GRIPS, Institut de Biologie Structurale, Grenoble. (3) UMR CNRS 6214 - INSERM U1083 BNMI, Angers. (4) INRA UR1268 BIA, BiBS platform, Nantes.

### Résumé :

La grande majorité des protéines localisées dans les organelles sont codées par le génome nucléaire. Afin d'être importées dans leur compartiment cellulaire, elles contiennent généralement dans leur partie N-terminale une séquence clivable, le peptide d'adressage. Les programmes informatiques existants ne peuvent pas prédire avec exactitude la longueur de cette pré-séquence. C'est pourquoi nous avons développé une méthode expérimentale pour déterminer précisément le site de clivage des peptides d'adressage aussi bien pour des protéines animales que végétales. La protéine d'intérêt, fusionnée à la GFP en C-terminal, est exprimée de façon transitoire dans des cellules animales (pour les protéines animales) ou des protoplastes de feuilles (pour les protéines végétales). Après import dans les organelles, le peptide d'adressage est clivé, et la protéine de fusion mature est ensuite purifiée à l'aide d'anticorps anti-GFP fixés sur des billes magnétiques. La séquence N-terminale peut être déterminée par microséquençage d'Edman ou spectrométrie de masse. La méthode a été validée avec des protéines mitochondriales (*H. sapiens*, *A. thaliana*) et chloroplastiques (*A. thaliana*), dont le peptide d'adressage était connu. Cette nouvelle méthode permettra d'acquérir de nouvelles données sur les séquences d'adressage. Ces connaissances sont essentielles pour une meilleure compréhension des mécanismes d'import, pour la caractérisation structurale et fonctionnelle des protéines des organelles et enfin pour l'amélioration des programmes de prédiction.

Primary authors : Mrs. POUPART, Pauline (1)

Co-authors : Mr. CANDAT, Adrien (1) ; Mr. ANDRIEU, Jean- Pierre (2) ; Dr. CHEVROLLIER, Arnaud (3) ; Prof. REYNIER, Pascal (3) ; Dr. ROGNIAUX, Hélène (4) ; Dr. AVELANGE-MACHEREL, Marie- Hélène (1) ; Prof. MACHEREL, David (1)

Presenter : Mrs. POUPART, Pauline (1)



## Oligomerization of ATP synthase and mitochondrial morphology from yeast to human cells

### Affiliation :

IBGC, Université Victor Ségalen, 1 rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux

### Résumé :

Chez les cellules eucaryotes, l'une des fonctions essentielles des mitochondries est d'assurer la production d'énergie, disponible pour la cellule sous forme d'ATP. Cette production est assurée par des enzymes insérées dans les membranes internes mitochondriales : les F1-F0 ATP synthases ou ATP synthases. Ces enzymes utilisent le gradient électrochimique en protons créé par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de Pi. Il est aujourd'hui clairement établi que ces enzymes s'organisent sous forme de structures supramoléculaires (dimères et oligomères) identifiées par des techniques de microscopie électronique ou d'électrophorèses non dénaturantes sur des extraits mitochondriaux. La formation de ces structures serait en partie dépendante de la présence de deux sous-unités accessoires des ATP synthases : les sous-unités e et g. L'observation en microscopie électronique de mitochondries appartenant à des souches de levure dépourvues de sous-unités e et g révèle une altération morphologique des crêtes mitochondriales. Les mitochondries adoptent une morphologie aberrante dite « en pelure d'oignon ». De plus dans ces mêmes souches le réseau mitochondrial apparaît fragmenté. L'ensemble de ces observations suggère l'existence d'un lien entre organisation des ATP synthases sous forme supramoléculaire et morphologies mitochondriales. Les associations dimériques d'ATP synthase seraient à l'origine de l'incurvation de la membrane interne mitochondriale guidant ainsi la formation de crêtes sous forme tubulaires. Chez l'homme, des morphologies mitochondriales anormales peuvent être spécifiquement associées à des altérations fonctionnelles, et dans certaines pathologies, on peut observer la présence de mitochondries arborant une morphologie aberrante. Des études tomographiques réalisées sur des mitochondries de coeur de boeuf et de foie de rat révèlent une organisation des ATP synthases, à la surface des membranes interne mitochondriale comparable à celle de levure. De plus, la présence de structures supramoléculaires d'ATP synthase ont pu être observées dans ces types cellulaires, par l'utilisation d'électrophorèses non dénaturantes. Les sous-unités e et g sont également des constituants des ATP synthases mitochondriales humaines. Cette étude consiste donc à déterminer s'il la régulation de la morphogenèse mitochondriale via l'oligomérisation de l'ATP synthase dans des cellules humaines en culture (cellules HeLa) est comparable à celle observée chez la levure. Par une approche d' interférence ARN visant à obtenir des lignées cellulaires dépourvues de sous-unités e et g, nous avons pu mettre en évidence l'implication de ces sous-unités dans la stabilité des oligomères d'ATP synthases humaine et dans le maintien de la morphologie du réseau mitochondrial. L'altération du processus d'oligomérisation de l'ATP synthase semble conduire à un fort remaniement de la physiologie mitochondriale en termes d'organisation et de fonction(s).

Primary authors : Dr. PAUMARD, Patrick (Université Bordeaux2) ; Dr. HABERSETZER, Johan (IBGC)

Co-authors : LARRIEU, Isabelle (IBGC) ; Dr. PRIAULT, Muriel (IBGC) ; Dr. SALIN, Benedicte (IBGC) ; Dr. BRÈTHES, Daniel (IBGC)

Presenter : Dr. PAUMARD, Patrick (Université Bordeaux2)



## Effects of a mild and transient endoplasmic reticulum stress response on mitochondrial population

### Affiliation :

Kayleen VANNUVEL, Patricia RENARD, Martine RAES and Thierry ARNOULD URBC (Unité de Recherche en Biologie Cellulaire), NARILIS (NAMur Research Institute for LIfe Science)University of Namur (FUNDP), Belgium.

### Résumé :

When the endoplasmic reticulum (ER) is exposed to a chronic stress leading to the accumulation of unfolded proteins, the normal physiological state of the organelle is affected and intracellular signalling pathways are activated in order to allow cell to cope with the stressing conditions. This response is known as UPR (Unfolded Protein Response). It has been shown that unregulated UPR might play an important role in diseases such as type 2 diabetes and insulin resistance, Alzheimer's disease and even cardiovascular diseases 1,2. This response modifies the expression of genes encoding chaperones increasing ER's protein folding capacity. If homeostasis cannot be restored, a prolonged UPR signalling may induce cell death by autophagy and/or apoptosis 3,4,5. It is thus interesting to note that the UPR is designated to either facilitate adaptation to stress and/or apoptosis depending on nature and severity of stressing condition 6. Our working hypothesis is that an adaptive UPR response might involve and impact on mitochondrial population in terms of activity, biogenesis, dynamics and/or morphology of the organelle. The aim of this work was thus to study the putative effects of a mild and transient endoplasmic reticulum stress on mitochondrial population. Mild and transient UPR response was thus induced with three different molecules known to induce UPR such as thapsigargin (an inhibitor of sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, SERCA), tunicamycin (an agent interfering with N-linked glycosylations in the secretory system) and Brefeldin A (an agent that interferes with anterograde protein transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi apparatus) in human cell line HepG2 (human hepatocellular carcinoma cells). For each ER stress-inducing molecule, we first determined the incubation conditions to induce a strong and transient UPR compatible with cell survival by analysing the abundance of GRP78 and phosphorylated eIF2 $\alpha$  proteins by Western blotting. Activation of XBP-1 is also a marker for an active UPR response. The activity of this transcription factor was thus followed in cells transiently transfected with a luciferase reporter plasmid driven by the promoter region of GRP78. We next started to investigate the abundance of markers of mitochondrial biogenesis and functional activity of the organelle in cells exposed to sub-lethal ER stress. Our preliminary data strongly suggests that Brefeldin A induces changes in mitochondrial population in HepG2 cells. Indeed, we observed an increase in the fragmentation of the mitochondrial network associated with an up-regulation of Fis1 RNA and protein levels and an increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> accompanied by a decrease in the mitochondrial membrane potential. In conclusion, we have shown that Brefeldin A is able to modify the morphology and physiology of mitochondria. References : 1. Yoshida, H., (2007) FEBS J 274: 630-658. 2. Lim, J. H., et al., (2009) Cell Signal 21: 169-177. 3. Bernales, S., et al., (2006) PLoS Biol 4: e423. 4. Szegedzi, E., et al., (2006) EMBO Rep 7: 880-885. 5. Walter, L. & G. Hajnoczky, (2005) J Bioenerg Biomembr 37: 191-206. 6. Rutkowski, D. T. & R. J. Kaufman, (2004) Trends Cell Biol 14: 20-28.

Primary authors : Ms. VANNUVEL, Kayleen (URBC), University of Namur, Belgium)

Presenter : Ms. VANNUVEL, Kayleen (URBC), University of Namur, Belgium

























## Liste des participants

ABDEL KHALEK	Waed	waed.abdel-khalek@supagro.inra.fr
ALLOUCHE	Stephane	allouche-s@chu-caen.fr
ALVES GUERRA	M-Clotilde	clotilde.alves-guerra@inserm.fr
ARNOULT	Damien	damien.arnoult@inserm.fr
ARNOUX	Thomas	tarnoux@trophos.com
ASSOULINE	Zahra	zahra.assouline@nck.aphp.fr
AVELANGE-MACHEREL	Marie-Hélène	marie-helene.macherel@agrocampus-ouest.fr
AVERET	Nicole	nicole.averet@ibgc.u-bordeaux2.fr
BARIS	Olivier	obaris@uni-koeln.de
BARQUISSAU	Valentin	valentin.barquissau@inserm.fr
BAS	Michele	michele.bas@sanofi.com
BASTIN	Jean	jean.bastin@inserm.fr
BAYRASY	Christelle	christelle.bayrasy@cirad.fr
BENAMAR	Abdelilah	abdelilah.benamar@univ-angers.fr
BERNARDELLI	Mathieu	mathieu.bernardelli@nck.aphp.fr
BERNARDI	Paolo	bernardi@bio.unipd.it
BERTOLIN	Giulia	giulia.bertolin@upmc.fr
BIZE	Pierre	pierre.bize@unil.ch
BIZOUARN	Tania	tania.bizouarn@u-psud.fr
BLONDEL	Marc	marc.blondel@univ-brest.fr
BONNEAU	Patrizia	patrizia.bonneau@orange.fr
BONNEAU	Dominique	pabonneau@chu-angers.fr
BÖRLIN	Marine	maryneb@msn.com
BOSSARD	Pascale	pascale.bossard@inserm.fr
BOUILLAUD	Frédéric	frederic.bouillaud@inserm.fr
BOURDON	Alice	alicebourdon@gmail.com
BOURNEL	Claire	nathalie.dormeau@sanofi.com
BRAVARD	Amélie	amelie.bravard@inserm.fr
BRENIAUX	Christiane	christiane.breniaux@wanadoo.fr
BRIAND	Gilbert	gilbert.briand@chru-lille.fr
BULTEAU	Anne-Laure	anne-laure.bulteau@inserm.fr
CABASSA	Cécile	cecile.cabassa@upmc.fr
CABELLO	Gérard	cabello@supagro.inra.fr
CAFFIN	Fanny	caffinf@yahoo.fr
CAILLAUD	Kevin	kevin.caillaud@hotmail.fr
CAMOUGRAND	Nadine	n.camougrand@ibgc.cnrs.fr
CASSEL	Roméo	romeo.cassel@hotmail.fr
CHARDENOT	Pascale	pascale.chardenot@sanofi.com
CHATRE	Laurent	laurent.chatre@pasteur.fr
CORBIERE	Cécile	cecile.corbiere@univ-rouen.fr
CORTI	Olga	olga.corti@upmc.fr
COTTET	Cécile	cecile.cottet@ujf-grenoble.fr
CRISCUOLO	François	francois.criscuolo@c-strasbourg.fr
CROCHEMORE	Clement	clement.crochemore2@univ-rouen.fr
DA COSTA	Barbara	barbara.dacosta.bd@gmail.com

DALOYAU	Marlene	daloyau@cict.fr
DAVEZAC	Noélie	davezac@cict.fr
DELERUE	Thomas	thomas.delerue@cict.fr
DEMEILLIERS	Christine	christine.demeilliers@ujf-grenoble.fr
DESQUIRET-DUMAS	Valérie	valerie.desquiret@wanadoo.fr
DEVIN	Anne	anne.devin@ibgc.cnrs.fr
DJOUADI	Fatima	fatima.djouadi@inserm.fr
DUJARDIN	Genevieve	dujardin@cgm.cnrs-gif.fr
DUMON	Elodie	elodie.dumon@u-bordeaux2.fr
ENNEQUIN	Gael	gael.ennequin@hotmail.fr
ENTELIS	Nina	n.entelis@unistra.fr
ESCOUBET	Johanna	johanna.escoubet@neuf.fr
ESNOUS	Catherine	catherine.esnous@inserm.fr
ESTEVEES	Pauline	pauline.esteves@inserm.fr
FAVIER	Judith	judith.favier@inserm.fr
FLORENTZ	Catherine	c.florentz@ibmc.u-strasbg.fr
FONGY	Anaïs	anais.fongy@univ-lyon1.fr
FONTAINE	Eric	eric.fontaine@ujf-grenoble.fr
FORTIN	Dominique	dominique.fortin@u-psud.fr
FROMENTY	Bernard	bernard.fromenty@inserm.fr
GAINARD	Pauline	pauline.gaignard@bct.aphp.fr
GARNIER-FAGART	Anne	anne.garnier@u-psud.fr
GHARIB	Abdallah	abdallah.gharib@univ-lyon1.fr
GILLERON	Mylène	mylene.gilleron@psl.aphp.fr
GIRAUDON PAOLI	Marc	mgiraudonpaoli@trophos.com
GLATIGNY	Annie	glatigny@cgm.cnrs-gif.fr
GOUARNE	Caroline	info@trophos.com
GOWHER	Ali	quireishi83@gmail.com
GUEGUEN	Naïg	naigueguen@yahoo.fr
GUIARD	Bernard	guiard@cgm.cnrs-gif.fr
GUTIERREZ	Nicolas	nicolas.gutierrez.cortes@gmail.com
HAMON	Marie-Paule	mariepaulehamon@gmail.com
HARAUX	Francis	francis.haroux@cea.fr
HARDY	Gaëlle	ghardy@chu-grenoble.fr
HECKEL	Anne-Marie	am.heckel@unistra.fr
JARDEL	Claude	claud.jardel@psl.aphp.fr
JOUBERT	Frederic	frederic.joubert@u-psud.fr
JUNG	Mireille	mireille.jung@sanofi.com
KLUZA	Jerome	jerome.kluza@inserm.fr
L'HERMITTE-STEAD	Caroline	caroline.l-hermitte-stead@inserm.fr
LALEVE	Anais	anais.laleve@versailles.inra.fr
LAMARCHE	Frederic	frederic.lamarche@ujf-grenoble.fr
LAMBERT	Mireille	mireille.lambert@inserm.fr
LANDRIEU	Pierre	pierre.landrieu@bct.aphp.fr
LARRIERU	Isabelle	isabelle.larrieu@ibgc.cnrs.fr
LAUQUIN	Guy	guy.lauquin@ibgc.u-bordeaux2.fr
LE BACHELIER	Carole	carole.le-bachelier@parisdescartes.fr
LEBLANC-NOBLESSE	Emmanuelle	eleblanc@research.lvmh-pc.com

LEBRE	Anne-Sophie	anne-sophie.lebre@nck.aphp.fr
LEMAIRE	Christophe	christophe.lemaire@uvsq.fr
LEMAIRE	Claire	claire.lemaire@cea.fr
LENAERS	Guy	guy.lenaers@inserm.fr
LENOIR	Véronique	veronique.lenoir@inserm.fr
LEPETIT	Elisabeth	elisabeth.lepetit@univ-lyon1.fr
LETELLIER	Thierry	thierry.letellier@u-bordeaux2.fr
LIAUZUN	Claire	claire.liauzun@inserm.fr
LOISEAU	Dominique	dominique.loiseau@univ-angers.fr
LOMBES	Anne	anne.lombes@inserm.fr
LOPES COSTA	Alexandra	alexandra.lopes-costa@etu.parisdescartes.fr
MACHEREL	David	david.macherel@univ-angers.fr
MANON	Stéphen	manon@ibgc.cnrs.fr
MANSOURI	Abdellah	abdel.mansouri@inserm.fr
MANSOURI	Abdelhak	abdelhak-mansouri@ethz.ch
MATEO	Philippe	philippe.mateo@u-psud.fr
MAYENÇON	Martine	martine.mayencon@chu-lyon.fr
MEGY	Camille	camille.megy@inserm.fr
MICHEL	Sébastien	smichel@fundp.ac.be
MILLET	Aurélie	aurelie_mp@yahoo.fr
MILS	Valérie	valerie.mils@univ-tlse3.fr
MONTEIL	Christelle	christelle.monteil@univ-rouen.fr
MORIN	Jean-Paul	jean-paul.morin@univ-rouen.fr
MORIO	Béatrice	beatrice.morio@clermont.inra.fr
MOUCHIROUD	Laurent	laurent.mouchiroud@epfl.ch
MOULIN	Maryline	maryline.moulin@u-psud.fr
MOUSSON DE CAMARET	Bénédicte	benedicte.mousson-de-camaret@chu-lyon.fr
NAPOLETANO	Francesco	francesco.napoletano@ens-lyon.fr
OSTOJIC	Jelena	ostojic@cgm.cnrs-gif.fr; jelenaostojic@gmail.com
OUNNAS	Fayçal	ounnasf@ujf-grenoble.fr
PAQUIS-FLUCKLINGER	Véronique	paquis@unice.fr
PAUMARD	Patrick	patrick.paumard@ibgc.u-bordeaux2.fr
PECQUEUR-HELLMAN	Claire	claire.pecqueur@univ-nantes.fr
PETIT	Patrice	patrice.petir@inserm.fr
PIERRON	Denis	dpierron@wayne.edu
PITAYU	Laras	laras.pitayu@igmors.u-psud.fr
PLANCHAIS	Severine	severine.planchais@upmc.fr
PORCEDDU	Mathieu	mporceddu@mitologics.com
POUPART	Pauline	pauline.poupart@agrocampus-ouest.fr
PRIP-BUUS	Carina	carina.prip-buus@inserm.fr
PROCACCIO	Vincent	viproccacio@chu-angers.fr
PROLA	Alexandre	alexandre.prola@wanadoo.fr
PROUTEAU	Claire	claireprouteau@hotmail.com
PRUNIER	Delphine	deprunier@chu-angers.fr
RANSAC	Stéphane	stephane.ransac@u-bordeaux2.fr
RENARD	Patsy	patsy.renard@fundp.ac.be
RENVOISE	Margaux	margaux.renvoise@cea.fr
REYNIER	Pascal	pareynier@chu-angers.fr

RICCHETTI	Miria	micch@pasteur.fr
RIEUSSET	Jennifer	jennifer.rieusset@univ-lyon1.fr
RIGOULET	Michel	michel.rigoulet@ibgc.u-bordeaux2.fr
RIO	Marlene	marlene.rio@nck.aphp.fr
RIVAL	Thomas	thomas.rival@univ-amu.fr
ROBIN	Marie-Anne	marie-anne.robin@inserm.fr
ROCHER	Christophe	crocher@u-bordeaux2.fr
ROJO	Manuel Rojo	manuel.rojo@ibgc.cnrs.fr
ROLLAND	Aurelia	aurelia.rolland@univ-angers.fr
ROMESTAING	Caroline	caroline.romestaing@univ-lyon1.fr
ROSSIGNOL	Rodrigue	rossig@u-bordeaux2.fr
ROTIG	Agnes	agnes.rotig@inserm.fr
ROUSSEL	Damien	damroussel@yahoo.fr
RUIZ	Matthieu	matthieu.ruiz@u-psud.fr
SLAMA	Abdel	abdel.slama@bct.aphp.fr
SANCHEZ	Corinne	corinne.sanchez@ibgc.cnrs.fr
SARZI	Emmanuelle	emmanuelle.sarzi@inserm.fr
SCHANEN	Cecile	cecile.schanen@chru-lille.fr
SELLEM	Carole	carole.sellem@cgm.cnrs-gif.fr
SEVENO	Marie	marie.seveno@inserm.fr
SIBILLE	Brigitte	brigitte.sibille@unice.fr
SIMARD	Gilles	gisimard@chu-angers.fr
SIRVENT	Pascal	pascal.sirvent@univ-bpclermont.fr
SISSLER	Marie	m.sissler@ibmc-cnrs.unistra.fr
STAVRU	Fabrizia	fabrizia.stavru@pasteur.fr
STEPIEN	Georges	georges.stepien@clermont.inra.fr
THEUREY	Pierre	pierre.theurey@etu.univ-lyon1.fr
THOMAS	Olivier Normann	olivier.thomas@u-bordeaux2.fr
TISSOT	Françoise	alantissot@yahoo.fr
TRIAN	Thomas	thomas.trian@u-bordeaux2.fr
TRIBOUILLARD-TANVIER	Deborah	dtribouillard@gmail.com
TUBBS	Emily	emily.tubbs@etu.univ-lyon1.fr
VANNUVEL	Kayleen	kayleen.vannuvel@fundp.ac.be
VAVROVA	Eliska	eliska.vavrova@inserm.fr
VENTURA-CLAPIER	Renée	renee.ventura@u-psud.fr
VIAL	Guillaume	guillaume.vial@ujf-grenoble.fr
VIDAL	Hubert	hubert.vidal@univ-lyon1.fr
VIENNE	Jean- Claude	jc-vienne@chru-lille.fr
WALTER	Ludivine	ludivine.walter@univ-lyon1.fr
WRUTNIAK-CABELLO	Chantal	wrutniak@supagro.inra.fr
WU	Qian	fharaux@noos.fr

# PARRAINAGES

LVMH RECHERCHE  
PARFUMS & COSMETIQUES



	26-sept-12	27-sept-12	28-sept-12	29-sept-12
8:30				
9:00		<b>Table ronde: OXPHOS pairs</b>	<b>Table ronde: Mitochondrie et 3 I</b>	<b>Table ronde: Actualités du diagnostic des maladies mitochondriales</b>
9:30				
10:00		<i>Pause café</i>	<i>Pause café</i>	<i>Pause café</i>
10:30				
11:00		<b>Table ronde: Aures rôles du potentiel membranaire, transhydrogénases</b>	<b>Table ronde: Mitochondrie et Vieillessement</b>	<b>Table ronde: Dysmétabolisme mitochondrial</b>
11:30				
12:00		<i>Déjeuner</i>	<i>Déjeuner</i>	<i>Déjeuner ou Pic-nic</i>
14:00				
14:30		<b>Affiches</b>		
15:00		<i>Pause café</i>	<b>Bioénergétique pratique</b>	
15:30				
16:00				
16:30		<b>Table ronde technologique: Oxymétrie</b>		
17:00			<i>Pause café</i>	
17:30				
18:00		<b>Conf 2: D. Arnoult Immunité virale et mitochondrie</b>	<b>Conf 3: H. Vidal Maladies métaboliques et mitochondrie</b>	
18:30				
19:00			<b>Assemblée Générale GDR</b>	
19:30	<b>Apéritif d'accueil</b>	<b>Présentation des Associations</b>		
20:00	<i>Dîner</i>	<i>Dîner méli-mélo</i>	<i>Dîner Gala</i>	
21:00				
21:30	<b>Conférence plénière: P. Bernardi</b>			
22:00		<b>Affiches</b>		